

**UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE**

Avaliação da atividade antileishmanial dos óleos essenciais das plantas *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., *Eucalyptus citriodora* Hook., *Mentha arvensis* L., e *Mentha piperita* L.

ANA MARIA GUEDES DE BRITO

Aracaju
Novembro – 2007

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

Avaliação da atividade antileishmanial dos óleos essenciais das plantas *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., *Eucalyptus citriodora* Hook., *Mentha arvensis* L., e *Mentha piperita* L.

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Ambiente, na área de concentração em Saúde e Ambiente.

ANA MARIA GUEDES DE BRITO
Orientador: Professor Lauro Xavier Filho, Dr.

Aracaju
Novembro – 2007

B862a

Brito, Ana Maria Guedes de

Avaliação da atividade antileishmanial dos óleos essenciais das plantas *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., *Eucalyptus citriodora* Hook., *Mentha arvensis* L. e *Mentha piperita* L. / Ana Maria Guedes de Brito ; orientador Lauro Xavier Filho. – Aracaju, 2007.
xii, 75 p. : il.

Inclui bibliografias

Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) – Universidade Tiradentes, 2007

1. Óleos essenciais. 2. Atividade antileishmanial. 3. Leishmaniose chagasi – prevenção e controle. 4. Farmácia. 5. Saúde pública.
6. Plantas medicinais. 7. Fitoterapia. I. Xavier Filho, Lauro. II. Título.

Avaliação da atividade antileishmanial dos óleos essenciais das plantas *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Eucalyptus citriodora* Hook., *Mentha arvensis* L., e *Mentha piperita* L.

ANA MARIA GUEDES DE BRITO

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE DA UNIVERSIDADE TIRADENTES, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM SAÚDE E AMBIENTE.

Aprovada por:

Lauro Xavier Filho, D.Sc.
Orientador

Heitor Franco de Andrade Junior, D.Sc.

Juliana Cordeiro Cardoso, D.Sc.

Aracaju
Novembro - 2007

Dedico esse trabalho:

A três mulheres fantásticas, Ana Cláudia de Brito Câmara, minha filha, Sheyla Alves Rodrigues e Geovânia Maria Santos, que estiveram presentes com muita paciência e carinho, incentivando e colaborando para a realização desse trabalho. Simplesmente, muito obrigada.

Agradecimentos

À Deus por ser o criador e eu criatura.

À Universidade Tiradentes, pela oportunidade de cursar o Mestrado em Saúde e Ambiente.

Aos professores do Programa de Mestrado, em especial aos doutores Ricardo Albuquerque, Verônica Sierpe e Juliana Cordeiro, pelos ensinamentos, incentivos e sugestões durante a realização desse trabalho.

Ao professor Dr. Lauro Xavier-Filho pela orientação do trabalho.

Aos doutores Heitor Franco de Andrade Junior e André Gustavo Tempone (USP), pela valiosa colaboração no ensaio experimental desse trabalho.

Aos doutores Adriano Antunes e Pérciles Barreto Alves (UFS), pela contribuição na caracterização química dos óleos essenciais, objeto desse estudo.

A minha família, Djalma, Davizinho e Ana Cláudia, que cada um com seu jeitinho peculiar incentivaram para a realização desse trabalho.

Aos amigos Cynthia Cristina Pagliari de Faro, Malone Pinheiro, José Melquiades Rezende Neto e Synara Alexandre de Araújo Silva pelo apoio e companheirismo, principalmente, quando me sentia cansada.

Aos colegas de mestrado pela amizade e colaboração, em especial a Marcos França.

A meu grande Amigo Hesmoney Santa Rosa por estarmos caminhando juntos a doze anos e aprendendo dia após dia como é importante edificar uma amizade, respeitando as diferenças de cada um.

Aos meus alunos, os de ontem, os de hoje e os de amanhã, pois são eles quem me impulsionam a buscar incessantemente melhorar como ser humano e como profissional, para poder contribuir nas suas formações pessoais e profissionais.

Muito obrigada
Ana M. G. Brito

Sumário

1 – INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1 – OBJETIVOS	16
1.1.1 – Objetivo Geral	16
1.1.2 – Objetivos Específicos	16
2 – CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. Óleos essenciais	17
2.2. <i>Cymbopogon citratus</i>	19
2.3. <i>Eucalyptus citriodora</i>	21
2.4. <i>Mentha arvensis</i> e <i>Mentha piperita</i>	23
2.5. Leishmaniose chagasi	25
2.6. Métodos <i>in vitro</i> versus <i>Leishmania</i>	30
REFERÊNCIAS	32
3 – CAPÍTULO II - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIAL DOS ÓLEOS ESSENCIAIS OBTIDOS DAS PLANTAS <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) STAPF., <i>Eucalyptus citriodora</i> HOOK., <i>Mentha arvensis</i> L. E <i>Mentha piperita</i> L.	40
3.1 – Resumo	40
3.2 – Abstract	41
3.3 – Introdução	42
3.4 – Material e Métodos	43
3.4.1 – Material botânico	43
3.4.2 – Reagentes utilizados	43
3.4.3 – Extrações dos óleos essenciais	44
3.4.4 – Rendimento dos óleos essenciais	44
3.4.5 – Caracterização química dos óleos essenciais por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/MS).	44
3.4.6 – Parasitas	45
3.4.7 – Determinação <i>in vitro</i> da atividade antileishmanial e da concentração efetiva de 50% (EC ₅₀) dos óleos essenciais de <i>C. citratus</i> , <i>E. citriodora</i> , <i>M. arvensis</i> e <i>M. piperita</i>	45
3.5 – Resultados e Discussão	46

3.6 – Conclusão	50
REFERÊNCIAS	51
4 – CAPÍTULO III - AVALIAÇÃO DO RENDIMENTO E DOS CONSTITUINTES CITRAL E MIRCENO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) STAPF., SUBMETIDO AO CULTIVO ORGÂNICO E BIODINÂMICO NA FAZENDA MÃE TERRA – SE.	54
4.1 – Resumo	54
4.2 – Abstract	54
4.3 – Introdução	55
4.4 – Materiais e Métodos	56
4.4.1 – Cultivo do <i>Cymbopogon citratus</i> na Fazenda Mãe Terra	56
4.4.2 – Colheita do Material Botânico	56
4.4.3 – Obtenção do Óleo Essencial	57
4.4.4 – Rendimento do Óleo Essencial	57
4.4.5 - Caracterização química dos óleos essenciais por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/MS).	57
4.5 – Resultados e Discussão	58
4.6 – Conclusão	60
REFERÊNCIAS	60
5 – CAPÍTULO IV - LEISHMANIOSE VISCERAL EM SERGIPE: PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DE 2001 A 2006.	63
5.1 – Resumo	63
5.2 – Abstract	63
5.3 – Introdução	64
5.4 – Metodologia	65
5.5 – Resultados	65
5.6 – Discussão	71
5.7 – Conclusão	72
REFERÊNCIAS	73
CONCLUSÃO GERAL	74

Lista de figuras

Figura 1 – Cultivo de <i>C. citratus</i> em sistema orgânico e biodinâmico na Fazenda Mãe Terra, Município de Santana do São Francisco, Sergipe.	20
Figura 2 – Folhas de <i>E. citriodora</i> .	22
Figura 3 (A e B) - Cultivo de <i>M. arvensis</i> em sistema orgânico e biodinâmico na Fazenda Mãe Terra, Município de Santana do São Francisco, Sergipe.	24
Figura 4 – Folhas de <i>M. piperita</i> .	24
Figura 5 – Ciclo de transmissão da <i>Leishmania chagasi</i> .	25
Figura 6 – Imagem de criança portadora de leishaniose chagasi apresentando quadro clínico de hepatoesplenomegalia.	28
Figura 1 – Estruturas dos principais constituintes presentes nos óleos essenciais de <i>Cymbopogon citratus</i> , <i>Eucalyptus citriodora</i> , <i>Mentha arvensis</i> e <i>Mentha piperita</i> .	48
Figura 2 - Determinação dos valores EC ₅₀ dos óleos essenciais contra as promastígotas de <i>Leishmania (L.) chagasi</i> .	49
Figura 1 – <i>Cymbopogon citratus</i> em sistema orgânico e biodinâmico na Fazenda Mãe Terra, Município de Santana do São Francisco, Sergipe.	57
Figura 2 - Cromatograma do óleo essencial das folhas frescas de <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf., submetido ao sistema orgânico e biodinâmico na Fazenda Mãe Terra.	59
Figura 1: Distribuição proporcional de casos confirmados de leishmanioses em Sergipe por ano de ocorrência.	67
Figura 2: Distribuição percentual de casos confirmados de LV em Sergipe, de acordo com o gênero dos portadores de 2001 a 2006.	67
Figura 3: Percentual de casos confirmados de LV por Zona de Residência do portador.	69
Figura 4: Distribuição percentual dos casos confirmados de LV por raça/cor do portador.	69
Figura 5: Distribuição percentual dos casos confirmados de LV por escolaridade do portador.	70
Figura 6: Distribuição percentual dos casos confirmados de LV que evoluíram para cura, óbito ou ignorado, em Sergipe de 2001 a 2006.	70

Lista de tabelas

Tabela 1 - Distribuição das concentrações em µg/mL dos óleos essenciais e fármaco-padrão pentamidina usadas para o experimento.	45
Tabela 2 – Rendimento dos óleos essenciais.	46
Tabela 3 - Constituintes químicos e suas respectivas porcentagens em óleos essenciais obtidos por arraste de vapor das folhas frescas de <i>C. citratus</i> , <i>E. citriodora</i> , <i>M. arvensis</i> e <i>M. piperita</i> .	47
Tabela 4 - Eficácia dos óleos essenciais obtidos por arraste de vapor das folhas frescas das plantas contra a <i>Leishmania (L.) chagasi</i> .	49
Tabela 1-Constituintes químicos e suas respectivas porcentagens em óleo essencial das folhas frescas de <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf., submetido ao sistema orgânico e biodinâmico na Fazenda Mãe Terra.	59
Tabela 1: Casos confirmados de leishmaniose visceral por Município de procedência em Sergipe de 2001-2006.	66
Tabela 2: Distribuição proporcional de casos confirmados de LV em Sergipe, conforme faixa etária.	68
Tabela 3: Distribuição proporcional de casos confirmados de LV segundo a técnica usada para diagnóstico.	68

Avaliação da atividade antileishmanial dos óleos essenciais das plantas *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., *Eucalyptus citriodora* Hook., *Mentha arvensis* L., e *Mentha piperita* L.

Ana Maria Guedes de Brito

Os óleos essenciais obtidos das plantas *Cymbopogon citratus*, *Eucalyptus citriodora*, *Mentha arvensis* e *Mentha piperita* são amplamente empregados na indústria de alimento, cosmética e farmacêutica. Por sua vez, diferentes métodos *in vitro* têm sido utilizados para a investigação de atividades biológicas dos óleos essenciais das plantas supra citadas. Esse trabalho teve como objetivo, avaliar a ação *in vitro* dos óleos essenciais das folhas frescas das plantas acima referidas contra formas promastigotas do protozoário *Leishmania* (L.) *chagasi*. Os óleos foram extraídos por arraste de vapor e suas composições químicas identificadas através da cromatografia com fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/MS). As promastigotas usadas no experimento foram mantidas em cultivo axênico no meio M-199. Para realização dos ensaios utilizou-se microplacas de 96 poços. Os óleos foram diluídos em meio M-199 e incubados com os parasitos em diferentes concentrações à 24°C por 48 horas, com a meta de se determinar as respectivas concentrações efetivas 50% (EC₅₀). A viabilidade dos promastigotas foi verificada através da atividade oxidativa mitocondrial por meio de um ensaio colorimétrico com difeniltetrazolium (MTT). A EC₅₀ de cada óleo foi determinada através de uma curva sigmoidal dose-resposta. A pentamidina foi o fármaco de escolha como controle positivo. Os resultados demonstraram que os óleos essenciais das folhas frescas das plantas em estudo exibiram ação contra promastigotas da *Leishmania* (L.) *chagasi*. O óleo de melhor efetividade foi de *Cymbopogon citratus*. Embora estudos mais aprofundados sejam necessários, os resultados contidos nessa pesquisa servem como base preliminar de dados que auxiliarão a confirmar a utilidade dos óleos essenciais dessas plantas para o combate, controle e prevenção da leishmaniose chagasi.

Palavras-chave: Atividade antileishmanial, óleos essenciais.

Assessment of the antileishmanial activity of essential oils of plants *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., *Eucalyptus citriodora* Hook., *Mentha arvensis* L., e *Mentha piperita* L.

Ana Maria Guedes de Brito

The essential oils obtained of the plants *Cymbopogon citratus*, *Eucalyptus citriodora*, *Mentha arvensis* and *Mentha piperita* are widely used in the food, cosmetics and pharmaceutical industries. Thus, different *in vitro* methods have been used for the investigation of biological activities of essential oils of the plants mentioned before. The object of this paper is to assess the *in vitro* action of essential oils of the plants fresh leaves referred above against promastigots forms of *Leishmania* (L.) *chagasi* protozoan. The oils were extracted by steam and their chemical composition identified through chromatography with gas phase coupled to spectrometry mass (GC / MS). The promastigots used in the experiment were kept in axenic cultivation in medium M-199. To perform the tests it was used microplates of 96-well. The oils were diluted in medium M-199 and incubated with parasites in different concentrations at 24°C for 48 hours, with the goal to determine the respective effective concentrations 50% (EC₅₀). The viability of promastigots was verified by mitochondrial oxidative activity through a colorimetric test with difeniltetrazolium (MTT). The EC₅₀ of each oil was determined by a dose-response sigmoidal curve. The pentamidine was the drug chosen as a positive control. The results showed that the essential oils of fresh leaves of the plants in study displayed action against promastigots of *Leishmania* (L.) *chagasi*. The oil of best effectiveness was the one from *Cymbopogon citratus*. Although further investigations are needed, the results enclosed in this research serve as the preliminary basis of data that will help to confirm the usefulness of plants essential oils for the combat, control and prevention of leishmaniasis chagasi.

Keywords: Antileishmanial activity, essential oils.

1 – INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais são líquidos oleosos e aromáticos que se evaporam quando expostos ao ar. São obtidos de várias partes vegetais, principalmente, por hidrodestilação ou expressão. Quimicamente, constituem-se misturas de substâncias divididas em dois grupos principais: derivados terpenóides e/ou derivados fenilpropanóides. Estão amplamente distribuídos no reino vegetal, especialmente nas famílias Asteraceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Rutaceae e Apiaceae, sua função envolve sinais de comunicação química no reino vegetal e atuam como armas de defesa química contra o reino animal (FLORÃO, 2006).

KRUCKEN (2005) afirma que apesar da maior parte dos óleos essenciais serem provenientes da produção agrícola, aproximadamente 30 (trinta) tipos deles são obtidos comercialmente a partir das florestas, gerando quase sempre desequilíbrio ecológico, perigo de extinção e levando a uma produção não-sustentável, como exemplos atuais, no Brasil, o sassafrás (*Ocotea pretiosa*) e pau-rosa (*Aniba rosaeodora*).

Os óleos essenciais são importantes matérias-primas industriais, utilizadas na manufatura de produtos nos setores da perfumaria, cosmética, farmacêutica, higiene e limpeza, alimentícia e bebidas (BUSATTA, 2006).

Os óleos essenciais oriundos das plantas *Cymbopogon citratus*, *Eucalyptus citriodora*, *Mentha arvensis* e *Mentha piperita*, apresentam atividades terapêuticas já cientificamente comprovadas em diversas infecções e afecções do homem, tais como: antimicrobianas, antifúngicas, antivirais, anticatarral, antiestresse, antihemorragicas, cardiotônica, descongestionante, diurética, hormonal, neurotônica, sedativa, colagoga, vermífuga, entre outras (BOYD; PEARSON, 1946; TISSERAND, 1985; PANDEY *et al.*, 2003; BERTINI *et al.*, 2005; BETONI *et al.*, 2006; NICOLETTI *et al.*, 2007).

Embora os óleos essenciais das plantas acima referidas sejam bastante estudados, o seu uso terapêutico contra a leishmaniose visceral na literatura consultada ainda não foi avaliado.

A leishmaniose visceral é uma parasitose sistêmica que atinge as células do sistema fagocitário mononuclear do homem, sendo os órgãos mais afetados: baço, fígado, linfonodos, medula óssea e pele. Outros órgãos e tecidos podem também ser acometidos, a exemplo o intestino e os pulmões. Em casos avançados da doença geralmente todos os órgãos são comprometidos. Esse agravo à saúde é de decurso grave de alta letalidade com mortalidade nos casos humanos não tratados podendo alcançar 70% a 90% (MELO, 2004).

A parasitose acima citada apresenta amplo espectro epidemiológico no mundo, ocorrendo em áreas tropicais e subtropicais, tendo como agentes etiológicos protozoários

pertencentes ao subgênero *Leishmania*, com três espécies principais: *Leishmania* (*Leishmania*) *donovani*; *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum*, *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* – agrupadas no complexo *Leishmania donovani*. Na América a leishmaniose visceral é uma infecção causada pela *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. (MAURICIO *et al.*, 2000; NOGUEIRA; GALATI, 2006).

A parasitose supra citada apresenta como principal mecanismo de transmissão com importância epidemiológica o vetorial, através da picada de artrópode fêmea da espécie *Lutzomia longipalpis* (MICHALICK, 2005).

O Brasil é o país americano com maior número de casos de leishmaniose chagasi. Doença considerada inicialmente rural, hoje é detectada em áreas urbanas. Dados recentes mostraram que essa parasitose já foi registrada em 19 das 27 unidades da federação e que aproximadamente 1.600 municípios apresentam casos de transmissão autóctone (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003). As intensas migrações humanas para áreas urbanas, a agressão ao meio ambiente pelos desmatamentos desenfreados, novos fatores imuno supressivos, tais como infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida, má nutrição, fatores genéticos, entre outros, são cruciais para a expansão dessa parasitose (BRASIL, 1998). A maior incidência da leishmaniose chagasi encontra-se no nordeste, com mais de 90% dos casos notificados (CAMPINO, 2003).

O estado de Sergipe é considerado como área endêmica para leishmaniose chagasi. Dados obtidos no Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) mostraram que nos anos de 2003, 2004, 2005 e 2006 foram notificados, respectivamente, 12 (02 Aracaju), 29 (11 Aracaju), 41 (15 Aracaju) e 37 (08 Aracaju) casos (DATASUS, 2007).

No que concerne ao tratamento da leishmaniose chagasi, ainda são limitadas às drogas existentes. Têm-se os antimoniais pentavalentes (Sb^{5+}), antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®) e estibogliconato sódico (Pentostam®), porém, eles possuem muitas restrições: não podem ser administrados para gestantes, portadores de deficiências renais, hepáticas e cardíacas, além de causar graves efeitos colaterais. Quando acontece resistência aos antimoniais pentavalentes, como segunda escolha pode ser usada Anfotericina B, no entanto o usuário deve ficar sob cuidados médicos intensivos, devido sua alta toxicidade, bem como alto custo. Outro fato crucial, reportado por vários pesquisadores a partir de comprovação científica é a existência de cepas resistentes aos tratamentos em vários países, a exemplos Honduras e Índia (BRASIL, 2002; ESCÓLAN *et al.*, 2005).

Estudos mostraram que a atividade terapêutica dos óleos essenciais das plantas *Cymbopogon citratus*, *Eucalyptus citriodora*, *Mentha arvensis* e *Mentha piperita* como uma possível alternativa para combater parasitoses, principalmente, a leishmaniose chagasi, ainda são poucos relatados na literatura. Mediante o exposto, os óleos essenciais obtidos das plantas acima referidas tornaram-se alvo de nosso interesse no sentido de explorar

seus potenciais contra as formas promastigotas de *Leishmania* (L.) *chagasi* em ensaios *in vitro*.

O presente trabalho foi estruturado em quatro capítulos, sendo que o primeiro capítulo apresentou uma revisão bibliográfica acerca de óleos essenciais das plantas *Cymbopogon citratus*, *Eucalyptus citriodora*, *Mentha arvensis*, *Mentha piperita*, o protozoário *Leishmania* (L.) *chagasi*, a doença leishmaniose chagasi e métodos *in vitro* versus *Leishmania*.

O segundo capítulo exibiu o artigo intitulado “Avaliação da atividade antileishmanial dos óleos essenciais obtidos das plantas *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., *Eucalyptus citriodora* Hook., *Mentha arvensis* L., e *Mentha piperita* L.

No terceiro capítulo se mostrou o artigo intitulado “Avaliação do rendimento e dos constituintes citral e mirceno do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., submetido ao cultivo orgânico e biodinâmico na Fazenda Mãe Terra – Sergipe”.

Já o quarto capítulo diz respeito ao artigo intitulado “Leishmaniose visceral em Sergipe: perfil epidemiológico de 2001 a 2006”.

1.1-OBJETIVOS

1.1.1 - Objetivo geral

O objetivo desse trabalho foi avaliar *in vitro* a atividade dos óleos essenciais extraídos das folhas frescas das plantas *Cymbopogon citratus*, *Eucalyptus citriodora*, *Mentha arvensis* e *Mentha piperita* contra formas promastígotas do protozoário *Leishmania (L.) chagasi*.

1.1.2 - Objetivos específicos

- Coletar o material botânico;
- Extrair os óleos essenciais a partir do material botânico coletado;
- Identificar e quantificar os compostos químicos dos óleos essenciais obtidos;
- Determinar seus respectivos rendimentos;
- Realizar os ensaios *in vitro* dos óleos essenciais citados contra as formas promastígotas de *Leishmania (L.) chagasi*;
- Delimitar os valores das concentrações 50% (EC₅₀) dos óleos essenciais contra as formas promastígotas de *Leishmania (L.) chagasi*.

2 – CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Óleos essenciais

Óleos essenciais são compostos orgânicos de estrutura química heterogênea que se apresentam, em certos gêneros de plantas superiores e inferiores, bem como em microrganismos. São líquidos viscosos e podem ou não exalar odor (BELL; CHARWOOD, 1980; SARTORATTO *et al.*, 2004).

O termo “óleo volátil”, conforme BUSATTA (2006) tem sido mais usado devido à relação com as propriedades físico-químicas da planta, já que “óleo essencial” pode designar também produtos odorantes não formados anteriormente no vegetal, que são as “essências heterosídicas” obtidas através da hidrólise enzimática de heterosídeos. Os óleos essenciais são originados do metabolismo secundário das plantas e possuem composição química complexa, destacando-se a presença de terpenos e fenilpropanóides, preponderando os terpenóides (GONÇALVES *et al.*, 2003 ; SILVA *et al.*, 2003).

Para MORAIS (2006) os óleos essenciais constituem, de forma geral, uma mistura muito complexa de hidrocarbonetos, álcoois e compostos aromáticos, existentes em todo tecido vivo das plantas, normalmente concentrados na casca, caule, flores, folhas, frutos, rizomas e sementes.

Segundo SIMÕES e SPITZER (1999), embora todos os órgãos de uma planta possam acumular óleos essenciais, sua composição pode variar conforme a localização (a exemplo, o óleo das cascas de canela é rico em aldeído cinâmico, enquanto, as folhas e raízes dessa planta são ricas, respectivamente, em eugenol e cânfora).

SIQUEIRA *et al.* (2000) ressaltam que esses óleos constituem os elementos essenciais contidos em muitos órgãos vegetais e estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal exercendo papel fundamental na defesa contra microrganismos.

A composição química do óleo essencial pode ser bastante variável, de acordo com a diversidade genética, o habitat e os tratamentos culturais (LEAL *et al.*, 2001).

O ambiente no qual o vegetal se desenvolve e o tipo de cultivo influem na composição química dos óleos essenciais. A temperatura, umidade relativa do ar, duração total da exposição ao sol e o regime de ventos exercem influência direta, principalmente nas espécies que possuem estruturas histológicas de estocagem de óleos na superfície. Por outro lado, nos vegetais em que a localização de tais estruturas é mais profunda, a

qualidade é mais constante. O grau de hidratação do terreno e a presença de nutrientes também podem influenciar na composição deles (SIMÕES ; SPITZER, 2000).

Os óleos essenciais podem ser obtidos através de diferentes processos, dependendo da localização no vegetal, quantidade e das características requeridas para o produto final. Os processos usuais são: prensagem ou expressão; destilação por arraste a vapor; extração com solventes voláteis e CO₂ supercrítico (SEMEN; HIZIROGLU, 2005).

Dentre as técnicas supracitadas, destacam-se a destilação por arraste a vapor e extração com solventes voláteis, por serem de extrema simplicidade e reduzido custo. Outros métodos podem ser utilizados para a obtenção desses óleos, como por exemplo: extração por soxhlet; extração por maceração e a extração por ultrassom (BUSATTA, 2006; WATENABE *et al.*, 2006).

Para a avaliação da composição química dos óleos essenciais, tem-se que os avanços das técnicas analíticas instrumentais, aliadas a simplicidade, precisão e rapidez, tornaram a cromatografia gasosa (CG) um dos processos mais difundidos para análises químicas, por ser uma técnica de separação eficiente para esclarecer uma determinada estrutura, tanto na indústria quanto nos laboratórios de pesquisa científica. Diversos pesquisadores destacam a cromatografia gasosa entre as melhores ferramentas analíticas e de extrema utilidade na análise de misturas complexas (FALSENJAK *et al.*, 1987; KUSTRAK; PEPELINJARK, 1989; VELICKOVIC *et al.*, 2002; RADULESCU *et al.*, 2004; VÁGI *et al.*, 2005; AVATO *et al.*, 2005).

No que concerne à qualidade e ao acondicionamento de um óleo essencial, especial atenção deve ser reservada quando da sua aquisição para evitar um produto adulterado. Tipicamente, os procedimentos de falsificação são: mistura do óleo essencial com outros da mesma espécie e qualidade inferior, aumentando o rendimento; diluição em um veículo, geralmente um óleo carreador; e adição de compostos sintéticos de baixo preço, diferentes ou iguais a seus respectivos componentes. Quanto ao acondicionamento por serem fotossensíveis devem ficar armazenados em frascos de cor âmbar (mais comum) ou azul cobalto. A observação minuciosa da cor, odor, variação de preço, procedência e idoneidade do fornecedor, data de fabricação e de validade são de suma importância (BRUNETON, 1993 ; LAVABRE, 1997).

A validade da maioria dos óleos essenciais é de dois anos, os cítricos devem ser usados por até um ano, a partir de sua data de fabricação, mas quando diluído em óleos carreadores sua validade é de alguns meses, observando-se alterações na coloração e no odor do óleo cítrico (BARATTA *et al.*, 1998).

Os óleos essenciais são produtos de extração de uma espécie vegetal e, portanto, mais concentrados apresentando toxicidade mais elevada que a da planta de origem, tornando o uso abusivo e sem orientação inaceitável. A toxicidade pode ser aguda ou crônica e ainda ocorrer interação medicamentosa entre os numerosos componentes do óleo

e certos medicamentos utilizados pelo indivíduo. O grau da toxicidade dependera da dose utilizada de óleo, em alguns casos dosagens baixas acarretam intoxicação levando a uma sensibilidade individual que pode provocar desde sensibilização, num primeiro momento, alergias, por contatos consecutivos, e reações de fotossensibilidade até problemas mais graves, principalmente quando utilizados por via oral (SIMÕES, 1999; MORAIS, 2006).

O uso terapêutico de óleos essenciais tem se expandido por todo o mundo, sendo amplamente utilizados contra várias doenças inflamatórias, alérgicas, reumáticas e artrite. Esses tratamentos são reconhecidos através de experimentações clínicas, em especial por aplicação na pele, via massagens e ungüentos, mas ainda existem poucos estudos científicos sobre suas ações biológicas. Até então tem sido estabelecido, cientificamente, que cerca de 60% dos óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas e 35% exibem propriedades antibacterianas (MARUYAMA *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Na aromaterapia, a via de administração mais comum para utilização de óleos essenciais é a cutânea, porém a escolha de outras vias, tais como: oral, parenteral, retal, vaginal, sublingual ou nasal, depende da orientação de um profissional habilitado como médicos, farmacêuticos, odontólogos e enfermeiros, além da indicação clínica ou da forma farmacêutica em que está incorporado o óleo essencial, ou das condições do paciente havendo, portanto, uma via adequada para cada caso (DE LA CRUZ, 1997).

O cultivo de espécies vegetais aromáticas tem aumentado e a obtenção de óleos essenciais constitui importante atividade econômica sendo amplamente utilizado como fragrância em cosméticos, aromatizantes de alimentos, bebidas e produtos de utilidade doméstica, a exemplo: detergentes, sabões, repelentes de insetos e aromatizantes de ambientes. Existindo também o emprego deles como intermediários sintéticos de perfumes (WOOLF, 1999).

DAVID *et al.* (2007) ressaltaram que os esforços na busca de substâncias ativas, que possam aumentar a produção de óleos essenciais, são de grande importância, principalmente, quando se considera a dependência da indústria farmacêutica nacional. Os autores ainda afirmaram que a importação de matéria-prima nessa área chega a 80% representando considerável evasão de divisas para o país.

Estudos realizados por SANGWAN *et al.* (1990), WALKER; MELIN (1996) e OKA *et al.* (2000) demonstraram existir ainda poucas pesquisas envolvendo a avaliação da eficácia de óleos essenciais e seus componentes no combate a helmintoses e protozooses.

2.2. *Cymbopogon citratus*

O *Cymbopogon citratus* é uma espécie vegetal originária da Índia e amplamente distribuída por vários países tropicais, entre eles o Brasil, onde assume diferentes

denominações populares conforme a região em que se encontra: capim-limão (MG), capim-santo (BA), erva-cidreira (SP) e outros como: capim-catinga, capim-de-cheiro, capim-cidrão, capim-cidilho, capim-cidro e capim-ciri. Pertence à família Poaceae (Gramineae) e se constitui em uma erva perene (Figura 1), que forma touceiras compactas e robustas de até 1.2 metros de altura, com rizoma semi-subterrâneo e sua propagação é assexuada por divisão de touceiras e realizada a campo (COSTA *et al.*, 2005).



Figura 1 – Cultivo de *C. citratus* em sistema orgânico biodinâmico na Fazenda Mãe Terra, Município de Santana do São Francisco, Sergipe.

Fonte: Foto gentilmente cedida pela proprietária da Fazenda Mãe Terra.

A planta tem sido cultivada no Brasil de forma artesanal em pequenos canteiros. Nos últimos anos, entretanto, a abrupta expansão da medicina alternativa provocou o rápido crescimento na demanda por folhas frescas e secas do *Cymbopogon*. Esses fatores fizeram com que as áreas, para cultivo dessa gramínea, se expandissem na mesma proporção para atender essa demanda (VIDA *et al.*, 2006).

Diversos clones de *Cymbopogon citratus* são cultivados para produção comercial de óleo essencial, conhecido internacionalmente como óleo de “Lemon grass”. Essa essência é largamente empregada como agente aromatizante em perfumaria, indústria cosmética e alimentícia por seu forte odor de limão, bem como para obtenção do citral, seu principal constituinte. Atualmente, o óleo essencial dessa planta vem sendo utilizado também como feromônio artificial para captura de enxames, pois proporciona um aumento real na captura e povoamento deles, o qual se torna de suma importância visto que a aquisição de novos enxames possui altos valores comerciais (CARVALHO *et al.*, 2005).

O componente mais importante do óleo essencial do *Cymbopogon citratus* é o citral (47% a 85%), sendo o citral uma mistura de isômeros, geranial (α -citral), e neral (β -citral),

que é utilizado pela indústria farmacêutica para síntese de ianonos e vitamina A, acompanhado em menor quantidade pelo mirceno (SIDIBE *et al.*, 2001).

BATISTA-PEREIRA *et al.* (2006) e TAPIA *et al.* (2007) afirmaram que em menor proporção já foram identificados outros compostos como: canfeno, citronelal, citronelol, farnesol, geraneol, limoneno, linalol, mentol, α -pineno, β -pineno e terpineal.

NASCIMENTO *et al.* (2003) salientaram que são usados, para fins de obtenção de óleo essencial, as folhas tanto frescas quanto secas e o seu rendimento é de 0,28 a 0,50% da massa fresca. Os autores recomendam que a colheita do *Cymbopogon citratus* seja realizada no horário de 08:00 às 13:00 horas quando é observado uma maior concentração de citral, pois as altas temperaturas influenciam na qualidade do óleo.

Dentre as atividades biológicas registradas da espécie *Cymbopogon citratus* destacam-se: efeito hipotensor e antiinflamatório da infusão das suas folhas, testado em ratos por VIANA *et al.* (2000), ação fungicida do óleo essencial obtido das suas folhas contra *Aspergillus niger*, avaliado por BARATTA *et al.* (1998), *Aspergillus fumigatus* e *Cladosporium trichoides* por KISHORE *et al.* (1993), *Didymella bryoniae* por FIORI *et al.* (2000), *Aspergillum flavus*, sendo que esse último mostrou efeito superior ao promovido pelos fármacos fungicidas sintéticos agrosan G. N, cerosan, agrosim, dithane M-4, bavistin e emison demonstrado por MISHRA e DUBEY (1994), bem como ação antibacteriana contra organismos Gram-positivos e Gram-negativos observado por ONAWUNMI e OGUNLANA (1986).

LAVABRE (1997) cita como ações farmacológicas reconhecidas do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*: antihipertensivo, antiespasmódico, antiasmático, antiséptico, antiparasitário, antitérmico, antireumático, miorelaxante e repelente para insetos. O autor ainda afirma que não deve ser utilizado em pessoas com ulcerações de quaisquer etiologias.

Quanto às vias de administração do supracitado óleo, as mais utilizadas são oral e tópica, e as especificações devem ser estritamente a critério médico. Estudos realizados acerca da avaliação toxicológica do óleo demonstraram que as manifestações de toxicidade foram mais evidentes quando ocorreu superdosagem que desencadeou congestão vascular no estômago e infiltrado hemorrágico focal na lâmina própria do fígado e rim (NETO *et al.*, 1995).

2.3. *Eucalyptus citriodora*

Originário da Austrália e da Indonésia, o *Eucalyptus citriodora* chegou ao Brasil em 1825 como planta ornamental. Sua utilização para fins econômicos teve início em 1903,

quando passou a ser empregado na produção de dormentes ferroviários e lenha para alimentar as locomotivas da época (GALANTI 1987).

Conforme LORENZI (2003), no Brasil, o *Eucalyptus* é encontrado em todas as regiões, sendo conhecidas cerca de 400 espécies, dentre elas o *Eucalyptus citriodora*, pertencente à família Mirtaceae e ao subgênero Corymbia (Figura 2), também conhecido como eucalipto cidro e “lemon scented gum”, destacando-se como uma das espécies mais promissoras pela sua adaptabilidade, com extenso cultivo, desde o Rio Grande do Sul até a região amazônica e por ser um dos maiores produtores de óleo essencial (XAVIER, 1993).



Figura 2 – Folhas de *E. citriodora*.

Fonte: Imagem disponível no site: www.evphotographics.com.au.

O rendimento em óleo essencial da espécie *Eucalyptus citriodora* varia de 1% a 1,6%, ou seja, a cada tonelada de biomassa foliar destilada pode ser extraído de 10 a 16 kg de óleo. A concentração do seu componente principal citronelal é cerca de 65% a 85% (CINIGLIO, 1993).

Segundo FRANCO (1999), além do citronelal, outros componentes tais como citronelol, pineno, limoneno, terpinol, confeno são observados na composição química do óleo.

A produção nacional de óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* em 1995 foi estimada em 1000 toneladas anuais, sendo que 90% tinham como finalidade a exportação. O Brasil apresenta uma grande participação no mercado mundial desse produto (SILVA *et al.*, 2002).

LIMA *et al.* (2003) relataram que o óleo essencial da espécie *Eucalyptus citriodora* apresentou atividade antibacteriana comprovada por diversos pesquisadores, a exemplo de ESTANISLAU *et al.* (2001) que demonstraram a ação dele frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella choleraesuis*.

OLIVEIRA *et al.* (2006) destacaram a ação do óleo acima referido como excelente cicatrizante tópico, bem como antiséptico, antifúngico e antiinflamatório. Vale ressaltar que VITTI (1999), adverte para o não uso dele como descongestionante. Ele afirma que para tal finalidade deve ser usado o óleo essencial da espécie *Eucalyptus globulus*.

Estudos realizados em animais por NICOLETTI *et al.* (2007) indicaram a possibilidade do óleo essencial, obtido a partir das folhas de *Eucalyptus*, induzirem enzimas hepáticas envolvidas no metabolismo de fármacos e a ação de outras drogas poderá ser diminuída quando administrada concomitantemente. Enfatizaram ainda que quando aplicado à pele com loção contendo 5-fluoruracila, o óleo aumenta a absorção dessa droga.

Relatos clínicos associam a administração oral do óleo de *Eucalyptus citriodora* com dificuldades de raciocínio e alterações no sistema nervoso, esses sintomas poderão ser intensificados quando usados conjuntamente com medicamentos que atuam no sistema nervoso central (benzodiazepínicos, barbitúricos, narcóticos, alguns antidepressivos) (WHO, 2002).

2.4. *Mentha arvensis* e *Mentha piperita*

As mentas são oriundas da Europa e Oriente Médio e foram trazidas para o Brasil no período da colonização. Existem diversas espécies de mentas, mais do que se consegue identificar, pois a polinização das várias espécies ocorre de forma cruzada, originando novos híbridos. O gênero *Mentha* compreende cerca de 25 espécies diferentes e correlatos que pertencem a família Lamiaceae. São plantas herbáceas e perenes, de crescimento rápido e fácil, com caules violáceos e ramificados, folhas opostas, serradas e cor variando entre verde-claro e verde-escuro, flores lilases ou azuladas dispostas em espigas terminais, fruto tipo aquênio (WATANABE *et al.*, 2006).

Conforme RUSSOMANNO *et al.* (2005) as espécies mais cultivadas no Brasil são a *Mentha arvensis* e *Mentha spicata*, por serem bem adaptáveis ao clima subtropical, bem como a *Mentha piperita*, um híbrido natural de *Mentha aquatica* e *Mentha spicata*.

Segundo KOTHARI (2005), anualmente a produção mundial de *Mentha arvensis* é de cerca de 16.000 toneladas, enquanto que a da *Mentha piperita* é 4.000 toneladas. O óleo é obtido a partir das folhas e flores e são destinados ao uso na indústria de alimentos, medicamentos, aromatizantes e fragrâncias. Os maiores produtores são a China, Índia, Brasil, Japão, França e Estados Unidos (SRIVASTAVA, 2002).

A *Mentha arvensis* (Figura 3), popularmente conhecida como menta doce, pode apresentar um rendimento de até 5% em óleo essencial, porém é mais comum um rendimento de 1% a 2%. Seu principal componente é o mentol (de 50% a 70% e em alguns casos 90%). Depois do mentol ser removido do óleo (desmentolado), restam ainda 17% a

35% de mentona, 5% a 13% de metil acetato, 2% a 5% de limoneno e 2,5% a 4% de neomentol. Existem ainda traços de outros terpenos (piperone, pulegone, entre outros) (RAJESWARA,1999).



Figura 3 (A e B) - Cultivo de *M. arvensis* em sistema orgânico biodinâmico na Fazenda Mãe Terra, Município de Santana do São Francisco, Sergipe.

Fonte: Foto gentilmente cedida pela proprietária da Fazenda Mãe Terra.

Já a *Mentha piperita* (Figura 4), popularmente conhecida como hortelãzinho, hortelã de panela, hortelã de cheiro, hortelã da folha miúda, hortelã pimenta, hortelã da horta e hortelã comum, possui um rendimento de 0,7% a 3% e a seguinte composição química: mentol (30-50%), mentona (14-32%), cineal (6-8%), mentofurano, pineno, limoneno e mentonapiperitona, entre outros. Quando cultivado em períodos de dias longos e noites curtas, apresenta um maior rendimento de óleo com teor aumentado de mentofurano, ao contrário, noites frias favorecem a formação de mentol (SCAVRONI, 2005).



Figura 4 – Folhas de *M. piperita*.

Fonte: Imagem disponível no site: www.aerzte-seite.de.

As ações terapêuticas atribuídas ao óleo essencial de *Mentha arvensis* são: antiespasmódica, expectorante, antihistamínica, colagoga, carminativa, antiséptica, tônica e

estimulante sobre o aparelho digestório, antivomitiva e antitérmica (LOPEZ *et al.*, 1998; SHÁSANY *et al.*, 2000; PRICE, 2001; PRICHARD, 2004).

No que se refere ao óleo essencial de *Mentha piperita*, ele possui ação contra várias cepas bacterianas, tais como: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenos*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, entre outras. Bem como, no combate a levedura *Cândida albicans*, conforme experimento *in vitro* realizado por vários pesquisadores, a exemplo de AH MAD e BEG (2001); KIRIMER *et al.* (2002); SARTORATTO *et al.* (2004).

VIDAL *et al.* (2007) demonstraram *in vitro* as ações do extrato e frações de *Mentha piperita* em trofozoitos de *Giardia lamblia*. O óleo supracitado, também apresenta outras ações terapêuticas, como antiinflamatória, expectorante, carminativa, cardiotônica, colagoga, antiespasmódica, vermífuga, miorelaxante, antidispéptica, anti-halitose e tônica (SÁNCHEZ *et al.*, 1996; LAVABRE, 1997; GRACE, 1999; BETONI *et al.*, 2006).

Um estudo realizado por AKDOGAN *et al.* (2004) demonstrou em modelos animais que a absorção de ferro pelas proteínas sangüíneas foi inibida quando chás de *Mentha piperita* foram administrados. Os autores afirmam que o uso de qualquer produto dessa *Mentha* em pacientes anêmicos ou crianças deve ser realizado sobre orientação médica.

Conforme NICOLETTI *et al.* (2007) estudos relataram que quando o óleo é administrado por via oral poderá aumentar os níveis sangüíneos de drogas como felodipino e sinvastatina.

2.5. Leishmaniose chagasi

Conforme MACHADO *et al.* (2007), as leishmanioses são endêmicas em 88 países dos quatro continentes, com total de 350 milhões de pessoas em risco. A estimativa global de casos de leishmanioses é de 12 milhões, ocorrendo dois milhões de novos casos a cada ano, sendo que 0,5 milhões deles são de leishmaniose visceral (LV). Cinco países registram 90% dos casos dessa doença, sendo eles: Nepal, Bangladesh, Brasil, Índia e Sudão. Afirmam os autores que, atualmente, a Organização Mundial de Saúde (O.M.S), admite a leishmaniose como um grave problema de saúde pública mundial.

Segundo MELO (2004), nas Américas a LV ocorre na Argentina, Paraguai, Bolívia, Honduras, Martinica, Costa Rica, Guatemala, Colômbia, Venezuela, México, El Salvador e Brasil. A autora declara ainda que, dados da FUNASA-MS, Brasil (2003), apontam o Brasil como o país americano detentor do maior número de casos. A doença, considerada inicialmente como de caráter eminentemente rural, hoje é observada também em áreas peri-urbanas e urbanas, bem como em expansão, a exemplo de Fortaleza (CE), Aracaju (SE), São Luiz (MA), Santarém (PA), Recife (PE), Salvador (BA), Rio de Janeiro (RJ), Palmas (TO), entre outros.

A importância da LV no contexto da saúde pública mundial tem aumentado na última década, devido sua expansão geográfica (invadindo áreas antes livre da doença), a urbanização desordenada, a re-emergência de focos endêmicos antigos, o desmatamento descontrolado alterando os ecossistemas, o número crescente de casos de LV associada à infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), as condições sócio-econômicas, entre outros (CALDAS *et al.*, 2001).

O primeiro caso de LV na América do Sul foi relatado por Migono em 1913, no Paraguai, em material de necropsia de um paciente que havia contraído a enfermidade no estado do Mato Grosso, Brasil. PENNA (1954) reportou os primeiros casos da parasitose no Brasil. Evandro Chagas entre 1936 e 1939 diagnosticou o primeiro caso humano *in vivo*, demonstrou a doença em cães, sugeriu o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* como possível vetor e nomeou o parasita *Leishmania chagasi* (CAMARGO; LANGONI, 2006).

No mundo, a LV é causada por um protozoário parasita, pertence ao complexo *Leishmania donovani* que possui três espécies: *Leishmania* (Leishmania) *donovani*, *Leishmania* (Leishmania) *infantum* e *Leishmania* (Leishmania) *chagasi*. Nas Américas essa última espécie é responsabilizada pelas formas clínicas da doença (MICHALICH, 2005).

O protozoário apresenta as formas amastígotas nos mamíferos hospedeiros vertebrados, já nos insetos vetores considerados os hospedeiros invertebrados, têm-se as formas promastígotas e paramastígotas. Nos hospedeiros vertebrados as formas amastígotas são encontradas parasitando células do sistema monuclear fagocitário (SMF), em especial macrófagos. Em humanos, localizam-se em órgãos linfóides, como baço, fígado, linfonodos, medula óssea, que podem estar densamente parasitados. O parasitismo pode abranger outros órgãos e tecidos, tais como placas de Peyer no intestino, os rins, os pulmões e a pele (UEDA-NAKAMURA *et al.*, 2006). Para CHAN-BACAB e PENA-RODRIGUEZ (2001), raramente as formas amastígotas podem ser encontradas no sangue, no interior dos leucócitos, íris, placenta e timo.

No hospedeiro invertebrado são encontradas no intestino médio e anterior as formas paramastígotas, promastígotas e promastígotas metacíclicas. Esse parasita desenvolve ciclo de vida do tipo heteroxênico, ou seja, precisa de dois hospedeiros para completar suas fases de desenvolvimento (MARZOCHI *et al.*, 1981).

Quanto à morfologia observada em microscópio óptico comum e corada pelas técnicas de Giemsa e/ou Leishman, a forma amastígota (Figura 5), se apresenta esférica ou oval medindo conforme a espécie, de 3-6 µm de comprimento por 2-4 µm de largura, possui membrana delgada, citoplasma, núcleo excêntrico, cinetoplasto (mitocôndria grande e com funções específicas) em forma de bastonete ou grânulo arredondado situado próximo ao núcleo, não há flagelo livre. A paramastígota (Figura 5) é oval ou arredondada, com flagelo curto, exteriorizando-se na porção anterior do corpo do parasita, o núcleo situa-se na porção

mediana e cinetoplasto localizado junto ao núcleo, medi de 5-10 μm de comprimento e 4-6 μm de largura. A promastígota (Figura 5) tem o corpo alongado, com flagelo livre e longo, sem membrana ondulante, emergindo do corpo do protozoário na sua porção anterior, núcleo que se situa de forma mediana ou anterior, o cinetoplasto localizado entre o núcleo e a extremidade anterior, mede de 10-40 μm comprimento por 1,5-3,0 μm de largura (MAZOCHI *et al.*, 1999).

O ciclo evolutivo inicia-se no hospedeiro vertebrado (Figura 5), quando as formas promastígotas metacíclicas são inoculadas pela fêmea do inseto vetor, durante o repasto sanguíneo. Essas formas são fagocitadas pelos macrófagos teciduais e granulócitos neutrófilos. Nos macrófagos, as promastígotas se transformam em amastígotas, que iniciam um processo de reprodução por divisão binária, formando ninhos, a célula não suportando a carga parasitária rompe-se e as amastígotas livres são fagocitadas por novos macrófagos. Desse ponto inicial por um processo imunoinflamatório, as amastígotas se dirigem para os órgãos linfóides viscerais já mencionados (AGUILAR *et al.*, 1998).

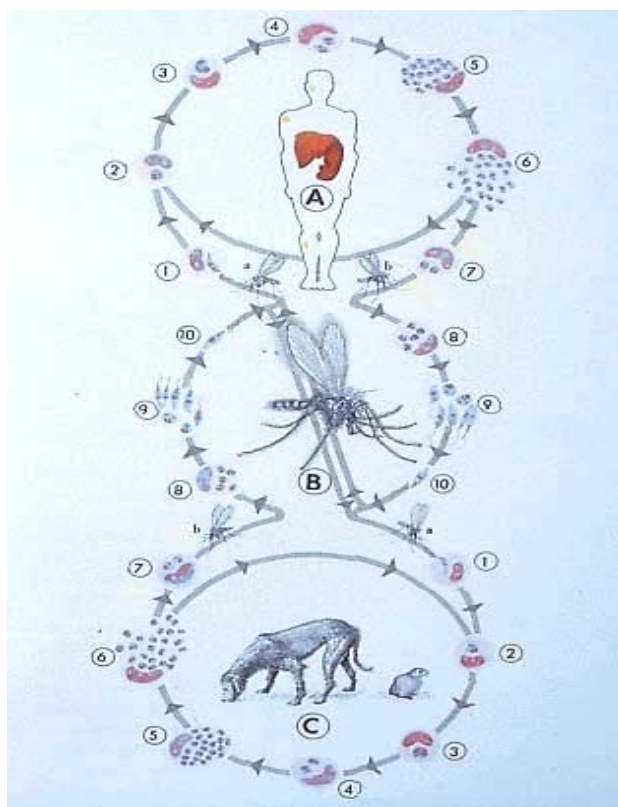


Figura 5 – Ciclo de transmissão da *Leishmania chagasi*.
Fonte: Foto disponível no site: www.sucen.sp.gov.br/.../ciclo_transm.jpg

Nos hospedeiros invertebrados, ao exercer a hematofagia, as fêmeas ingerem junto com o sangue sorvido, as amastígotas, essas no interior dos macrófagos e leucócitos em cerca de 15 horas transformam-se em promastígotas, que são encontradas livres no trato

digestório médio e anterior do inseto. Elas passam a multiplicar-se por divisão binária, transformando-se em paramastígotas que se aderem por hemidesmossomos ao epitélio do esôfago e laringe do inseto, ocorre transformação para promastígota procíclica, e posterior para promastígota metacíclica livre. Essas se encaminham para a prosbócida do inseto, estando ele apto a infectar (NASCIMENTO, 2007).

Quanto aos mecanismos de transmissão, o principal e de maior importância epidemiológica é o vetorial, cujo responsável no Brasil é a fêmea da espécie *Lutzomyia longipalpis*. Outros mecanismos devem ser considerados, tais como, compartilhamento de seringas e agulhas contaminadas durante o uso de drogas injetáveis, transfusional, entre outras (MENDES *et al.*, 2000).

A patogenia da leishmaniose chagasi é delimitada por multifatores envolvendo hospedeiro e parasito, estado imunológico e nutricional do indivíduo, entre outros. A via de disseminação é a hematogênica e/ou linfática (CAMARGO e BARCINSKI, 2003).

A parasitose pode apresentar desenvolvimento rápido ou gradativo e os sinais sistêmicos típicos estão aliados à febre intermitente, palidez de mucosas, esplenomegalia associada ou não a hepatomegalia, anorexia, apatia, e progressivo emagrecimento com debilidade geral do portador (Figura 6). A tosse não produtiva, diarreia e dor abdominal são as queixas mais comuns na fase aguda da infecção. No decurso da doença, o portador pode desenvolver anemia, epistaxes, edema, icterícia e ascite, a anorexia e a desnutrição aumentam acentuadamente, podendo levá-lo a óbito. Porém, geralmente o óbito é determinado pelas hemorragias e infecções intercorrentes. Em casos de portadores de HIV, a morte às vezes acontece antes que os sintomas sejam deflagrados. Os aspectos relacionados com a imunidade do homem à infecção por LV, ainda não se encontram claramente definidos (GUERIN, 2002).



Figura 6 – Imagem de criança portadora de leishmaniose chagasi apresentando quadro clínico hepatoesplenomegalia

Fonte: Foto disponível no site: www.nsgs.it/indexap7.htm.

O diagnóstico clínico da doença é possível, desde que a anamnese e os exames de palpação e de percussão sejam notadamente claros, a demonstração do parasito, todavia, é conclusiva (MICHALICK ; GENARO, 2005).

A punção medular óssea, do fígado ou do baço é o recurso mais utilizado para a obtenção amostral de tecidos dos portadores de leishmaniose chagasi para demonstração das formas amastigotas. Com o material obtido, usualmente são realizados esfregaços em lâmina e coloração pela técnica de Giemsa, semeadura em meio de cultura McNeal, Novy e Nicolle (NNN) ou inoculação em hamster. Quanto aos métodos imunológicos, à reação de imunofluorescência indireta, ensaio imunoenzimático, teste rápido anticorpo antileishmania donovani e teste de aglutinação direta são os mais utilizados (SUNDAR *et al.*, 2002).

BERMAN (1997) afirmou que a eletroforese de proteínas, apesar de não ser um método específico, é de suma importância, pois ele detecta a inversão da reação albumina/globulina, sendo bastante útil não só como diagnóstico, mas para avaliação da eficiência terapêutica.

A Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) tem sido executada para pesquisa de ácido desossiribonucleico da *Leishmania*, com resultados bastante satisfatórios (MELO, 2004).

No que tange ao tratamento da leishmaniose chagasi humana, o seu sucesso é diretamente proporcional à precocidade com que é instituído. A alta mortalidade acontece em portadores com diagnóstico incorreto, demorado ou em imunodeprimidos, sendo mais específico em portadores de HIV-positivo (DAVIES *et al.*, 1992).

O arsenal terapêutico contra a parasitose acima citada é limitado. Os antimoniais pentavalentes (Sb^{5+}) antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®) e o estibogliconatosódico (Pentostam) são na maioria dos países, a primeira opção terapêutica desde 1940. No Brasil, a droga de escolha é Glucantime®, ela é distribuída gratuitamente na rede de saúde pública. Porém, esses medicamentos apresentam restrições de uso, tais como, não podem ser administrados a gestantes, portadores de deficiências renal, hepática, cardíaca e chagásica, bem como desencadeiam efeitos colaterais acentuados, sendo necessário monitoramento médico. Como segunda opção tem-se os esquemas terapêuticos à base de desoxicolato de sódio de anfotericina B e suas formulações lipossomais, as pentaminidas e os imunomoduladores, são as drogas indicadas, entretanto, seu uso é sob regime exclusivamente hospitalar, devido à alta toxicidade exibida pelos medicamentos. Além de existir cepas do parasito já resistente a esses princípios ativos, fato esse observado na Índia, Sudão, entre outras regiões (TEMPONE *et al.*, 2005; ESCOLÁN *et al.*, 2005; SHARIF *et al.*, 2006). Tendo em vista essa situação, a O.M.S. direcionou esforços para pesquisa de novas drogas. Como resultado, no ano de 2000 foi disponibilizado uma nova droga de uso oral, o Miltefosine, um hexadecilfosfocolina, originalmente desenvolvido para tratar câncer (MICHALICK; GENARO, 2005).

Conforme MACHADO *et al.* (2007), ainda não existem disponíveis vacinas para nenhuma forma de leishmaniose. A autora enfatiza a necessidade premente de pesquisas

tanto no campo de novos princípios ativos sintéticos quanto naturais para o tratamento das leishmanioses.

O início do programa de controle da leishmaniose chagasi no Brasil, foi na década de 50 e tinha como objetivos, quebrar os elos epidemiológicos da cadeia de transmissão da doença, ou seja, diagnosticar e tratar os doentes, eliminar os cães com sorologia positiva e combater as formas adultas do inseto vetor. A falta de evidência, entretanto, que essas medidas tiveram impacto positivo na redução da incidência da doença humana no país fez com que em 2000 o Ministério da Saúde / FUNASA convocasse um comitê de especialistas para conjuntamente com a gerência do programa reavaliassem as estratégias de controle empregadas e redirecionassem as ações de controle visando à racionalização da atuação (MICHALIK; GENARO, 2005).

Um grande passo para se alcançar as respostas foi dado pela Fundação Nacional de Saúde e Sociedade Brasileira de Medicina Tropical ao patrocinarem oficinas de trabalho, conferências e simpósios, que têm contribuído para melhor entendimento da complexidade do problema (MELO, 2004).

2.6. Métodos *in vitro* x *Leishmania*

O termo *in vitro* é uma expressão de origem latina que designa todos os processos biológicos que ocorrem fora dos sistemas vivos, no ambiente controlado e fechado de um laboratório e que são executados geralmente em um recipiente de vidro (MCQUEEN, 1989).

Os primeiros estudos *in vitro* acerca do cultivo de *Leishmania* foram realizados com formas promastigotas em ensaios axênicos, posteriormente foi demonstrado a diferenciação de promastigotas em amastigotas mediante variações de pH e temperatura em meios livres de células (ZILBERSTEIN; SHAPIRA, 1994).

Foi possível, também, *in vitro* realizar a maturação e replicação de *Leishmania* em macrófagos, principal célula hospedeira durante o processo de infecção, bem como exibir infecções em células epiteliais e dendríticas (GHOSH; BANDYOPADHYAY, 2004).

Por outro lado, diversos compostos químicos isolados a partir de extratos vegetais têm comprovado atividade leishmanicida sobre formas promastigotas e/ou amastigotas em ensaios *in vitro*. Já foi reportado a atividade leishmanicida de aminoglicosteróides e aminosteróides (KAM *et al.*, 2000), flavonóides (ARAÚJO *et al.*, 2003), lignanas (BARATTA *et al.*, 2000), alcalóides (MAHIOU *et al.*, 1994), terpenóides (SAUVAIN *et al.*, 1996), chalconas (BOECK *et al.*, 2006) e glicosídeos iridóides (MITTAL *et al.*, 1998).

Quanto aos óleos essenciais obtidos das plantas aromáticas, alguns deles também têm demonstrado ação leishmanicida *in vitro*, a exemplo o óleo essencial oriundo do *Cróton cajurana* (ROSA *et al.*, 2003).

Apesar de vários estudos nessa área, ainda existem muitas espécies vegetais com potencial atividade leishmanicida a serem avaliados.

Dentre as diversas metodologias utilizadas para realização de ensaios *in vitro* com a finalidade de avaliar a ação antileishmanial de produtos advindos de plantas se destacou na literatura consultada o ensaio com difeniltetrazolium brometo (MTT). Esse teste baseia-se na medida do dano induzido por uma droga no metabolismo celular de glicídeos usualmente através da atividade de desidrogenases. A atividade celular é quantificada pela redução do brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium (MTT). As reações com o teste acima citado são usadas para localizar a atividade de desidrogenases presentes em células viáveis. O sal de tetrazólio não reage diretamente com as desidrogenases, mas com os produtos da reação nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (reduzido) - NADH ou nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato (reduzido) - NADPH que reduzem o MTT para a formazana correspondente. A quantificação da inibição enzimática é realizada espectrofotometricamente permitindo a obtenção dos valores de IC_{50} - concentração das drogas que inibem 50% da atividade enzimática (MACIEL *et al.*, 2002).

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, C. M.; FERNANDEZ, E.; CENNOVA, D. C. Urban Visceral Leishmaniasis in Venezuela, *Mem. do Instituto Osvaldo Cruz*, 93, p. 15-16, 1998.
- AHMAD, I.; BEG, A. Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 INDIAN plants against multi-drug resistant human pathogens, *Journal Ethnopharmacol.* 74, p. 113-123, 2001.
- AKDOGAN, M.; GULTEKIN, F.; YONTEM, M. Effect of *Mentha piperita* L (labiateae) and *Mentha spicata* (Labiateae) on iron absorption in rats, *Toxicol. IND. Health*, 20 (6), p. 119-122, 2004.
- ARAÚJO, C. A. C.; ALEGRIO, L. V.; LEON, L. L. Antileishmanial activity of compounds extracted and characterized from *Centrolobium sclerophyllum*. *Phytochemistry*, 49, p. 751-754, 1998.
- AVATO, P.; FORTUNATO, I. M.; RUTA, C.; D'ELIA, R. Glandular Hair and Essential oils in micropopagated plants of *Salvia officinalis* L., *Plant Science*, 2005.
- BARATA, L. E. S.; SANTOS, L. S.; FERRI, P. H.; PHILLIPSON, J. D.; PAINE, A.; CROFT, S. L. Anti-leishmanicidal activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. *Phytochemistry*, 55, p. 589-595, 2000.
- BARATTA, M. T.; DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G.; BIONDI, D.M.; RUBERTO, G. Chemical Composition, antimicrobial and oxidative activity of laurel, Sage, Rosemary, oregano and coriander essential oils, *Journal of essential oils*, 10, p. 618-627, 1998.
- BATISTA-PEREIRA, L. G.; FERNANDES, J. B.; CORRÊA, A. G.; SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C. Electrophysiological responses of *Eucalyptus brown* Looper *Thyrinteina* Arnoibia to Essential Oils of Seven *Eucalyptus* Species, *BRAS. CHEM, SOC.*, 17(3), p. 1-12, 2006.
- BELL, E. A.; CHARLWOOD, B. V. Essential Oils. IN: BELL, E. A, Charlwood, B.V. **Secondary Plants Products**, chap. 05, New York: Springer – Verlag, 1980.
- BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic developments in the last 10 years, *Clin Infect Dis.*, 24, p. 684-703, 1997.
- BERTINI, L. M.; PEREIRA, A. F.; OLIVEIRA, C. L. L.; MENEZES, E. A.; MORAIS, S. M.; CUNHA, F. A. CAVALCANTI, E.S.B. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil, *Pharm. Bras*, 48, p. 80 – 83, 2005.
- BETONI, J. E. C.; MANTOVANI, R. P.; BARBOSA, L. N.; DISTASI, L. C.; FERNANDES-JUNIOR, A. F. Synergism Between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases, *MEM. INT. Osvaldo Cruz*, 101 (4), p. 387-390, 2006.
- BOECK, P.; FALCÃO, C. A. B.; LEAL, P. C.; YUNES, R. A.; CECHINEL, F. V.; TORRES-SANTOS, E. C.; ROSSI—BERGMANN, B. Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. *Bioorg Med Chem*, 14, p. 1538-1545, 2006.
- BOYD, E. M.; PEARSON G. L. The expectorant action of volatile oils, *American Journal of Medical Science*, 06, p.09-13, 1946.

BRASIL, MINISTERIO DA SAÚDE-Fundação Nacional de Epidemiologia. **Guia de Vigilância Epidemiológica**, Brasília – DF, 1998.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Epidemiologia. **Guia de Vigilância Epidemiológica**, Brasília – DF, 2002.

BRUNETON, J. How to pack the essential oils. In: BRUNETON, J. **Pharmacognosie. Plytochimie plantes medicinales**, 2 ed., chap. 12, Paris: Tec Doc, 1993.

BUSATTA, C, **Caracterização Química e Atividade Antimicrobiana *in vitro* e em alimentos dos extratos de orégano e manjerona**. Dissertação de Mestrado, EA/URI, Campus Erechim, Rio Grande do Sul, RS, Brasil, 2006.

CALDAS, A. J. M.; SILVA, D. R. C.; PEREIRA, C. C. R.; NUNES, P. M.; SILVA, B. P.; SILVA, A. M. Infecção por *Leishmania chagasi* em crianças de uma área endêmica de leishmaniose visceral americana na ilha de São Luis/ Ma, Brasil, *REV. SOC. Bras. Med. Trop.*, 34, p. 445-451, 2001.

CAMACHO, M. R.; PHILLIPSON, J. D.; CROFT, L. S.; KIRBY, G. C.; WARHURST, D. C.; SOLIS, P. N. Terpenoids from *Guarea rhopalacarpa*. *Phytochemistry*, 56, p. 203-210, 2000.

CAMARGO, L. B., LANGONI, H. Impact of Leishmaniasis on Public Health, *J. Venon. Anim. Toxinsinci. Trop. Dis.* 12 (4), p. 527-548, 2006.

CAMARGO, L. M. A.; BARCINSK, M. A. Leishmanioses, feridas bravas e calazar, *Ciência cultura*, 1, p. 34-37, 2003.

CAMPINO, L. M. Canine resevoir and leishmanioseis: epidemiology and disease. In: FARRELL, H. **Word Class Parasites**, chap.04, Boston: Klumer Academic. Publishers, 2003.

CARVALHO, C.M.; COSTA, C.P.M.; SOUZA, J. S.; SILVA, R. H.; OLIVEIRA, C. L.; PAIXÃO, F. J. R. Rendimento da produção de óleo essencial de capim-santo submetido a diferentes tipos de adubação, *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, 5(2), p. 1 -8, 2005.

CHAU-BACAB, M.J.; PENA - RODRIGUEZ, Plant Natural products with leiishmanicidal activity, *Natural products reports*, 18, 674-688, 2001.

CINIGLIO, G. **Eucalyptus para a produção de óleos essenciais**, Piracicaba: ESALQ/USP/ Departamento de Ciências Florestais, p. 1-15, 1993.

COSTA, L. C. B.; CORRÊA, R. M.; CARDOSO, J. C. W.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; FERRI, P. H. Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de capim-limão, *HORTIC. BRAS*, 23 (4), p. 01-08, 2005.

DATASUS, Disponível em: <http://w3.datasus.gov.br/datasus/datasus.php>, Consultada em 18/07/2007.

DAVID E. F. S.; MISCHAN, M.M.; BOARD, C. S .F. Desenvolvimento e rendimento de óleo essencial de mentha (*Mentha piperita* L.) cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de fósforo, *Biotemas*, 20 (2), p. 15-26, 2007.

DAVIES, C. R., KAYE, P.; CROFT, S. L.; SUNDAR, S. Leishmaniasis: new approaches to disease control, *B.H.J.*, 326, p. 3773-3782, 1992.

DE LA CRUZ, M. G. F. **Plantas Medicinais Utilizadas por Raizeros: uma abordagem etnobotânica no contexto da saúde e doença**, Dissertação de Mestrado, ISC/UFMT, Mato Grosso, MT, Brasil, 1997.

ESCOLÁN. P.; RIVERA, M.; ALGER, J. Falla Terapéutica Del Antimoniato de Meglumina en el Tratamiento de la leishmaniasis visceral. Informe de un caso, *Rev. Med. Mondur*, 73, p. 172-178, 2005.

ESTANISLAU, A. A.; BARROS, F. A. S.; PENA, A. P.; SANTOS, S. C.; FERREIRA, P. H.; PAULA, J. R. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de cinco espécies of *Eucalyptus* cultivados em Goiás, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 11 (2), p. 95-100, 2001.

FALSENJAK, V.; PELJNJAK, S.; KUSTRAK, D. Microcapsules of Sage Oil: essential oils content and antimicrobial activity, *Pharmazie*, 42, p. 419-420, 1987.

FLORÃO, A. **Avaliação das atividades biológicas de óleos essenciais de quatro espécies de *Baccharis*, Asteraceae**. Dissertação de Mestrado, UFPR, Curitiba, PR, Brasil, 2006.

FRANCO, L. L. As sensacionais 50 plantas medicinais campeãs de poder curativo. In: FRANCO, L. L. *O Naturalis*, 4 Ed., cap.09, Curitiba: Lobo Franco Ltda, 1999.

GALANTI, S. **Produção de óleo essencial do *Eucalyptus citriodora* Hook., no município de Torrinha**, estado de São Paulo. Monografia de Conclusão de Curso, EF/UFV, São Paulo, SP, Brasil, 1987.

GHOSH, M.; BANDYOPADHYAY, S. Interaction of Leishmani parasites with dendritic cells and its functional consequences. *Immunobiology*, 209, p. 173-177, 2004.

GONÇALVES, L. A.; BARBOSA, L.C. A.; AZEVEDO, A. A.; CASALI, V. W. D.; NASCIMENTO, E. A. Produção e Composição do óleo essencial de alfavaquina (*Ocimum selloi*; Benth) em resposta a dois níveis de radiação solar. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 6, p. 8-14, 2003.

GRACE, K. Introdução à aromaterapia. In: GRACE, K. **Aromaterapia: o poder curativo dos aromas**, cap. 01, São Paulo, Mandarim, 1999.

GUERIN, P. J.; OLLIARO, P.; SUNDAR, S.; BOELAERT, M.; CROFT, S. L.; DESJEUX, P.; WAISUNA, M. K.; BRYCESON, A. D. Visceral Leishmaniasis: current status of control, diagnosis and treatment an a proposed research and development agenda, *Lancet. Infect. Dis.*, 2, p. 494-501, 2002.

KAM, T. S.; SIM, K. M.; KOYANA, T.; TOYOSHIMA, M.; KOMYAMA, K. Cytotoxic and leishmanicidal aminoglycosteroids and aminosteroids from *Holarrhena curtissi*. *J. Nat. Prod.*, 61, p. 1332-1336, 1997.

KOTHARI, R. The Indian essential oil industry, *Perfumer and flavorist*, 30, p. 46-50, 2005.

KIRIMER, N.; ISCAN, G.; KURKCUOGLU, M.; CAN BASER, K. H.; DEMIRCI, F. Antimicrobial Screening of *Mentha piperita* Essential Oils, *J. Agric. Food Chem*, 50, p. 3943-3946, 2002.

KISHORE, N.; MISHRA, A. K.; CHANSOURIA, J. P. N. Fungitoxicity of essential oils of against Dermatophytes, *Mycoses*, 36, p. 211-215, 1993.

KUSTRAK, I.; PEPELJNJAK, S. Antimicrobial Activity of Dalmatian Sage oil from different regions of the Yugoslav Adriatic Coast, *ACTA Pharmaceutica Jugoslavica*, 39, p. 209-213, 1989.

LAVABRE, M. Os aromas e perfumes na história. In: LAVABRE, M. **Aromaterapia: a cura pelos óleos essenciais**, 4 Ed., cap. 01, Rio de Janeiro: Record, 1997.

LEAL, T. C. A. B.; FREITAS, S. P.; SILVA, J. F.; CARVALHO, A. J. C. Avaliação do efeito da variação estacional e horário de colheita sobre o teor foliar de óleo essencial de capim-cidreira (*Cymbopogon citratus*) (DC.) Stapf., *Revista Ceres*, 278 (48), p.445-453, 2001.

LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L.; SANTOS, B. H. C. Propriedades antibacterianas de óleos essenciais de plantas medicinais, *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, 7, p. 251-258, 2003.

LÓPEZ, I. M.; GOVIN, E. S.; GUERRA, C. C. Estandarizacion de *Mentha arvensis* L., medicamento herbário con actividad antihistamínica, *Rev. Cubana Plant. MED*, 3 (1), p. 46-50, 1998.

LORENZI, H. *Eucalyptus* como planta aromática. In: LORENZI, H. **Árvores Exóticas no Brasil: madeiras, ornamentais e aromáticas**, cap. 30, São Paulo: Instituto Plantarum, 2003.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA-JR, V. F. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares, *Química Nova*, 25 (3), p. 429-438, 2002.

MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L.; CASTRO, S. L. Activity of Brazilian and Bulgarian própolis against different species of *Leishmania*, *MEM. INT. Osvaldo Cruz*, 102 (1), p. 73-77, 2007.

MCQUEEN, C. A. **In vitro toxicology: model systems and methods**. 1 Ed., Cap. 2, Engled: Medical, 1989.

MAHIOV, V.; ROBLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVE, A.; ROJAS de ARIAS, A.; INCHAUSTI, A.; YALUFF, G.; FOURNET, A. Aporphine alkaloids from *Guatteria foliosa*. *J. Nat. Prod.*, 57, p. 890-895, 1994

MARUYAMA, N.; SEKIMOTO, Y.; ISHIBASHI, H.; INOUE, S.; OSHIMA, H.; YAMAGUCHI, H. ABE, S. Suppression of neutrophil accumulation in mice by cutaneous application of geranium essential oil, *J. Inflamm*, 2(1), p. 34-39, 2005.

MARZOCHI, M.C.A.; COUTINHO, S. G.; SOUZA, W. J. S. Leishmaniose visceral no Rio de Janeiro: Aspectos sorológicos durante o tratamento de casos humanos autóctones. Cepas isoladas. In: *XVII Congresso da Sociedade Brasileira de Medica Tropical*, Caldas Novas, GO, 1981.

MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F.; SCHUBACH, A.O. Leishmania Visceral Americana (Calazar Americano ou Neotropical). In: CIMERMAN, B; CIMERMAN, S. **Parasitologia Humana e Seus Fundamentos Gerais**, 1 Ed., Cap.10, São Paulo: Atheneu, 1999.

MAURICIO, I. L. ; GAUNT, M. W. ; STOTHARD, J. R. ; MILLES, M. A. Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions, *Rev. Parasitol.*, 122, p.393 – 403, 2000.

MELO, N. Leishmaniose visceral no Brasil: desafios e perspectivas, *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 23 (1), p. 41-47, 2004.

MENDES, W. S.; TROVÃO, J. R. SILVA, A. A. M. Dinâmica da ocupação do espaço na cidade de São Luís e a Leishmaniose visceral, *Cad Saúde Pública*, 16(4), p. 872-875, 2000.

MICHALICK, M. S. M.; G. O. Leishmaniose visceral Americana. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**, 11 Ed., cap. 10, São Paulo: Atheneu, 2005.

MICHALICK, M. S. M. Gênero *Leishmania*. In: NEVES, D. P. **Parasitose Humana**, 11 Ed, cap. 7, São Paulo: Atheneu, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**, Brasília - DF, 2003.

MISHRA, A. K.; DUBEY, N. K. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities, *APPL. NUIR. MICROBIAL*, 60, p.1101-1105, 1994.

MITTAL, N.; GUPTA, N.; SAKSENA, S.; GOYAL, N.; ROY, U.; RASTOGI, A. K. Protective effect of picrovile from *Pichrorhiza kurroa* against *Leishmania donovani* infections in *Mesocricetus auratus*. *Life Sci*, 63, p. 1823-1834, 1998.

MORAIS, S. M.; CANTUNDA-JUNIOR, F. E. A.; SILVA, A. R. A.; MARTINS NETO, J. S. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de Croton do nordeste do Brasil, *Quim. Nova*. 29 (5), p. 907-910, 2006.

NASCIMENTO, J. C.; PAIVA, B. R.; MALAFRONTA, R. S.; FERNANDES, W. D.; GALATI, E. P. B. Natural infection of Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in a visceral – Leishmaniasis focus in Mato Grosso do Sul, Brasil, *Rev. Int. Med. Trop.*, 42(2), p. 119-122, 2007.

NASCIMENTO, I. B.; INNECCO, R.; MARCO, C. A.; MATTOS, S. H.; NAGÃO, E. O. Efeito do horário de corte no óleo essencial de capim-santo, *Revista Ciência Agronômica*, 34 (2), p. 169-172, 2003.

NETO. M. H. M.; CARDOSO, M. L. C.; SANT’ANA, D. M; G.; WANKO, N. S. **Noções sobre o organismo humano e utilização de plantas medicinais**. 3 ed. Cascavel: Assoeste p.203, 1995.

NICOLETTI, A. M.; OLIVEIRA--JUNIOR, M. A. ; BERTASSO, C.C.; CAPOROSSI, P. Y. ; TAVARES, A. P. L. Principais interações no uso de medicamentos fitoterápicos, *Pharm. Bras*, 57, p. 32-40, 2007.

NOGUEIRA, Y. L. ; GALATI, E. A. B. Reproduction of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* chagasi; in conditioned cell culture growth medium, *Rev. Inst. Med. Trop*, 48 (3), p. 147-150, 2006.

OLIVEIRA, R. A. G, LIMA, E. O.; VIEIRA W. L.; FREIRE, K. R. L.; TRAJANO, V. N.; LIMA, I. O.; SOUZA, E. L. TOLEDO, M. S.; SILVA-FILHO, R. N. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16(1), p. 77-82, 2006.

OKA; C.; ROPERTO, A. Herbário Aquiléa. Hortelã, São Paulo, Disponível em: <http://www.cotianet.com.br/eco/herb/hort.html>, consultado em 19/08/2007.

ONAWUNMI, G. O.; OGUNLANA, E. O. A study of the antibacterial activity of the essential oil of lemon grass (*Cymbopogon citratus*), *Journal Crude Drug*, 24, 421-423, 1987.

PANDEY, A.K; ACHARYA, D. Chemical composition and antimycotic activity of the essential oils of corn mint (*Mentha arvensis*) and lemon grass (*Cymbopogon flexuosus*) against human, *Pathogenic Fungi*, 41 (6), p. 421-425, 2003.

PRICE, S. Aromas e óleos essenciais nas suas relações com as emoções. In: PRICE, S. **Aromaterapia e as emoções: como usar óleos essenciais para equilibrar o corpo e a mente**, cap. 03. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, 2001.

PRICHARD, A. J. N. The use of essential oils to treat snoring, *Rev. Phytotherapy Research*, 18, p. 696-699, 2004.

QUEIROZ, E. F.; ROBLOT, F.; CAVE, A. Pessoin and spinosine, two catecholic berberines from *Annona sp. nescens*. *J. Nat. Prod.*, 59, p. 438-440, 1996.

RADULESCU, V.; CHILIMENT, S.; OPREA E. CAPILLARY Gas Chromatography – Mass Spectrometry of Volatile and Semi – volatile of *Salvia Officinalis*, *Journal Chromatographya*, 1027, p. 121-126, 2004.

RAJESWARA RAO, B. R. Biomass and essential oil yields of commint (*Mentha arvensis* L., var. *piperascens* Malinvaud ex Holmes) planted in different months in semi-arid tropical climate, *Industrial crops and products*, 10, p. 107-113, 1999.

ROSA, M. S. S.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; BIZZO, H. R.; RODRIGUES, I. A.; SOARES, R. M. A.; SOUTO-PADRÓN, T.; ALVIANO, C. S.; LOPES, A. H. C. S. Antileishmanial Activity of a Linalool-Rich Essential Oil from *Cróton cajurana*. *Antimicrobial Agents and chemotherapy*, 47 (6), p. 1895-1901, 2003.

RUSSOMANNO, O. M. R.; KRUPPA, P. C.; FIGUEIREDO, M. B. *Oidium cisteri – punicea* em plantas de hortelã-pimenta, *Fitopatologia Brasileira*, 30 (5), p. 551-557, 2005.

SCAVRONI, J.; BOARO, C. S. F.; MAYO MARQUES, M. O.; FERREIRA, L. C. Yield and composition of the essential oil of *Mentha piperita* L., (Lamiaceae). grown with biosolid, *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17 (4), p. 345-352, 2005.

SHASANY, A. K.; KHANUJA, S. P. S.; DHAWAN, S.; KUMAR, S. Positive correlation between menthol content and *in vitro* menthol tolerance in *Mentha arvensis* L., cultivars, *Journal BIOSCI.*, 25 (3), p. 263-266, 2000.

SÁNCHEZ, E.; GARCIA, D.; CARBALLO, C.; CRESPO, M. *Mentha x Piperita*, *Rev. Cubana Plant Med*, 1 (3), p. 40-45, 1996.

SANGWAN, N.K.; VERMA, B. S.; VERMA, K. K.; DHINDSA, K.S. Nematicidal Activity of some essential plant oils, *Pestic. SCI*, 28, p. 331-335, 1990.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, M. G.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil, *Brazilian Journal of Microbiology*, 35, p. 275-280, 2004.

SAUVAIN, M.; KUNESCH, N.; POISSON, J.; GANTIER, J. C.; GAYRAL, P.; DEDET, J. P. Isolation of leishmanicidal triterpenes and lignans from Amazonian liana *Doliocarpus dentatus* (Deliaceae). *Rev. Phytother*, 10, p. 1-4, 1996.

- SEMEN, E.; HIZIROGLU. Production, Yield and Derivatives of Volatile Oils from Eastern Redcedar (*Jeniperus virgiana* L.), *American Journal Environmental Sciences*, 1(2), p.133-138, 2005.
- SHARIF, M.; ZIAEL, H.; AZADBAKHT, M.; DARYANI, A.; EBADATTALAB, A.; ROSTAMI, M. Effect of Methanolic Extracts of *Artemisia aucheri* and *Camellia sinensis* on *Leishmania major* (In Vitro), *Turk. J. Med. Sci.*, 36 (6), p. 365-369, 2006.
- SIDIBE, L.; CHALCAT, J. C.; GARRY, R. P.; LIACOMBE, L.; HARAMA, H. Aromatic Plants of Mali (IV): Chemical composition of essential oils *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf., and *C. giganteus* (Hochst) Chiou, *J. Essent. Oil Rev*, 13, p. 110-112, 2001.
- SILVA, A. F. I BARBOSA, L. C. A.; CASALI, V. W. D.; NASCIMENTO, E. A. Composição química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L) POIT. (LAMIACEA), *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 6, p. 1-7, 2003.
- SILVA, P. H. M.; BRITO, J. O.; WAGEMAKER, T. A. L.; GABRIEL, M. V. Estudo preliminar de novas espécies de *Eucalyptus* para produção de óleos essenciais no Brasil. In: *Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo*, 10, Piracicaba, 2002. Resumos. São Paulo: USP, 2002.
- SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos Essenciais. IN: SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Da Planta ao Medicamento**, cap. 18, Rio Grande do Sul: editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999.
- SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos essenciais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. D.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia**, cap. 18, Porto Alegre, Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. D.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.(org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/EDUFSC, 1999.
- SIQUI, A. C.; SAMPAIO O., A. L. F.; SOUZA, M. C.; HENRIQUES, H. G. M. O.; Ramos, M. F. S. Óleos Essenciais – Potencial antiinflamatório, *Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento, Quimi. Nova*, 16, p.38 – 43, 2000.
- SRIVASTAVA, R. K.; SINGH, A. K.; KALRA, A.; TOMAR, V. K. S.; BANSAL, R. P.; PATRA, D. D.; CHANDY, S.; NAQUI, A. A.; SHARMA, S.; KUMAR, S. Characteristics of menthol mint *Mentha arvensis* cultivated on Industrial scale in the Indo-Gangetic plains, *Industrial Crops and Products*, 15, p. 189-198, 2002.
- SUNDAR, S.; PAI, K; SAHU, M. Immunochromatographic scriptest detection of anti K39 antibody in Indian visceral leishmaniasis, *Ann.Trop. Med. Parasital*, 96, p. .19-23, 2002.
- TAPIA, A.; CHEEL, J.; THEODULOZ, C.; RODRIGUEZ, J.; SCHMEDA-HIRSCHHANN, G.; GERTH, A.; WILKEN, D.; JORDAN, M.; Radical Scavengers from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf plants cultivated in bioreactors by the temporary immersion (TIS) principle, *Z. Naturforsch*, 62, p. 447-457, 2007.
- TEMPONE, A. G.; BORBOREMA, S. E. T.; ANDRADE-JUNIOR, H. E.; GUALDA, N. C. A.; YOGI, A.; CARVALHO, C. S.; BACHIEGA D.; LUPO, F. N.; BONOTTO, S. V.; FISHER, D. C. H. Antropozool activity of Brazilian plant extracts from iso-quinoline alkaloid- producing families, *Phytomedicine*, 12, p. 382-390, 2005.

- TISSERAND, M. **Aromatherapy for Women**. 1 ed. Wellingboreni, Inglaterra: *Thorsons*, 1985.
- VÁGI, E.; SIMÁNDI, B.; SUHAJDA, A.; HÉTHELVI, É. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L., extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbondioxide, *Food Research International*, 38, p. 51-57, 2005.
- VELICKOVIC, D. T.; RANDJELOVIC, N. U.; RISTIC, M. S.; SMELCEROVIC, A. A.; VELICKOVIC, A. S. Chemical Composition and antimicrobial action of the ethanol extracts of *S. pratensis* L., *S. glutinosa* L., *S. aethiopis* L., *Journal Serbia*, 2002.
- VIANA, G. S. B.; VALE, T. G.; PINHO, R. S. N.; MATOS, F. J. A. Antinocicetive effect of the essential oil from *Cymbopogan citratus* in mice, *J. Ethnopharmacol*, 70, p. 323-327, 2000.
- VIDA, J. B.; CARVALHO-JUNIOR, A. A.; VERZIGNASSI, J. R. Primeira ocorrência de ferrugem em capim-limão causada por *Puccinia cymbopogonis* no Brasil, *Summa Phytopathol*, 32 (1), p. 89-91, 2006.
- VIDAL, F.; GADELHA, A. P. R.; LOPES, C. S.; COELHO, M. G. P.; MONTEIRO-LEAL, L. H. *Giardia lamblia*: the effects of extracts and fractions from *Mentha x piperita* Lin., (Lamiaceae) on trophozoites, *Experimental Parasitology*, 115, p. 25-31, 2007.
- VITTI, A. M. S. **Avaliação do crescimento e do rendimento e qualidade do óleo essencial de procedências de *Eucalyptus Citriodora***. Dissertação de Mestrado, ESALQ/USP, São Paulo,SP, Brasil, 1999.
- WALKER, J. T.; MELIN, J. B. *Mentha x piperita*, *Mentha spicata* and effects of their essential oils on *Meloidogyne* in soil, *J. Nematol*, 28, p. 629-635, 1996.
- WATANABE, C. H.; NOSSE, T. M.; GARCIA, C. A.; PINHEIRO POUH, N. Extração do óleo essencial de menta (*Mentha arvensis* L.) por destilação por arraste a vapor e extração com etanol, *Revista BRAS. PI. MED*, 8(4), p. 76-86, 2006.
- WOOLF, A. Essential Oil Poisoning, *J. Toxicol Clin Toxicol*, 37, p. 721-727, 1999.
- WHO. **WHO Monographs on selected medicinal plants**. Geneva: World Health Organization. 1999. V. 1, p. 288, 2002.
- XAVIER, A. **Variabilidade genética de óleo essencial e de crescimento em progênes de meio-irmãos de *Eucalytpus citriodora* Hook**. Dissertação de Mestrado, EF/UFV, São Paulo,SP, Brasil, 1993.
- ZILBERSTEIN, D.; SHAPIRA, M. The role of pH and temperature in the developmental of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol*, 48, p. 449-470, 1994.

3 – CAPÍTULO II

Avaliação da atividade antileishmanial dos óleos essenciais obtidos das plantas *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., *Eucalyptus citriodora* Hook., *Mentha arvensis* L. e *Mentha piperita* L.

3.1 - RESUMO

A leishmaniose visceral acomete milhões de pessoas no mundo, as drogas existentes contra essa parasitose desencadeiam graves efeitos colaterais, requerem tratamentos longos e acarretam alto custo, além de estudos já terem comprovado cepas resistentes a elas. Esse trabalho avaliou *in vitro* a atividade dos óleos essenciais das folhas frescas obtidos por arraste de vapor das plantas *Cymbopogon citratus*, *Eucalyptus citriodora*, *Mentha arvensis* e *Mentha piperita* contra as formas promastigotas de *Leishmania* (L.) *chagasi*. A ação foi verificada por ensaio colorimétrico com difeniltetrazolium (MTT). As concentrações efetivas 50% (EC₅₀) foram determinadas por curvas sigmoidais dose-resposta. A pentamidina foi o fármaco controle positivo. Os resultados demonstraram que os óleos essenciais nas condições desse experimento exibiram ação contra promastigotas de *Leishmania* (L.) *chagasi*. O óleo de maior efetividade foi *Cymbopogon citratus* com EC₅₀ de 21,91 µg/mL.

Palavras-chave: Atividade antileishmanial, óleos essenciais.

Assessment of the antileishmanial activity of essential oils of plants *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., *Eucalyptus citriodora* Hook., *Mentha arvensis* L. e *Mentha piperita* L

3.2 – ABSTRACT

The visceral leishmaniasis affects millions of people worldwide, the existing drugs against this parasitosis cause serious side effects, require long-lasting treatment and result in high cost, in addition to studies that have already shown strains resistant to them. This paper evaluated *in vitro* the activity of essential oils of fresh leaves obtained by steam drag of plants of plants *Cymbopogon citratus*, *Eucalyptus citriodora*, *Mentha arvensis* e *Mentha piperita* against promastigots forms of *Leishmania* (L.) *chagasi*. The action was verified by colorimetric test with difeniltetrazolium (MTT). The effective concentrations 50% (EC₅₀) were determined by dose-response sigmoidal curves. The pentamidine was positive control drug. The results showed that the essential oils in the conditions of this experiment displayed against promastigots of *Leishmania* (L.) *chagasi*. The oil of greater effectiveness was *Cymbopogon citratus* with EC₅₀ of 21,91 µg/mL.

Keywords: Antileishmanial activity, Essential oils

3.3 – INTRODUÇÃO

As leishmanioses são parasitoses causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, sendo transmitidos para humanos pela picada de fêmeas de dípteros da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, conhecidos genericamente por flebotomíneos. Essas parasitoses são endêmicas em 88 países, com o total de 350 milhões de pessoas em risco. A estimativa global de casos de leishmaniose é de 12 milhões, ocorrendo 2 milhões de novos casos a cada ano, sendo 0,5 milhão dos casos de leishmaniose visceral (AHUA, 2007).

A Leishmaniose visceral (LV) constitui-se na forma mais grave, pois, quando não tratada adequadamente determina elevados índices de letalidade e encontra-se amplamente distribuída no mundo, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia, Oriente Médio, África e Américas. O Brasil é o país americano que apresenta o maior número de casos, sendo o nordeste o detentor da maior incidência com mais de 97% dos casos notificados (MELO, 2004).

O estado de Sergipe é considerado como endêmico para LV, consulta realizada no Sistema de Informação de Agravos Notificáveis (SINAM) demonstrou que no período de 2001 a 2006 foram notificados 230 casos de leishmaniose visceral nesse estado, distribuídos em 41 municípios, sendo que 11,74% dos acometidos tiveram desfecho para óbito (DATASUS, 2007).

O tratamento da LV é realizado com derivados antimoniais pentavalente como droga de primeira escolha. Elas desencadeiam graves efeitos colaterais, restrições de uso e estudos já demonstraram existir cepas resistentes (ROSA *et al.*, 2003). Como drogas de segunda escolha têm a pentamidina e anfotericina B que apresentam usos limitados por serem altamente tóxicas, possuírem alto custo e administração exclusivamente a nível hospitalar sob vigilância médica (TEMPONE *et al.*, 2005).

Por outro lado, a evolução científica das plantas medicinais usadas nas preparações de remédios populares tem provido a medicina moderna com medicamentos eficazes para o tratamento de doenças causadas por protozoários parasitas. O primeiro medicamento desenvolvido para o tratamento da malária e amebíase foi obtido dos alcalóides quinina e emetina, a partir de diferentes espécies dos gêneros *Cinchona* e *Cephalis* (CHAU-BACAB; PENA-RODRIGUEZ, 2001; KVIST *et al.*, 2006).

Várias pesquisas com óleos essenciais que são produtos oriundos do metabolismo secundários das plantas aromáticas têm sido desenvolvidas em condições *in vitro* contra as formas promastigotas de *Leishmania* (L.) *chagasi*, mas apesar da grande importância desses estudos, por serem valores preditivos da ação leishmanicida exercidas pelos óleos

essenciais, pesquisas complementares usando as formas intracelulares amastigotas do protozoário em macrófagos de hospedeiros vertebrados, bem como a citotoxicidade deles faz-se mister (SAUVAIN *et al.*, 1993).

No Brasil tem sido crescente o uso dos óleos essenciais das plantas *Cymbopogon citratus*, *Eucalyptus citriodora*, *Mentha arvensis* e *Mentha piperita* na indústria alimentícia, cosmética, saneante e farmacêutica. Estudos científicos têm comprovado a ação dos óleos essenciais dessas plantas contra bactérias, fungos, helmintos e protozoários (GOKALP *et al.*, 2002; BERTINE *et al.*, 2005; VIDAL *et al.*, 2007; ESTANISLAU *et al.*, 2007).

Na literatura consultada não foram observados estudos relacionando a efetividade dos óleos essenciais das folhas frescas das plantas supra citadas contra as formas evolutivas do protozoário *Leishmania* (L) *chagasi*.

A partir dessa premissa, esse estudo objetivou demonstrar a atividade *in vitro* dos óleos essenciais obtidos das folhas frescas das plantas *Cymbopogon citratus*, *Eucalyptus citriodora*, *Mentha arvensis* e *Mentha piperita* contra as formas promastigotas de *Leishmania* (L) *chagasi*.

3.4 - MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 - Material botânico

As folhas frescas de *C. citratus* foram colhidas na Fazenda Mãe Terra e as de *C. citriodora* na Fazenda Terra Nova, ambas pela manhã. As fazendas estão localizadas no município de Santana de São Francisco, SE - Brasil. As folhas foram selecionadas, lavadas com água destilada, cortadas e pesadas.

3.4.2 - Reagentes utilizados

Meio de cultivo M-199, $C_{24}H_{32}ClFeN_4O_4$ (Hemina), (3 – [4,5 – dimethylthiazol – 2 – yl] 2,5 – diphenyltetrazolium bromide) – MTT (Sigma Chemical Co. - St. Louis, MO, EUA), dodecyl sulfato de sódio (SDS), ácido clorídrico (HCl), salina tamponada com fosfato – PBS (Merck KgaA – Darmstadt, Alemanha), soro bovino fetal (Cultilab, São Paulo/SP-Brasil) e pentamidina (Eurofarma, São Paulo/SP-Brasil).

3.4.3 - Extrações dos óleos essenciais

Para as extrações dos óleos essenciais das folhas de *C. citratus* e *E. citrodora* foi utilizado o método por arraste de vapor, conforme ALENCAR *et al.* (1984). O tempo de extração foi de aproximadamente 2 horas para cada planta e os óleos obtidos foram acondicionados em frascos de vidro de cor âmbar, hermeticamente fechados e armazenados na temperatura de -15°C até as análises. Os óleos essenciais das plantas *M. arvensis* e *M. piperita* foram adquiridas junto à Aromalândia, Belo Horizonte (MG).

3.4.4 - Rendimento dos óleos essenciais

O rendimento foi calculado pelo volume de cada óleo essencial obtido dividido pela sua massa de folhas frescas e o resultado multiplicado por 100, segundo RODRIGUES (2007).

3.4.5 - Caracterização química dos óleos essenciais por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/MS)

As análises foram realizadas em um equipamento SHIMADZU GS-MS, modelo QP5050A, utilizando-se uma coluna de sílica fundida (30m x 0,25mm) com fase estacionária ZB-5MS (0,25mm de espessura filme). O gás Hélio foi utilizado para arraste com fluxo de 1,8 mL/min e a temperatura foi programada mantendo 50°C por 2 minutos, seguido de um aumento de 4°C até atingir 200°C. Logo depois a razão de aquecimento foi alterada para 15°C/min até atingir 250°C, mantendo-se constante essa temperatura por 15 minutos; temperatura do detector de 250 °C. Foi injetado um volume de 0,5 µL de cada óleo essencial diluído em acetato de etila; taxa de partição do volume injetado 1:100 e pressão na coluna de 166 kPa. As condições do espectro de massa foram detector de captura iônica operando por impacto eletrônico e energia de impacto de 70 eletronsVolt (eV); velocidade de varredura 1000, intervalo de varredura 0,50 fragmentos/s e fragmentos detectados de 40 a 500 Dalton (Da). Os compostos foram identificados através da comparação com espectros encontrados na literatura, de acordo com ADAMS (2001) com espectros padrões existentes no banco de dados (NIST21 E NIST107) do equipamento e pela composição dos índices de retenção com aqueles preconizados na literatura. Os índices de retenção de Kovats (IK) foram determinados utilizando uma curva de calibração de uma série de n-alcanos (C₈-C₁₈) injetados nas mesmas condições cromatográficas da amostra, empregando a equação de VAN den DOOL e KRATZ (1963).

3.4.6 - Parasitas

As formas promastígotas de *Leishmania* (L) *chagasi* (MHOM/Br/1992/LD) foram mantidas em cultivo no meio M-199, suplementado com 10% de soro bovino fetal, 0,25% de hemina e 5% de urina humana em frascos com roscas (screw-capped), incubados em estufa BOD (Biological Oxygen Demand) à 24°C, conforme TEMPONE *et al.*, (2005).

3.4.7 - Determinação *in vitro* da atividade antileishmanial e da concentração efetiva de 50% (EC₅₀) dos óleos essenciais de *C. citratus*, *E. citrodora*, *M. arvensis* e *M. piperita*

As promastígotas em cultivo axênico foram utilizados para os experimentos, o crescimento ocorreu em fase logarítmica, a fase estacionária foi alcançada em 3×10^7 parasitas/mL. As concentrações dos óleos essenciais usadas para os ensaios estão na tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição das concentrações em µg/mL dos óleos essenciais e fármaco-padrão pentamidina usadas para o experimento.

Óleos essenciais	Concentrações (µg/mL)						
<i>C. citratus</i>	5,57	11,14	22,29	44,58	89,16	-	-
<i>E. citriodora</i>	11,19	22,39	44,79	89,58	179,16	358,33	
<i>M. arvensis</i>	5,86	11,72	23,43	46,87	93,75	187,5	374,89
<i>M. piperita</i>	11,71	23,43	46,87	93,75	187,5	-	-
Pentamidina	0,01	0,08	0,16	0,31	0,62	1,25	-

As promastígotas foram contadas em hemocitômetro (Câmara de Neubauer), ajustando-se a concentração dos parasitos para 1×10^6 com meio M-199. Foram utilizadas microplacas contendo 96 poços com 150 µL/poço total, sendo 100 µL dos óleos essenciais nas concentrações já citadas diluídos em meio M-199 e 50 µL da cultura, incubando-se as placas à 24°C por 48 horas. O fármaco pentamidina foi usado como controle positivo nas concentrações apresentadas na tabela 1. Os ensaios foram validados em quadruplicata.

A viabilidade dos parasitos foi avaliada utilizando ensaio colorimétrico com MTT para observar a atividade oxidativa mitocondrial. Para o ensaio foi usado 5 mg/mL de MTT, dissolvido em PBS (pH 7.0) e esterilizado por membrana Millipore (0,22 µm), de acordo com TADA *et al.* (1986). Foi adicionado em cada poço 20 µL de solução MTT e incubado a 37°C por 4 horas. Após foi adicionado 100 µL de SDS a 10% acidificado com HCl 0,01 M e incubado por 18 horas à 24°C. A leitura do ensaio foi realizada em um Multiskan MS-

UNISCIENCE, através da densidade ótica (D.O.) em 570 nm. O resultado da leitura foi correlacionado com o número de promastígotas vivas e padronizado para cada placa. O controle foi feito com promastígotas mantidas em cultivo axênico, essas foram usadas como parâmetro de 100% de viabilidade, segundo SARTORELLI *et al.* (2007).

As concentrações efetivas 50% (EC₅₀) dos óleos essenciais analisados foram determinadas por curvas sigmoidais dose-resposta, utilizando-se o Software Graph Pad Prisma 3.0, analisando-se os respectivos intervalos de confiança 95%.

3.5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo VITTIE e BRITO (1999), o rendimento em óleo essencial é considerado uma das mais importantes características a serem avaliadas nos plantios destinados à produção comercial. Ela expressa a quantidade de óleo produzido a partir de uma determinada quantia de folhas. No Brasil, os plantios de *E. citriodora* destinados à extração de óleo essencial apresentam rendimentos variando de 1,2% a 1,4%. Os cultivos de procedências de *E. citriodora* que apresentarem um maior rendimento seriam de grande interesse, pois poderia se extrair uma maior quantidade de óleo de uma mesma quantidade de folhas. Nesse estudo o rendimento de óleo essencial obtido por arraste de vapor das folhas frescas de *E. citriodora* coletadas na Fazenda Terra Nova foi de 5,6490% (Tabela 2). Observando esse resultado, se pode verificar que o rendimento em óleo essencial foi maior que os preconizados na literatura consultada para planta acima citada. A existência de um maior rendimento em óleo essencial nas folhas frescas de *E. citriodora* mostrou que outras pesquisas poderiam ser desenvolvidas visando analisar esse fato com acuidado já que um maior rendimento e qualidade desse óleo são de grande interesse comercial para o Brasil.

Já o rendimento em óleo essencial das folhas frescas de *C. citratus* coletadas na Fazenda Mãe Terra submetido ao cultivo orgânico e biodinâmico foi de 0,4669% (Tabela 2). Esse óleo apresenta um rendimento de 0,28% a 0,5% da massa fresca, conforme CARVALHO *et al.* (2005). Outros estudos devem ser desenvolvidos objetivando avaliar o rendimento desse óleo essencial em manejo orgânico e biodinâmico.

Tabela 2 – Rendimento dos óleos essenciais.

Folhas	Massa das folhas frescas (g)	Quantidade de óleo obtido (mL)	Rendimento (%)
<i>C.citratus</i>	4.925,93	23	0,4669
<i>E.citriodora</i>	1.948,27	110	5,6490

O óleo essencial das folhas frescas de *C. citratus* apresentou como compostos majoritários geranial (α – citral), 40,55%; neral (β – citral), 28,36% e mirceno, 24,21% (Tabela 3 e Figura 1). Segundo ORDÓNEZ *et al.* (2004) e MATOS (2000) as ações antibacteriana, antifúngica, calmante e espasmolítica comprovadas desse óleo são atribuídas aos constituintes geranial e neral, já o mirceno isolado não apresentou tais atividades, mas demonstrou ação analgésica.

Quanto ao óleo essencial das folhas frescas de *E. citriodora*, ele exibiu um alto teor de citronelal, 91,16% (Tabela 3 e Figura 1). Por ser o citronelal uma substância irritante da mucosa do trato respiratório preparações realizadas com óleo essencial dessa planta devem ser cuidadosamente administradas, corroborando as informações de MATOS (1997).

No que diz respeito a *M. arvensis* e *M. piperita*, elas apresentaram como compostos majoritários o iso-mentol (40,26%), a mentona (25,37%), o mentol (51,32%) e a mentona (20,15%), respectivamente (Tabela 3 e Figura 1). Os óleos essenciais das plantas acima referidas possuem atividades terapêuticas já cientificamente comprovadas em diversas infecções e afecções do homem (NICOLETTI *et al.*, 2007).

TABELA 3 - Constituintes químicos e suas respectivas porcentagens de óleos essenciais obtidos por arraste de vapor das folhas frescas de *C. citratus*, *E. citriodora*, *M. arvensis* e *M. piperita*.

<i>C. citratus</i> Componentes (%)	<i>E. citriodora</i> Componentes (%)	<i>M. arvensis</i> Componentes (%)	<i>M. piperita</i> Componentes (%)
Citronelol (0,10)	A - pineno (0,51)	Sabineno (0,10)	Limoneno (0,10)
β - (E)-ocimeno (0,19)	B-cariofileno (1,55)	β -Carofileno (0,12)	α -Terpinol (0,22)
β - (Z)-ocimeno (0,32)	Isopulegol (1,87)	Tricicleno (0,17)	α -Borboneno (0,36)
Linalol (0,49)	Citronelol (1,92)	Mirceno (0,24)	Germacreno-D (0,41)
iso-butilato de linalol (0,51)	iso-Isopulegol (2,24)	1,8-Cineol (0,24)	neo-iso-Mentol (0,49)
6-metil-5-hepten-2-ona (1,99)	Citronelal (91,16)	β -Terpineol (0,33)	iso-Pulegol (0,64)
Mirceno (24,31)	Não identificados (0,75)	α -Pineno (0,35)	Pulegona (1,06)
Neral (β – Citral) (28,36)		neo-iso-Mentol (0,37)	β -Carofileno (1,54)
Geranial (α – citral) (40,55)		Piperitona (0,51)	1,8-Cineol (1,8)
Não identificados (3,18)		Pulegona (1,08)	Piperitona (1,92)
		neo-Isopulegol (1,20)	neo-Mentol (4,82)
		3-Octanol (1,5)	Acetato de Mentila (6,15)
		Limoneno (4,35)	iso-Mentona (8,48)
		Acetato de Mentila (5,20)	Mentona (20,15)
		Mentol (5,70)	Mentol (51,32)
		iso-Mentona (11,49)	Não Identificados (0,54)
		Mentona (25,37)	
		iso-Mentol (40,26)	
		Não identificados (0,88)	
Total 100	Total 100	Total 100	Total 100

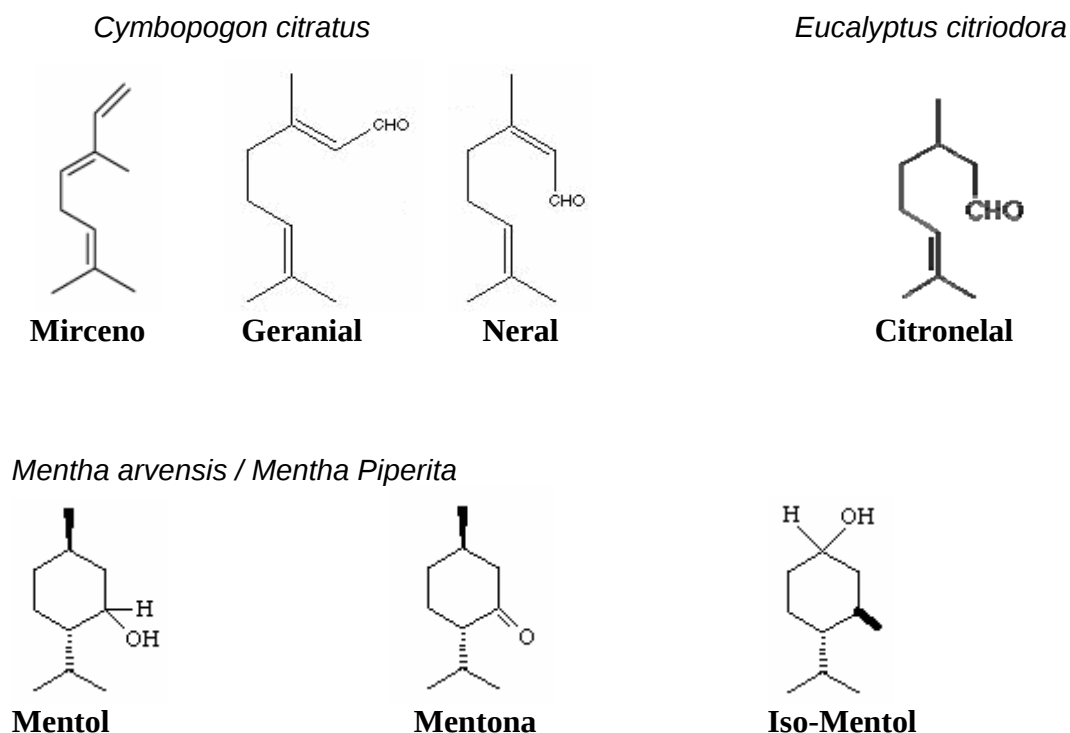


Figura 1 - Estruturas dos principais constituintes presentes nos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, *Eucalyptus citriodora*, *Mentha arvensis* e *Mentha piperita*.

No que tange à ação antileishmanial dos óleos essenciais das plantas objeto desse estudo, os resultados obtidos indicaram existir. Esse efeito foi melhor evidenciado no óleo essencial de *C. citratus*, o qual mostrou um valor de EC_{50} de 21,91 $\mu\text{g/mL}$. Foi verificada uma dose-resposta intermediária entre os óleos essenciais de *M. arvensis* e *E. citriodora* (Tabela 4). O óleo essencial de *M. piperita* foi de menor atividade contra promastígotas de *Leishmania (L) chagasi* nas condições testadas (Tabela 4). A pentamidina foi usada como fármaco padrão controle positivo, revelando uma EC_{50} de 0,09634 $\mu\text{g/mL}$, comparando-se as EC_{50} da pentamidina (0,09634 $\mu\text{g/mL}$) com a do *C. citratus* (21,91 $\mu\text{g/mL}$), o óleo essencial apresentou sua eficácia cerca de 14 vezes menor. Comparações, entretanto, entre pentamidina e óleos essenciais devem ser cuidadosamente traçadas, visto que a pentamidina é um componente puro, enquanto, o óleo essencial é uma mistura complexa em estado natural, sendo necessário para fins comparativos estudo dos componentes isolados.

Na figura 2, apresentaram-se os valores de EC_{50} dos óleos essenciais contra as promastígotas de *Leishmania (L) chagasi* utilizando-se curvas sigmoidais dose-resposta.

Tabela 4 - Eficácia dos óleos essenciais obtidos por arraste de vapor das folhas frescas das plantas contra a *Leishmania (L.) chagasi*.

Espécies	<i>Leishmania (L.) chagasi</i> promastigota EC ₅₀ , valor (µg/mL) (95%-IC)
<i>C. citratus</i>	21,91 (15,48 – 31,00)
<i>E. citriodora</i>	56,32 (37,53 – 84,52)
<i>M. arvensis</i>	49,63 (33,23 – 74,10)
<i>M. piperita</i>	58,18 (25,48 – 132,9)
Pentamidina	0,09634 (0,05919-0,1568)

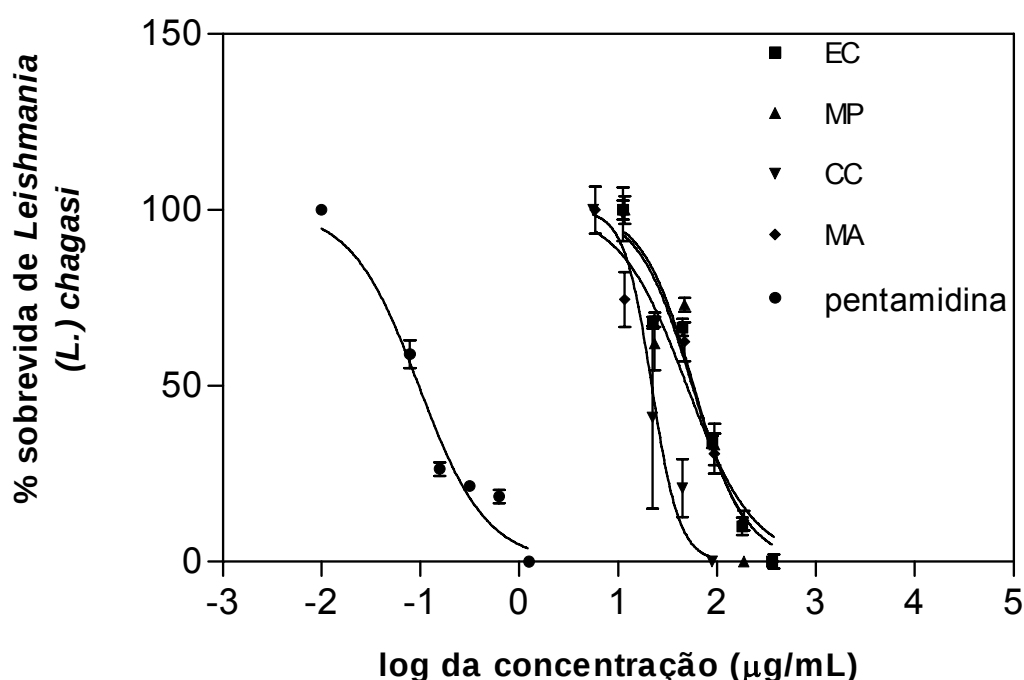


Figura 2 - Determinação dos valores EC₅₀ dos óleos essenciais contra as promastigotas de *Leishmania (L.) chagasi*.

■ *E. citriodora*, ▲ *M. piperita*, ▼ *C. citratus*, ◆ *M. arvensis* e ● Pentamidina.

TEMPONE *et al.* (2005) com extratos brutos e diluídos de nove espécies de plantas brasileiras contra formas promastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* demonstraram que o extrato bruto do alcalóide da espécie *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae) apresentou ação contra as promastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* com uma EC₅₀ – 24,84 µg/mL, concentração essa próxima a encontrada nesse estudo com relação ao óleo essencial de *C. citratus*, EC₅₀ - 21,91 µg/mL.

MACHADO *et al.* (2007) com extratos etanólicos de própolis oriundos do Brasil e da Bulgária contra as promastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* obtiveram uma EC₅₀ de 53,9 µg/mL para própolis da Bulgária e EC₅₀ de 49,9 µg/mL para a do Brasil, observou-se que o

óleo essencial de *C. citratus* (EC_{50} - 21,91 $\mu\text{g/mL}$) foi mais efetivo que os extratos etanólicos de própolis dos dois países.

BRAGA *et al.* (2007) com extrato etanólico das flores de *Ocinum gratissimum* L. (Lamiaceae) contra formas promastígotas de *Leishmania* (L.) *chagasi* detectaram uma EC_{50} de 71,0 $\mu\text{g/mL}$, se comparadas às EC_{50} dos óleos essenciais de *C. citratus* (EC_{50} - 21,91 $\mu\text{g/mL}$), *E. citriodora* (56,32 $\mu\text{g/mL}$), *M. arvensis* (49,63 $\mu\text{g/mL}$) e *M. piperita* (58,18 $\mu\text{g/mL}$) os óleos essenciais foram mais eficazes.

SARTORELLI *et al.* (2007) com extrato metanólico fracionado em hexano de frutos de *Cássia fistula* (Leguminosae), observaram que a fração isolada e caracterizada como colesterol a partir dos frutos da planta citada apresentou ação *in vitro* contra promastígotas de *Leishmania* (L.) *chagasi*, matando 100% dessas formas. Nas condições desse estudo os óleos essenciais das plantas *C. citratus*, *E. citriodora*, *M. arvensis* e *M. piperita*, também eliminaram em 100% as formas promastígotas de *Leishmania* (L.) *chagasi* (Figura 2).

Conforme ESCÓLAN *et al.* (2005) nos últimos anos em Honduras tem sido documentados casos de falhas terapêuticas no tratamento de leishmaniose visceral com derivados pentavalentes. Esse fato, também foi reportado por AHUA *et al.* (2007) na Índia. Além de essas drogas desencadearem efeitos colaterais acentuados e requerem regime de tratamento longo com alto custo (CROFT; COOBS; 2003).

A pesquisa e síntese de novos fármacos mais efetivos e seguros contra leishmaniose visceral são de grande importância e podem abrir novas perspectivas de tratamento em regiões onde essa parasitose acomete milhões de pessoas, principalmente, quando verificou-se a ação *in vitro* do *C. citratus* contra as formas promastígotas de *Leishmania* (L.) *chagasi*, sendo esse altamente efetivo.

Salienta-se, ainda, que deverão ser conduzidos ensaios para aumentar a eficiência de sua extração e purificação.

3.6 – CONCLUSÃO

Os óleos essenciais obtidos das folhas frescas por arraste de vapor das plantas *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., *Eucalyptus citriodora* Hook., *Mentha arvensis* L. e *Mentha piperita* L. apresentaram *in vitro* resultados altamente promissores contra as formas promastígotas de *Leishmania* (L.) *chagasi*.

Foi verificado que o óleo essencial da planta *Cymbopogon citratus* (DC.) Satpf. foi mais eficaz quando comparado sua EC_{50} com as dos outros três óleos essenciais.

Nesse experimento foi avaliado que os óleos essenciais obtidos das folhas frescas das plantas objeto desse estudo mataram 100% as promastigotas de *Leishmania* (L.) *chagasi*.

Embora estudos mais aprofundados sejam imprescindíveis, os resultados expostos nesse trabalho constituem uma base rica de dados a cerca das atividades biológicas dos óleos essenciais citados, sendo uma fonte preliminar de informações científicas de suma importância que incitam pesquisas futuras.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R.P. Identification of essential oils components by gás chromatography/mass spectroscopy. *Carol Stream: Allured Publishing Corporation*, 2001.

AHUA, K. M.; IOSET, J. R.; IOSET, K. N.; DIALLO, J. M.; HOSTETTMANN, K. Antileishmanial activities associated with plants used in the Malian traditional medicine, *Journal of Ethnopharmacology*, 110, p.99-104, 2007.

ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F.J. A. Kovats indici as a presetion routine in mass spectra searches of volaties. *Journal of Natural Products*, 47, p. 890-892, 1984

BRAGA, F. G. B.; BOUZADA, M. L. M.; FRABRI, R. L.; MATOS, M. O.; MOREIRA, F. O.; SCIO, E.; COIMBRA, E. S. Antileishmanial and antifugal activity of plants used in tradicional medicine in Brazil, *Journal of Ethnopharmacology*, 111, p. 396-402, 2007

BERTINI, L. M; PEREIRA, A. F; OLIVEIRA, C. L. L.; MENEZES, E. A; MORAIS, S. M.; CUNHA, F. A. CAVALCANTI, E.S.B. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil, *Pharm. Bras*, 48, p. 80 – 83, 2005.

CARVALHO, C.M.; COSTA, C.P.M.; SOUZA, J. S.; SILVA, R. H.; OLIVEIRA, C. L.; PAIXÃO, F. J. R. Rendimento da produção de óleo essencial de capim-santo submetido a diferentes tipos de adubação, *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, 5(2), p. 1 -8, 2005.

CHAU-BACAB, M.J.; PENA-RODRIGUEZ, Plant Natural products with leiishmanicidal activity, *Natural products reports*, 18, 674-688, 2001.

CROFT, L. S.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs, *Trends in Parasitology*, 19, p. 502-508, 2003

DATASUS, Disponível em: <http://w3.datasus.gov.br/datasus/datasus.php>, Consultada em 18/07/2007.

DOOL, V. D.; KRATZ, P. D. J. A. Generalization of the retention index sustem including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography, *Journal of chromatography*, 11, p.463-471, 1963.

ESCOLÁN. P.; RIVERA, M.; ALGER, J. Falla Terapéutica Del Antimoniato de Meglumina en el Tratamento de la leishmaniasis visceral. Informe de un caso, *Rev. Med. Mondur*, 73, p. 172-178, 2005.

ESTANISLAU, A. A.; BARROS, F. A. S.; PENA, A. P.; SANTOS, S. C.; FERREIRA, P. H.; PAULA, J. R. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de cinco espécies of *Eucalyptus* cultivados em Goiás, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 11 (2), p. 95-100, 2007.

GOKALP, I.; KIREMER, N.; KUKCUOGLU, K.; HUSNU, C. B.; DEMIRCI, F. A. T. I. H. Antimicrobial Screenig of *Mentha piperita* Essential Oils, *J. Agric. Food Chem*, 50, p.3943-3946, 2002.

KVIST, L. P. O.; CHRISTENSEN, S. B.; RASMUSSEN, H. B.; MEIJA, K.; GONZALEZ, A. Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria an leishmaniasis, *Journal of Ethnopharmacology*, 4146, p. 1-13, 2006.

MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L.; CASTRO, S. L. Activity of Brazilian and Bulgarian própolis against different species of *Leishmania*, *MEM. INT. Osvaldo Cruz*, 102 (1), p. 73-77, 2007.

MATOS, F.J.A. *As plantas das farmácias vivas*, Fortaleza, BNB, 1997.

MATOS, F.J.A. *Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usados em fitoterapia no Nordeste do Brasil*, Fortaleza, UFC, 2000.

MELO, N. Leishmaniose visceral no Brasil: desafios e perspectivas, *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 23 (1), p. 41-47, 2004.

NICOLETTI, A. M.; OLIVEIRA-JUNIOR, M. A.; BERTASSO, C.C.; CAPOROSSO, P. Y.; TAVARES, A. P. L. Principais interações no uso de medicamentos fitoterápicos, *Pharm. Bras.* 57, p. 32-40, 2007.

ORDÓÑEZ, M. G.; JORGE, M. R.; SIMÓN, G. G.; RANGEL, C. L. Actividad antimicrobiana del aceite esencial y crema de *Cymbopogon citratus* (DC). Stapf, *Revista Cubana de Plantas Medicinai*s, 09 (2), p. 01-06, 2004

RODRIGUES, S.A. Toxicidade aguda e efeito analgésico e depressor do extrato aquoso obtido das folhas de *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera (quitoco). Dissertação de Mestrado da Universidade Federal de Sergipe (UFS), 2007.

ROSA, M. S. S; MENDONÇA-FILHO, R.; BIZZO, H. R.; RODRIGUES, I. A.; SOARES, R. M. A.; PADRÓN, T. S., ALVIANO, C. S.; LOPES, A. H. C. S. Antileishmanial Activity of a Linalool-Rich Essential Oil from *Cróton cajurana*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47 (6), p. 1895-1901, 2003.

SARTORELLI, P.; ANRADE, S. P.; MELHEM, M. S. C.; PRADO, F. O.; TEMPONE, A. G. Isolation of Antileishmanial Sterol from the Fruits of *Cássia fistula* using Bioguided Fractionation. *Phytother. Res.* (in press), p. 01-04, 2007.

SAUVAIN, M.; DEDET, J.; KUNESCH, N.; POISSON, J.; GANTIER, J.; GAYRAL, P. KUNESCH, G. *In vitro* and *in vivo* leishmanicidal activities of natural and synthetic quinoids, *Phytotherapy aesearch*, 7 (11), p. 167- 171, 1993.

TADA, H., SHIHO, O., KUROSHIMA, K., KOYAMA, M., TSUKAMOTO, K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J. Immunol. Methods*, 93, p. 157-165, 1986.

TEMPONE, A. G.; BORBOREMA, S. E. T.; ANDRADE-JUNIOR, H. E.; GUALDA, N. C. A.; YOGI, A.; CARVALHO, C. S.; BACHIEGA D.; LUPO, F. N.; BONOTTO, S. V.; FISHER, D. C. H. Antropozoal activity of Brazilian plant extracts from iso-quinoline alkaloid- producing families, *Phytomedicine*, 12, p. 382-390, 2005.

VIDAL, F.; GADELHA, A. P. R.; LOPES, C. S.; COELHO, M. G. P.; MONTEIRO-LEAL, L. H. *Giardia lamblia*: the effects of extracts and fractions from *Mentha x piperita* Lin., (Lamiaceae) on trophozoites, *Experimental Parasitology*, 115, p. 25-31, 2007.

VITTI, A. M. S.; BRITO J. O. Avaliação do rendimento e do teor de citronelal do óleo essencial de procedências e raças de *Eucalyptus Citriodora*. *Rev. Scientia Forestalis*, 56, p. 14-154, 1999.

4. – CAPÍTULO III

Avaliação do rendimento e dos constituintes citral e mirceno do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., submetido ao cultivo orgânico e biodinâmico na Fazenda Mãe Terra – Se.

4.1 – RESUMO

O rendimento e a composição química do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (Poaceae) é de suma importância para a indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética, podendo afetar severamente o valor comercial do óleo. Nesse trabalho, foram avaliados o rendimento e os constituintes citral e mirceno do óleo essencial obtido das folhas frescas de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. submetido ao cultivo orgânico e biodinâmico na Fazenda Mãe Terra. Os resultados encontrados nesse estudo indicaram que o cultivo orgânico e biodinâmico propiciou um bom rendimento (0,4669%) em óleo essencial. Os componentes químicos majoritários do óleo foram o geranial (40,55%), o neral (28,48%) e o mirceno (24,80%).

Palavras-chave: *Cymbopogon citratus*, cultivo orgânico e biodinâmico, óleo essencial.

Assessment of the yield and the constituents citral and myrcene of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., submitted to the organic and biodynamic cultivation in Mãe Terra Farm – Se

4.2 – ABSTRACT

The yield and the chemical composition of the essential oil from *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (Poaceae) is very important for the food, cosmetics and pharmaceutical industries, and can severely affect the commercial value of the oil. In this paper, the yield and the constituents citral and myrcene of the essential oil obtained from fresh leaves of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf were assessed, submitted to the organic and biodynamic cultivation in Mãe Terra Farm. The results from this study indicated that the organic and biodynamic cultivation provided a good yield (0,4669%) in essential oil. The major chemical components of the oil were the geranial (40,55%), the neral (28,48%) and the myrcene (24,80%).

Keywords: *Cymbopogon citratus*, organic and biodynamic cultivation, essential oil.

4.3 – INTRODUÇÃO

O *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. é uma espécie vegetal de origem asiática amplamente distribuída por vários países tropicais, entre eles o Brasil, onde assume diferentes denominações populares conforme a região em que se encontra, a exemplo de capim-limão, capim-santo, entre outras. Pertence à Família Poaceae (Gramineae) e se constitui em uma erva perene que forma touceiras compactas e robustas de até 1,2 metros de altura, com rizoma semi-subterrâneo, sua propagação é assexuada por divisão de touceiras e realizada a campo (COSTA *et al.*, 2005).

Essa planta tem sido cultivada no Brasil de forma artesanal em pequenos canteiros. Nos últimos anos, entretanto, a abrupta expansão da medicina alternativa provocou o rápido crescimento na demanda por folhas frescas e secas dela. Esse fato fez com que as áreas, para cultivo dessa gramínea, se expandissem na mesma proporção para atender a demanda (VIDA; CARVALHO-JUNIOR; VERZIGNASSE, 2006).

Vários clones de *C. citratus* são cultivados para produção comercial de óleo essencial conhecido internacionalmente como óleo de “Lemon grass”. Essa essência é largamente empregada como agente aromatizante em perfumaria, indústria cosmética e alimentícia por seu forte odor de limão, bem como para obtenção do citral, seu principal constituinte químico que é utilizado pela indústria farmacêutica para síntese de ianonas e vitamina A (CARVALHO *et al.*, 2005).

Dentre as atividades biológicas registradas da espécie *C. citratus* destacam-se os efeitos hipotensor e antiinflamatório da infusão de suas folhas, testado em ratos por VIANA *et al.* (2000). A efetividade fungicida do óleo essencial obtido das folhas contra *Aspergillus niger*, avaliada por BARATTA *et al.* (1998), assim como a sua atividade antibacteriana contra organismos Gram positivos e negativos observada por BERTINI *et al.* (2005). Outras ações, tais como analgésica, calmante, diurética, antihelmíntica e inseticida exercida pelo óleo essencial dessa planta foram reportados por ALMEIDA *et al.* (2003).

A composição química e o rendimento em óleo essencial de *C. citratus* podem ser variáveis, a depender da variabilidade genética intra-específica, habitat, horário de colheita e os tratos culturais (LEAL *et al.*, 2001).

Por outro lado, a agricultura orgânica é conceituada como a produção de alimentos oriundos dos vegetais e animais sem a utilização de agrotóxicos, fertilizantes sintéticos, reguladores de crescimento e aditivos para a alimentação animal e/ou outros agentes contaminantes, através de um conjunto de sistemas de produção com enfoque holístico, que buscam a maximização dos benefícios sociais, a auto-sustentação, a redução/eliminação da dependência de insumos, energia não renovável e a preservação do ambiente mediante a

otimização do uso de recursos naturais e socioeconômicos disponíveis (MELLO *et al.*, 2003).

Já o manejo biodinâmico trata a planta não só nas suas necessidades físicas, mas procurando alimentar seu campo energético com preparados biodinâmicos (KEMP, 2004).

Quanto à fazenda Mãe Terra fica localizada no município de Santana de São Francisco, no estado de Sergipe (Se). No ano de 2000 foi implementada nessa fazenda o cultivo orgânico e a partir de 2002 adotado o sistema biodinâmico. Assim sendo, o objetivo desse trabalho foi avaliar o rendimento e os constituintes citral e mirceno do óleo essencial obtido das folhas frescas de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., submetido ao cultivo orgânico e biodinâmico na fazenda Mãe Terra.

4.4 – MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 - Cultivo do *Cymbopogon citratus* na Fazenda Mãe Terra

O solo foi inicialmente analisado e corrigido com calcário, fosfato natural, cinza, mb4 e compostagem em toda área de plantio, arado e em seguida passado a grade leve. As mudas foram plantadas no inverno e o brotamento delas foi cerca de 100%. Os tratos foram de capina manual apenas quando ervas daninhas começaram a sufocar a cultura ou atrapalhar a colheita e essa capina foi deixada como cobertura para lavoura. Além da capina foi realizada as adubações folheares a cada colheita com urina de vaca, microgel e preparado 501 (pulverizado de chifre e sílica, 2 g/ha). As adubações do solo com esterco bovino foi realizada de 2 a 3 vezes ao ano e a plantação foi irrigada diariamente. Após 3 meses do plantio foi efetuado o primeiro corte, depois os cortes se sucederam em cerca de 30 a 40 dias. A produção média no verão para cada área de produção resultou em uma tonelada de massa verde. No inverno poderia ser maior o rendimento, todavia, ocorrem intervalos no corte da folhas da em função do processamento. Essa espécie tem um ciclo médio de 5 anos.

4.4.2 - Colheita do material botânico

As folhas frescas de *C. citratus* foram coletadas na Fazenda Mãe Terra em 12/05/2007 às 8h30min (Figura 1). Após a coleta, foram acondicionadas em sacos plásticos e encaminhadas ao Laboratório de Produtos Naturais e Biotecnologia (ITP), onde foram selecionadas, lavadas com água destilada, cortadas e pesadas.



Figura 1 – *Cymbopogon citratus* em sistema orgânico e biodinâmico na Fazenda Mãe Terra, Município de Santana do São Francisco, Sergipe.

4.4.3 - Obtenção do óleo essencial

Para extração do óleo essencial foi utilizado o método por arraste de vapor de acordo com a metodologia descrita por Alencar *et al.* (1984), em um aparelho extrator de óleo essencial tipo Marconi, Modelo MA-480 e série 0218108. O tempo de extração foi de aproximadamente duas horas. O óleo foi armazenado em frasco de cor âmbar com tampa esmerilhada sob refrigeração a -15°C até o momento da análise.

4.4.4 - Rendimento do óleo essencial

O rendimento em óleo essencial foi calculado dividindo-se a massa do óleo extraído pela biomassa das folhas frescas e o resultado multiplicado por 100, conforme RODRIGUES, (2007).

4.4.5 - Caracterização química dos óleos essenciais por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/MS)

As análises foram realizadas em um equipamento SHIMADZU GS-MS, modelo QP5050A, utilizando-se uma coluna de sílica fundida (30m x 0,25mm) com fase estacionária ZB-5MS (0,25mm de espessura filme). O gás Hélio foi utilizado para arraste com fluxo de 1,8 mL/min e a temperatura foi programada mantendo 50°C por 2 minutos, seguido de um aumento de 4°C até atingir 200°C. Logo depois a razão de aquecimento foi alterada para 15°C/min até atingir 250°C, mantendo-se constante essa temperatura por 15 minutos; temperatura do detector de 250°C. Foi injetado um volume de 0,5 µL do óleo essencial

diluído em acetato de etila; taxa de partição do volume injetado 1:100 e pressão na coluna de 166 kPa. As condições do espectro de massa foram detector de captura iônica operando por impacto eletrônico e energia de impacto de 70 eletronsVolt (eV); velocidade de varredura 1000, intervalo de varredura 0,50 fragmentos/s e fragmentos detectados de 40 a 500 Dalton (Da). Os compostos foram identificados através da comparação com espectros encontrados na literatura, de acordo com ADAMS (2001) com espectros padrões existentes no banco de dados (NIST21 E NIST107) do equipamento e pela composição dos índices de retenção com aqueles preconizados na literatura. Os índices de retenção de Kovats (IK) foram determinados utilizando uma curva de calibração de uma série de n-alcanos (C₈-C₁₈) injetados nas mesmas condições cromatográficas da amostra, empregando a equação de VAN den DOOL e KRATZ (1963).

4.5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

O vasto campo de aplicação do óleo essencial de *C. citratus* por indústrias de alimentos, cosmética e farmacêutica tem motivado ininterruptas pesquisas dessa espécie.

Nesse estudo obteve-se um rendimento em óleo essencial, calculado em base fresca de 0,4669%. Autores, a exemplo de SINGH *et al.* (1982) afirmaram que o rendimento em óleo essencial da planta acima citada é de 0,28% a 0,50%. Observou-se que no sistema de cultivo acima referido e nas condições desse experimento houve bom rendimento. Uma pesquisa realizada por CARVALHO *et al.* (2005) comparando o rendimento em óleo essencial de *C. citratus* submetido a diferentes tipos de adubação, demonstrou que o tratamento com adubação orgânica apresentou um rendimento superior quando comparado ao tratamento com adubação convencional, entretanto, nesse estudo foi realizado apenas uma coleta, seria interessante outras pesquisas utilizando mais coletas em horários e temperaturas diferentes, bem como meses diversificados visando observar a reprodutibilidade do experimento. Um estudo comparativo entre o cultivo orgânico e biodinâmico com outro tipo de cultivo deve ser também realizado buscando nortear suas vantagens e desvantagens.

Na figura 2, tem-se o perfil cromatográfico do óleo essencial de *C. citratus* e a tabela 1 demonstrou seus componentes e respectivas porcentagens obtidos empregando-se um cromatógrafo a gás com detector de massas (CG/EM).

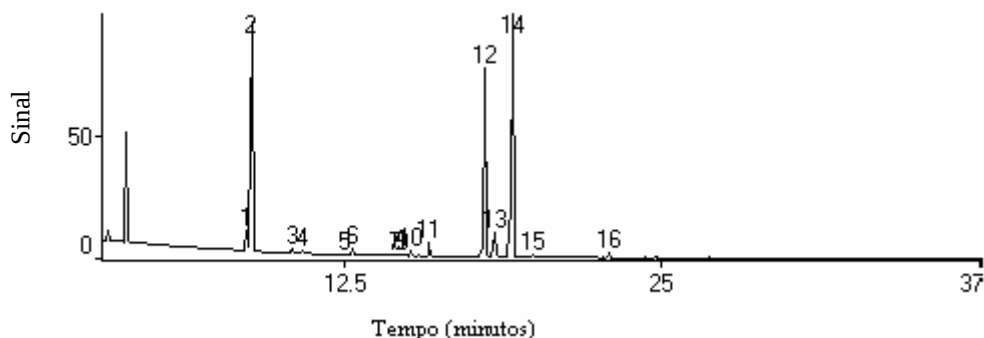


Figura 2- Cromatograma do óleo essencial das folhas frescas de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., submetido ao sistema orgânico e biodinâmico na Fazenda Mãe Terra.

Tabela 1-Constituintes químicos e suas respectivas porcentagens em óleo essencial das folhas frescas de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., submetido ao sistema orgânico biodinâmico na Fazenda Mãe Terra.

Pico	TR (min)*	Composto	(%)	IRR exp.**	IRR lit.***
1	8,725	6-metil-5-hepten-2-ona	1,99	983	985
2	8,875	Mirceno	24,80	987	991
3	10,533	α -(Z)-Ocimeno	0,32	1034	1040
4	10,917	β -(E)-Ocimeno	0,19	1045	1050
5	12,558	Não identificado	0,08	1090	-
6	12,883	Linalol	0,49	1099	1098
7	14,508	Não identificado	0,06	1142	-
8	14,700	Não identificado	0,12	1147	-
9	14,850	Citronelal	0,10	1151	1153
10	15,183	Não identificado	0,54	1160	-
11	15,875	Não identificado	1,41	1178	-
12	18,025	Neral (β -Citral)	28,36	1237	1238
13	18,458	Não identificado	3,27	1249	1253
14	19,142	Geranial (α -Citral)	40,55	1268	1270
15	20,008	Não identificado	0,20	1291	-
16	22,967	Iso- butirato de linalol	0,51	1376	1374
Total			100		

* Tempo de Retenção

** Índice de Retenção Relativo ou Índice de Kovat's

*** Índice de Retenção Relativo da Literatura (ADAMS 2001).

Como a composição química é um dos parâmetros que agrega valor ao óleo essencial, de acordo com SOUZA *et al.* (2006), avaliaram-se os constituintes químicos do óleo de *C. citratus* tratado com sistema orgânico e biodinâmico.

Segundo NASCIMENTO *et al.* (2003), comercialmente distinguem-se dois tipos de óleo essencial de capim-santo, o East Indian e o West Indian conforme as diferenças de composição química que se refletem na solubilidade em álcool a 70% do teor de mirceno.

Nas condições desse estudo observou-se que os teores relativos de citral (68,91%) e mirceno (24,80%) caracterizaram esse óleo como provavelmente do tipo West Indian, entretanto, outros experimentos devem ser conduzidos em horários diferentes de coletas das folhas dessa plantas, visto que para CASTRO (2001) a composição de um óleo essencial comumente é bastante dinâmica, sendo que as interconversões dos seus constituintes abrangem reações de oxidação, redução, desidratação, hidratação, isomerização e ciclização.

4.6 – CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo em relação ao rendimento e os constituintes citral e mirceno do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., submetido ao sistema de cultivo orgânico e biodinâmico na Fazenda Mãe Terra foram bastante promissores.

Sugere-se mais pesquisas envolvendo esse sistema de cultivo e estudos comparativos com outros tipos, a exemplo hidroponia, bem como em diferentes horários de colheitas e o seu arranjo espacial.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. In Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy Allured Publishing Corporation: USA, 421 p., 2001.
- ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A. Kovats index as a presentation routine in mass spectra searches of volatiles, *Journal of Natural Products*, 47, p. 890-892, 1984.
- ALMEIDA, M. A. O.; BOTURA, M. B.; SANTOS, M. M., ALMEIDA, G. N.; DOMINGUES, L. F.; COSTA, S. L.; BATATINHA, M. J. M. Efeitos dos extratos aquosos de folhas de *Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf (capim-santo) e de *Digitaria insularis* (L.) Fedde (capim-açu) sobre cultivos de larvas de nematóides gastro intestinais de caprinos, *Ver. Bras. de Parasitol. Vet.*, 12 (3), p. 125-129, 2003.
- BARATTA, M. T.; DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G.; BIONDI, D.M.; RUBERTO, G. Chemical Composition, antimicrobial and oxidative activity of laurel, Sage, Rosemary, oregano and coriander essential oils, *Journal of essential oils*, 10, p. 618-627, 1998.

BERTINI, L. M.; PEREIRA, A. F.; OLIVEIRA, C. L. L.; MENEZES, E. A.; MORAIS, S. M.; CUNHA, F. A. CAVALCANTI, E.S.B. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil, *Pharm. Bras*, 48, p. 80 – 83, 2005.

CARVALHO, C. M.; COSTA, C. P. M.; SOUZA, J. S.; SILVA, R. H. D.; OLIVEIRA, C. L.; PAIXÃO, F. J. R. Rendimento da produção de óleo essencial de capim-santo submetido à diferentes tipos adubação. *Revista de Biologia e Ciência da Terra*, 5 (002), p. 10-17, 2005.

CASTRO, D. M. Efeito da variação sazonal, colheita selecionada e temperatura de secagem sobre a produção de biomassa, rendimento e composição de óleos essenciais de folhas de *Lippia alba* (Hill). N. E. Br. Ex Brith. & Wilson (Verbenaceae). 2001. 132f. Tese (Doutorado em Agronomia)- Universidade Estadual de São Paulo.

COSTA, L. C. B.; CORRÊA, R. M.; CARDOSO, J. C. W.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; FERRI, P. H. Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de capim-limão, *HORTIC. BRAS*, 23 (4), p. 01-08, 2005.

KEMP, C. Efeitos de preparados biodinâmicos de campo na biota do solo. *Journal of Biodynamic Agriculture Austrália*, 6, p. 57-59, 2004.

LEAL, T. C. A. B.; FREITAS, S. P.; SILVA, J. F.; CARVALHO A. J. C. Avaliação do efeito da variação estacional e horário de colheita sobre o teor foliar do óleo essencial de capim-cidreira (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf). *Revista Ceres*, 48 (278), p. 445-453, 2001.

MELLO, J.C.; DIETRICH, R.; MEINERT, E.M.; TEIXEIRA, E.; AMANTE, E. R. Efeito do cultivo orgânico e convencional sobre a vida-de-prateleira de alface americana (*Lactuca sativa* L.) minimamente processada. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 23 (3), p. 418-426, 2003.

MISHRA, A. K.; DUBEY, N. K. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities, *APPL. NUIR. MICROBIAL*, 60, p.1101-1105, 1994.

NASCIMENTO, I. B.; INNECCO, R.; MARCO, C. A.; MATTOS, S. H.; NAGAO, E. O. Efeito do horário de corte no óleo essencial de capim-santo. *Revista Ciência Agronômica*, 34 (2), p. 169-172, 2003.

RODRIGUES, S.A. Toxicidade aguda e efeito analgésico e depressor do extrato aquoso obtido das folhas de *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera (quitoco). Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências da Saúde, do Núcleo de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Federal de Sergipe, 2007. 72 p.

SINGH, A.; BALYAN, S. S.; SHAHI, A. K. Cultivation of jammu lemongrass in North India under irrigated conditions. In: ATAL, C.K.; KAPUR, B. M. Cultivation and utilization of aromatic plants Jammu- Taqui: Council oh Scientific and Industrial Research, p. 303-313, 1982.

SOUZA, W. P.; QUEIROGA, C. L.; SARTORATTO, A.; HONÓRIO, S. L.. Avaliação do teor e da composição química do óleo essencial de *Mentha piperita* (L.) Huds durante o período diurno em cultivo hidropônico, *Ver. Bras. Pl. Méd.*, 8 (4), p. 108-111, 2006.

VAN den DOOL, H.; KRATZ, P. D. J.; J. Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatog*, 11, p. 463-471, 1963.

VIANA, G. S. B.; VALE, T. G.; PINHO, R. S. N.; MATOS, F. J. A. Antinociceptive effect of the essential oil from *Cymbopogon citratus* in mice, *J. Ethnopharmacol*, 70, p. 323-327, 2000.

VIDA, J. B.; CARVALHO-JUNIOR, A. A.; VERZIGNASSI, J. R. Primeira ocorrência de ferrugem em capim-limão causada por *Puccinia cymbopogonis* no Brasil, *Summa Phytopathol*, 32 (1), p. 89-91, 2006.

5 – CAPÍTULO IV

Leishmaniose visceral em Sergipe: perfil epidemiológico de 2001 a 2006.

5.1 - Resumo

Esse trabalho objetivou descrever o perfil epidemiológico da leishmaniose visceral em Sergipe, Brasil de 2001 a 2006. Os dados foram obtidos no Sistema de Informação de Agravos Notificados (SINAN). Observou-se 230 casos de leishmaniose visceral, distribuídos em 41 municípios, sendo as maiores incidências foram em Aracaju (85) e Estância (31). A faixa etária mais acometida foi 1 a 5 anos (28,26%), seguida de 20 a 40 anos (25,65%). As técnicas utilizadas para diagnóstico laboratorial foram parasitológica e imunológica. Quanto a zona de residência dos portadores foram notificadas como urbana (50%). A raça/cor de maior ocorrência foi a cor parda (59,10%). A escolaridade dos portadores destacou-se de 4 a 7 anos concluídos (47,85%). Quanto ao desfecho da doença, evoluíram para cura (76,96%). O perfil epidemiológico obtido nesse estudo servirá como base para justificar a adoção de estratégias visando à profilaxia, controle dos reservatórios e vetores da leishmaniose visceral em Sergipe.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral, perfil epidemiológico, Sergipe.

Visceral leishmaniasis in Sergipe: epidemiological profile from 2001 to 2006.

5.2 – Abstract

This paper intended to describe the epidemiological profile of visceral leishmaniasis in Sergipe, Brazil from 2001 to 2006. The data were obtained from the Sistema de Informação de Agravos Notificados (SINAN). There were 230 cases of visceral leishmaniasis, spread in 41 towns, with the greatest impact in Aracaju (85) and Estância (31). The age bracket most affected was 1 to 5 years old (28,26%), followed by 20 to 40 years old (25,65%). The techniques used for laboratory diagnosis were parasitological and immunological. Concerning the area of residence for those people was notified as urban (50%). The race / color of greater occurrence was the brown color (59,10%). Their schooling is mostly from 4 to 7 years completed (47,85%). Regarding the outcome of the disease, evolved for cure (76,96%). The epidemiological profile obtained in this study will serve as basis to justify the adoption of strategies aimed at prophylaxis, control of reservoirs and vectors of visceral leishmaniasis in Sergipe.

Keywords: Visceral leishmaniasis, epidemiological profile, Sergipe.

5.3 – INTRODUÇÃO

Ao desenvolvimento tem sido historicamente atribuída a incumbência de melhorar a qualidade de vida das comunidades. Entretanto, no Brasil, o que se tem observado é o aumento da incidência de doenças infecciosas que estão diretamente atreladas às precárias condições de vida e sua disseminação está relacionada com a degradação ambiental, permitindo maior circulação dos parasitos (TAVARES; TAVARES, 1999).

O modelo de desenvolvimento atualmente adotado tem-se caracterizado por ausências de políticas que leve em consideração as condições em que vive a população brasileira e que promovam a organização do espaço social. Sem isso, o que tem ocorrido é a ocupação de novas áreas e a invasão do ambiente natural de forma desordenada, promovendo mudanças que acarretam desequilíbrio ecológico, expondo as populações ao risco de contrair infecções por microrganismos que circulam nos focos naturais (MELLO, 1991).

Desde 1934, casos de leishmaniose visceral (LV) humana vêm sendo registrados no Estado de Sergipe. Em 1936, no Município de Aracaju, o Dr. Evandro Chagas diagnosticou o primeiro caso, em vida, da doença no Brasil. Tratava-se de um indivíduo de 16 anos, em cuja família havia ocorrido dois óbitos, com os mesmos sintomas (CHAGAS, 1936).

Segundo MICHALICK e GENARO (2005), a LV é uma doença sistêmica que atinge as células do sistema mononuclear fagocitário do homem, sendo os órgãos mais afetados o baço, fígado, linfonodos, medula óssea e pele, outros órgãos e tecidos podem também ser atingidos, por exemplo, o intestino e os pulmões. Em casos avançados da doença praticamente todos os órgãos são acometidos. Afirmam ainda os autores que se trata de uma doença grave, de alta letalidade, sendo que sua mortalidade nos casos humanos não tratados pode alcançar 70% a 90%.

A LV possui como agente etiológico um protozoário que nas Américas a espécie responsabilizada denomina-se *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*, transmitida ao homem pela picada de artrópodos fêmeas infectadas da espécie *Lutzomyia longipalpis* presentes em todos os países da América Latina, exceto no Chile (CANELA *et al.*, 2004; CAMARGO; LANGONE, 2006).

Em 1983, foi realizado o levantamento e mapeamento das espécies flebotomínicas existentes em Sergipe, sendo constatado que o vetor *Lutzomyia longipalpis* encontrava-se disseminados em 38 municípios distribuídos em todas as regiões do estado (AGUIAR, 1983).

De acordo com o MINISTÉRIO DA SAÚDE (2003), o Brasil enfrenta atualmente a expansão e urbanização da LV com casos humanos e grande número de cães positivos

(considerado o último o principal reservatório no Brasil) em várias cidades de grande e médio porte. O ciclo de transmissão que anteriormente ocorria no ambiente silvestre e rural, hoje também se desenvolve em centros urbanos. Duas décadas após o registro da primeira epidemia urbana em Teresina (PI), o processo de urbanização se intensificou com a ocorrência de importantes epidemias em várias cidades da região Norte (Boa Vista e Santarém), Sudeste (Belo Horizonte e Montes Claros), Centro Oeste (Cuiabá e Campo Grande) e Nordeste (São Luis e Natal). Em Sergipe, a ocorrência de casos autóctones já foi notificada em 67 dos 75 municípios, distribuídos nas diferentes regiões, onde se encontra uma grande diversidade quanto aos aspectos ambientais.

Mediante o exposto, o presente estudo objetivou avaliar o perfil da leishmaniose visceral no Estado de Sergipe entre os anos de 2001 e 2006.

5.4 – METODOLOGIA

Foi realizado um estudo longitudinal, descritivo e retrospectivo da leishmaniose visceral no período de 2001 a 2006 no estado de Sergipe. A pesquisa foi desenvolvida na Coordenação de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Saúde do Estado de Sergipe (SES-SE), através da análise dos dados informatizados consolidados no Sistema de Informação de Agravos Notificáveis (SINAN), que é um Software disponibilizado pelo Ministério da Saúde para todos os estados e municípios brasileiros, com a finalidade de informar as patologias elencadas como de notificação compulsória. Os dados avaliados foram: número total de casos confirmados, procedência dos casos, faixas etárias e gênero dos portadores, técnicas utilizadas para diagnóstico, zona de residência, raça/cor, escolaridade dos acometidos e desfecho dos casos. A análise dos dados constou de distribuições de frequências, apresentadas em gráficos e tabelas.

5.5 – RESULTADOS

No período de 2001 a 2006 foram registrados 230 casos de leishmaniose visceral no Estado de Sergipe, distribuídos em 41 municípios (Tabela 1). Os municípios com maior número de casos notificados foram respectivamente, Aracaju (58), Estância (31), Canindé do São Francisco (16), Lagarto e Aquidabã (07), Gararu (06), os demais variaram de 01 a 05 casos (Tabela 1). Em relação ao número de casos notificados ao longo dos anos (Figura 1), observou-se que os maiores ocorreram em 2005 (44) e 2006 (51), e o menor em 2003 com (17) casos notificados.

Tabela 1: Casos confirmados de leishmaniose visceral por Município de procedência em Sergipe de 2001-2006.

Municípios	2001	2002	2003	2004	2005	2006	Total
Amparo de S. Francisco	1	-	1	-	-	-	2
Aquidabã	2	5	-	-	-	-	7
Aracaju	7	11	7	15	20	25	85
Areia Branca	-	-	-	2	2	-	4
Barra do Coqueiro	-	-	-	-	1	2	3
Boquim	-	-	-	-	1	-	1
Brejo Grande	1	-	-	-	-	-	1
Campo do Brito	1	-	-	-	-	1	2
Canindé do S. Francisco	2	6	1	1	3	3	16
Capela	-	-	1	-	-	-	1
Carira	-	1	-	1	1	-	3
Divina Pastora	-	-	-	-	-	1	1
Estância	7	2	3	7	5	7	31
Feira Nova	-	1	-	-	-	-	1
Garanu	-	-	-	1	4	1	6
Indiaroba	1	-	-	-	-	-	1
Itabaiana	1	1	1	-	-	-	3
Itabaianinha	-	-	-	-	1	-	1
Itabi	-	-	-	-	-	1	1
Itaporanga D'Juda	2	1	-	-	-	1	4
Jaboatão	1	2	-	-	-	-	3
Japarutuba	-	-	1	-	-	-	1
Lagarto	4	1	-	-	1	1	7
Laranjeira	-	1	1	-	-	-	2
Macambira	-	2	-	-	-	-	2
Maruim	2	1	-	-	-	1	4
N. S. Aparecida	2	1	-	-	-	-	3
N. S. da Glória	-	-	-	-	-	1	1
N. S. do Socorro	-	-	-	2	1	2	5
Neópolis	3	-	1	1	-	1	6
Pacatuba	2	-	-	-	-	-	2
Pirambu	-	-	-	2	-	-	2
Poço Redondo	2	-	-	-	1	-	3
Própria	2	-	-	-	-	-	2
Riachão do Danta	1	-	-	-	-	-	1
Ribeirópolis	-	-	-	2	-	-	2
S. Cristóvão	2	-	-	-	-	2	4
Simão Dias	1	-	-	-	-	-	1
St. Amaro da Brota	-	-	-	-	2	-	2
Stª. Luzia do Itanhi	-	-	-	-	-	1	1
Tobias Barreto	1	-	-	-	1	-	2
Total	48	36	17	34	44	51	230

Fonte: SINAN/SES/SE (2001-2006)

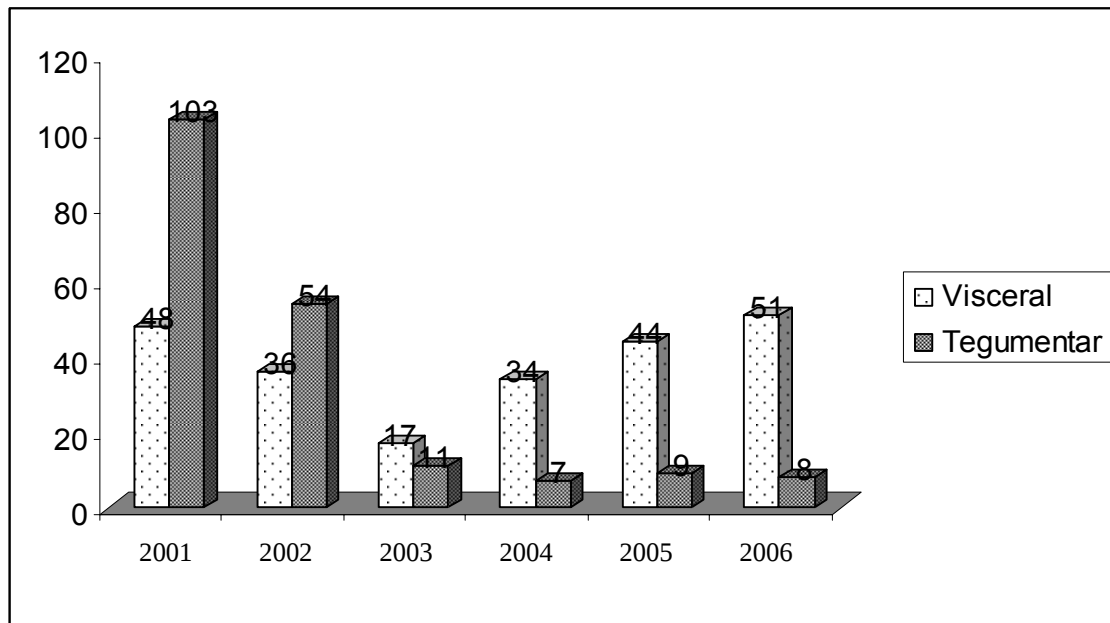


Figura 1: Distribuição proporcional de casos confirmados de leishmanioses em Sergipe por ano de ocorrência.

Fonte: SINAN/SES/SE (2001-2006)

No que concerne ao gênero dos portadores, 60,43% (139) foram masculino (Figura 2). A faixa etária mais acometida foi de 1 a 5 anos, 28,26% (36), e a menor em indivíduos maiores de 70 anos, 0,46% (01) (Tabela 2).

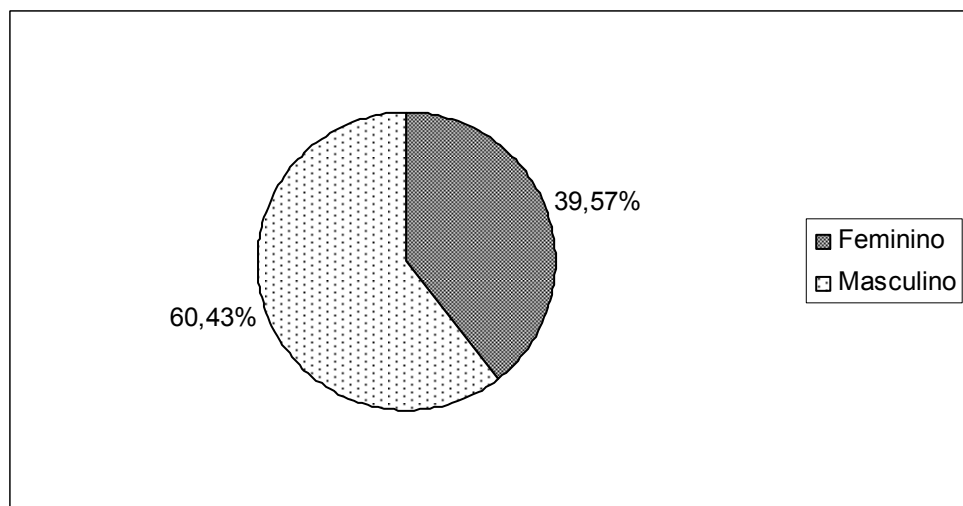


Figura 2: Distribuição percentual de casos confirmados de LV em Sergipe, de acordo com o gênero dos portadores de 2001 a 2006.

Fonte: SINAN/SES/SE (2001-2006)

Tabela 2: Distribuição proporcional de casos confirmados de LV em Sergipe, conforme faixa etária.

Faixa Etária	2001	2002	2003	2004	2005	2006	Total	%
< 1	1	-	-	2	5	1	9	3,91
1 - 5	17	8	4	12	10	14	65	28,26
5 - 10	11	5	5	2	4	9	36	15,65
10 - 20	7	9	4	2	10	4	36	15,65
20 - 40	9	9	3	9	12	17	59	25,65
40 - 60	3	5	1	5	2	4	20	8,70
60 - 70	-	-	-	1	1	2	4	1,74
> 70	-	-	-	1	-	-	1	0,43
Total	48	36	17	34	44	51	230	100,00

Fonte: SINAN/SES/SE (2001-2006)

Para confirmação do diagnóstico laboratorial as técnicas utilizadas foram a parasitológica, realizada em todos os portadores (230), e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Nessa última pode-se observar que parte dos portadores não realizou (83) e em alguns casos (11) os resultados constavam como negativos (Tabela 3)

Tabela 3: Distribuição proporcional de casos confirmados de LV segundo a técnica usada para diagnóstico.

Técnica de diagnóstico	Tipo de notificação	2001	2002	2003	2004	2005	2006	Total
	Positivo	48	36	17	34	44	51	230
Parasitológica	Negativo	-	-	-	-	-	-	0
	Ignorado	-	-	-	-	-	-	0
	Positivo	16	22	5	20	31	44	138
Imunológica (RIFI)	Negativo	1	3	1		5	1	11
	Ignorado	31	11	11	14	8	6	81

Fonte: SINAN/SES/SE (2001-2006)

Na distribuição proporcional de casos confirmados de LV por zona residencial do portador (Figura 3), notou-se que a zona urbana apresentou 50% (115) e a rural 45,66% (105). Ressalta-se que os casos ignorados foram de 3,04% (07) e urbano/rural de 1,3% (03).

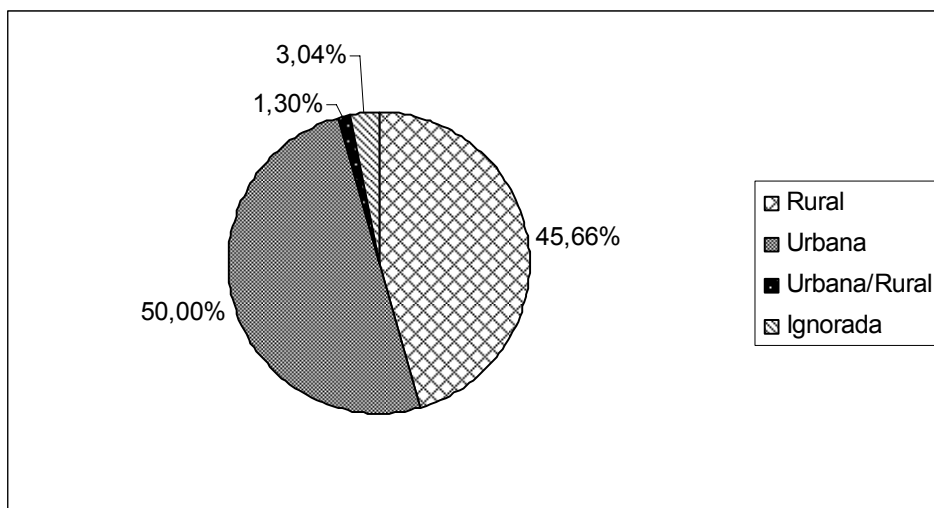


Figura 3: Percentual de casos confirmados de LV por Zona de Residência do portador.
Fonte: SINAN/SES/SE (2001-2006)

No que se refere à raça/cor dos portadores, têm-se que a cor parda representou 59,10% (136), a cor branca 14,78% (36), a cor negra 9,70% (22) e a cor amarela 1,30% (03) e notificados como indígenas 0,42% (1), enfatiza-se que esse dado foi cadastrado como ignorado em 14,78% (34) dos casos (Figura 4).

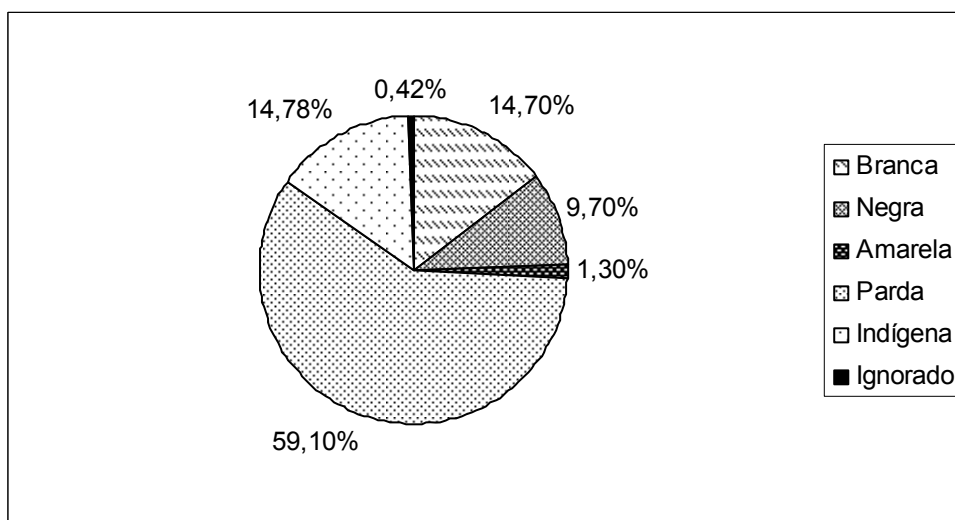


Figura 4: Distribuição percentual dos casos confirmados de LV por raça/cor do portador.
Fonte: SINAN/SES/SE (2001-2006)

Em relação à escolaridade dos acometidos (Figura 5), avaliou-se que a maioria, 47,85% (110) possuíam 4 a 7 anos concluídos, seguidos de 13,47% (31) com 1 a 3 anos, 13,04% (30) com 8 a 11 anos, 11,30% (26) com nenhum ano concluído e em 8,69% (20) dos acometidos esse dado foi ignorado.

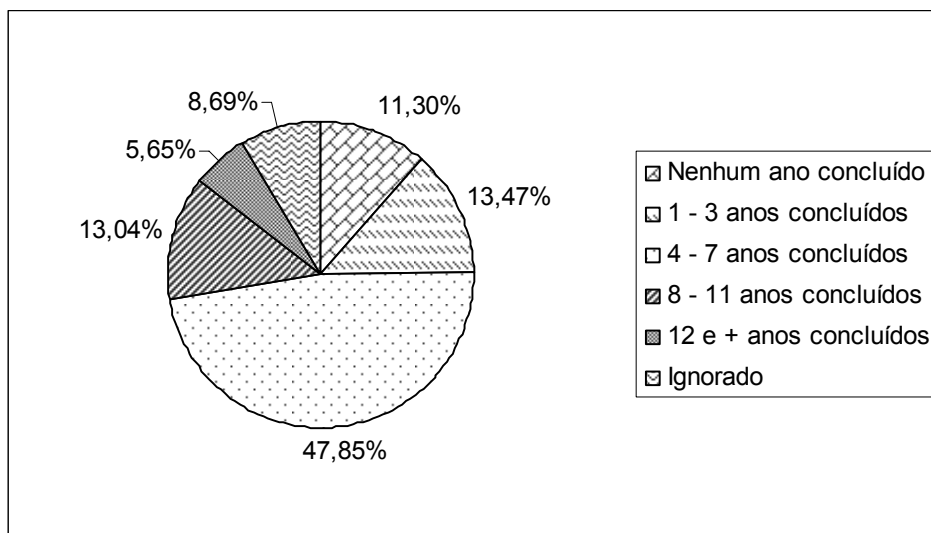


Figura 5: Distribuição percentual dos casos confirmados de LV por escolaridade do portador.
Fonte: SINAN/SES/SE (2001-2006)

A figura 6 avaliou o desfecho da doença, donde 76,96% (177) dos acometidos evoluíram para a cura e 11,74% (27) para óbito, é necessário salientar que esse dado foi ignorado em 11,30% (26) dos casos notificados.

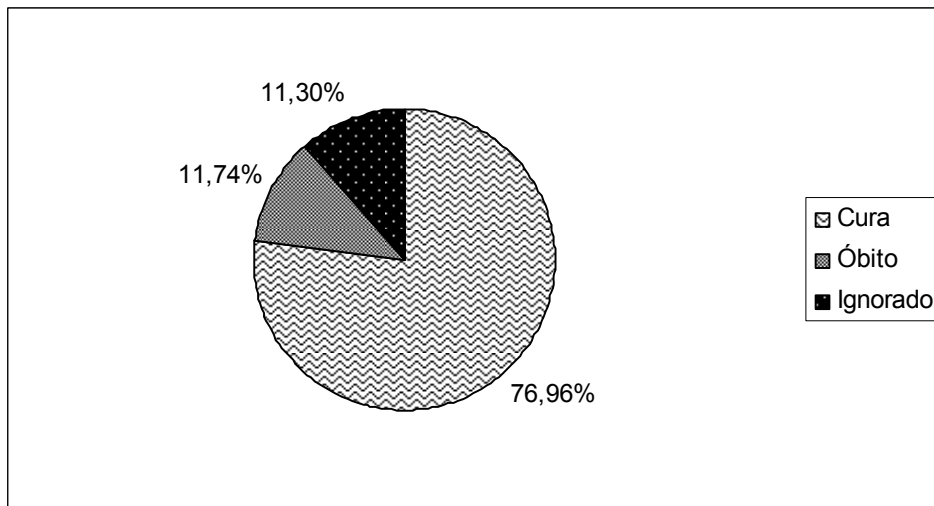


Figura 6: Distribuição em percentual dos casos confirmados de LV que evoluíram para cura, óbito ou ignorado, em Sergipe de 2001 a 2006
Fonte: SINAN/SES/SE (2001-2006)

5.6 – DISCUSSÃO

Nessa pesquisa, se constatou que foram notificados e confirmados 230 casos de leishmaniose visceral em Sergipe no período de 2001 a 2006, oriundos de 41 municípios dos 75 que compõem o Estado, ou seja, 54,66% apresentaram esse agravo à saúde.

Conforme CORREIA (1998), uma importante característica da LV é que, quanto maior a incidência da doença, maior o risco para as crianças mais jovens, fato já documentado no Brasil, aonde a preferência da parasitose pela população infantil vem se mantendo ao longo dos anos. Essa característica também foi observada nesse estudo, no qual a infecção predominou nos primeiros 5 anos de vida. Para BADARÓ *et al.* (1986), já que a imunidade duradoura se desenvolve com a idade, é provável que a maior incidência da doença no grupo de menor idade dependa da maior suscetibilidade à infecção e da depressão da imunidade observada nessa faixa etária. Entretanto, nesse estudo, houve também a ocorrência de um elevado número de casos na faixa etária de 20 a 40 anos. Esse fenômeno, talvez, esteja atrelado às atividades laborais dos portadores e uma maior exposição aos fatores de risco, a exemplo, contato com os artrópodes vetores. Vale ressaltar que, na literatura consultada, tem-se uma gama de trabalhos publicados referentes a estudos na faixa etária de até 15 anos, sendo prioridade pesquisas que abranja outras faixas etárias.

Segundo PASTORINO *et al.* (2002), a literatura aponta o gênero masculino como o mais susceptível ao adoecimento por LV. Nesse trabalho, o gênero masculino foi o mais acometido. COSTA *et al.* (1990) afirmaram, todavia, que o problema da maior prevalência da enfermidade entre as pessoas do gênero masculino ainda não está completamente elucidado. Complementam os autores, que se postulam a existência de um fator hormonal ligado ao gênero ou a exposição.

As técnicas utilizadas para diagnóstico laboratorial da LV em Sergipe, foram a parasitológica e imunológica. No banco de dados do SINAN, porém, não consta a origem do material que foi colhido para a execução da técnica. No entanto, segundo MELO (2004) a demonstração do parasito através de técnicas parasitológicas, tais como, esfregaço por aposição, cultura ou inoculação em animais ainda são os melhores testes laboratoriais para diagnosticar LV a partir de material de biópsia ou punção aspirativa de tecidos, com o baço sendo mais sensível que de medula óssea. Quanto ao imunológico o teste de escolha foi a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), conforme CANELA *et al.* (2004) é a mais utilizada na rotina para pesquisa de anticorpos antileishmania. SUNDAR *et al.* (2002) enfatizaram que essa técnica por utilizar antígenos brutos de leishmania torna-se limitada em termos de especificidade e reprodutibilidade.

A incidência de LV em Sergipe foi mais elevada na Zona Urbana que na Rural. Essa mudança de Zona Rural para Urbana é um fato epidemiológico que vem sendo analisado pelos pesquisadores, a exemplo de COSTA *et al.* (1990) e MOREIRA *et al.* (2005), desde a década de 70. Conforme, MELO (2004) a proximidade entre as habitações, a alta densidade populacional e a grande susceptibilidade das pessoas à infecção contribuíram para a rápida expansão da doença no ambiente urbano. Afirmar ainda a autora que pelo fato da urbanização ser um fenômeno relativamente novo, pouco ainda se conhece sobre a epidemiologia da LV nos focos urbanos, visto que as relações entre os componentes da cadeia de transmissão no cenário urbano parecem ser bem mais complexas e variadas que no rural.

Quanto ao grau de escolaridade dos portadores, se percebeu que a maioria possuíam de 4 a 7 anos concluídos, ou seja, o ensino fundamental incompleto, denotando a urgência de políticas educacionais no Estado de Sergipe e programas continuados voltados para educação em saúde.

No que concerne aos portadores de LV quanto a raça/cor, prevaleceu a cor parda. No Brasil a cor da pele é um parâmetro bastante controverso, visto que não existe estabelecido um conceito determinando as diferenças de cor para cútis.

Em relação ao desfecho dos casos, a evolução para cura foi bastante acentuada no período em estudo, mostrando a provável procura por serviços de saúde pelos supostos portadores antes do agravamento da doença, bem como a possível precocidade no diagnóstico e tratamento. Mas o número de casos ignorados foi bastante preocupante.

5.7 – CONCLUSÃO

Os resultados apresentados nesse estudo demonstraram o perfil epidemiológico da leishmaniose visceral em Sergipe, que segundo a Organização Mundial de Saúde pode desencadear alta morbimortalidade.

Acredita-se que, levando em consideração a importância médica social e econômica da leishmaniose visceral e também as falhas detectadas na alimentação do SINAN, a criação de um sistema de registro e acompanhamento estadual, traria uma melhora no atendimento e na qualidade dos serviços prestados à comunidade, reduzindo custos e principalmente agilizando o diagnóstico da doença e tratamento precoce dos casos humanos, bem como a diminuição dos riscos de transmissão mediante controle da população de reservatórios e vetores.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C. P. *Relatório técnico da campanha contra a Leishmaniose, Ministério da Saúde/SUCAM*. Aracaju, 1983, (mimeo).
- BADARÓ, R.; JONES, T. C.; LOURENÇO, B. A. Prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil, *J. Infect. Dis.*, 154:639-649, 1986.
- CAMARGO, L. B.; LANGONI, H. Impact of Leishmaniasis on Public Health, *J. Venomur. Anim. Toxins Inci. Trop. Dis.*, 12(4):527-548, 2006.
- CANELA, J. R.; ALVES, C. J. M.; RODRIGUES, G. C. Diagnostic profile of visceral leishmaniasis in adult patients at Clemente de Faria University Hospital, *Unimontes Científica*, 6 (2):107-111, 2004.
- CHAGAS, E. Primeira verificação em indivíduo vivo da leishmania visceral no Brasil, *Brasil-Médico*, 11(11):221-222, 1936.
- CORREIA, J. B. *Epidemiology of visceral leishmaniasis in Pernambuco, North-East of Brazil and the use of a látex agglutination test in urine for its diagnosis*. M.S. Dissertation, Liverpool School of Tropical Medicine, Liverpool, ING, 1998.
- COSTA, H. N. C.; PEREIRA, H.F.; ARAÚJO, M. V. Epidemia de leishmaniose visceral no estado do Piauí, Brasil, 198-1986, *Revista de Saúde Pública*, 24 (5):361-372, 1990.
- MELLO, D. A. Parasitic diseases in Brazil and the role of wild mammals: an analysis based on leishmaniasis, Chagas Disease an Schistosomíasis mansoni, *Ciência e Cultura*, 43 (4):274-278, 1991.
- MELLO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: desafios e perspectivas, *Rev. Parasitol. Vet.*, 23(1):41-45, 2004.
- MICHALICK, M. S. M.; GENARO, O. Leishmaniose visceral Americana. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**, 11ª ed. Atheneu: São Paulo, p. 184-193, 2005.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE – *Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral*, Brasília, 2003.
- MORENO, E. C.; MELO, M. N.; GENARO, O. LAMBERTUCCI, J. C. S.; AANDRADE, A. S. R.; ANTUNES, C. M. F.; CARNEIRO, M. Risk factors for Leishmania chagasi infection in an urban area of Minas Gerais State, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38(6):456-463, 2005.
- PASTORINO, A. C.; JACOB, C. M. A.; OSELKA, G. W.; SAMPAIO, M. M. C. Leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais, *Journal of Pediatric*, 78:120-127, 2002.
- SUNDAR, S.; PAI K., SAHU, M. Immunochromatographic strip test detection af anti k39 antibody in Indian visceral leishmaniasis, *Rev. Trop. Med. Parasitol.*, 96: 19-23, 2002.
- TAVARES, L. M. S. A.; TAVARES, E. D. Incidência, distribuição e aspectos ambientais das áreas endêmicas da leishmaniose visceral em Sergipe, *Informe Epidemiológico do SUS*, 8(1):47-52, 1999.

CONCLUSÃO GERAL

O potencial biológico proveniente do reino vegetal é uma fonte inesgotável para investigação científica de novas drogas que possam vir a serem utilizadas no tratamento das infecções e afecções do homem, melhorando sua qualidade de vida.

A pesquisa por produtos oriundos de espécies vegetais tem intensificado por eles possuírem grande diversidade molecular que é primordial para produção de novos fármacos.

Por outro lado, as parasitoses continuam sendo um problema de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento desencadeando alta morbimortalidade em especial nas crianças.

A parasitose leishmaniose visceral no estado de Sergipe é considerada como endêmica e atualmente estar preocupantes sendo necessárias novas estratégias urgentes que atuem na prevenção, controle dos vetores e reservatórios.

Os óleos essenciais obtidos das plantas *Cymbopogon citratus*, *Eucalyptus citriodora*, *Mentha arvensis* e *Mentha piperita* são bastante pesquisados e já possuem várias atividades farmacológicas comprovadas cientificamente.

Na literatura consultada, entretanto, não foi encontrado estudos envolvendo a ação desses óleos essenciais contra formas evolutivas do gênero *Leishmania*.

Nessa pesquisa os óleos essenciais obtidos das folhas frescas por arraste de vapor das plantas citadas apresentaram *in vitro* atividade contra as formas promastigotas de *Leishmania* (L.) *chagasi*. Eles eliminaram em 100% essas formas nas condições desse estudo.

Quando comparando as concentrações efetivas (EC₅₀) dos óleos essenciais, pode-se concluir que o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* apresentou maior eficiência que os outros três óleos essenciais.

Pesquisas aliadas a etnofarmacologia, fitoquímica, atividade biológica e biologia molecular têm corroborado para a compreensão do mecanismo de ação de princípios ativos obtidos de espécies vegetais, além de identificar os sítios receptores existentes nas células do hospedeiro.

Essa perspectiva emprega-se, também, aos óleos essenciais das espécies de plantas objeto desse estudo, uma vez que o estudo aprofundado em formas intracelulares amastigotas de *Leishmania* em hospedeiros vertebrados e a avaliação da citotoxicidade, bem como a síntese de seus componentes majoritários podem contribuir não só para valorização econômica desses óleos, mas principalmente na utilização deles como agentes terapêuticos contra as leishmanioses que já apresentam cepas resistentes aos

medicamentos encontrados no arsenal farmacêutico, sendo prioridade, portanto, pesquisas de novas drogas seguras e eficazes para o tratamento dessas parasitoses.