



RENORBIO

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e
Citral contra leishmaniose visceral.

Ana Maria Guedes de Brito

Aracaju – SE

Março – 2013

Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e
Citral contra leishmaniose visceral.

Tese apresentada como pré-requisito para obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da pela RENORBIO, Ponto Focal – Aracaju – Sergipe.

Área de concentração: Biotecnologia em Recursos Naturais.

Ana Maria Guedes de Brito

Orientador: Prof. Dr. Lauro Xavier-Filho

Aracaju – SE

Março – 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

B862a Brito, Ana Maria Guedes de
Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.)
Stapf e Citral contra leishmaniose visceral / Ana Maria Guedes de
Brito ; orientador Lauro Xavier-Filho. – Aracaju, 2013.
88 f. : il.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Rede Nordeste de
Biotecnologia – RENORBIO, Universidade Federal de Sergipe,
2013.

1. Biotecnologia – Aplicações médicas. 2. Matéria médica
vegetal. 3. *Mycobacterium tuberculosis*. I. Trindade, Rita de
Cássia, orient. II. Título.

CDU 606:616.24-002.5

Ana Maria Guedes de Brito

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral.

Tese apresentada como pré-requisito para obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da RENORBIO, Ponto Focal – UFS – São Cristóvão – Sergipe.

Área de concentração: Biotecnologia em Recursos Naturais.

Aprovada em: ____/____/____

Prof. Dr. Lauro Xavier-Filho
Orientador

Prof. Dra. Edna Aragão Cândido
(Universidade Tiradentes/Aracaju)

Prof. Dr. Allan Pablo do Nascimento Lameira
(Universidade Tiradentes/Aracaju)

Prof. Dr. Márcio Roberto Viana dos Santos
(UFS/São Cristóvão)

Prof. Dr. Roberto Rodrigues de Souza
(UFS/São Cristóvão)

Parecer

“Se não houver frutos, valeu a beleza das flores. Se não houver flores, valeu a sombra das folhas. Se não houver folhas, valeu a intenção das sementes.”

Henfil, humorista e cartunista brasileiro.

Agradecimentos

Ao longo do desenvolvimento do presente trabalho foram tantas as pessoas que colaboraram na experiência profissional e nos conhecimentos agregados. Acredito que, sem essas colaborações a realização desse estudo seria irrealizável. Assim, agradeço:

Universidade Tiradentes/Aracaju – SE, na qual faço parte há 20 anos e durante esse tempo sempre fui respeitada e incentivada à capacitação.

Instituto de Tecnologia e Pesquisa/Aracaju – SE, onde homenageio aos Doutores Verônica Sierpe, Cláudia Melo, Ricardo Albuquerque, Vânia Fonseca e Juliana Cordeiro pelos momentos de saberes, amizade e descontração.

Universidade Federal de Sergipe/São Cristóvão – SE, por me receber com carinho e sempre que possível atender minhas solicitações nas realizações das Cromatografias Gasosas e FID, em especial a Darlisson de Alexandria Santos e Elizangela Mércia Oliveira Cruz.

Hospital Universitário/Universidade Federal de Sergipe, ao Dr. Roque Pacheco e Priscila Lima pelos ensaios desenvolvidos e conversas científicas.

Laboratório de Toxinologia Aplicada do Departamento de Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz/São Paulo – SP, ao Dr. André Gustavo Cardoso Tempone e a MSc. Erika Pinto pelos conhecimentos, pelos ensaios desenvolvidos e principalmente pela amizade que aos poucos foi acontecendo.

Aos meus filhos Davizinho e Ana Cláudia (neinha) por acreditar em mim, por todo o amor, carinho, felicidade, apoio, incentivo e compreensão demonstrada ao longo, de todo esse percurso e até nos momentos mais difíceis.

Aos meus queridos amigos Hesmoney Santa Rosa, Malone Pinheiro, Pureza Ramos de Santa Rosa, Ana Carolina Mota, Isamar Dantas Oliveira, Cláudio Moreira de Lima, Ana Paula Prata, Ana Paula Belizário, Synara Alexandre e especialmente Adriana Guimarães, Josivaldo Amarin e Sheyla Alves Rodrigues.

Ao meu jovem e talentoso sobrinho Renan Guedes de Brito que tem sido um verdadeiro companheiro e contribuído em todos os momentos na construção dessa Tese.

Ao meu estimado Orientador Dr. Lauro Xavier-Filho, o senhor é demais!

Aos portadores de leishmaniose visceral, como é complicada a relação parasita - hospedeiro e aos modelos animais, posto, sem eles torna-se difícil o caminhar da Ciência.

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.

Agradecida a todos!

Ana Maria Guedes de Brito

EPÍGRAFE

*“Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis.”*

Bertolt Brecht

RESUMO

BRITO, A. M. G. Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral. Tese de Doutorado, 88 páginas, Aracaju-SE, 2013.

No Brasil as leishmanioses atingem 19 estados, sendo que mais de 90% dos casos humanos da doença concentram-se na região Nordeste, havendo ainda focos importantes nas regiões Centro-Oeste, Norte e Sudeste. Estudos sinalizam para a ocorrência de cerca de 20.000 casos anuais da doença. A necessidade de novos fármacos mais eficazes, seguros e acessível para o tratamento das leishmanioses, em especial a visceral, posto, acomete fígado, baço, sistema reticuloendotelial, medula óssea e linfonodos torna-se relevante. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, as espécies vegetais são fontes de fármacos importantes para humanidade e o Brasil possui 60,7% do seu território de florestas naturais e plantadas, representando a segunda maior área florestal do mundo, atrás apenas da Rússia. Assim, esse estudo objetivou investigar as atividades do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e Citral contra *Leishmania* (L.) *chagasi*. Para tal, obteve-se o óleo das folhas fresca colhidas na fazenda Mãe Terra, localizada em Santana do São Francisco/SE, já o Citral foi adquirido da Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany). Foram realizadas suas Cromatografias Gasosas e Detecções por Ionização de Chama para identificar seus constituintes químicos, bem como avaliação das concentrações inibitórias 50% nas promastigotas e amastigotas na *Leishmania* supracitada, ensaios de citotoxicidade, produção de oxido nítrico e fluorescência para detectar possível aumento da permeabilidade de membrana em presença do Citral foram desenvolvidos. Atividades farmacológicas foram constatadas em promastigotas (CI_{50} /48 horas 25 μ g/mL para óleo e 30 μ g/mL para Citral), entretanto, não foi encontrada ação nas amastigotas. A citotoxicidade (CI_{50} foi de 26,25 μ g/mL para óleo e 33,96 μ g/mL para Citral). Quanto ao aumento na produção de oxido nítrico, essa não ocorreu, todavia, foi observada formação de poros nas membranas celulares nos promastigotas em presença de Citral. Portanto, o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e Citral pode vir a ser usados como medida preventiva contra leishmaniose visceral. Uma vez que as promastigotas são as formas que infectam os animais vertebrados, inclusive o homem.

Palavras-chave: Produtos naturais, plantas aromáticas, *Cymbopogon citratus*; Citral, leishmaniose visceral.

ABSTRACT

BRITO, A. M. G. Activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf and Citral against visceral leishmaniasis. Doctoral Thesis, 88 pages, Aracaju-SE, 2013.

In Brazil leishmaniasis reach 19 states, and more than 90% of human cases of the disease are concentrated in Northeast region, there is still important regions foci in the Midwest, North and Southeast regions. Studies point for the occurrence of about 20.000 new cases annually of the disease. The need for new drugs more effective, safe and accessible for the treatment of leishmaniasis, visceral in particular, later on, affects liver, spleen, reticuloendothelial system, bone marrow and lymph nodes becomes relevant. Furthermore, according to the World Health Organization, the plant species are the best and major source of drugs for humanity and Brazil has 60.7% of its territory of natural and planted forests, representing the second largest forest area in the world, only behind from Russia. Thus, this study aimed investigated the activities of the essential oil of *Cymbopogon citratus* and Citral against *Leishmania* (L.) *chagasi*. In order for this to happen, oil from fresh leaves were harvested on the Mother Earth farm, located in Santana do São Francisco/SE. The Citral was acquired from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany). Gaseous Chromatography and Detections by Flame Ionization were carried to identify its chemical constituents, just like an evaluation of inhibitory concentrations 50% in promastigotes and amastigotes in *Leishmania* mentioned beforehand, cytotoxicity assays, nitric oxide production and fluorescence to detect possible increase of membrane permeability in the presence of Citral were developed. Pharmacological activities were found in promastigotes ($CI_{50}/48$ hours 25 μ g/mL for oil and 30 μ g/mL for Citral), however, activities were not found in amastigotes. The cytotoxicity (CI_{50} was 26.25 μ g/mL for oil and 33.96 μ g/mL for Citral). As for the increased production of nitric oxide, this did not occur, however, pore formation was observed in cell membranes of promastigotes in the presence of Citral. Therefore, the essential oil of *Cymbopogon citratus* and Citral may come to be used as preventive measure against visceral leishmaniasis. Since the promastigotes are the ways that infect vertebrates, including man.

Key-words: Natural products, aromatic herbs, *Cymbopogon citratus*, Citral, visceral leishmaniasis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais vias do metabolismo secundário.....	7
Figura 2. Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.....	7
Figura 3. <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf.....	11
Figura 4. Fórmula estrutural dos isômeros do Citral.....	14
Figura 5. <i>Lutzomyia longipalpis</i> , vetor da leishmaniose no Brasil.....	17
Figura 6. Promastigotas de <i>Leishmania</i> (L) <i>chagasi</i> obtidas a partir de cultivo.....	17
Figura 7. Macrófago de baço de Hamster dourado exibindo ninhos de amastigota de <i>Leishmania</i> (L) <i>chagasi</i>	18
Figura 8. Ciclo evolutivo de <i>Leishmania</i> spp.....	19
Figura 9. Distribuição geográfica mundial dos casos de leishmaniose, bem como dos casos de co-infecção com VIH 1990 a 1998.....	20
Figura 10. Estratificação dos Municípios, segundo perfil de transmissão de LV – Brasil, 2006 - 2008.....	20
Figura 11. Casos humanos confirmados de leishmaniose no Brasil em 2008.....	21
Figura 12. Leishmaniose visceral – evidenciando hepatoesplenomegalia...	23
Figura 13. Fórmula estrutural de Glucantime.....	33
Figura 14. Fórmula estrutural de Anfotericina B.....	34
Figura 15. Fórmula estrutural de Pentamidina.....	34
Figura 16. Fórmula estrutural de Miltefosina.....	34
Figura 17. Extrator de óleo essencial por arraste de vapor – Marconi.....	38
Figura 18. <i>Hamsters golden</i> saudáveis pertencente ao Biotério do Instituto Adolfo Lutz/São Paulo – São Paulo.....	41
Figura 19. Leitura dos resultados obtidos para o óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> e Citral através da metodologia Brometo de 3 (4,5-dimetiltiazol-2-Il)-2,5difeniltetrazólio.....	42
Figura 20. Camundongos BALB/c provenientes do Biotério do Instituto	

Adolfo Lutz/São Paulo – São Paulo.....	43
Figura 21. Placa mostrando ensaio de citotoxicidade do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> e Citral.....	44
Figura 22. <i>Hamsters Golden</i> portador de leishmaniose visceral.....	45
Figura 23. Microplaca (NUNC-PolySorp) apresentando resultado do tratamento das formas amastigotas intracelular de <i>Leishmania (L.) chagasi</i> com óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> e Citral.....	45
Figura 24. Cromatograma do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> obtido das folhas frescas por Cromatografia Gasoso acoplado a um Espectrometro de Massas e Detector por Ionização de Chama.....	49
Figura 25. Cromatograma do Citral por Cromatografia Gasoso acoplado a um Espectrometro de Massas e Detector por Ionização de Chama.....	50
Figura 26. Curvas concentrações respostas para o óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> (Figura A) e Citral (Figura B) contra 1×10^6 promastigotas/poço de <i>Leishmania (L.) chagasi</i>	53
Figura 27. Curvas concentrações respostas para o óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> e Citral em macrófagos (4×10^5 macrófagos/poço) da cavidade peritoneal de BALB/c.....	55
Figura 28. Efeito do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> e do Citral na geração de nitrito em macrófagos (7×10^5 /poço) de cavidade peritoneal de BALB/c.....	57
Figura 29. Imagens obtidas a partir de microscopia de luz dos promastigotas de <i>Leishmania (L.) chagasi</i>	58
Figura 30. Fluorescência Sytox Green da <i>Leishmania (L.) chagasi</i>	59

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Constituintes químicos do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> identificados por GC-MS/FID e os respectivos teores.....	51
Tabela 2. Constituintes químicos do Citral identificados por GC-MS/FID e os seus respectivos teores.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SIGLAS E SÍMBOLOS

AAS – Ácido Acetilsalicílico

ABNT – Associação Brasileira de Normas e Técnicas

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BALB/c – Espécie de camundongo albino

CC – Concentração citotóxica

CDB – Convenção da Diversidade Biológica

CDC – Tipo de armadilha para captura de insetos com luminosidade

CG – Cromatografia Gasosa

CG – EM – Cromatografia Gasosa com Espectrômetro de Massas

CG – FID – Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama

CI₅₀ - Concentração inibitória 50%

CRAS – Centro de Reabilitação de Animais

Da - Dalton

DATASUS – Departamento de Informação do Sistema Único de Saúde do Brasil

DEN – Dietilnitrosamina

Di – Diâmetro interno

DMSO – Dimetilsulfoxido

DO – Densidade ótica

d.p.m – Desvio padrão médio

DPPH – 1,1-difenil-2-picril-hidrazil

eV - eletro Volt

GIPLs – Fosfolipídios glicosilinositol

gp – glicoprotéina

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

hPa – Hectopascal

IFN – Interferon

Ig – Imunoglobulina

iNOS – Óxido nítrico sintase induzível

IS – Índice de seletividade

(L.) - *Leishmania*

LC – Leishmaniose cutânea

LCF – Fator Quimiotático da *Leishmania*

LMC – Leishmaniose mucocutânea

LPG – Lipofosfoglicano

LT – Leishmaniose tegumentar

LV – Leishmaniose visceral

LVH – *Leishmania visceral* humana

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

MIP – Proteína inflamatória dos macrófagos

MS – Ministério da Saúde

MTT – [Brometo de 3 (4,5-dimetiltiazol-2-Il)-2,5difeniltetrazólio]

ON – Óxido Nítrico

O₂ – Anion superóxido

8-OGdG – 8-hodroxideoxiguanosina

OMS – Organização Mundial de Saúde

ONU – Organização das Nações Unidas

OPAS – Organização Panamericana de Saúde

PBS – Solução salina tamponada fosfatada

PCLV – Programa de Controle da Leishmaniose Visceral

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PCR – RFLP – Reação de Polimerase em Cadeia associada com o Polimorfismo de Fragmento de DNA obtidos por Enzimas de Restrição

QPN – Química de Produtos Naturais

RR – Risco Relativo

mRNA – Ácido Ribonucléico mensageiro

SBCAL – Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório

SINAN – Sistema de Informações Notificáveis

spp – Sem espécie

TBARS – Produção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

TGF- β – Fator de transformação de crescimento beta

Th1 – Célula tipicamente produtora de INF, IL-2 e TNF

UPF – Ultra Baixo Volume

SUMÁRIO

1 Introdução.....	1
2 Revisão da Literatura.....	3
2.1 Plantas Medicinais: aspectos gerais.....	3
2.2 Plantas Aromáticas.....	5
2.3 Óleos Essenciais.....	6
2.4 <i>Cymbopogon citratus</i> (D. C.) Stapf.....	10
2.5 Citral.....	14
2.6 Leishmanias e leishmanioses.....	16
2.7 Leishmaniose visceral: Etiologia, patogenia e peculiaridades clínicas.....	22
2.8 Interação <i>Leishmania</i> -vetor.....	22
2.9 Relação <i>Leishmania</i> – hospedeiro humano.....	25
2.10. Aspectos eco-epidemiológicos das leishmanioses.....	26
2.11. Tratamento contra as leishmanioses.....	30
2.12. Prevenção.....	35
3. Objetivos.....	37
4. Metodologia.....	38
4.1. Material botânico.....	38
4.2. Extração do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i>	38
4.3 Caracterização química do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> e Citral.....	39
4.4 Aspecto ético.....	40
4.5 Animais.....	40
4.6 Eutanásia e descarte dos animais.....	40
4.7 Parasitas.....	41
4.8. Determinações das concentrações inibitórias 50% (CI ₅₀) do óleo essencial e Citral contra promastigota de <i>Leishmania</i> (L) <i>chagasi</i>	41
4.9. Ensaio de citotoxicidades do óleo essencial e Citral.....	43
4.10. Atividades do óleo essencial e Citral sobre amastigota intracelular	

em <i>Leishmania</i> (L.) <i>chagasi</i>	44
4.11. Produção do óxido nítrico em macrófago por óleo essencial e Citral.....	46
4.12. Estudos morfológicos.....	46
4.13. Avaliação da permeabilidade de membrana celular em promastigota de <i>Leishmania</i> (L.) <i>chagasi</i> pelo Citral.....	46
4.11. Análise estatística.....	47
5. Resultados e Discussão.....	48
5.1 Caracterização química do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> e Citral.....	48
5.2 Determinações das concentrações inibitórias 50% (CI ₅₀) do óleo essencial e Citral contra promastigota de <i>Leishmania</i> (L.) <i>chagasi</i>	52
5.3 Ensaio de citotoxicidades do óleo essencial e Citral.....	54
5.4. Determinações das concentrações inibitórias 50% do óleo essencial e Citral em amastigotas intracelulares de <i>Leishmania</i> (L.) <i>chagasi</i>	55
5.5 Produção de nitrito em macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c por óleo essencial e Citral.....	56
5.6 Imagens obtidas por microscopia de luz.....	58
5.7 Avaliação da permeabilidade de membrana celular em promastigota de <i>Leishmania</i> (L.) <i>chagasi</i> pelo Citral.....	59
6 Conclusão.....	60
7 Propostas de trabalhos futuros.....	61
Referências.....	62
Anexos.....	82
Anexo 1. Liberação do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP-UNIT.....	83
Anexo 2. Artigo 1. Evaluation of the <i>in vitro</i> activity of the essential oil of <i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf and Citral on <i>Leishmania</i> (L.) <i>infantum</i> ...	85
Anexo 3. Artigo 2. Anti- <i>Leishmania</i> activity: integrative review from 2000 to 2011.....	86
Anexo 4. Artigo 3. Aromaterapia: da gênese a atualidade.....	87
Anexo 5. Resumo aceito no 5º Congresso Mundial de Leishmaniose.....	88

1 Introdução

As leishmanioses causadas por protozoários do gênero *Leishmania* são endêmicas em 88 países, incluindo alguns dos continentes europeus e, essencialmente, nos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento como o Brasil. Essa doença tropical potencialmente fatal é considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), como a segunda protozoose mais importante em saúde pública (GIL et al., 2008).

No Brasil, as leishmanioses atingem 19 estados, sendo que mais de 90% dos casos humanos da doença concentram-se na região Nordeste, havendo ainda focos importantes nas regiões Centro-Oeste, Norte e Sudeste. Estudos sinalizam para a ocorrência de cerca de 20.000 novos casos anuais da doença (MAIA-ELKHOURY et al., 2008). Os medicamentos utilizados para o tratamento das parasitoses acima referidas demonstram variabilidade de sua eficácia, desencadeiam reações adversas danosas e apresentam casos de resistência (MALTEZOU, 2010; TEMPONE; OLIVEIRA; BERLINCK, 2011).

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 o número de casos por ano no período de 2003 a 2011 notificados em Sergipe foram: 12 casos no ano de 2003, 29 em 2004, 41 em 2005, 50 em 2006, 75 em 2007, 79 em 2008, 45 em 2009, 90 em 2010 e 83 casos em 2011 (DATASUS, 2012).

A incidência de milhões de novos casos por ano, bem como as deficiências no tratamento atual mostra uma necessidade premente por novos medicamentos para as leishmanioses (GACHET et al., 2010). Essa circunstância justifica a busca de novas moléculas que possuam efetividade contra elas, em especial a visceral, sendo os produtos naturais uma importante fonte de pesquisa (ESPINDOLA, 2007). Conforme a OMS, as espécies vegetais são interessante fonte de fármacos para humanidade (ROCHA et al., 2005). Nesse âmbito se inclui as plantas aromáticas que por metabolismo secundário originam os óleos essenciais (BRITO et al., 2008).

O óleo essencial de *Cymbopogon citratus* que é uma espécie vegetal originária da Índia e amplamente distribuída por vários países tropicais, entre eles o Brasil, tem sido empregado como aromatizante em perfumaria, indústria cosmética e alimentícia por seu forte odor de limão e também para obtenção do Citral, seu principal constituinte (COSTA

et al., 2005). Igualmente possui ações farmacológicas reconhecidas tais como antiespasmódica (SIMÕES et al., 1999), antiasmática (FERREIRA; FONTELES, 1985), fungicida (KISHORE; MISHARRI; CHANSOURIA, 1993) e antibacteriana (MAHMOUD, 1994).

O aumento do número de casos de leishmaniose visceral no Brasil e em especial Sergipe, notadamente em Aracaju, os problemas enfrentados no que concerne ao seu tratamento, a indisponibilidade de vacina eficaz e atentando para biodiversidade existente na flora brasileira e o seu potencial como fonte de moléculas bioativas a serem averiguadas foram pontos que propiciaram o desenvolvimento dessa pesquisa.

Assim, esse estudo objetivou investigar a atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra *Leishmania (L) chagasi*. Para tal, foram realizadas Cromatografias Gasosas e Detecções por Ionização de Chama para identificar seus constituintes químicos, avaliação das concentrações inibitórias 50% (CI₅₀) em promastigotas e amastigotas intracelulares da *Leishmania* supracitada, além de ensaios de citotoxicidade, produção de óxido nítrico e alteração de permeabilidade da membrana celular para observar possível desestabilização da membrana na presença do Citral.

O presente trabalho foi estruturado como segue: Introdução, Revisão da Literatura, Objetivo Geral e Específicos, Metodologia, Resultados e Discussão, bem como Conclusão, Proposta para outros Trabalhos, Referências e Anexos.

2 Revisão da Literatura

2.1 Plantas Medicinais: aspectos gerais

A procura por alívio e cura de agravos à saúde pela ingestão de ervas e folhas, talvez, tenham sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006). O uso de plantas no tratamento de doenças no homem data de tempos remotos com registro na antiga China há cerca de 2.700 a. C. e em papiros egípcios por volta de 1500 a. C. (SOUZA et al., 2007). A medicina tradicional chinesa progrediu com tal magnificência e desempenho que nos dias atuais muitas espécies e preparados vegetais medicinais são estudados na busca do entendimento de seu mecanismo de ação e no isolamento de princípios ativos (KOSSUNGA, 2008).

Um exemplo notável de produtos naturais que desencadearam grande impacto na humanidade, e de certa maneira modificou o comportamento do homem moderno, foi a descoberta das substâncias alucinógenas. Os povos antigos usavam rapés e bebidas alucinógenas em suas atividades religiosas (HOSTETTMANN et al., 2003).

O ópio, preparado dos bulbos de *Papaver somniferum*, é conhecido há séculos por suas propriedades soporíferas e analgésicas. Essa planta foi utilizada desde a época dos Sumérios (4.000 a. C.), existindo relatos na mitologia grega atribuindo à papoula do ópio o simbolismo de Morfeu, o deus do sono. Em 1803 Derosne descreveu o “sal de ópio” iniciando os primórdios dos estudos sobre a constituição química do ópio, cujo são obtidos alcalóides como morfina utilizada até os dias atuais para analgesia, codeína como antitussígeno, tebaína um antagonista da morfina, narcotina com ação espasmolítica e antitussígena e papaverina que possui atividade espasmolítica (AMAROZO, 2002).

A eficiência da morfina como analgésico foi reconhecida após a invenção da seringa hipodérmica em 1835, sendo largamente utilizada pelas tropas dos Estados Unidos durante a Guerra Sucessão entre 1861 a 1865 (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). A história do Brasil está estreitamente relacionada ao comércio de produtos naturais (as especiarias), os quais marcaram as várias disputas de posse da nova terra que culminou com a colonização portuguesa. Do Pau-Brasil (*Cesalpínea echinata*) era obtido um corante vermelho muito utilizado para tingimento de roupas e como tinta de escrever, já utilizado nas Índias orientais desde a idade média (SOUZA et al., 2008).

Apesar da utilização dos produtos naturais desde tempos imemoráveis, o desenvolvimento e aplicação deles apresentaram pouco progresso até a década de 1940. Esse fato está atrelado às inúmeras limitações existentes para a caracterização dos princípios ativos presentes nas espécies, visto que até então, a principal ferramenta utilizada para a elucidação da composição de suas substâncias era a execução dos métodos químicos de análises, que consistiam no uso de reações de degradação, derivatização e identificação de grupos funcionais, na tentativa de se determinar a estrutura da molécula ambicionada (MACHADO et al., 2010).

Não obstante a importância dos métodos químicos de análise, a área de produtos naturais somente pode se desenvolver a partir do advento dos métodos físicos de análise e de purificação, como exemplo a espectroscopia na região visível, ultravioleta e infravermelho no início dos anos quarenta e ressonância nuclear magnética nos anos sessenta (ALVES, 2001). No século XIX, com o desenvolvimento da indústria farmacêutica, os produtos naturais começaram a ser explorados comercialmente para o desenvolvimento de medicamentos e as plantas terrestres tiveram grande importância como a primeira fonte de matéria prima para essas indústrias (SILVA; DE PAULA; ESPINDOLA, 2009).

O marco mais importante para o progresso dos fármacos a partir de produtos naturais, talvez, tenha sido a descoberta dos salicilatos obtidos da casca de *Salix alba*, que possuem propriedades analgéticas e antipiréticas. Do extrato de *Salix alba* foi isolado a salicina, a qual foi usada como modelo para a síntese do ácido salicílico e do ácido acetilsalicílico (AAS), um composto menos ácido que o ácido salicílico, mas, com a mesma propriedade analgésica desejada. Após mais de um século de sua descoberta o AAS ainda continua sendo alvo de inúmeras pesquisas sobre sua aplicação terapêutica (YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO 2001).

A importância dos produtos naturais de origem vegetal no combate a diferentes tipos de doença que acometem a espécie humana pode ser constatada pelo grande número de fármacos que estão disponíveis no mercado, cujos se citam artemisina, um antimalárico obtido da planta *Artemisia annua*, atropina, anticolinérgico extraído da planta *Atropa belladonna*, estreptomomicina, o primeiro antibiótico utilizado no tratamento da tuberculose, isolado do fungo *Streptomyces griseus*, pilocarpina retirada das folhas da planta *Pilocarpus jaborandi*, usada como colírio no tratamento de glaucoma, entre outros (ROCHA et al., 2005).

Estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostraram que aproximadamente 80% da população mundial recorrem do uso de plantas medicinais para satisfazer suas necessidades de cuidados primários de saúde, sendo que 30% dos usuários utilizam fitoterápicos por indicação médica (MARTINS, 2000; ALBAGLI, 2001).

2.2 Plantas Aromáticas

O desenvolvimento sustentável de um país depende fundamentalmente de uma política estável de educação, ciência, tecnologia e inovação, defendida na preservação da natureza, na biodiversidade e na exploração racional de fontes naturais necessárias para alimentação, avanço social e econômico, num cenário que assegura a manutenção da saúde e a cura de doenças (BRAZ FILHO, 2010).

As atividades da fotoquímica podem contribuir significativamente para a concretização do plano acima referido através da investigação da flora e seu quimismo, da propalação e geração de novos saberes e da formação de recursos humanos qualificados. A química de produtos naturais (QPN) de vegetais – fitoquímica, como é entendida nos dias atuais, se dedica à caracterização estrutural, avaliação de propriedades e investigações biossintéticas de substâncias naturais produzidas pelo metabolismo secundário de organismos vivos (TORSSELL, 1983).

Dentre as plantas medicinais, existem as aromáticas que por metabolismo secundário origina grupos de compostos de grande importância econômica devido seu crescente uso nas indústrias farmacêutica, alimentícia, cosmética, higiene e limpeza. Os principais grupos de compostos advindos do metabolismo secundário das plantas aromáticas com atividade biológica são os alcalóides, flavonóides, cumarinas, taninos, quinonas e óleos essenciais (BUSATA, 2006).

O Brasil é detentor de uma flora rica, composta por uma infinidade de espécies com aplicações terapêuticas e possui a maior diversidade genética vegetal (megabiodiversidade), contando com mais de 55.000 espécies catalogadas, sendo assim a maior cobertura vegetal em todo o planeta (CORRÊA, 2002). Conforme Maia; Zoghbi; Andrade (2001) tinha sido identificada até 2001 noventa espécies aromáticas na região amazônica, sendo o potencial dessa flora indiscutível, uma vez que, pode ser considerada como uma fonte renovável, apropriada à produção de essências aromáticas, como alternativa econômica para o desenvolvimento sustentável.

2.3 Óleos Essenciais

São misturas complexas de substâncias voláteis lipofílicas comumente odoríferas e líquidas. Sua principal característica é a volatilidade, diferindo-se, assim, dos óleos fixos, mistura de substâncias lipídicas, obtidos geralmente de sementes (NERIO; VERBEL; SASHENKOT, 2010).

Os óleos essenciais apresentam também outras características tais como aparência oleosa à temperatura ambiente, aroma agradável e intenso na maioria deles, solubilidade em solventes orgânicos apolares. Em água possuem solubilidade limitada, mas suficiente para aromatizar as soluções aquosas, que são nominadas de hidrolatos, seus sabores são geralmente acres (ácido) e picantes, cor quando recentemente extraídos são na maioria incolores ou ligeiramente amarelados, sendo poucos os óleos que apresentam cor, como o óleo essencial de camomila com coloração azulada pelo seu alto teor de azuleno (PILLA; AMOROZO; FURLAN, 2006).

Quanto à estabilidade, em geral não são muito estáveis, principalmente na presença de ar, calor, luz, umidade e metais, a maioria possui índice de refração e são opticamente ativos. Já seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, e até compostos com enxofre. Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações, normalmente, um deles é o composto majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades ou traços (SIMÕES; SPITZER, 2003).

A grande maioria dos óleos essenciais é constituída de derivados de terpenóides ou de fenilpropanóides (figura 01), sendo que os primeiros preponderam. Os terpenóides são advindos de unidades do isopreno e os fenilpropanóides são procedentes do ácido chiquímico, que forma as unidades básicas dos ácidos cinâmico e p-cumárico. Tais compostos são metabólitos secundários (figura 02), cuja origem é explicada a partir do metabolismo da glicose (SIMÕES et al., 2003).

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

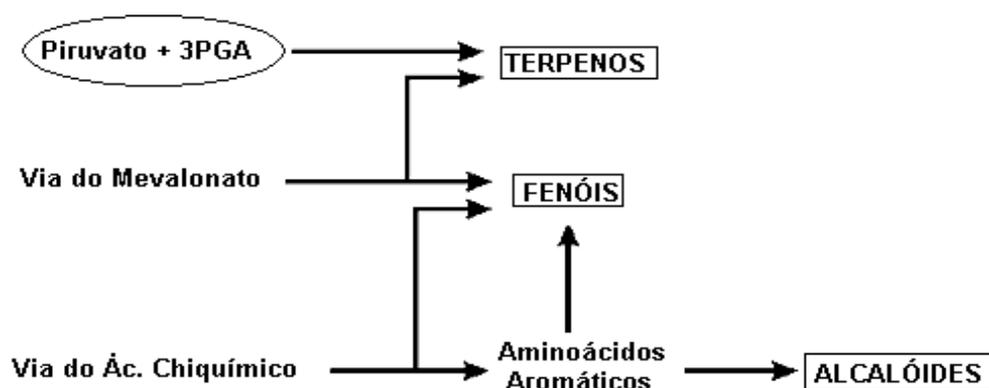


Figura 1. Principais vias do metabolismo secundário

Fonte: Adaptado de Peres (2004).

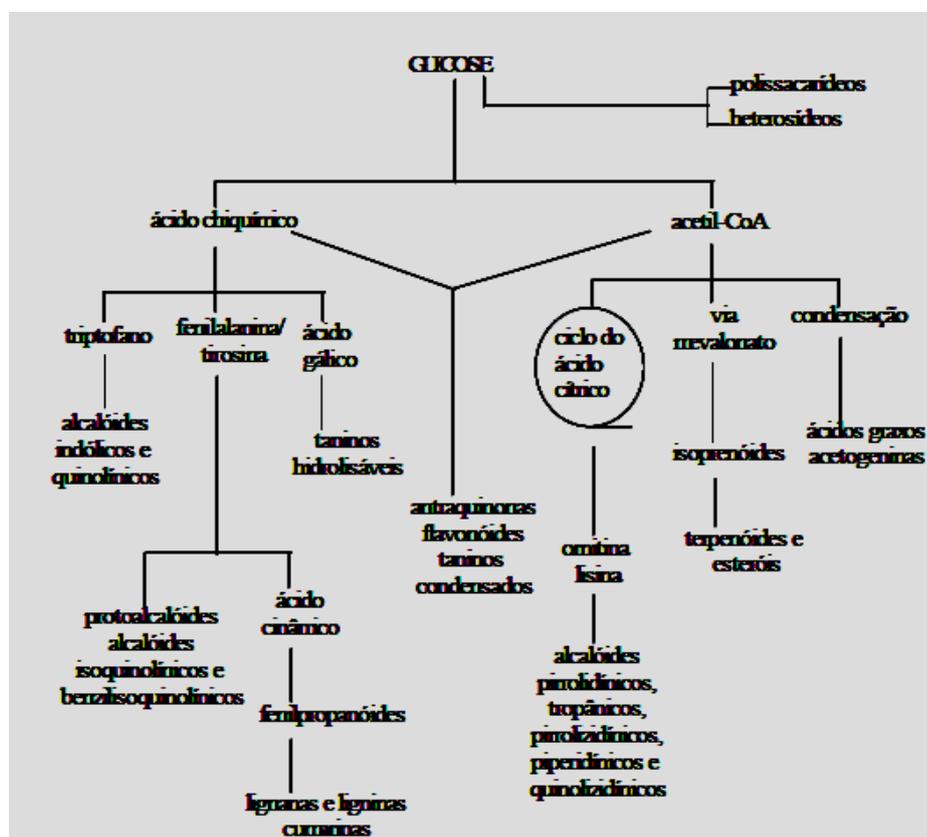


Figura 2. Ciclo biossintético dos metabólitos secundários

Fonte: Adaptado de Simões et al., (2004)

Os referidos óleos estão amplamente distribuídos no reino vegetal, especialmente nas famílias Asterácea, Laminácea, Laureácea, Myrtácea, Rutácea e Apiácea, sua função envolvem sinais de comunicação química nos vegetal e atuam como armas de defesa química contra o reino animal (BRITO, 2008).

O ambiente no qual o vegetal se desenvolve e o tipo de cultivo influi na composição química dos óleos essenciais. A temperatura, umidade relativa do ar, duração total da exposição ao sol e o regime de vento exercem influência direta, fundamentalmente nas espécies que possuem estruturas histológicas de estocagem de óleos essenciais na superfície. No entanto, 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 dos óleos essenciais (SILVA et al., 2010).

Os óleos essenciais podem ser obtidos através de diferentes processos, dependendo da localização no vegetal, da quantidade e das características requeridas para o produto final. Os processos usuais são Enfleurage, Destilação por Arraste a Vapor, Prensagem a Frio, Hidrodestilação, Extração com Solventes Voláteis, gases Supercrítico, Microondas, Turbodestilação, Hidrodifusão e Fitóis ou Florasóis (SEMEN; HIZIROGLU, 2005).

Dentre as técnicas supracitadas destaca-se a Destilação por Arraste a Vapor. Nessa técnica, os constituintes do material vegetal possuem pressão de vapor mais elevada que a da água, sendo por isso, arrastados pelo vapor d'água. Em pequena escala, emprega-se o aparelho de Clevenger. O óleo essencial obtido, após separar-se da água, deve ser seco com Na₂SO₄ anidro. Esse procedimento, embora clássico, pode levar à formação de artefatos em função da alta temperatura empregada. Preferencialmente, esse método é utilizado para extrair óleos de plantas frescas (WATABE et al., 2006).

Para avaliar a 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 e geralmente pode ser acoplada ao Espectrômetro de Massas (EM). Diversos pesquisadores destacam a CG-EM entre as melhores ferramentas analíticas e de extrema utilidade na análise de misturas complexas (FALSENJAK; PELJNJAK; KUSTRAK, 1987; KUSTRAK; AVATO et al., 2005).

No que concerne à qualidade e 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 (BRUNETON, 1993).

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 (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 médica inaceitável. A toxicidade pode ser aguda ou crônica e ainda ocorrer interação medicamentosa entre os numerosos compostos do óleo e certos medicamentos usados pelo indivíduo (OLIVEIRA et al., 2006).

O grau da toxicidade dependerá 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. O uso terapêutico de óleos essenciais tem se expandido por todo o mundo, sendo amplamente utilizados contra várias doenças inflamatórias, alérgicas, reumáticas e artrite ((MORAIS, 2006)

Esses tratamentos são reconhecidos através de experimentações clínicas, em especial por aplicação na pele, via massagens e unguentos, 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 ação antibacteriana (MARUYAMA et al., 2005). No entanto, estudos realizados por Sangwan et al. (1990) e Walker; Melin (1996) demonstraram existir ainda poucas pesquisas envolvendo a avaliação da eficácia de óleos essenciais e seus componentes no combate a helmintoses e protozooses.

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 usuário 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 utilizados como fragrância em cosméticos, aromatizantes de alimentos, bebidas e produtos de utilidade doméstica, a exemplo de detergentes, sabões, repelentes de insetos e aromatizantes de ambientes. Existindo também o emprego deles como intermediários sintéticos de perfumes (WOOLF, 1999).

No mercado internacional o Brasil é o décimo maior importador de óleos essenciais e o quarto maior exportador somando US\$ 98 bilhões em 2004. Existem hoje aproximadamente 3.000 óleos conhecidos e 300 comercializados, sendo os seis principais produzidos e exportados os óleos de laranja, limão taiti, eucalipto, pau-rosa, lima e capim-limão (BARATA; QUADROS, 2006).

David; Mischan; Board, (2007) ressaltaram que os esforços na busca de substâncias ativas que venham 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.

2.4 *Cymbopogon citratus* (D C.) Stapf

O *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf, comumente conhecido como capim santo, capim cidrão, cha-de-estrada, erva-cidreira, capim limão e capim-cheiroso, é uma planta originária do sudoeste asiático e pertencente à família das *Poaceae* (*Graminea*), sendo perene e de médio porte, forma-se de touceiras compactas e grandes (figura 03), com distribuição por todo o planeta em zonas tropicais e de savana, porém, não suportam regiões muito frias, suscetíveis a geada. O Brasil é um dos países onde essa planta está perfeitamente aclimatada, em suas regiões tropicais (BIDINOTTO, 2009).

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 citratus*. Esses fatores fizeram com que as áreas, para cultivo dessa gramínea, se expandissem na mesma proporção para atender essa demanda (VIDA; CARVALHO-JUNIOR; VERZIGNASSI, 2006).



Figura 3. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf
Fonte: aromatherapy-essentials.com

Essa planta possui odor característico exalado pelas folhas, hastes e rizomas, devido à presença, em especial, do composto Citral em seu óleo essencial, cujo é uma mistura de dois isômeros, geranial e neral (MOREIRA et al., 2010). Além do citral, o óleo essencial de capim-limão possui outros compostos ativos, sendo que os principais são o β -mirceno e o geraniol. O principal composto, Citral, é responsável por aproximadamente 40% a 80% do total do óleo, enquanto, o β -mirceno e o geraniol compõem a maior parte da porcentagem restante (BARBOSA et al., 2008).

O chá de suas folhas é usado largamente no Brasil como antiespasmódico, analgésico, antiinflamatório, antipirético, diurético e sedativo e seu óleo essencial é amplamente empregado pelas indústrias de perfumes e cosméticos. Vários são os estudos descritos na literatura sobre as atividades do vegetal citado, e diferentes são as formas de extração de seus compostos potencialmente ativos: óleo essencial (SILVA et al., 2010), extrato etanólico (PEREIRA et al., 2008), metanólico (TAPIA et al., 2007) e até decocções e infusões, sendo administrados geralmente pela via intragástrica ou pela dieta (CHEEL et al., 2005).

Dentre as atividades biológicas registradas da espécie *Cymbopogon citratus* destacam-se: efeito hipotensor e antinociceptivo da infusão da suas folhas, testado em ratos (MOREIRA et al., 2010), ação fungicida do óleo essencial obtido das suas folhas contra *Aspergillus niger* (BARATTA et al., 1998), *Aspergillus fumigatus* e *Cladosporium trichoides* (KISHORE; MISHRA; CHANSOURIA, 1993), *Didymella bryoniae* (FIORE et al., 2000), *Aspergillum flavius*, sendo que o último mostrou efeito superior aos fungicidas sintéticos agrosan G. N, cerosan, agrosim, dithane M-4 e bavistin (MISHRA; DUBEY, 1994), e ação antibacteriana contra organismos Gram-positivos e negativos (ONAWUNMI; YISAK; OGUNLANA, 1984).

Algumas ações farmacológicas do óleo essencial da planta referida ou de seus compostos têm sido descritas na literatura. Por exemplo, Vale et al. (2002) demonstraram os efeitos do óleo essencial ou de seus compostos Citral e β - mirceno no sistema nervoso central em camundongos Swiss machos, através da análise comportamental, enquanto, Viana et al. (2000) descreveram os efeitos anti-noceptivos do óleo essencial em ratos e Moreira et al. (2010) demonstraram efeitos cardiovasculares induzidos pelo óleo essencial de *Cymbopogon citratus* DC. Stapf, Poaceae, em ratos.

Já o extrato etanólico dele não se exibiu mutagênico em *Salmonella typhimurium*, inibiu a mutagenicidade causada por vários mutagenos nessa mesma linhagem de bactérias (VINITKETHUMNUEN et al., 1994) e minimizou a mortalidade de *Escherichia coli* induzidas por dano oxidativo pelo SnCl₂ (MELO et al., 2001). Esse extrato também reprimiu a formação de anomalias cromossômicas em linfócitos humanos expostos a mitomicina C (MEEVATEE et al., 1993), inibiu a formação de micronúcleos em ratos expostos a ciclofosfamida, retardou o crescimento tumoral e diminuiu o número de metástases em camundongos transplantados com células de fibrosarcoma 180 (SUAHEYUN et al., 1997).

Já os extratos etanólicos, metanólicos, decocções ou infusões apresentaram efeitos antioxidantes, reduzindo a peroxidação lipídica (analisado através da inibição da produção de TBARS) em cérebro de ratos, induzida pelo sulfato de ferro, nitroprussiato de sódio ou ácido 3-nitropropionico (PEREIRA et al., 2008) ou em hemácias, induzida por t-butil hidroperóxido (CHEEL et al., 2005). Foi notado também possuir atividade de “*Free Radical Scavenging*”, através da captura do radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) (PEREIRA et al., 2008) ou anion superóxido (CHEEL et al., 2005).

O extrato de *Cymbopogon citratus* aumentou a atividade da glutatona S-transferase em intestino de camundongos (LAM; ZHENG, 1991), reduziu o dano oxidativo (8-OHdG) em hepatócitos de ratos F344 tratados com dietilnitrosamina (DEN) (PUATANACHOKCHAI et al., 2002) e a formação de adutos de DNA (7-meG e O6-meG) no colon de ratos F344 induzida pelo AOM (SUAHEYUN et al., 1997).

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 já que a aquisição de novos enxames possui altos valores comerciais (CARVALHO et al., 2005).

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 horas às 13:00 horas quando é notado maior concentração de Citral, posto, temperaturas altas influenciam na sua qualidade.

Quanto às vias de administração do óleo essencial, as mais utilizadas são oral e tópica, e as especificações devem ser estritamente a critério médico. Estudos realizados acerca da sua avaliação toxicológica 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 (SOMÕES, 2003). Vale salientar que *Cymbopogon citratus* encontra-se entre as ervas regulamentadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), cuja regulamentação encontra-se disponível via internet no site da ANVISA.

2.5 Citral

O *Cymbopogon citratus* possui de 40 a 80% de Citral em seu óleo essencial, sendo o Citral ou 3,7-dimethyl-2,6-octadienal ou lemonal (figura 04) constituído por um par de terpenóides com fórmula molecular $C_{10}H_{16}O$. Os dois compostos são isômeros duplos, sendo eles o *trans*-isômero que é conhecido por geranial ou Citral A (49%) e *cis*-isômero denominado neral ou Citral B (31%) (FERREIRA et al., 2009).

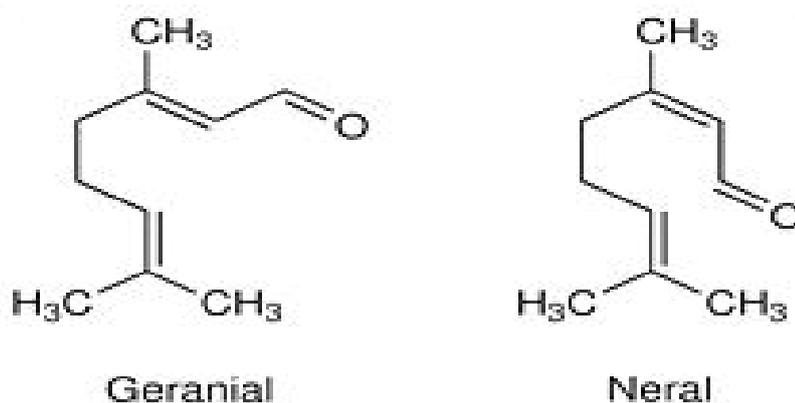


Figura 4. Fórmula estrutural dos isômeros do Citral

Fonte: qnint.s bq.org.br

Quanto aos dados físicos e químicos do Citral, podemos citar: temperatura de ignição (225 °C), solubilidade em água (0,42 g/L - 25 °C), massa molar (152,23 g/mol), densidade (0,89 g/cm³ - 20°C), ponto de ebulição (227°C a 229°C - 1013 hPa), pressão de vapor (< - 1hPa - 50°C), limite de explosão (4,3 – 9,9% - V), ponto de inflamação (98 °C), índice de refração (1.4872 - 20 °C, 589 nm) (RESS et al., 2003).

O composto referido acima apresenta um odor acentuado cítrico e desperta grande interesse, pois, é amplamente empregado nas industriais de perfumes, alimentos e cosmético, para aromatização de sorvetes, bebidas, refrigerantes, bombons, composição de perfumes, entre outros produtos. Na indústria farmacêutica o Citral é utilizado como matéria prima para síntese de ionona, sendo a Beta-ionona especificamente empregada como substância iniciadora para síntese de vitamina A (KOSHIMA; MING; MARQUES, 2006)

Dentre as propriedades biológicas do Citral, destacam-se sua ação fungicida e antimicrobiana (KOLB et al., 2007). O aumento da demanda de óleo essencial com alto teor em Citral tem sido provido na atualidade pelo *Cymbopogon citratus* que possibilita seu uso como alternativa para extração de Citral, cujo apresenta rápida eliminação pela urina, posto, aproximadamente 50% de seu total ingerido é eliminado em 24 horas (DILIBERTO et al., 1990).

Existem vários trabalhos discrepantes sobre as atividades biológicas do Citral. Enquanto alguns estudos mostraram efeitos citotóxicos desse composto, avaliados através do aumento da expressão da proteína p53 algumas horas após sua administração em células de cultura (DUERKSEN-HUGHES; YANG; OZCAN, 1999), outros notaram ausência de mutagenicidade pelo teste de Ames (GOMES-CARNEIRO; FELZENSZWALB; PAUMGARTTEN, 1998) ou mesmo atividade anti-clastogênica (através da redução na formação de micronúcleos, induzidos por cloreto de níquel em camundongos) e antioxidante, por captura de superóxido (RABBANI et al., 2006).

Iersel et al. (1996) descreveram a ausência de efeitos do Citral na inibição da atividade de glutathione-S-transferase em células de melanoma humano, enquanto, Nakamura et al., (2003) demonstraram que ele (em especial o isômero geraniol) induziu a atividade de GSTP1 em hepatócitos RL34 *in vitro*, bem como que essa substância atua como inibidor de peroxidação lipídica em pele de camundongos induzida pela TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato).

O Citral mostrou efeitos inibitórios na promoção de tumores de pele em camundongos Sencar iniciados por DMBA (CONNOR, 1991), e induziu a expressão de caspase-3 em várias células de câncer hematopoiético (DUDAI et al., 2005). A literatura relata também efeitos antiinflamatórios desse composto, por inibição da produção de óxido nítrico (LEE et al., 2008).

Demonstrou também que juntamente com o geraniol, ocorreu a inibição da atividade de CYP2B6 microsomal em células hepáticas, indicando que esses compostos possuem atividade quimiopreventiva, por alterarem a biodisponibilidade de drogas metabolizadas por essa enzima do citocromo P450 (SEO et al., 2008). Estudo demonstrou, entretanto, efeitos tóxicos de altas doses de Citral, tais como mortalidade, perda de peso corpóreo, opacidade ocular, apneia, entre outros (RESS et al., 2003).

Um trabalho executado por Ferreira et al. (2009), em pacientes hospitalizados exibiu que o Citral possui ação contra leveduras do gênero *Candida*, já pesquisa realizada por Quintans-Júnior et al. (2011) demonstrou que o Citral reduziu a resposta nociceptiva e inflamatória em roedores.

2.6 Leishmanias e leishmanioses

O gênero *Leishmania* engloba um grupo de protozoários flagelados da família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida. Os parasitas de todas as espécies de *Leishmania* são morfologicamente similares, sendo necessárias análises bioquímicas para uma identificação formal no nível de espécie. Possuem uma única mitocôndria e o DNA mitocondrial mostra-se condensado numa região próxima dos corpúsculos basais do flagelo – nove pares de microtúbulos concêntricos e um par central – sendo denominado kinetoplasto. Eles desencadeiam uma parasitose denominada leishmaniose (AZEVEDO et al., 2008).

A OMS descreve quatro formas clínicas principais de leishmaniose, a saber: Leishmaniose cutânea - produz úlceras cutâneas crônicas no local da picada do inseto vetor, podendo levar meses para cicatrizar. Essa forma freqüentemente é autolimitada, entretanto, ela pode criar sérias incapacitações e cicatrizes permanentes (CHAPPUIS et al., 2007).

Leishmaniose cutânea difusa - muito difícil de ser tratada devido às lesões disseminadas, cujas não curam espontaneamente. Leishmaniose mucocutânea - popularmente conhecida no Brasil como úlcera de Bauru ou ferida brava, inicialmente causa úlceras na pele similares àquelas da leishmaniose cutânea que cicatrizam para depois reaparecerem como lesões desfigurantes na face que podem destruir as membranas mucosas do nariz, boca e garganta (MARZOCHI; MARZOCHO; SCHUBACH, 2008). Leishmaniose visceral – conhecida também como ‘calazar’ ou ‘kala azar’, sendo a forma mais severa da leishmaniose e usualmente é fatal se não tratada precocemente. (MALTEZOU, 2010).

O parasita acima citado habita alternativamente nos insetos flebotomíneos fêmeas dos gêneros *Lutzomyia* no novo mundo e *Phlebotomus* no velho mundo (figura 5), na forma promastigota, sendo ela flagelada e alongada, com cerca de 5-15 µm, e no hospedeiro mamífero como forma amastigota intracelular (figuras 6 e 7), não flagelada e ovóide, com 3-5 µm que vivem dentro de vacúolos lisossomais presentes nas células

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

fagocíticas do hospedeiro vertebrado, inclusive o homem, denominadas monócitos, macrófagos e células dendríticas (BATES, 2008).



Figura 5. *Lutzomyia longipalpis*, vetor da leishmaniose no Brasil.

Fonte: OMS, 2007.

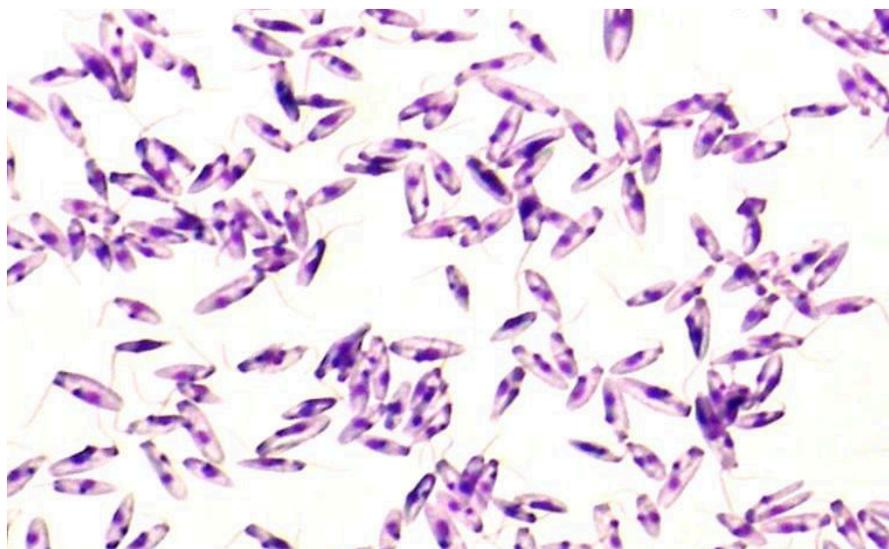


Figura 6. Promastigotas de *Leishmania* (L) *chagasi* obtidas a partir de cultivo.

Fonte: Dados da Pesquisa.

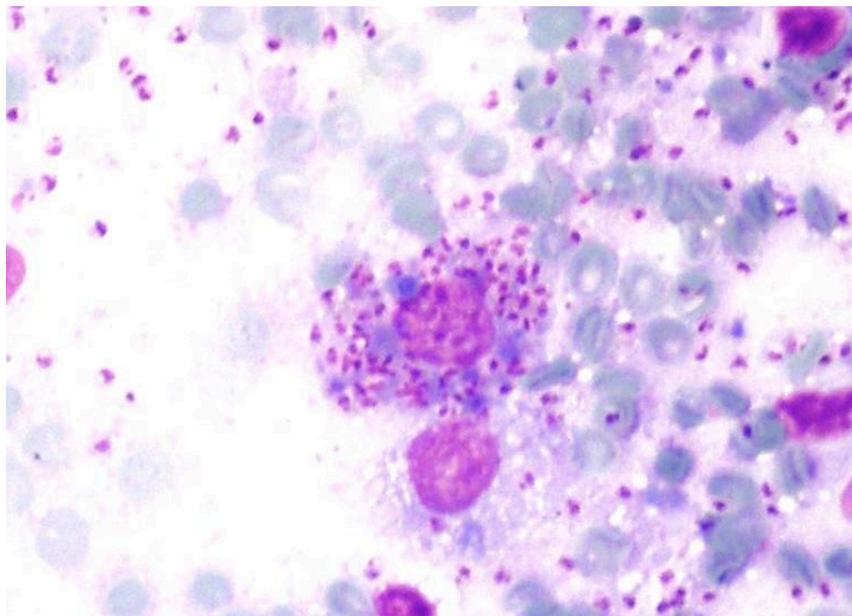


Figura 7. Macrófago de baço de Hamster dourado exibindo ninhos de amastigota de *Leishmania* (L) *chagasi*.

Fonte: Dados da pesquisa.

Quando a fêmea do inseto vetor pica um mamífero infectado, as células infectadas com amastigotas entram pelo seu trato digestório, onde passam por uma série de alterações morfológicas e funcionais e se diferenciam numa forma promastigota procíclica móvel e divisível, que se prende à parede do intestino. Em sequência, transformam-se numa forma promastigota metacíclica não divisível que é incapaz de se prender ao intestino e por isso migra para a parte superior do aparelho digestório, o proboscis (NEUBER, 2008)

Ao realizar nova hematofagia (figura 8), o vetor inocula os promastigotas flagelados metacíclicos na pele do hospedeiro mamífero, onde são rapidamente fagocitados pelos monócitos locais, os quais são atraídos ao local de inoculação pela reação inflamatória. Os promastigotas ligam-se ao fagócito mononuclear via mecanismo mediado por receptor, e entram na célula por fagocitose através de um fagossoma que se funde com lisossomas para formar um fagolisossoma. Dentro dos macrófagos os promastigotas sofrem modificações bioquímicas e metabólicas, das quais resultam as formas intracelulares obrigatórias, os amastigotas. Esses são libertados pelos

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

macrófagos e podem re-invadir células dendríticas e fibroblastos, assim como novos macrófagos (PINTO et al., 2010).

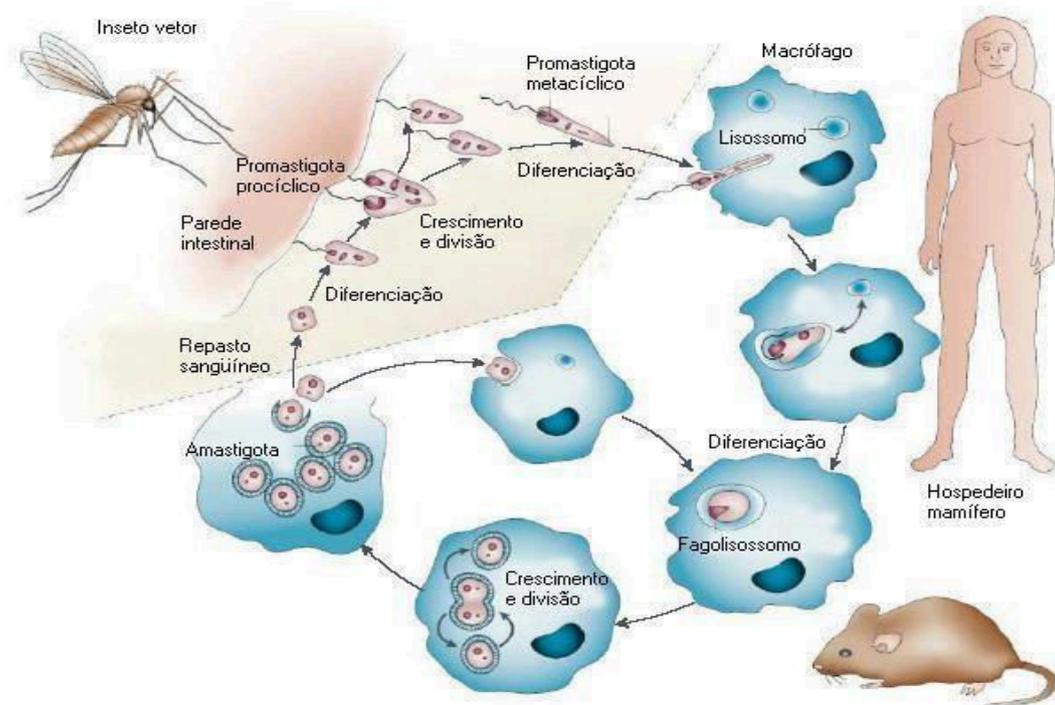


Figura 8. Ciclo evolutivo de *Leishmania* spp. (Modificado de SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002).

Conforme a OMS (figuras 9 e 10), aproximadamente 350 milhões de indivíduos encontram-se em áreas de contaminação por leishmaniose e mais de 12 milhões de pessoas em 88 países são afetados por esse agravo a saúde (NEITZKE et al., 2008). Anualmente, cerca de dois milhões de novos casos dessa parasitose surgem, sendo que 500 mil são causados por leishmaniose visceral (MURRAY et al., 2005). Esses dados deixam muito a desejar, posto, nem todos os casos de leishmaniose são oficialmente declarados, visto que o registro compulsório é obrigatório em apenas 32 dos 88 países acometidos por essa doença (ROMERO; BOELAERT, 2010).

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

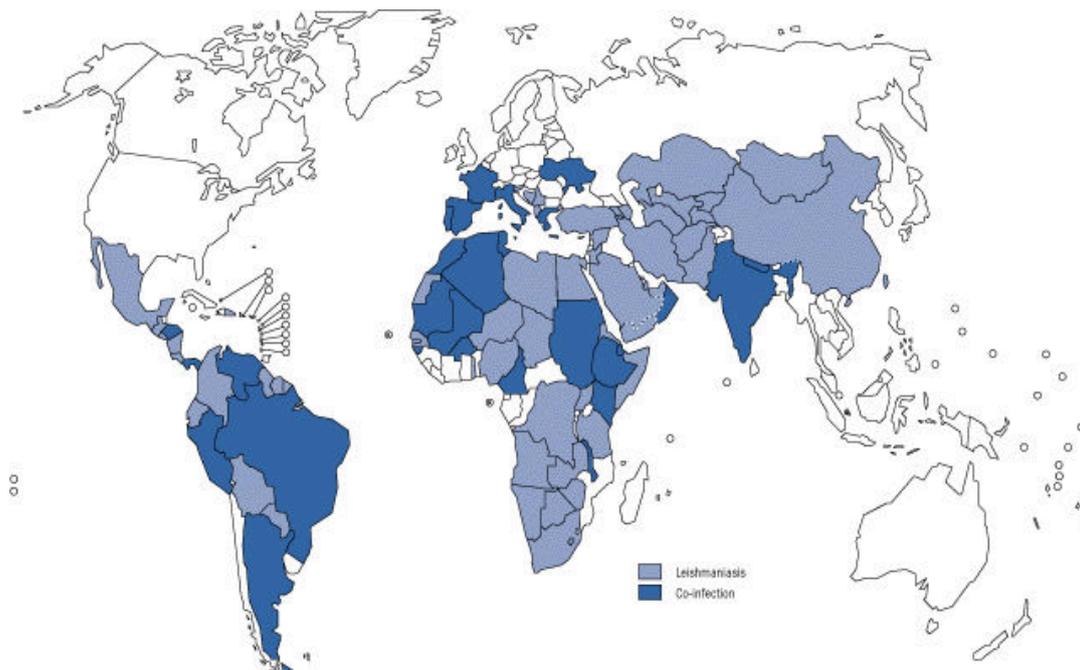


Figura 9. Distribuição geográfica mundial dos casos de leishmaniose, bem como dos casos de co-infecção com VIH 1990 a 1998 (adaptado de WHO/NTD/IDM HIV/AIDS, Tuberculosis and Malaria (HTM) World Health Organization, 2010)

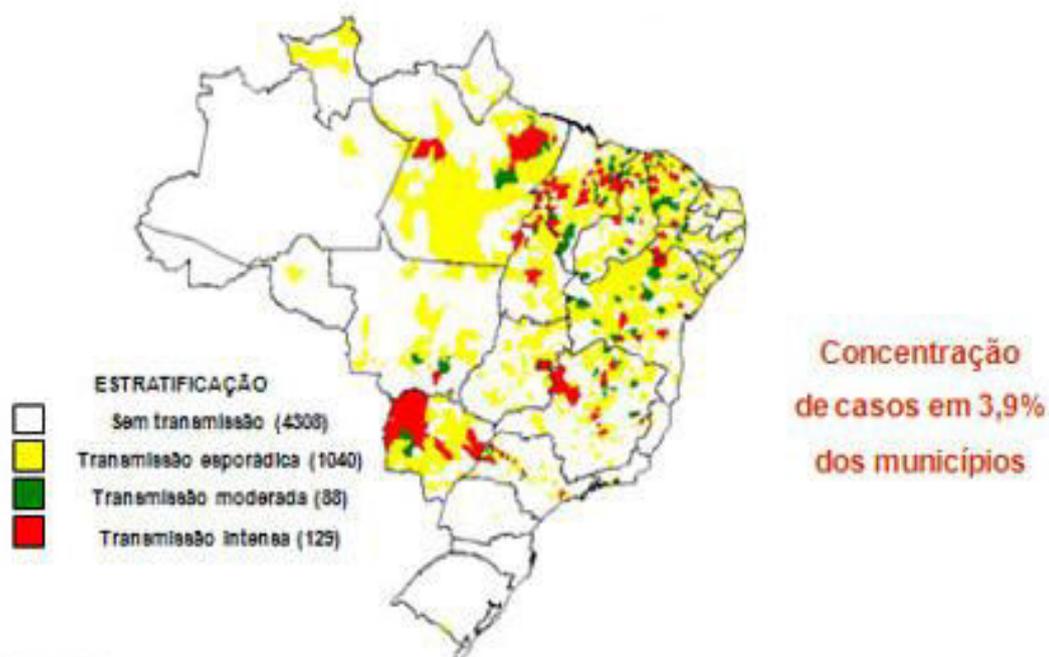


Figura 10. Estratificação dos Municípios, segundo perfil de transmissão de LV – Brasil, 2006 - 2008

Fonte – Sinan/SVS (2008).

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

No Brasil (figura 11) existem cerca de 26.000 casos registrados de leishmaniose por ano, cujos estão presentes, principalmente na região nordeste, norte e sudeste e em franca disseminação pelo país (GACHET, 2010). O estado de Sergipe é considerado como endêmico para LV. Segundo o SINAM no período entre 2001 a 2011 registrou-se 384 casos de LV nesse estado, distribuídos em 41 municípios e indicando que 9,42% dos acometidos foram à óbito (DATASUS, 2012).

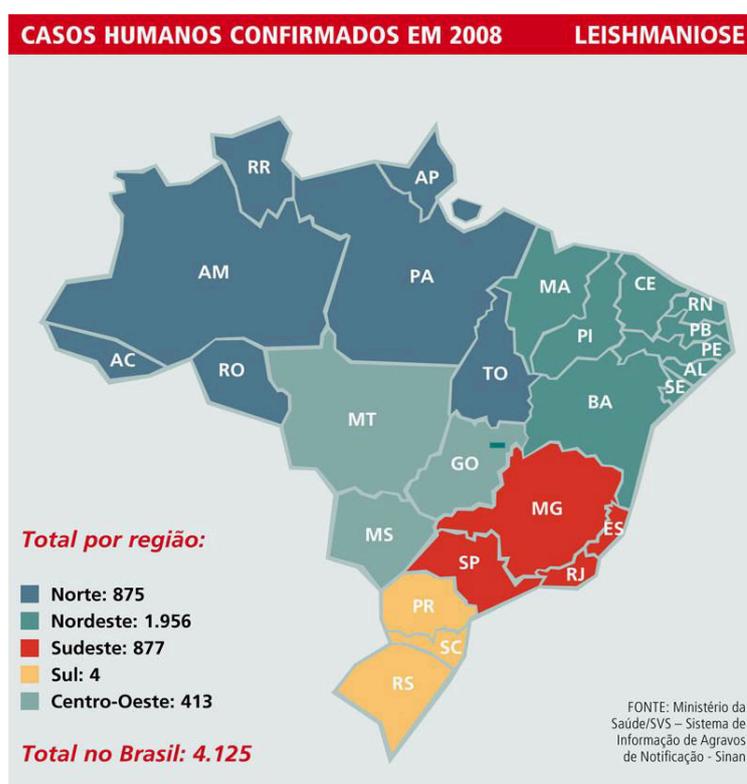


Figura 11. Casos humanos confirmados de leishmaniose no Brasil em 2008.

Fonte: Ministério da Saúde/SVS – Sistema de informação de Agravos de Notificação – Sinan.

A alta incidência da doença e suas consequências como lesões desfigurantes na leishmaniose tegumentar, e às vezes fatal como pode acontecer na leishmaniose visceral, levou a OMS a incluí-la entre as seis endemias mais importantes no mundo (BAILEY, 2007). O perfil epidemiológico das leishmanioses tem modificado com o tempo, principalmente, em virtude do crescimento desordenado da população, falta

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

de planejamento urbano e modificações do ambiente, esses fatores têm contribuído para o aumento de casos em regiões urbanas e periurbanas (HAILU, 2005).

2.7 Leishmaniose visceral: Etiologia, patogenia e peculiaridades clínicas

A LV é uma parasitose desencadeada por protozoários do complexo *Leishmania donovani* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), estando inclusas duas espécies: *Leishmania* (L.) *donovani* e *Leishmania* (L.) *infantum*, a depender da região geográfica. A denominação *Leishmania chagasi* foi criada baseada na suposição de tratar-se de uma espécie distinta, existente no Continente Americano antes da colonização européia. Discussões referentes à nomenclatura, todavia, têm levado em consideração a origem do parasita (MAIA-ELKHOURY et al., 2008).

Alguns autores acreditam que *Leishmania chagasi* e *Leishmania infantum* são semelhantes, tendo sido importadas da Europa durante a colonização portuguesa e espanhola (RIOUX et al., 1990), já outros, afirmam que a *Leishmania chagasi* encontrava-se presente no Continente Americano antes da colonização Européia (LAINSON; RANGEL, 2005).

Independente da origem, baseando-se em estudos imunológicos e genéticos, autores consideram que *Leishmania infantum* e *Leishmania chagasi* representam a mesma espécie (MAURICIO; STOTHARD; MILES, 2000), porém, outros pesquisadores as consideram, como subespécies (LAINSON; RANGEL, 2005). No entanto, Maurício, Stothard e Miles (2000) afirmaram que os dados genéticos e enzimáticos tornaram evidentes que *Leishmania infantum*, descrita por Nicolle (1908) e *Leishmania chagasi*, descrita por Cunha e Chagas (1937) devem ser consideradas sinônimos, tendo prioridade à nomenclatura mais antiga.

Os integrantes do complexo *Leishmania donovani* vivem, sob a forma amastigota, no interior de vacúolos das células do Sistema Fagocítico Mononuclear. Dentro dos vacúolos parasitóforos as formas acima citadas multiplicam-se por divisão binária até que o seu acúmulo leve ao rompimento da célula e surgimento dos sintomas (REY, 2008)

As características clínicas são semelhantes em cães e em humanos. O período de incubação da doença pode variar de meses a anos, durante o qual o parasito se dissemina pelo corpo, sendo que a forma clássica caracteriza-se por sinais e sintomas de doença crônica persistente, incluindo febre ondulante, fadiga e perda de peso, a invasão

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

das células sanguíneas e do sistema reticuloendotelial (figura 12) acarreta hepatoesplenomegalia e linfadenopatia (CHAPPUIS et al., 2007).

O surgimento da doença e sua evolução são conseqüências de um complexo de interações entre o parasito e a resposta imune do hospedeiro, então, o conhecimento dos fatores que predis põem um indivíduo a desenvolver a doença e outro a controlar a infecção é extremamente importante para o desenvolvimento de vacinas e o controle da enfermidade. Quanto aos cães, alguns desenvolvem a doença clínica, enquanto, outros permanecem como portadores assintomáticos infectivos aos flebótomos e, desta forma, transmitindo a doença para outros cães e humanos (BANETH; AROCH, 2008).



Figura 12. Leishmaniose visceral – evidenciando hepatoesplenomegalia.

Fonte: leishrisk. net

2.8 Interação *Leishmania* – vetor

Os flebotomíneos são da família Psychodidae, ordem Diptera e subfamília Phlebotominae e possuem ampla distribuição geográfica. No Brasil são conhecidos popularmente como asa branca, birigui, cangalhinha, mosquito palha ou tatuquira. Eles medem de 2 mm a 4mm de comprimento, o corpo é densamente coberto de pêlos finos e apresenta uma característica inerente que quando em repouso suas asas são mantidas divergentes em posição semi-ereta. O grande gênero de interesse médico no Novo

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

Mundo é o *Lutzomyia* que é formado por 15 subgêneros, 11 grupos de espécies e 17 espécies não agrupadas. No Velho Mundo o gênero *Phlebotomus* possui as espécies de interesse médica (KILLICK-KENDRICK; MAROLI; KILLICK-KENDRICK, 1991).

As formas imaturas dos insetos acima referidos encontradas no Novo Mundo não são observadas em áreas domiciliares e sim no peridomicílio em locais onde existe acentuada quantidade de matéria orgânica como galinheiros. Já na natureza são observados em detritos de fendas rochosas, chão de cavernas, no solo entre raízes de árvores, por baixo de folhas mortas e úmidas. Desenvolvem-se no solo úmido, mas não molhado ou em locais ricos em matéria orgânica em decomposição. Devido à dificuldade de encontrar locais de desenvolvimento natural, a maior parte das informações é advinda de informações de criatórios laboratoriais (JARVIS, RUTLEDGE, 1992).

A progênese das fêmeas em laboratório capturadas no campo é mantida em colônias, entretanto, é um processo de custo alto. O insetário precisa dispor de estufa com controle de temperatura a 24°C e 80% de umidade relativa. A alimentação larval consiste em uma mistura de *Daphnia* seca e extrato aquoso liofilizado de fígado de galinha e de pólen contendo 24 aminoácidos essenciais. Os adultos são mantidos em acesso constante a solução de sacarose a 10% e as fêmeas se alimentam em hamsters (KILLICK-KENDRICK, 1990).

Nas condições supracitadas as fêmeas produzem 47 ovos por postura. O período médio de incubação é de 67 dias e o larval 18 dias. A fase pupal tem duração de 16 dias. O ciclo biológico da oviposição até a eclosão da geração seguinte ocorre em cerca de 36 dias (JARVIS; RUTLEDGE, 1992).

O flebótomo fêmea adquire *Leishmania* ao alimentar-se em um mamífero através da ingestão de macrófagos infectados com formas amastigotas, posto, essas formas não são encontradas livres no sangue. A susceptibilidade do flebótomo a infecção por *Leishmania* depende das interações que acontecem no trato digestório, iniciando-se com as alterações de temperatura e pH (BATES, 2008). Após a infecção o parasita passa por fases desde a migração do intestino médio do inseto até a porção anterior da cavidade bucal. Cada fase de desenvolvimento é caracterizada por alterações morfológicas e funcionais capazes de manter o parasita vivo (CUNNINGHAM, 2002).

No início do ciclo de vida a amastigota diferencia-se em procíclica, uma forma pequena com um curto flagelo e pouco móvel, sendo resistente as enzimas digestiva do

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

vetor, nesse estágio começa seu primeiro ciclo reprodutor. As formas procíclicas desenvolvem-se em nectomonas que são formas largas, alongadas e extremamente móveis e tendo como função escapar do confinamento da matriz peritrófica para ancorar-se nas células epiteliais e migrar para a parte mais anterior do trato digestório. Esse escape é facilitado pela produção de quitinases do parasita (KAMHAWI, 2006).

As nectomonas diferenciam-se em leptomonas, geralmente no quarto dia após a infecção, então, elas multiplicam-se de forma maciça e produzem um gel glicoprotéico que é importante para a sobrevivência da forma metacíclica, a qual é a forma infectante capaz de sobreviver ao sistema complemento do hospedeiro. O tempo adequado para o parasita completar o seu ciclo evolutivo no flebótomo é de 6 dias a 9 dias. A adesão e escape do parasita são de fundamental importância para sua sobrevivência, caso contrário ele seria expulso nas fezes do inseto. Uma das moléculas crucial na ligação ao epitélio do intestino do flebótomo vetor é uma glicoproteína (BATES, 2008).

A formação do “plug” parasitário envolto por essa glicoproteína conhecida como proteofosfoglicana filamentosa, é um fator indubitavelmente importante para infecção do parasita por protegê-lo do sistema imune do hospedeiro em seu período inicial de invasão e também interfere no comportamento biológico do vetor, pois estimula a um aumento de picadas no hospedeiro devido à obstrução do canal alimentar causado pelo “plug” parasitário envolto pelo gel (ROGERS, 2004).

2. 9 Relação *Leishmania* – hospedeiro humano

Os aspectos relacionados com a imunidade do homem à infecção por *Leishmania* (*L.*) *chagasi* ou por *Leishmania* (*L.*) *donovani* não se encontram claramente definidos. No entanto, a partir de estudos em humanos têm sido demonstrado que, durante a fase aguda da doença, ocorre resposta predominante de linfócitos TCD4+ do tipo Th2, havendo uma prevalência da produção de IL-4 sobre a produção de IFN- γ , e ativação de células B policlonais resultando em hipergamaglobulinemia (KHARAZMI et al., 1999; MALA; MAHAJAN, 2006).

No baço, os níveis de mRNA que codificam IL-4 são elevados durante a fase aguda da doença e há um declínio significativo após a cura. O fato anteriormente relatado ocorre também com o perfil das citocinas IFN- e IL-4 após estimulação com formas promastigotas e com antígenos de amastigotas de *Leishmania*, demonstrados nos estudos de Kharazmi et al. (1999).

Segundo Bogdan; Röllinghoff (1998) e Stafford et al. (2002), os macrófagos ou células *Kupffer* são as principais células parasitadas por *Leishmania* e, dessa forma, a capacidade dessas células de destruir parasitos intracelulares é o mecanismo envolvido no controle da infecção. Espécies reativas de oxigênio, de nitrogênio e o óxido nítrico (NO) são fundamentalmente as responsáveis pela atividade microbicida dos macrófagos. Conforme Malafaia (2008), NO é produzido nos macrófagos a partir de L-arginina em reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e possui importância na eliminação do parasito pelos macrófagos (BLANCHETTE et al., 2003; KIMA, 2007).

2.10 Aspectos eco-epidemiológicos das leishmanioses

Desjeux (2001) qualificou os fatores cruciais responsabilizados pelo aumento do número de casos e da distribuição geográfica das leishmanioses. Dentre os mais importantes esta o crescimento do tamanho e número das áreas urbanas, com o consequente aumento do número de possíveis hospedeiros – aumento na densidade e, portanto, nas taxas de contato entre vetor - hospedeiro. Nas cidades, o papel dos reservatórios é admitido ser o cão doméstico, embora, não esteja clara ainda a importância de animais silvestres sinantropicos.

Nas regiões mais pobres das cidades, o vetor torna-se abundante devido ao acúmulo da matéria orgânica peridomiciliar e o número de cães soltos aumenta o risco da infecção humana. Onde há problemas de nutrição, especialmente em crianças até nove anos de idade, há uma taxa maior da LVH (CAMARGO; LANGONE, 2006).

Para identificar os fatores decisivos da infecção humana por *Leishmania chagasi* em uma área urbana, Moreno et al. (2005) realizaram um estudo seccional de base populacional utilizando-se questionário pre-codificado. Nessa investigação, as variáveis que pareceram aumentar o risco de infecção pela referida *Leishmania* em área urbana foram o lixo não coletado pelo sistema público, o lixo não enterrado ou depositado no peridomicílio, áreas de erosão no bairro, encontrar-se fora de casa entre 18:00h -- 22:00h e criação de aves.

Monteiro et al. (2005) pesquisaram flebotomíneos e infecção canina no município de Montes Claros - MG, e encontraram um ambiente característico e adequado a ocorrência de LV, onde as habitações são extremamente pobres, com deficiência na

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

coleta de lixo e de saneamento básico, baixos índices sócio econômicos, convivência com animais domésticos bastante elevada e acúmulo de matéria orgânica.

Guimarães (2008) caracterizou o perfil socioeconômico dos portadores de LV em Campo Grande. Das pessoas com mais de 20 anos e que haviam parado de estudar 68,8% não concluíram o ensino médio e dos chefes de família 73,5% não concluíram o ensino médio. Em 52,1% das habitações não existe pavimentação asfáltica e em 82,9% não possuía rede de esgoto.

Os flebotomíneos se ajustam bem a abrigos úmidos e escuros. A maioria das espécies frequenta principalmente copas das árvores, cavernas e cavidades entre pedras, além de, eventualmente, mudarem de ambiente de acordo com o horário. A localização dos insetos e a hematofagia das diferentes espécies nos vários horários tem grande importância epidemiológica, pela possibilidade de contato com o homem e outros reservatórios silvestres e domiciliares de parasitos (CARVALHO et al., 2005).

As fêmeas apresentam preferências de hospedeiros e costumam ser oportunistas, geralmente picam a noite ou no crepúsculo. Os criadouros ficam em ambientes terrestres úmidos, mas, não encharcados, e escuros, sendo bastante variáveis, incluindo o espaço sob pedras ou folhas, terra próxima de raízes tabulares, estábulos e ocos de árvores, sua localização costuma ser extremamente difícil, devido à grande dispersão e a falta de conhecimento sobre suas características (MARCONDES, 2005).

Estudo realizado por Silva; Andreotti; Honer, (2007), em Campo Grande entre maio de 2003 a abril de 2005, através de capturas com armadilhas luminosas, tipo CDC, em doze estações distribuídas na zona Urbana de Campo Grande. Foram capturados 2.275 flebotomíneos, destes 2.115 (92,9%) da espécie *Lutzomyia longipalpis*. A abundância de *Lutzomyia longipalpis* foi maior no peridomicílio, principalmente em galinheiros, com exceção dos meses de setembro e outubro de 2003, julho de 2004 e janeiro de 2005. Os bairros com maior quantidade foram Rita Vieira, Monte Alegre e São Conrado, situados próximos as nascentes e que possuem vegetação em demasia.

Gavani et al. (2002), em vilarejos no Ira, mostraram a relação entre cães soropositivos e crianças infectadas, notando que a soropositividade das crianças aumentou significativamente com a densidade da população canina e com a razão cão/homem. Já Moreira et al. (2003) investigaram o papel de animais domésticos na

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

manutenção da leishmaniose, concluindo que a presença deles aumentou o risco de LVH: suínos – RR = 4,1 galinhas – RR = 3,6 e outros animais domésticos RR = 2,6.

Maroli et al. (2007) citaram casos de LV em gatos na Itália. Figueiredo et al. (2008) relataram um caso de leishmaniose tegumentar americana em felino doméstico no Rio de Janeiro. Serrano et al. (2008) detectaram *Leishmania* spp. em gato na zona urbana de Araçatuba - SP. Em Mato Grosso do Sul, Souza et al. (2009) encontraram *Leishmania* (L.) *amazonensis* em felino doméstico no município de Ribas do Rio Pardo e Noé (2008) observou *Leishmania* sp. em gatos em Campo Grande.

Lainson e Rangel (2005) enfatizaram a importância dos hospedeiros silvestres: canídeos, marsupiais e possivelmente roedores, notando que, enquanto essas fontes existirem, será difícil conseguir uma eliminação do parasito. O cão, reservatório doméstico principal, pode sempre se infectar com contato de animais silvestres – nada se sabe sobre esta possibilidade no Município acima citado, onde há populações desses animais amplamente distribuídas. Carvalho (2005) identificou hospedeiros reservatórios silvestres no município de São Vicente Férrer - PE. Amostras de baço foram positivas para *Leishmania* em gambá (*Didelphis albiventris*) e rato da água (*Nectomys squamipes*).

Humberg (2009) investigou a ocorrência de *Leishmania* sp. em animais silvestres de cativeiro e de vida livre, recepcionados no Centro de Reabilitação de Animais Silvestres de Campo Grande - MS, no Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Viçosa - MG e no Zoológico da Universidade Federal do Mato Grosso - MT. Os resultados foram positivos em gambás (*Didelphis albiventris*), lobinhos (*Cerdocyon thous*), lobos-guara (*Chrysocyon brachyurus*), raposas (*Pseudalopex vetulus*), quatis (*Nasua nasua*) e em onças pardas (*Puma concolor*).

Freitas et al. (2010) averiguaram a participação de roedores e marsupiais na transmissão de leishmaniose em Rondonópolis - MT. Os resultados demonstraram que ocorre circulação de *Leishmania chagasi* e *Leishmania braziliensis* entre marsupiais da espécie *Didelphis albiventris* e entre roedores silvestres (*Necromys lasiurus*) e sinantropicos (*Rattus rattus*).

Souza et al. (2010) relataram a infecção de canídeos silvestres por *Leishmania* (L.) *infantum chagasi* mantidos em cativeiro no Estado de Mato Grosso. Foram coletadas amostras de pele, medula óssea e linfonodos de seis raposas (*Cerdocyon thous*) e um cão vinagre (*Spheotos venaticus*) para observação e caracterização de *Leishmania* sp

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

pela técnica de PCR-RFLP. Todos os animais pesquisados apresentaram-se positivos para *Leishmania* (L.) *infantum chagasi*.

Dias; Lorosa; Rebelo, (2003) trabalharam com o conteúdo estomacal de *Lutzomyia longipalpis* nos ambientes intradomiciliar e peridomestico, no Município de Raposa - MA, por meio da reação da precipitina. Foram capturadas 2.240 fêmeas de *Lutzomyia Longipalpis*, sendo 84% no ambiente peridomestico e 16% no intradomicilio, dessas 547 (24,4%) estavam alimentadas com sangue de ave (87,9%), roedor (47,2%), humano (42,4%), cão (27,6%), mucura (26,6%) e equino (22,5%). A galinha foi o animal domestico mais comum no ambiente peridomestico (28,3%), seguido pelo cão (21,7%), gato (17,5%).

Entre os animais sinantropicos, a mucura foi a mais referida no município (39,3%), seguida pelo rato (37,9%), morcego (14,3%), guaxinim (3,6%). A maioria das casas é de taipa, sem infra-estrutura sanitária e os abrigos de animais domésticos são próximos das casas, além de serem encontrados galinhas, cães e gatos dentro das habitações. O achado de *Lutzomyia longipalpis* alimentados com sangue humano, de mucura e do cão no peridomicilio, corrobora a hipótese de que a transmissão da infecção aconteça na habitação humana, posto, todos os elos da cadeia de transmissão da *Leishmania chagasi* estão presentes no ambiente peridomestico e periurbano do Município acima citado.

O comportamento e hábitos alimentares de algumas espécies de flebotomíneos foram analisados no município de Porteirinha - MG por Barata et al. (2005), que efetuaram capturas mensais sistematizadas utilizando 28 armadilhas luminosas tipo CDC, durante o período de janeiro a dezembro de 2002. Foram capturadas 14 espécies de flebotomíneos, totalizando 1.408 exemplares. Os resultados mostraram que o peridomicilio apresentou a maior porcentagem dos espécimes encontrados na região (53,3%) e que a espécie *Lutzomyia longipalpis* alimentou-se de galinhas e cavalos (26,3%), roedores (15,8%), cães (13,2%), bois (10,5%) e homem (5,3%).

Em Campo Grande, o habito alimentar de flebotomíneos foi avaliado por Oliveira et al. (2006), eles verificaram que a maioria das fêmeas capturadas foi de *Lutzomyia longipalpis*, das quais 66,4% alimentaram-se de sangue humano, 64,8% de aves e 8,9% de cães. Vários insetos alimentaram-se de mais de um vertebrado, sendo detectadas as seguintes combinações: aves + humanos (43,4%), aves + cães (0,9%), aves + humanos + cães (6,1%) e cães + humanos (1,5%). Nas áreas residenciais, 83,4% das fêmeas de

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

Lutzomyia longipalpis foram capturadas no peridomicílio e as que ingeriram sangue humano predominaram no interior de todas as casas.

2.11 Tratamento contra as leishmanioses

No que concerne ao tratamento para as leishmanioses, esse é complicado, posto, no homem, o protozoário *Leishmania* é um parasita intracelular obrigatório de macrófagos na sua forma amastigota. Para além que o arsenal terapêutico disponível para tratamento da leishmaniose, assim como de outras doenças tropicais é bastante precário, sendo atualmente restrito a duas linhas de medicamentos: os antimoniais e os não-antimoniais (MARCHESE, 2009).

Não existe ainda vacina disponível para a doença e os medicamentos de primeira escolha, os antimoniais pentavalentes, desenvolvidos por Gaspar de Oliveira Vianna em 1912, são tóxicos e administrados exclusivamente por via parenteral (ROCHA et al., 2005). Além disso, já foi reportada resistência a esses medicamentos, sendo um fato crescente em todas as formas de leishmanioses e notadamente em áreas endêmicas para esses agravos a saúde do homem (BRENDELE et al., 2002). O mecanismo de ação de antimoniais pentavalentes (figura 13), no combate à *Leishmania* é ainda controverso e pouco compreendido (CHAI et al., 2005).

Para exercer atividade farmacológica, tem-se que o antimonial pentavalente – Sb (V) seja convertido à sua forma trivalente – Sb (III). O Sb (III) é altamente ativo sobre as formas promastigotas e amastigotas do parasita ao passo que o Sb (V) apresenta-se mais ativo contra as formas amastigotas intracelular. O antimonial pentavalente é, portanto, considerado um pró-fármaco (KOTHARI et al., 2007).

O fármaco, ao entrar em contato com a forma amastigota do parasita, se interioriza e, em seguida, diretamente ou após redução à sua forma trivalente, exerce seu efeito leishmanicida (AMATO et al., 2008). Um dos mecanismos de ação inicialmente proposto foi que o antimonial interferia nas atividades bioenergéticas do parasita, inibindo sua atividade glicolítica e a via oxidativa dos ácidos graxos, levando-o, conseqüentemente, à morte por depleção de adenosina trifosfato (ATP) e guanosina trifosfato (GTP) (CHAN-BACAB; PENÃ-RODRIGUEZ, 2001).

Outros mecanismos de ação mais recentes demonstraram que antimônio mata o parasita por um processo de apoptose envolvendo fragmentação do DNA e externalização da fosfatidilcolina na superfície externa da sua membrana celular

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

(ASHUTOSH et al., 2007). Estudos exibiram também que os antimoniais comprometem o potencial redox da *Leishmania* por indução da perda de tióis intracelulares associado ao acúmulo de dissulfuretos ou ainda por inibição de tripanotiona redutase (SINGH, 2006).

Quanto à redução do fármaco a sua forma trivalente, o local exato (amastigota ou promastigota) e o seu mecanismo (enzimático ou não enzimático) ainda não são totalmente elucidados (CROFT et al., 2006). No entanto, alguns estudos sugerem que essa redução ocorre preferencialmente no macrófago, e não no parasita, embora, seja possível acontecer tanto no parasita quanto no hospedeiro (OUELLETTE et al., 2004). No que referi ao mecanismo da redução, há evidências de que tióis específicos do parasita, como a tripanotiona, ou tióis específicos do hospedeiro, a exemplo de glicilasteína, podem reduzir o antimônio por mecanismo não enzimático (ASHUTOSH et al., 2007).

No que tange ao desenvolvimento da resistência, observa-se que uma vez estabelecida para complexos trivalentes, há alta incidência de resistência cruzada para complexos pentavalentes, porém, surpreendentemente há aumento da suscetibilidade a drogas de segunda geração como pentamidina e anfotericina B. A combinação entre antimoniais e interferongama ou alopurinol, tem sido proposta como alternativa para melhora da eficácia terapêutica desses compostos (AMATO et al., 2000).

Conforme Seifert e Croft (2006), na região de Bihar, na Índia, onde a prevalência de leishmanioses é bastante acentuada, foram relatadas taxas acima de 65% de não responsividade ao tratamento com antimoniais pentavalente e, nos dias atuais eles não são mais usados nesses locais.

Como segunda linha de tratamento, em casos de resistência ou intolerância aos antimoniais, é utilizada a anfotericina B (figura 14), na forma liofilizada de desoxicolato sódico de anfotericina e a pentamidina. No entanto, devido aos inúmeros e freqüentes efeitos adversos desenvolvidos pela anfotericina B, sob a forma de desoxicolato, novas formulações foram produzidas e encontram-se atualmente disponíveis comercialmente. Uma dessas formulações é a anfotericina B lipossomal. Seu elevado custo, porém, não permite que se use na rotina dos serviços em saúde de países em desenvolvimento como o Brasil (BRASIL, 2006a).

Sobre a *Leishmania*, a ação do fármaco citado se faz através de uma toxicidade seletiva por interferência no episterol, precursor do ergosterol na membrana do parasita (BADARÓ, 2005). Adicionalmente, leva a uma lesão oxidativa que resulta em alterações

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

metabólicas prejudiciais à sobrevivência celular. Em menor escala, a anfotericina B liga-se também ao colesterol da membrana das células humanas, alterando-as e provocando efeitos adversos (MARTINEZ; HELMING; GORDON, 2009).

Estudo conduzido por Cohen (1998) mostrou que o mecanismo de ação, assim como da toxicidade, envolve a formação de poros artificiais ao longo da membrana celular do parasito e do hospedeiro, alterando a permeabilidade seletiva a cátions e levando à morte celular. No caso da *Leishmania*, a letalidade do antibiótico é agravada por lise coloidal osmótica devido ao influxo iônico exacerbado. (DOGRA; SAXANE, 1996).

Quanto à pentamidina (figura 15), ela pertence ao grupo químico das diamidinas e têm sido particularmente útil em casos que não responderam aos antimonials ou aqueles portadores de leishmanioses hipersensíveis ao antimônio, contudo, sua alta toxicidade torna-se fator limitante, visto ter sido observado hipoglicemia, hipotensão, alterações cardíacas, nefrotoxicidade e, até morte repentina foram descritas nos usuários, bem como tem sido reportado à ocorrência de cepas resistentes (RATH et al., 2003). Seu mecanismo de resistência pode estar associado a um decréscimo do potencial da membrana mitocondrial com redução do acúmulo do fármaco em terapias prolongadas (MUKHERJEE et al., 2006).

A pentamidina é concentrada ativamente pela mitocôndria do parasita onde é capaz de inibir a enzima topoisomerase II mitocondrial. É sabido que a atividade da enzima supracitada é acentuadamente aumentada em células em proliferação e consiste em promover um giro em torno da bifurcação da replicação do DNA para que a molécula-filha originada seja liberada no momento da segregação mitótica. A enzima prove o giro em torno do eixo, realiza um corte em ambos os filamentos de DNA e, em sequência, procede à reunião das rupturas (RANG; DALE, 2001).

Mais um medicamento que se tem mostrado efetivo contra a leishmaniose visceral é a paromicina considerado um aminoglicosídeo, sendo usado por via parenteral, tendo apresentado uma taxa de cura de 79%, mas, não foi observado sucesso contra leishmaniose cutânea. Além de, apresentar alta toxicidade renal (SINGH; SIVAKUMAR, 2004). Quanto ao seu mecanismo de ação, esse fármaco possui como alvo primário os ribossomos da *Leishmania*, agindo por inibição da síntese protéica através da ligação às subunidades ribossômicas induzindo, dessa forma, a leitura equivocada do mRNA. Age também alterando a fluidez da membrana do parasita e o seu metabolismo lipídico (JHINGRAN et al., 2009).

No ano de 2002, a miltefosina (figura 16) desenvolvida como uma substância anticancerígena foi registrada na Índia para tratar leishmaniose visceral, sendo o primeiro tratamento por via oral, e foi o último medicamento leishmanicida colocado no mercado (AHUA et al., 2007). Em 2007 esse medicamento foi registrado na Colômbia para tratar leishmaniose cutânea (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). Desde que passou a ser usado clinicamente, nenhum caso de resistência à terapia da leishmaniose com miltefosina foi relatado. Estudos sinalizam para a facilidade que resistência possa vir a ocorrer quando o uso desse medicamento se tornar assíduo (CHOUDHURY et al., 2008).

O mecanismo de ação da miltefosina sobre *Leishmania* é ainda bastante contestado. Pesquisas *in vitro* evidenciaram que esse fármaco estimula as células T e os macrófagos a secretarem interferon gama (IFN γ) e aumentar a produção de intermediários reativos de nitrogênio e oxigênio pelos macrófagos (PALUMBO, 2008). Choudhury et al. (2008) observaram que miltefosina induz a morte celular programada, sendo também a apoptose um de seus possíveis mecanismos de ação.

Azóis e alopurinol são dois dos vários medicamentos orais que são fracamente ativos contra *Leishmania*. Essas drogas não são úteis como um agente único, e há relatos de casos que elas podem interferir na eficácia do tratamento de pacientes imunossuprimidos, quando as drogas foram usadas em combinação, embora, os ensaios clínicos para testar essa combinação não ter sido realizados (TEMPONE; OLIVEIRA; BERLINCK, 2011).

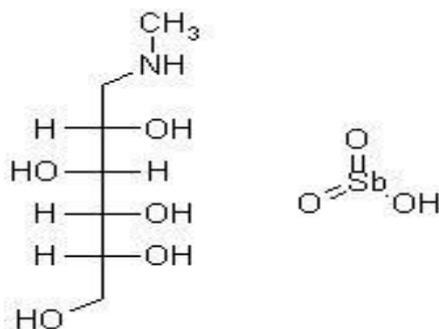


Figura 13. Fórmula estrutural de Glucantime

Fonte: Fillipin, (2006)

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

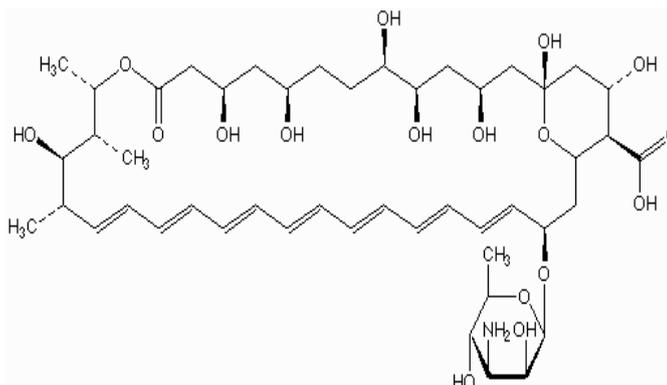


Figura 14. Fórmula estrutural de Anfotericina B

Fonte: Fillipin, (2006)

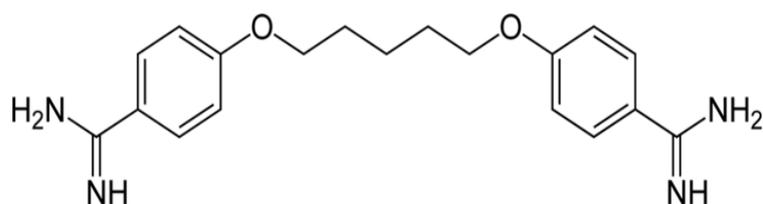


Figura 15. Fórmula estrutural de Pentamidina

Fonte: Fillipin, (2006)



Figura 16. Fórmula estrutural de Miltefosina

Fonte: Fillipin, (2006)

Um dos problemas cruciais para o desenvolvimento de novos fármacos ocorre no momento da interpretação das diferenças e identificação do alvo que se tornará válido para a ação do fármaco. Por exemplo, os estudos têm atentado para fármacos de ação antiparasitária que possam se acumular no interior das células. Além disso, deve ser

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

dada atenção às características físico-químicas do fármaco, pois são essas que irão intervir diretamente na sua biodisponibilidade (CROFT, 1997).

A ação de fármacos que se acumulam nos fagossomos tem estado em evidência, especialmente aquelas que possuem tropismo por lisossomos como aminoácidos, ésteres e dipeptídeos análogos do bis-benzil poliamino (RABINOVITCH, 1989). Há ainda moléculas carreadoras que podem ser incorporadas à droga, ajudando na ação de receptores de superfície de células infectadas ou de superfície do parasito, como visto em receptores de manose e fucose em macrófagos infectados por *Leishmania* permitindo a ação do alopurinol (NEGRE et al, 1992).

Os mecanismos de interação do fármaco com seu alvo podem ser visualizados por modelos computacionais. Aliás, devem-se levar em consideração os testes de biodisponibilidade, processamento metabólico, toxicidade e interação com outras substâncias (DAVIS; MURRAY; HADMAN, 2004). As *Leishmanias* apresentam diferentes adaptações não apenas ao que se refere ao tropismo por macrófagos de diferentes órgãos, mas também adaptações para sua sobrevivência intracelular, o que contribui para diferente comportamento quanto à susceptibilidade a drogas (CROFT; COOMBS, 2003).

A cura da leishmaniose durante a quimioterapia parece depender do desenvolvimento de uma resposta imune que ativa macrófagos para que essas células possam produzir óxido nítrico, causando uma explosão respiratória e a produção de ânions e superânions, capaz de matar as formas amastigotas (BOGDAN et al., 1996).

Várias estudos são realizados para a avaliação da susceptibilidade de formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* sp. a fármacos. Os dois estágios possuem diferenças bioquímicas causando diferentes resultados nesses testes. No geral, promastigotas são menos susceptíveis a fármacos que amastigotas. Os experimentos realizados com amastigotas intracelulares se correlacionam melhor com a resposta *in vivo*. Isso ocorre devido ao fato da forma amastigota ser aquela encontrada no hospedeiro (FUMAROLA; SPINELLI; BRANDONISIO, 2004).

2.12 Prevenção

O controle constante e bem conduzido apresenta excelentes resultados, que para serem duradouros requer vigilância epidemiológica perseverante e obstinada, caso contrário os focos ressurgem pondo a perder todo o trabalho até então realizado. A inspeção da LV recomendado pela OMS desde a década de 70 é baseado em três pontos: diagnóstico precoce e tratamento dos casos humanos; eliminação dos cães reservatórios; e controle do vetor com aplicação de inseticidas (OPAS, 1987).

Até o ano de 2003, as estratégias de controle, realizadas muitas vezes de forma isolada e sem continuidade, não foram efetivas para reduzir a incidência, o que determinou a reavaliação do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV). Pelas novas diretrizes, os estados e municípios sem ocorrência de casos humanos ou caninos também foram incluídos nas ações de vigilância; onde ocorre a transmissão, as medidas serão distintas, adequadas e executadas de forma integrada (BRASIL, 2003).

O PCLV é aplicado em áreas urbanas ou rurais. Critérios epidemiológicos, ambientais e sociais orientam a delimitação da área a ser trabalhada onde o indicador é a ocorrência de casos humanos. Ressalta a atenção ao homem, com capacitação de pessoal técnico e profissionais de saúde para diagnóstico e tratamento (BRASIL, 2003).

A vigilância epidemiológica é um dos componentes que visa minimizar as taxas de letalidade e o grau de morbidade através do diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, bem como da diminuição dos riscos de transmissão mediante controle da população de reservatórios e vetores. O novo enfoque do PCLV incorpora áreas sem ocorrência de casos humanos ou caninos da doença nas ações de vigilância e controle, com objetivo de evitar ou diminuir a expansão da doença (BRASIL, 2003).

3 Objetivos:

3.1 Geral:

Investigar a atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral sobre *Leishmania (L) chagasi*.

3.2 Específicos:

- Identificar e quantificar os compostos químicos do óleo essencial obtido das folhas frescas de *Cymbopogon citratus* e do Citral por Cromatógrafo Gasoso acoplado a um Espectrometro de Massas e Detector por Ionização de Chama;
- Determinar as concentrações inibitórias 50% (CI₅₀) do óleo essencial e Citral contra as formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *Leishmania (L.) chagasi*;
- Mensurar a citotoxicidade do óleo essencial e Citral em células da cavidade peritoneal de camundongo BALB/c;
- Observar a produção de óxido nítrico pelo óleo essencial e Citral em macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c;
- Diagnosticar as alterações morfológicas nas promastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* desenvolvidas em presença do óleo essencial e Citral por microscopia de luz;
- Avaliar a permeabilidade de membrana celular em promastigota de *Leishmania (L) chagasi* pelo Citral por fluorescência.

4 Metodologia

4.1 Material botânico

As folhas frescas de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf foram colhidas as 7 horas e 40 minutos na Fazenda Mãe Terra em maio de 2011, na temperatura de 21°C, umidade relativa do ar de 68%. A fazenda se localiza no município de Santana do São Francisco/SE – Brasil. A planta foi identificada pelo sistemata Dr. Lauro Xavier-Filho e foi depositada sua exsicata no Herbário da Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão/SE com número de registro ASE19145. Quanto ao Citral, esse foi obtido comercialmente da Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany).

4.2 Extração do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*

Para extração do óleo essencial das folhas frescas de *Cymbopogon citratus* foi utilizado o método por arraste de vapor (figura 17), conforme Alencar; Craveiro, Matos. (1984). O tempo de extração foi de aproximadamente 2 horas, em sequência se calculou o teor em óleo essencial pelo volume de óleo essencial obtido dividido pela sua massa de folhas frescas e o resultado multiplicado por 100, segundo RODRIGUES (2007). O óleo foi acondicionado em frasco de vidro de cor âmbar, hermeticamente fechado e armazenado na temperatura de -15°C até a análise. A extração foi realizada no Laboratório de Produtos Naturais e Biotecnologia do Instituto de Tecnologia e Pesquisa – Aracaju/SE.



Figura 17. Extrator de óleo essencial por arraste de vapor – Marconi.

Fonte: Laboratório de Produtos Naturais e Biotecnologia do Instituto de Tecnologia e Pesquisa – Aracaju/SE.

4.3 Caracterizações químicas do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e Citral

As análises de Cromatografia Gasosa (CG) foram realizadas utilizando um Cromatógrafo Gasoso acoplado a um Espectrometro de Massas e Detector por Ionização de Chama - CG-MS/FID (CG-2010 Plus; CGMS-QP2010 Ultra, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão), equipado com um amostrador automático AOC-20i (Shimadzu), procedente do Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais no Departamento de Quimica da Universidade Federal de Sergipe – UFS/São Cristovão - SE.

As separações foram realizadas usando uma coluna capilar de sílica fundida Rtx®-5MS Restek (polissiloxano 5%-difeníl-95%-dimetil) de 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno(d.i.), 0,25- μ m de espessura de filme, em um fluxo constante de hélio (99,999%) com taxa de 1,2 mL.min⁻¹. Foi utilizado um volume de injeção de 0,5 μ L de óleo essencial e Citral (5 mg.mL⁻¹), com razão de *split* de 1:10.

A programação de temperatura do forno utilizada foi a partir de 50 °C (isoterma durante 1,5 min), com um aumento de 4 °C / min, à 200 °C, em seguida, a 10 °C / min até 250 °C, terminando com isoterma de 5 min a 250 °C. Os dados de MS e FID foram simultaneamente adquiridos empregando um sistema de separação de detector; a razão de separação de escoamento foi de 4:1 (MS: FID). Um tubo restritor de 0,62 m x 0,15 milímetros d.i.. (coluna capilar) foi usado para ligar o divisor para o detector MS; um tubo restritor de 0,74 m x 0,22 mm d.i. foi utilizado para ligar o divisor para o detector FID.

A temperatura do injetor foi de 250 °C e a da fonte de íons foi de 200 °C. Os espectros de massa foram gerados à 70 eV; uma velocidade de varrimento de verificação 0,3 s , e os fragmentos detectados no intervalo de 40-350 Da. A temperatura do FID foi ajustada para 250 °C, e os suprimentos de gás para o FID foram ar sintético, hidrogénio, hélio em taxas de fluxo de 30, 300 e 30 mL.min⁻¹, respectivamente.

A quantificação de cada constituinte foi estimada por normalização da área do pico gerado no FID em porcentagem (%). As concentrações dos compostos foram calculadas a partir das áreas dos picos de CG e foram dispostos por ordem de eluição de CG. A identificação dos constituintes foi realizada com base na comparação dos índices de retenção da literatura (ADAMS, 2007). Para o índice de retenção foi utilizando a equação de Van den Dool e Kratz (1963) em relação a uma série homóloga de *n*-alcanos

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

(nC9 - nC18). Foram também utilizadas três bibliotecas do equipamento WILEY8, NIST107 e NIST21 que permitem a comparação dos dados dos espectros com aqueles constantes das bibliotecas utilizando um índice de similaridade de 80%.

4.4 Aspecto ético

No presente estudo foram respeitados os princípios éticos estabelecidos pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animal de Laboratório (SBCAL) e todos os procedimentos experimentais foram analisados e previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Tiradentes – UNIT/SE, cujo Parecer Consubstanciado possui número 060511R (Anexo 1).

4.5 Animais

Para obtenção dos macrófagos utilizados nos ensaios de citotoxicidade e amastigotas intracelulares foram usados camundongos BALB/c adultos de $18,0 \pm 2,0$ gramas, mantidos no Laboratório de Toxinologia Aplicada a Fármacos Antiparasitários, pertencente ao Instituto Adolfo Lutz – São Paulo/São Paulo. Já o experimento para detectar produção de óxido nítrico realizado também em macrófagos de camundongos BALB/c, esses foram preservados no Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe (UFS).

A cepa de *Leishmania* (L.) *chagasi*, elas foram conservadas em Hamster Dourado da espécie *Mesocricetus auratus*. Os animais permaneceram em gaiolas de polipropileno forradas com serragem, dieta balanceada com ração do tipo “pallet” e água ad libitum, temperatura controlada $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar de 40% - 50% ($\pm 10^{\circ}\text{C}$) e ciclo de luz claro/escuro de 12 horas.

4.6 Eutanásia e descartes dos animais

Após a eutanásia dos Camundongos e Hamster realizada em Câmara de Gás CO_2 , suas carcaças foram depositadas em sacos plásticos apropriados e armazenadas em freezer de coleta de materiais biológicos, situados no Laboratório de Toxinologia Aplicada a Fármacos Antiparasitários, pertencente ao Instituto Adolfo Lutz – São Paulo/São Paulo e no Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia da UFS, para posterior recolhimento durante a coleta de lixo específica. Os resíduos perfurocortantes foram armazenados em caixas adequadas para posterior descarte apropriado.

4.7 Parasitas

Leishmania (L) *chagasi* (MHOM/BR/1972/LD) foi conservada em Hamsters Dourados (figura 18). Em cerca de 60 a 70 dias após a infecção as formas amastigotas foram obtidas a partir de seus baços por centrifugação diferencial e a carga parasitária foi determinada utilizando-se o método de Stauber; Franchino; Grun, (1958). Já as promastigotas foram mantidas em cultivo no meio M-199 suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal e 0,25% (v/v) de hemina a temperatura de 24°C (TEMPONE et al., 2008). Esses ensaios foram desenvolvidos no Laboratório de Toxinologia Aplicada a Fármacos Antiparasitários, pertencente ao Instituto Adolfo Lutz – São Paulo/São Paulo.



Figura 18. Hamsters dourados saudáveis oriundo do Biotério do Instituto Adolfo Lutz/São Paulo – São Paulo

4.8 Determinações das concentrações inibitórias 50% (CI₅₀) do óleo essencial e Citral contra promastigota de *Leishmania* (L) *chagasi*

A inibição do crescimento do promastigota de *Leishmania* (L) *chagasi* foi estabelecida como relatado por Tempone et al. (2005), usando Pentamidina como fármaco padrão. Para realizar os experimentos se utilizou microplacas de 96 poços. Sucintamente, 1×10^6 promastigotas foram semeadas com diferentes concentrações de óleo essencial e Citral (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,5625 e 0,78125 µg/mL), previamente dissolvido em Dimetilsulfoxido a 0,3% (DMSO) e diluído em meio M-199 enriquecido com soro bovino fetal a 10%. Quanto a Pentamidina foi usado uma CI₅₀ de (0,0964 µg/mL), segundo Sartorelli et al. (2007).

A viabilidade dos parasitos foi determinada utilizando ensaio colorimétrico com [brometo de 3 (4,5 – dimetiltiazol – 2 – II) – 2,5 difeniltetrazólio] - 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 μ m), conforme TADA et al. (1986). Foi adicionado em cada poço 20 μ L de solução MTT e incubado a 37°C por 4 horas. Após foi acrescido 100 μ L de SDS a 10% acidificado com HCl 0,01 M e incubado por 18 horas à 24°C. A leitura foi realizada em um Multiskan MS UNISCIENCE, através da densidade ótica (D.O.) em 570 nm (Figura 19).

O resultado da leitura foi correlacionado com o número de promastigotas vivas e padronizado para cada placa. Os controles foram feitos com promastigotas mantidas em cultivo axênico, essas foram usadas como parâmetro de 100% de viabilidade, segundo Sartorelli et al. (2007) e promastigotas mais DMSO a 0,3 %. As concentrações inibitórias 50% (CI₅₀) do óleo essencial e Citral foram determinadas no tempo de 48 horas e analisadas por curvas sigmoidais concentração-resposta. Conforme Oliveira et al. (2009), a concentração final de DMSO não deve exceder a 0,4%, posto, até essa concentração não ocorre danos para *Leishmania*.

Esses ensaios foram conduzidos no Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Universitário da UFS/SE, realizados em triplicata e repetidos duas vezes com o objetivo de avaliar a conservação da atividade do óleo essencial e Citral, bem como observar a reprodutibilidade dos resultados.

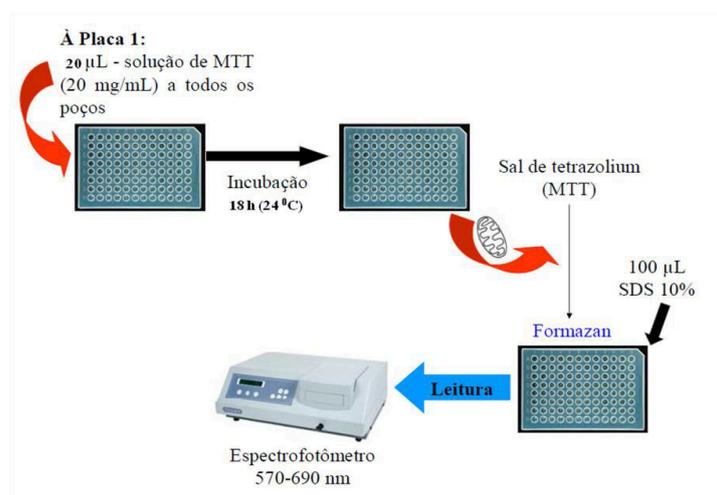


Figura 19. Leitura dos resultados obtidos para o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e Citral usando Brometo de 3 (4,5-dimetiltiazol-2-II)-2,5difeniltetrazólio – MTT.

4.9 Ensaios de citotoxicidades do óleo essencial e Citral

A citotoxicidade do óleo essencial e Citral foram mensuradas em macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c (4×10^5 macrófagos/poço). O ensaio foi conduzido em microplacas de 96 poços e as células foram incubadas em meio de cultivo M-199 suplementado com 10% de soro bovino fetal a 37°C e 5% de CO₂ por 2 horas para adesão das células nos poços. Em continuidade, as culturas foram incubadas com diferentes concentrações de óleo essencial e Citral (100; 50; 25; 12,50; 6,25, 3,125, 1,5625 e 0,78125 µg/mL), previamente solubilizados em DMSO a 0,3% e diluído em meio M-199 enriquecido com soro bovino fetal a 10%.

Para determinar a viabilidade das células utilizou-se o método colorimétrico com sal solúvel de tetrazólio – MTT (TADA et al., 1986). A leitura do teste foi realizada em Multiskan, através da D. O. em 570 nm. Os controles foram poços contendo Pentamidina como fármaco de referência, poços com parasitas (promastigotas) mais meio de cultivo (100% de viabilidade) e DMSO a 0,3% contendo promastigotas (figuras 20 e 21). Os ensaios foram executados no Laboratório de Toxinologia Aplicada a Fármacos Antiparasitários do Instituto Adolfo Lutz – São Paulo/São Paulo, sendo realizados em triplicata e repetidos 2 vezes com a meta de avaliar a manutenção da atividade do óleo essencial e Citral, e também a reprodutibilidade dos resultados.



Figura 20. Camundongos BALB/c provenientes do Biotério do Instituto Adolfo Lutz/São Paulo – São Paulo

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

microscopia de luz para verificar se havia ocorrido atividade do óleo essencial e Citral sobre os amastigotas. Esses testes foram executados em triplicata e repetido 2 vezes com o objetivo de avaliar a permanência da atividade do óleo essencial e Citral, e a reprodutibilidade dos resultados no Laboratório de Toxinologia Aplicada a Fármacos Antiparasitários pertencente ao Instituto Adolfo Lutz – São Paulo/São Paulo.



Figura 22. Hamster dourado portando leishmaniose visceral. Seta indica perda de pelo.

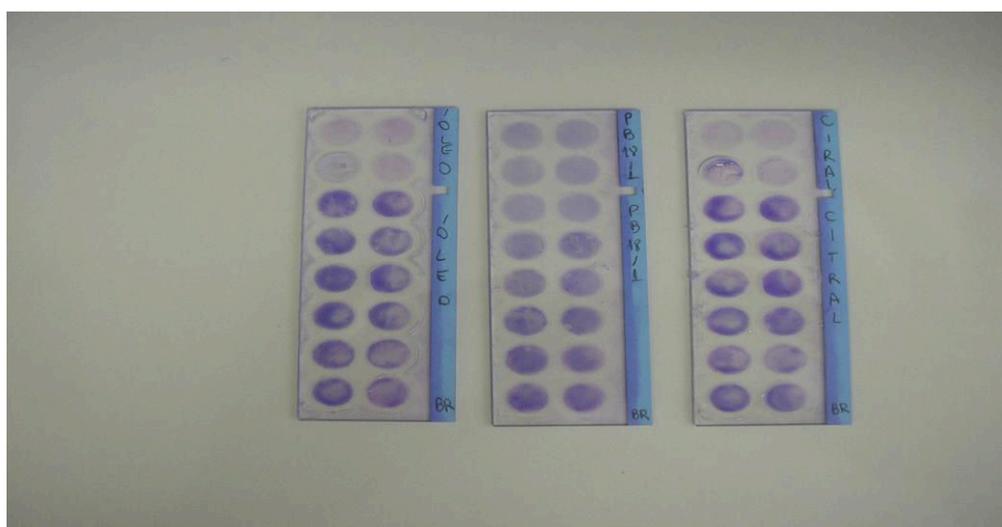


Figura 23. Microplaca (NUNC-PolySorp) apresentando resultado do tratamento das formas amastigotas intracelular de *Leishmania* (L.) *chagasi* com óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e Citral.

4.11 Produção de óxido nítrico em macrófagos por óleo essencial e Citral

Os níveis de óxido nítrico (NO) em sobrenadante de culturas de macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de camundongos BALA/c foram avaliados pela medida da dosagem de seu produto de degradação, o nitrito, através da reação de Griess (Panaro et al., 1999). Nesse método, o nitrito reage com a sulfanilamida em meio ácido para formar um composto intermediário, o sal de diazônio. Em seguida, esse sal reage com N-naftil-etilenodiamina formando um composto azo estável de coloração púrpura, podendo ser analisado em espectrofotômetro, na faixa de comprimento de onda de 490 a 540 nm.

Em microplaca de 96 poços foram pipetados 50 μ L dos sobrenadantes das culturas de macrófagos (7x10⁵/poço) expostos ao óleo essencial (25 μ g/mL) e Citral (30 μ g/mL) e 50 μ L do reagente de Griess, seguido de incubação das placas por 10 minutos à temperatura ambiente. Interferon- γ foi utilizado na estimulação da produção de óxido nítrico. As concentrações de nitrito foram calculadas a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio. Os registros de absorbância foram realizados no comprimento de onda de 492nm. Essa investigação foi desenvolvida no Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Universitário da UFS/SE.

4.12 Estudos morfológicos

Para avaliar as alterações morfológicas induzidas pelo óleo essencial e Citral sobre as promastigotas de *Leishmania* (L) *chagasi*, os parasitas foram submetidos às concentrações de 25 μ g/mL em óleo essencial e 30 μ g/mL de Citral por 48 horas. Posteriormente foi confeccionado, em lâmina de vidro, um esfregaço a partir da suspensão dos parasitas, cujos foram fixados com metanol e corados com “Panótipo Rápido LB” (Laborclin, Pinhais, Paraná, Brasil). As imagens foram obtidas usando um microscópio de luz Zeiss Axioskop 2 plus acoplado ao programa de visão Axio, do Laboratório de Morfologia e Biologia Estrutural no Instituto de Tecnologia e Pesquisa – Aracaju/SE

4.13 Avaliação da permeabilidade de membrana celular em promastigota de *Leishmania* (L) *chagasi* pelo Citral

Para avaliar a permeabilidade de membrana celular se utilizou formas de promastigotas de *Leishmania* (L.) *chagasi* (1x10⁶/ poço), cujas foram lavadas com PBS e

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

incubadas com 30µL de Sytox Green (1µM) por 15 minutos no escuro. Em sequência foi adicionado 30 µg/mL de Citral. O aumento da fluorescência foi executado devido à ligação do marcador fluorescente ao parasita, onde se mediu em um espectrofluorímetro de placas com os filtros de excitação de 485 nm e emissão de 520 nm. A permeabilização máxima foi obtida na presença do detergente Triton X-100 a 0,5% (controle positivo) (KULKARNI et al., 2009).

A fluorescência foi avaliada a cada 30 minutos até um total de 2 horas. Esse ensaio foi realizado no Laboratório de Toxinologia Aplicada a Fármacos Antiparasitários pertencente ao Instituto Adolfo Lutz – São Paulo/São Paulo, sendo executado em triplicata e repetido 2 vezes com o objetivo de avaliar a reprodutibilidade dos resultados.

4.14 Análise estatística

Para o cálculo da CI_{50} de óleo essencial e Citral foi utilizado o método de regressão linear e não linear, já para as comparações múltiplas de dados foi empregado o teste de variância ANOVA, duas vias, seguido pelo teste de Tukey ou o teste variância Kruskal-Wallis quando apropriado. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. Para análise de dados foi utilizado o software Graph Pad Prism 5.0 (Graph Pad Prism Software, San Diego, CA).

5 Resultados e Discussão

5.1 Caracterizações Químicas do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e Citral

O teor em óleo essencial é considerado uma dos mais importantes parâmetros a ser avaliado nos plantios destinados à produção comercial, posto, expressa o percentual em óleo produzido a partir de uma determinada quantidade de folhas. Nas condições desse estudo o teor em óleo essencial das folhas fresca de *Cymbopogon citratus* obtido por arraste de vapor foi de 0,4669%. Esse óleo apresenta um teor de 0,28% a 0,5% da massa fresca, conforme CARVALHO et al. (2005).

Os Cromatogramas do óleo essencial obtido das folhas frescas e do Citral gerados por Cromatografia Gasosa encontram-se nas figuras 24 e 25. O Citral pode ser isolado a partir do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, entretanto, por motivos técnicos não foi possível nesse estudo se realizar essa purificação.

Em relação a composição química foi percebido pelos dados das Tabelas 1 e 2, que o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* possui monoterpenos aldeídos acíclicos isoméricos como constituintes predominantes, sendo que o componente majoritário encontrado foi o geranial (53,00%) e neral (36,72%). Para mirceno foi detectado (6,02%). Já o Citral apresentou geranial (62,21%) e neral (36,50%). O geranial e neral são estereoisômeros e a mistura constitui o Citral. Assim, o Citral é uma mistura isomérica de geranial [(2E)-3,7-dimetilocta-2,6-dienal; citral A ou isômero E] e neral [(2Z)-3,7-dimetilocta-2,6-dienal; citral B ou isômero Z] (OLIVEIRA et al., 2011).

O Citral é considerado uma molécula versátil por ser relevante nas indústrias de alimentos e aromas tendo em vista possuir essência de limão, sendo também utilizado como matéria prima em indústrias farmacêuticas, cosméticas e de perfumes. Além de apresentar atividade antimicrobiana cientificamente comprovada, conforme Behboud et al. (2012). Esses atributos permitem ao Citral agregar valor comercial. Quanto ao mirceno estudo demonstrou ação analgésica (ORDÓNEZ et al., 2007).

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

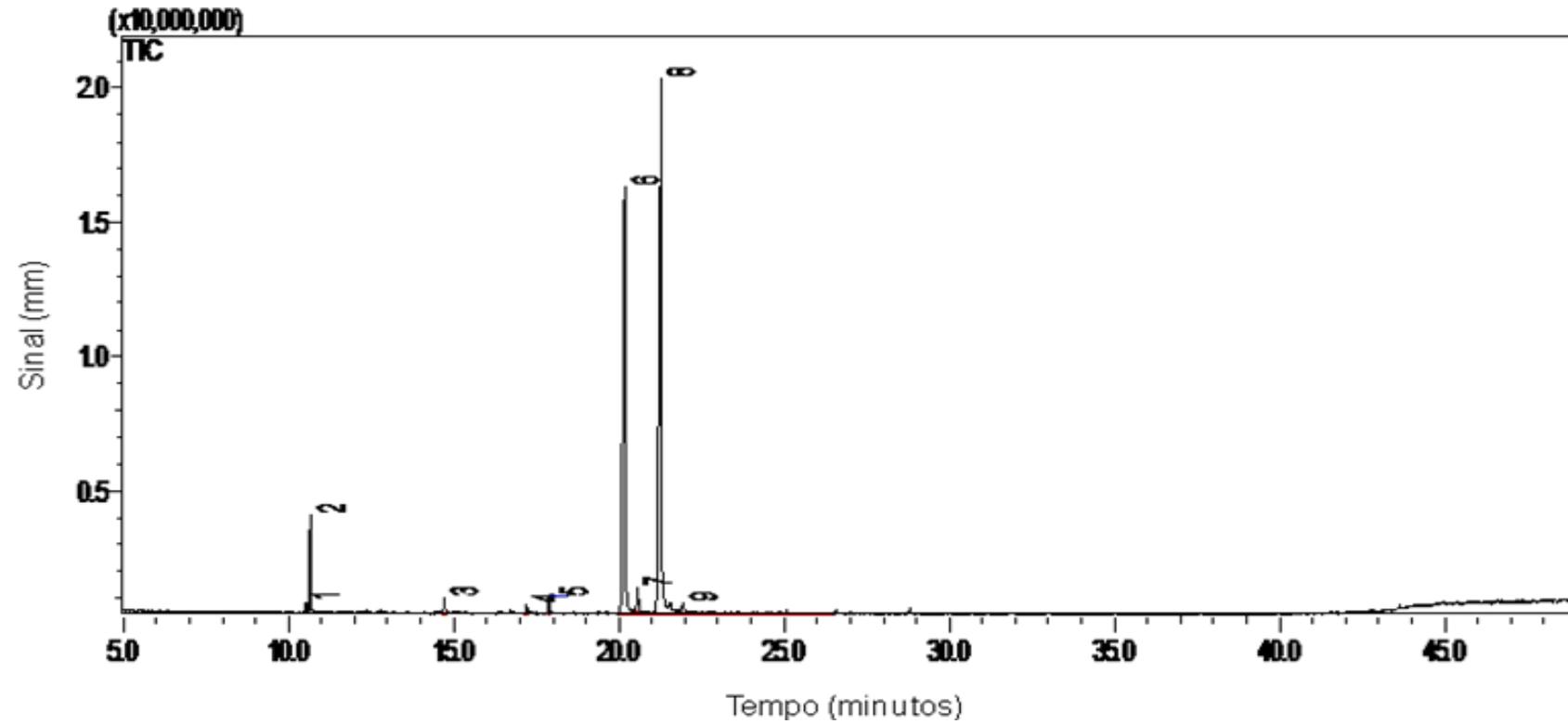


Figura 24 - Cromatograma do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* obtido das folhas frescas por Cromatografia Gasosa acoplado a um Espectrometro de Massas e Detector por Ionização de Chama.

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

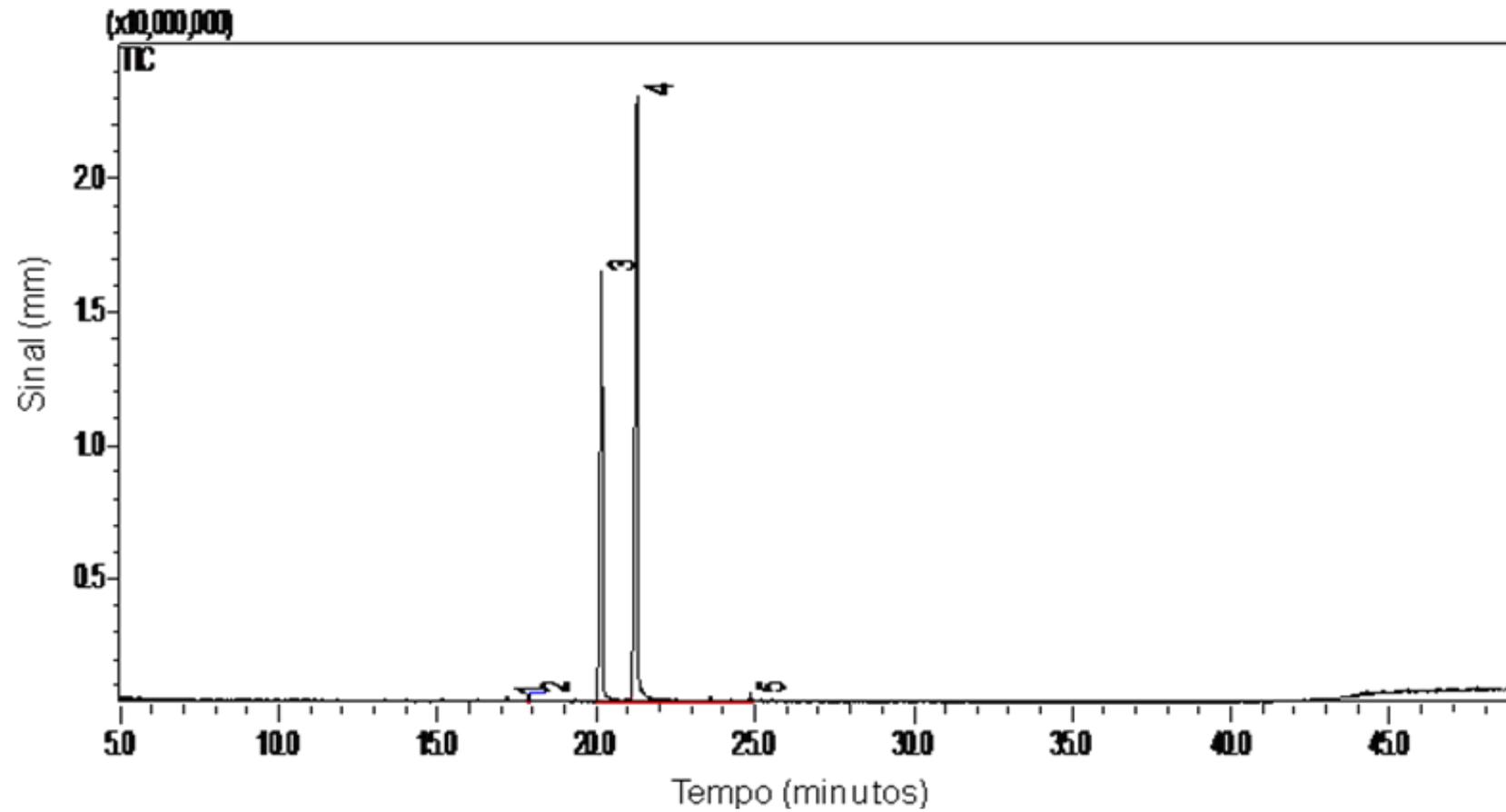


Figura 25. Cromatograma do Citral por Cromatografia Gasosa acoplado a um Espectrometro de Massas e Detector por Ionização de Chama.

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

Tabela 1. Constituintes químicos do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* identificados por GC-MS/FID e os respectivos teores.

Picos	TR (min.)	Compostos	(%)	(%)	IRR exp.*	IRR lit.**
			GC-MS	GC-FID		
1	10.515	6-metil-5-hepten-2-ona	0,51	0,49	988	981
2	10.655	Mirceno	4,35	6,02	992	988
3	14.710	Linalol	0,83	0,79	1101	1095
4	17.185	Z-isocitral	0,54	0,50	1167	1160
5	17.870	E-isocitral	0,97	0,93	1185	1177
6	20.170	Neral	35,63	36,72	1247	1235
7	20.550	Geraniol	1,32	1,17	1258	1249
8	21.265	Geranial	55,28	53,00	1277	1264
9	21.935	2-undecanona	0,57	0,37	1295	1293
Total			100	100		

*Índice de retenção relativo experimental; **Índice de retenção relativo da literatura. GC-MS/FID: Cromatógrafo Gasoso acoplado a um Espectrometro de Massas e Detector por Ionização de Chama. TR: Tempo de Retenção.

Tabela 2. Constituintes químicos do Citral identificados por GC-MS/FID e os seus respectivos teores.

Pico	TR (min.)	Composto	(%)	(%)	IRR exp.*	IRR lit.**
			GC-MS	GC-FID		
1	17.185	Z-isocitral	0,25	0,29	1167	1160
2	17.870	E-isocitral	0,52	0,50	1185	1177
3	20.170	Neral	36,09	36,50	1247	1235
4	21.265	Geranial	62,45	62,21	1277	1264
5	24.860	NI	0,68	0,50	1379	NI
Total			100	100		

*Índice de retenção relativo experimental; **Índice de retenção relativo da literatura. GC-MS/FID: Cromatógrafo Gasoso acoplado a um Espectrometro de Massas e Detector por Ionização de Chama. TR: Tempo de Retenção.

5.2 Determinação da concentração inibitória 50% do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e Citral em promastigotas de *Leishmania (L.) chagasi*

Nessa pesquisa, se investigou *in vitro* a atividade do óleo essencial das folhas frescas de *Cymbopogon citratus* e Citral contra *Leishmania (L.) chagasi* nas formas promastigota e amastigota intracelular. Nas condições desse estudo foi observado que nos promastigotas tanto o óleo essencial quanto o Citral demonstraram efetividade com uma $CI_{50}/48$ horas de 25 $\mu\text{g/mL}$ para óleo essencial e $CI_{50}/48$ horas de 30 $\mu\text{g/mL}$ para Citral, conforme figura 26. Em consonância com um estudo realizado por Oliveira et al. (2009), que mostrou um $CI_{50}/72$ horas de 45 $\mu\text{g/mL}$ para o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* sobre as formas promastigotas de *Leishmania (L.) chagasi*.

Santoro et al. (2007) encontraram em um estudo que o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e Citral foram efetivos em concentrações baixas, contra formas epimastigotas e tripomastigotas do protozoário *Tripanosoma cruzi*. Trabalho realizado por Almeida et al. (2008) detectou atividade no extrato hidroalcoólico de *Cymbopogon citratus* sobre o fungo *Candida* spp. Já Heimerdinger (2005) mostrou eficácia do extrato alcoólico de *Cymbopogon citratus* para *Boophilus micropulus* em bovinos.

Para Oliveira et al. (2012), a atividade anti-*Leishmania* avaliada cientificamente do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* é devido principalmente ao Citral. Pesquisa desenvolvida por Ferreira et al. (1999) buscando a identificação de marcadores químicos para espécie vegetal *Cymbopogon citratus* demonstrou que seu óleo essencial possui geranial (52,23%) e neral (42,72%), que são os formadores do Citral. Partindo dessa premissa, pode ser que o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* desse estudo também tenha como marcador químico o Citral (tabela 1).

O fato da resistência por parte do protozoário *Leishmania* aos fármacos existentes, os graves efeitos adversos desencadeados por eles, os custos financeiros elevados que na maioria das vezes são para sanar os problemas causados pelos transtornos dos fármacos vigentes, bem como a não existência ainda de uma vacina eficaz e o crescimento exponencial demonstrado em estudos epidemiológicos tem sensibilizado a comunidade científica e diversas pesquisas estão sendo conduzidas no mundo utilizando produtos naturais, notadamente as plantas na busca de moléculas bioativas contra as leishmanioses.

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

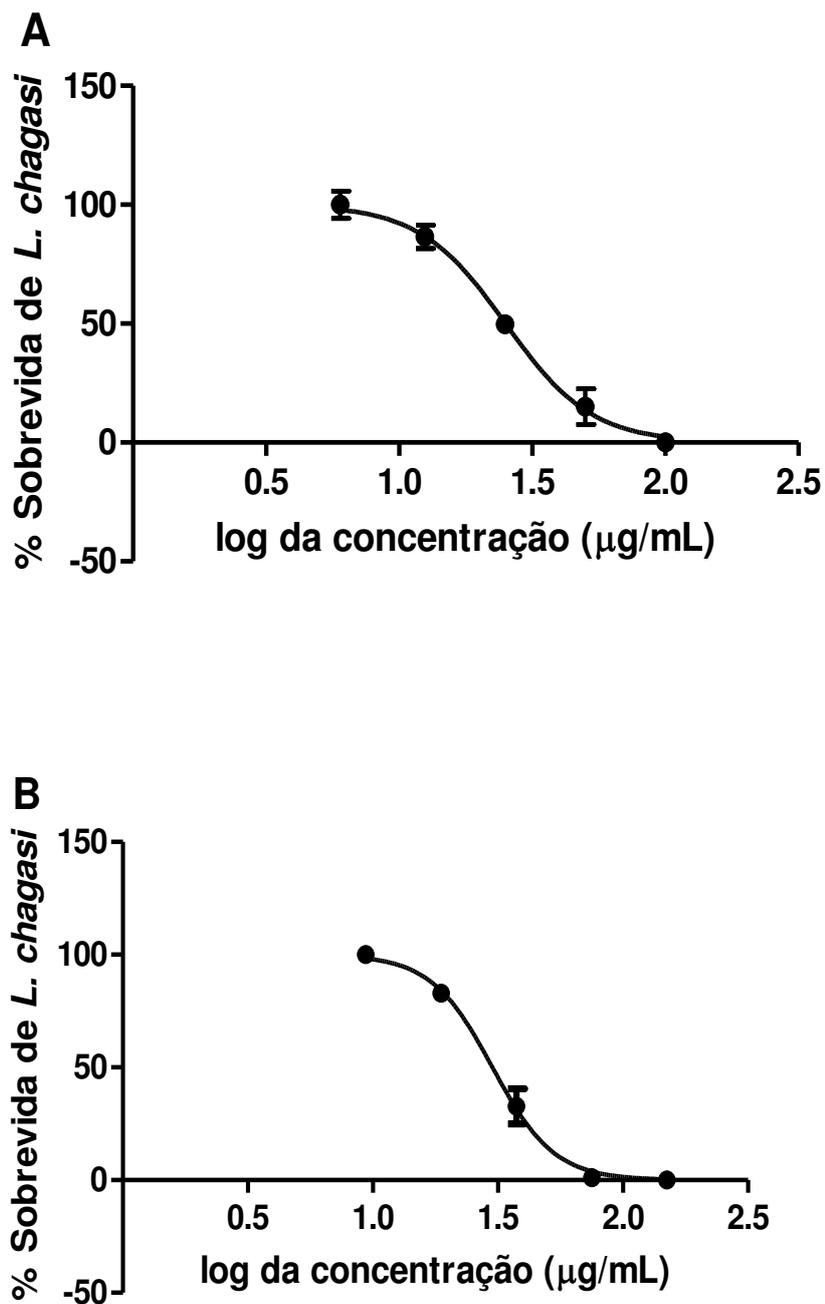


Figura 26. Curvas concentrações respostas para o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (Figura A) e Citral (Figura B) contra 1×10^6 promastigotas/poço de *Leishmania* (*L.*) *chagasi*. A viabilidade dos parasitas foi determinada usando Brometo de 3 (4,5-dimetiltiazol-2-Il)-2,5difeniltetrazólio – MTT.

5.3 Ensaios de citotoxicidades para óleo essencial e Citral

Os testes de citotoxicidade são primordiais para as fases iniciais de desenvolvimento de drogas antiparasitárias, uma vez que definem a concentração a ser utilizada, em etapas posteriores de avaliação. Além disso, evita danos celulares e asseguram a seletividade do parasita *in vitro* (ARAÚJO et al., 2011). Já o ensaio com MTT é um dos indicadores colorimétrico de viabilidade celular bastante utilizado, sendo capaz de mensurar a função celular mitocondrial conforme a redução enzimática do sal tetrazólico pelas desidrogenases mitocondriais nas células viáveis (MOSMANN, 1983).

Nesse estudo, a ação citotóxica do óleo essencial e Citral testados em macrófagos da cavidade peritoneal de BALB/c mostrou CC_{50} de 26,25 $\mu\text{g/mL}$ para o óleo essencial e 33,96 $\mu\text{g/mL}$ para Citral (figura 27). A toxicidade para o macrófago e a ação contra *Leishmania* (L.) *chagasi* foi comparada através do Índice de Seletividade (IS). Ele foi calculado a partir da relação entre a CC_{50}/CI_{50} do óleo essencial e Citral sobre a forma promastigota de *Leishmania* (L.) *chagasi*, segundo Osório et al. (2007). Nessa pesquisa o resultado do IS do óleo essencial foi de $26,25 \mu\text{g/mL}/25 \mu\text{g/mL} = 1,05$, ou seja, de 1,05. Já para o Citral foi de $33,96 \mu\text{g/mL}/30 \mu\text{g/mL} = 1,13$, ou seja, 1,13.

Nas condições desse estudo, o IS tanto para o óleo essencial quanto para o Citral foram baixos, sugerindo pouca especificidade da atividade observada. Estudo realizado por Santin et al. (2009), com óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e Citral contra *Leishmania amazonensis* e trabalhando com macrófagos da estirpe J774G8 demonstraram IS de 7,8 para o óleo essencial e 2,0 para Citral, sugerindo que a espécie de *Leishmania*, bem como a célula escolhida para realizar teste de citotoxicidade podem influir nos resultados.

Quando o IS for baixo indica que a atividade anti-*Leishmania* é provavelmente devido à citotoxicidade, em vez de atividade contra o parasita. Em contraste, se IS for elevado oferece um potencial de terapia mais seguro (TEMPONE et al., 2005). Nesse estudo se resolveu definir 4 como valor mínimo de IS para validar uma utilização segura anti-*Leishmania*. Já valores de IS superior a 10 e de CI_{50} inferior a 10 mg/mL deve ser fonte promissora de moléculas anti-*Leishmania*.

Pesquisas devem ser conduzidas usando outras células animais para testar citotoxicidade e atividade contra *Leishmania visceral*, bem como outras espécies de Leishmanias usando o óleo essencial e Citral objetos desse estudo.

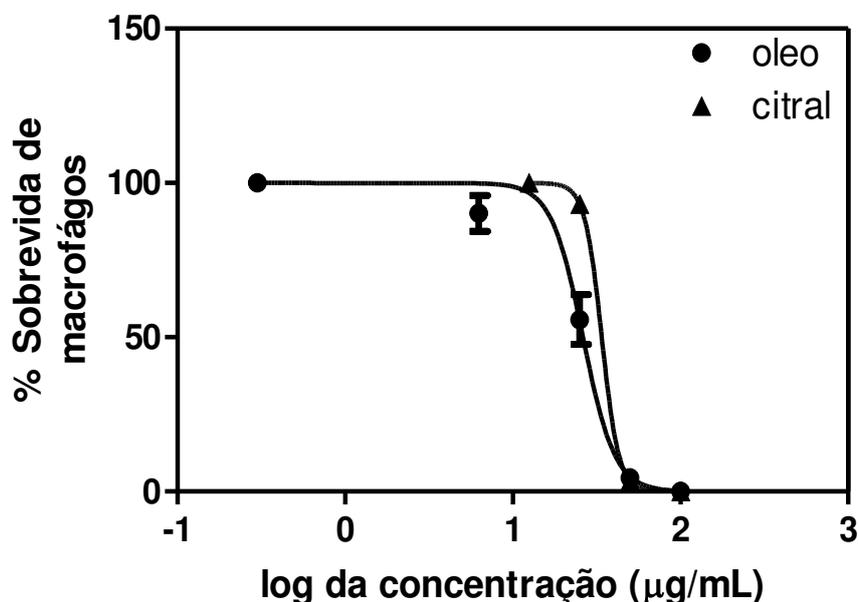


Figura 27. Curvas concentrações respostas para o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e Citral em macrófagos (4×10^5 macrófagos/poço) da cavidade peritoneal de BALB/c (Intervalo de Confiança: 95%).

5.4 Determinações das concentrações inibitórias 50% do óleo essencial e Citral em amastigotas intracelulares de *Leishmania (L) chagasi*

O resultado do ensaio conduzido contra as formas amastigotas intracelulares tratadas com óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e Citral mostrou que os compostos acima referidos não foram ativos. Santin et al. (2009) utilizando o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e Citral contra *Leishmania amazonensis* exibiram resultados de $CI_{50}/72$ horas de $1,7 \mu\text{g/mL}$ para óleo essencial e $CI_{50}/72$ horas de $8,0 \mu\text{g/mL}$ para Citral nas promastigotas e nas amastigotas foram encontrados para o óleo essencial uma CI_{50} de $3,2 \mu\text{g/mL}$ e para Citral foi uma CI_{50} de $25 \mu\text{g/mL}$.

Os estudos sobre a atividade leishmanicida de plantas *in vivo* não têm obtido resultados semelhantes *in vitro*. As frações diclorometano e éter de petróleo de

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

Peperomia galioides (Canela branca) e seus constituintes ativos difenólicos exibiram propriedades *in vitro*. No entanto, esta atividade não foi observada no estudo *in vivo* utilizando camundongos Balb/c infectados com *L. amazonensis* (FOURNET et al., 1996).

A miltefosina oral, que foi originalmente desenvolvida como um fármaco antineoplásico, é ativo contra *Leishmania* (CROFT et al., 2006). No entanto, parece mais eficaz contra algumas espécies de *Leishmania*, sendo sua efetividade variável dependendo das áreas geográficas, inclusive para a mesma espécie (GONZÁLEZ et al. 2008). As espécies de *Leishmanias* apresentam diferentes adaptações não apenas no que diz respeito ao seu tropismo por macrófagos de diferentes órgãos, mas também adaptação para sua sobrevivência intracelular, contribuindo para um diferente comportamento quanto à susceptibilidade a drogas, de acordo com Coombs (2003).

Para o entendimento do processo completo de infecção por *Leishmania* e de como essas infecções desencadeiam quadros clínicos diferenciados é necessário que se compreenda como esses parasitas enganam as defesas celulares, sobrevivem e se reproduzem no hospedeiro, uma vez que, o esclarecimento desses mecanismos pode expressar novos avanços na quimioterapia das leishmanioses, especialmente, a possibilidade do desenvolvimento de novos fármacos e formulações mais específicas e efetivas contra as leishmanioses, entretanto, muitas dúvidas ainda paira sobre as *Leishmanias* (MALAFAIA, 2008).

Os fatos acima relatados podem explicar os resultados encontrados nesse estudo e reforçar a idéia de outros trabalhos envolvendo óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e Citral em associação com outros princípios ativos vegetais como recursos terapêuticos contra outros protozoários a exemplo, *Giardia lamblia* e também em diferentes espécies de *Leishmanias*.

5.5 Produção de nitrito em macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c por óleo essencial e Citral

A produção de nitrito foi analisada pela reação de Griss, como uma medida da produção de óxido nítrico. No que se refere à geração de nitrito, percebeu-se que não houve diferença significativa na sua produção quando comparado ao controle (figura 28).

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

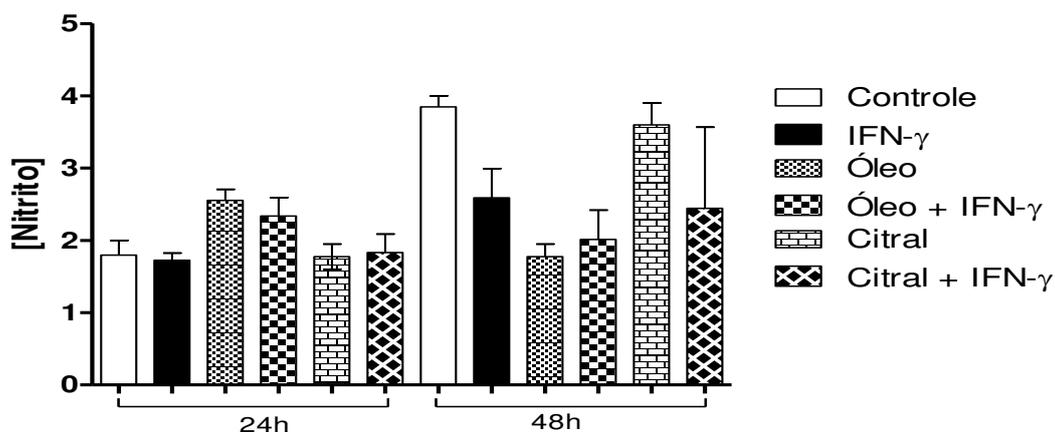


Figura 28. Efeito do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e do Citral na geração de nitrito em macrófagos (7×10^5 /poço) de cavidade peritoneal de BALB/c. Os macrófagos foram tratados com o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (25 $\mu\text{g/mL}$) e Citral (30 $\mu\text{g/mL}$). O controle foi representado por promastigota + meio de cultivo (100% viabilidade). IFN- γ – citocina estimuladora de macrófagos a sintetizar NO. Os dados estão expressos em média \pm d.p.m. Os dados foram analisados através do teste de variância Kruskal-Wallis

Em modelos murinos tem sido reportada que a morte intracelular de amastigotas pode estar correlacionada com a síntese de nitrito, um produto estável da degradação do NO, que é considerada como a principal molécula responsabilizada pela eliminação da *Leishmania* (GREEN et al., 1982)

A geração de NO por macrófagos é catalizada pela enzima óxido sintase induzida (iNOS), cuja substrato é L-arginina. A capacidade de macrófagos matarem amastigota de *Leishmania* tem sido correlacionada com a capacidade de produção de NO por eles. No entanto, além da produção de NO, outro mecanismo associado à atividade anti-*Leishmania* de macrófagos ativados é a produção de moléculas reativas de oxigênio, como o ânion superóxido (O_2^-), radicais hidroxila (OH^\cdot) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (MURRAY, 2005).

Os resultados obtidos nesse estudo mostraram que nem o óleo essencial nem o Citral induziram a produção de NO nos macrófagos. Com essa constatação pode-se pensar que procede a falta de atividade das substâncias acima referidas nas amastigotas intracelular em *Leishmania (L.) chagasi*.

5.6 Imagens obtidas por microscopia de luz

Quando observado por microscopia de luz em lâminas de vidro corada por “Panótipo Rápido LB” (Laborclin, Pinhais, Paraná, Brasil), as promastigotas de *Leishmania* (L.) *chagasi*, após tratamento com óleo essencial e Citral (CI_{50} /48 horas de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para óleo essencial e 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para Citral) revelaram alterações morfológicas (figura 29 C e D), notadamente nos flagelo que em algumas formas não foram observados e em outras existiam dois, bem como aumento do volume celular seguida por ruptura da membrana plasmática.

Pesquisa desenvolvida por Siqueira et al. (2011) exibiu alterações semelhantes as encontradas nesse estudo usando o óleo essencial obtido das folhas de *Annona coriacea in vitro* (CI_{50} /24 horas de 39,33 $\mu\text{g}/\text{mL}$), nas formas promastigotes de *Leishmania* (L.) *chagasi*, *Leishmania* (L.) *amazonensis*, *Leishmania* (L.) *major* e *Leishmania* (V.) *braziliensis*.

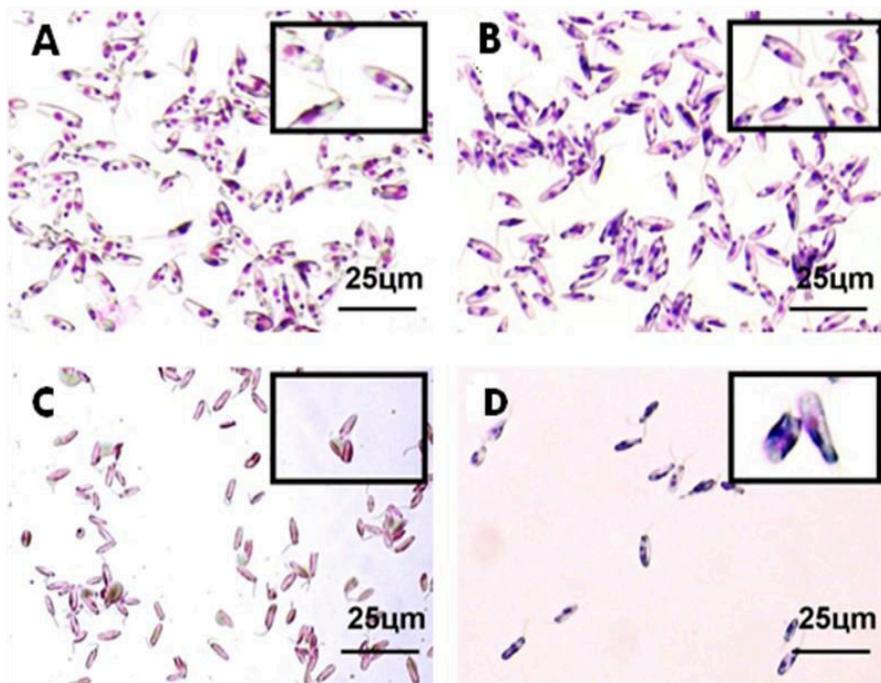


Figura 29. Imagens a partir de microscopia de luz dos promastigotas de *Leishmania* (L.) *chagasi*. Nas Figuras (A e B) vê-se promastigotas em cultivo axênico (viabilidade de 100%). Nas Figuras (C e D) têm-se formas promastigotas tratadas com 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de OE de *Cymbopogon citratus* e 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Citral. A coloração utilizada foi “Panótipo Rápido LB” (Laborclin, Pinhais, Paraná, Brasil).

5.7 Avaliação da permeabilidade de membrana celular em promastigota de *Leishmania (L.) chagasi* pelo Citral

Para avaliar a permeabilidade da membrana celular em promastigotas de *Leishmania (L.) chagasi*, o Citral foi selecionado por ser um componente puro e a purificação de compostos ativos pode resultar em um aumento considerável da sua atividade, já o óleo essencial é uma mistura complexa em estado natural. A figura 30 mostrou que ocorreu significativa alteração na permeabilidade da membrana do promastigota em presença do Citral, podendo essa interação ter promovido a formação de poros na membrana celular do parasita e o conseqüente extravasamento de substâncias intracelular acarretando, provavelmente, a morte dele.

O mecanismo pode ter sido pela ligação do Citral ao ergosterol da membrana celular da *Leishmania (L.) chagasi* levando a alteração na permeabilidade celular, em anuência com estudos realizados com o fármaco sintético anti-*Leishmania* Anfotericina B por Saha et al. (1986), Olliaro; Bryceson, 1993 e Urbina, 1997 que notaram ser o mecanismo do fármaco citado decorrente de sua ligação ao ergosterol que resultou em alteração da permeabilidade de membrana celular e do equilíbrio osmótico do parasita.

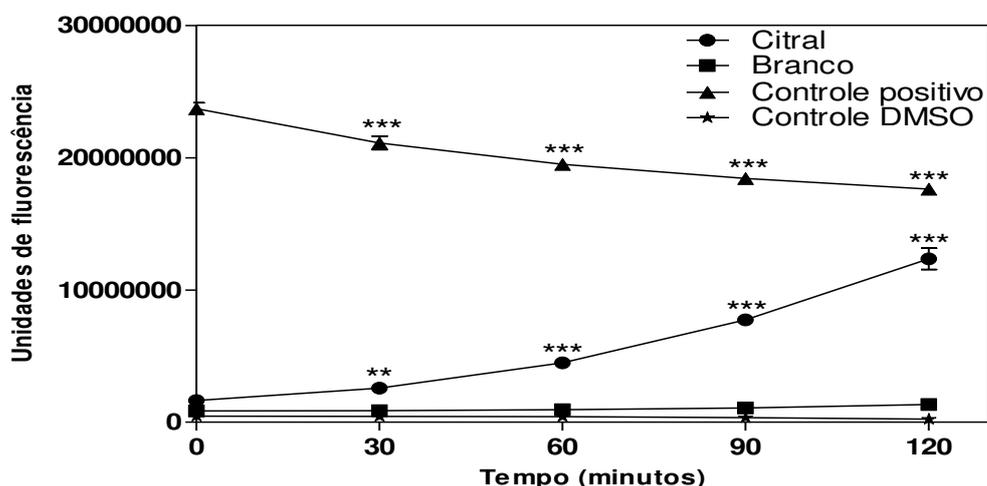


Figura 30. Fluorescência Sytox Green da *Leishmania (L.) chagasi*. Promastigotas (1×10^6 /poço) foram tratadas com Citral ($30 \mu\text{g/mL}$), branco (*Leishmania (L.) chagasi* em meio de cultivo), DMSO (controle negativo) ou Triton X-100. (controle positivo). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado ao controle (DMSO) (teste de variância ANOVA duas vias, seguido pelo teste de Tukey).

6 Conclusão

Os dados evidenciados no presente trabalho permite sugerir que o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral:

- apresentam ação contra as formas promastigotas de *Leishmania* (L.) *chagasi*. No entanto, não foi verificada atividade sobre as formas amastigotas intracelulares;
- expressam atividade citotóxica em macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c;
- não formam nitrito em macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c;
- produzem alterações na morfologia externa nas formas promastigotas da *Leishmania* (L.) *chagasi*, notadamente nos flagelo que em algumas formas não foram observados e em outras existiam dois, bem como aumento do volume celular seguida por ruptura da membrana plasmática;
- Citral forma poros na membrana celular das formas promastigotas, sugerindo que o mecanismo de ação pode ser por alteração de permeabilidade de membrana celular e do equilíbrio osmótico levando a morte do parasita.

7 Propostas para trabalhos futuros

Na busca por um fármaco que possa ser eficaz contra a leishmaniose visceral e com efeitos colaterais minimizados para o usuário apresentamos algumas sugestões:

Pesquisar estratégias que permitam usar o Citral no controle das formas promastigotas no vetor *Lutzomyia longipalpis*, na tentativa de minimizar a infecção do homem e outros animais tais como os cães em Sergipe;

Realizar estudos pré-clínico em camundongos BALB/c, bem como em outros animais susceptíveis a leishmaniose visceral, empregando uma formulação, a exemplo emulsão apartir do Citral, com a meta de observar a possibilidade de usá-la como um novo medicamento preventivo em áreas consideradas endêmicas para leishmaniose visceral como Aracaju.

Referências

ADAMS, R.P. Identification of essential oils components by gás chromatography/mass spectroscopy. **Carol Stream: Allured Publishing Corporation**, 2007.

AHUA, K. M. et al. Antileishmanial activities associated with plants used in the Malian traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 99-104, 2007.

ALBAGLI, S. Amazônia: fronteira geopolítica da biodiversidade. **Revista Parcerias Estratégicas**, v. 12, p. 5-19, 2001.

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

ALMEIDA, R. B. G. et al. Atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus* (DC.) stapf sobre *Candida* spp. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 37, n.2, p. 147-153, 2008.

ALVES, H. M. A. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, v 8. n 3, p. 10-15, 2001.

ALVES, T. M. A. et al. Biological screening of brasizilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n.3, p. 367-373, 2000.

AMATO, V. S. et al. Use of Itraconazole in the treatment of mucocutaneous Leishmaniasis: A pilot study. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 4, n.3, p. 153-157, 2000.

AMATO, V. S. et al. Mucosal leishmaniasis current scenario prospects for treatment. **Acta Tropica**, v. 105. p. 1-9, 1, 2008.

AMOROZO, M. C. M. Uso e Diversidade de Plantas Medicinais em Santo Antônio do Leverger, MT, Brasil, **Acta Botânica Brasileira**, v. 16, n. 2, p. 189-103, 2002.

ANTONORIS, S. et al. Leishmaniasis among organ transplant recipients. **The Lancey Infections Diseases**, v. 8, p. 191-199, 2008.

ARAUJO, M. S. S. et al. Immunological changes in canine peripheral blood leukocytes triggered by immunization with first or second generation vaccines against canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 141 p. 64-75, 2011.

ASHUTOSH, A. SUNDAR, S.; GOYAL, N. Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56. p. 143-153, 2007.

AVATO, P. et al. Glandular Hair and Essential oils in micropopagated plants of *Salvia officinalis* L., **Plant Science**, v. 23 n.169. p. 29-36, 2005.

AZEVEDO, A. C. et al. Studies on the Sandflex fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from transmission areas of American cutaneous leishmaniasis in State of Acre, Brazil. In: **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 8, p. 760-769, 2008.

BADARÓ R. et al. Treatment of visceral leishmaniasis with pentavalent antimony and interferon gamma. **New England Journal Medicine**, v. 322, p.16-21, 1990.

BAILEY, M. S. Cutaneous leishmaniasis. In: **Lockwood DN Clin. Dermatol**, v. 25, p. 203-211, 2007.

BANETH, G., AROCH, I. Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. **Veterinary Journal**, v.17, p. 14-15, 2008.

BARATA, R. A. et al Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 5, p. 421-425, 2005.

BARATA, L. E. S.; QUADROS, C. R. New essential oils from Brazilian biodiversity: Science and Markets. The rosewood experiment, Centifolia, 6th Int. **Congress on Perfumery and Natural raw material**, França, 2006.

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

BARATTA, M. T. et al. Chemical Composition, antimicrobial and oxidative activity of laurel, Sage, Rosemary, oregano an coriander essential oils, **Journal of essential oils**, v. 10, p. 618-627, 1998a.

BARBOSA, L. C. A. et al. Evaluation of the chemical composition of Brazilian commercial *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf samples. **Molecules**, v. 13, n.8, p. 1864-74, Fev. 2008.

BATES, P.A. *Leishmania* sand fly interaction: progress and challenges. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, p. 340-344, 2008.

BEHBOUD, J. et al. Antibacterial Activities of Lemon Grass Methanol Extract and Essence on Pathogenic Bacteria. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science**, v. 12, n. 8, p. 1042-1046, 2012

BIDINOTO, L. T. **EFEITOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon citratus* STAPF (CAPIM-LIMÃO) SOBRE O PROCESSO DE CARCINOGENESE QUÍMICA EM FÊMEAS BALB/C**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, São Paulo/Botucatu, 2009. 246p.

BOGDAN C, ROLLINGHOFF M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p.121-34, 1998.

BLANCHETTE, J., JARAMILLO, M., OLIVIER, M. Signalling events involved in interferon-gamma inducible macrophage nitric oxide generation. **Immunology**, v. 108, p. 513-522, April. 2003.

BRASIL, 1993. Lei nº. 8689, de 27 de julho de 1993. **Dispõe sobre a extinção do Instituto Nacional de Assistência Médica da Previdência Social (INAMPS) e dá outras providências**. Brasília, DF: Senado, 1993.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Editora, 2003. p. 120.

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária da Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle de leishmaniose visceral/ Ministério da Saúde**, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde 120p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos), 2006a.

BRAZ FILHO, R. CONTRIBUIÇÃO DA FITOQUÍMICA PARA O DESENVOLVIMENTO DE UM PAÍS EMERGENTE. **Química Nova**, v. 33, n.1, p. 229-234, 2010.

BRINDLE, J. et al. Activities of several classes of aromatic dications. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 3, p. 797-807, 2002.

BRITO, A. M. G. B. Avaliação da atividade anti-*Leishmania* dos óleos essenciais obtidos das plantas *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., *Eucalyptus citriodora* Hook., *Mentha arvensis* L., e *Mentha piperita* L. **Anais do XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil e X Internacional Congress of Ethnopharmacology São Paulo**. Setembro de 2008.

BRITO, R. G. et al. Citronellol, a monoterpene alcohol, reduces nociceptive and inflammatory activities in rodents. **Journal of Natural Medicines**, v. 66, n. 4, p. 637-44, 2012.

BRUNETON, J. How to pack the essential oils. In: BRUNETON, **Journal 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. 94p.

CAMARGO, L. B.; LANGONI, H. Impact of Leishmaniasis on Public Health, **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 12, n. 4, p. 527-548, 2006.

CAMARGO-NEVES, V. L. F.; SANTUCCI, S. G. **Leishmaniose Visceral Americana**. Superintendência de Controle de Endemias SUCEN, Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria de Saúde do Estado São Paulo, 2000-2001. Disponível em: <http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/leish_visvc/texto_leish_visvc_pro.htm> Acesso em 23 maio, 2011.

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

CARVALHO, M. R. **Eco-epidemiologia da leishmaniose visceral americana na zona da mata norte de Pernambuco**. Dissertação. Recife: Programa de Pós-graduação em Saude Publica da Fundação Oswaldo Cruz, 2005. 86p.

CARVALHO, A. C. B. **Plantas medicinais e Fitoterápicas: regulamentação Sanitária e proposta de modelo de Monografias para espécies vegetais oficializadas no Brasil**. Dissertação. Brasília – DF: Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde de Brasília – DF, 2011. 175p.

CARVALHO, V. M. et al. Uso e cultivo de plantas medicinais em residências de cidades do norte do Estado do Paraná. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA**, 45, 2005, Fortaleza Anais... Fortaleza: CBO/SOB, 2005.

CECHINEL FILHO, V. C.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n.1, p. 99-105, 1998.

CHAI, Y. et al. Complexation of antimony (Sb-V) with guanosine 5'-monophosphate and guanosine 5'-diphospho-Dmannose: formation of both mono- and bis- adducts. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 99, p. 2257-2263, 2005.

CHAN-BACAB, M. J.; PENA-RODRÍGUEZ, L. M. Plant natural products with leishmanial activity. **The Royal Society of Chemistry**, v. 18, p. 674-688, 2001.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 5, p. 873-882, Nov. 2007.

CHEEL, J. et al. Free radical scavengers and antioxidants from lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 7, p. 2511-2517, 2005.

CHOUDHURY, K. et al. Identification of a *Leishmania infantum* gene mediating resistance to miltefosina an Sb^{III}. **International Journal for Parasitology**. doi: 10.1016/j.ijpara. 2008. 03. 005, 2008.

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

COHEN, B. E. Amphotericin B toxicity and lethality: a tale of two channels. **International Journal of Pharmaceutics**, v.162, p. 195, 1998.

CONNOR, M. J. Modulation of tumor promotion in mouse skin by the food additive citral (3, 7-dimethyl-2,6-octadienal). **Cancer Lett**, v. 56, n.1, p. 25–28, 1991.

COOMBS, G.H. Leishmaniasis—current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends Parasitol**, v. 19, p. 502–508, 2003.

CORRÊA, P. C. et al. Modelo matemático para representação da hidrosolubilidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v. 27, n. 1, p. 45-51, 2002.

COSTA, L. C. B. et al. Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de capim-limão. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 4, p. 01-08, 2005.

CROFT, S. L. The current status of antiparasite chemotherapy. **Parasitology**, v. 114 (Supl:S), p. 3-15, 1997.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB. Drug resistance in leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n.1, p. 111-126, 2006.

CROFT, S. L.; COOMBS, C. H. Leishmaniasis – current Chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, v. 1, n. 18, p. 502-508, 2003.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Pathology**, v. 72, n. 2, p. 132-141, 2002.

DEPARTAMENTO DE INFORMÁTICA DO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE - **DATASUS**, Disponível em: <http://w3.datasus.gov.br/datasus/datasus.php>. Consulta em 18/012/2012

DE LA CRUZ, M. G. F. **Plantas Medicinais Utilizadas por Raizeiros: uma abordagem etnobotânica no contexto da saúde e doença**. Dissertação de Mestrado, ISC/UFMT, Mato Grosso, MT, Brasil, 1997. 96p.

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

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**, v. 20, n. 2, p. 15-26, 2007.

DAVIS, A. J.; MURRAY, H. W.; HADMAN, E. Drugs against leishmaniasis: a synergy of technology and partnerships. **Trends Parasitol**, v. 20, n. 2, p. 73-76, 2004.

DESJEUX P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, p. 239-43, 2001.

DIAS, F. O. P.; LOROSA, E. S.; REBELO, J. M. M. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). **Caderno de Saúde Pública**, v.19, n. 5, p.1373-80, 2003.

DOGRA, J.; SAXENA, V. N. Itraconazole and leishmaniasis: a randomized double-blind trial in cutaneous disease. **International Journal for Parasitology**, v. 26 n.12, p.1413-1415, 1996.

DILIBERTO, J. J. et al. Metabolism of citral, an alpha,beta-unsaturated aldehyde, in male F344 rats. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 18, n. 6, p. 866-875, 1990

DUERKSEN-HUGHES, P. J.; YANG, J.; OZCAN, O. P53 induction as a genotoxic test for twenty-five chemicals undergoing *in vivo* carcinogenicity testing. **Environ Health Perspect**, v, 107, n.10, p. 805-812, 1999.

DUDAI, N. et al. Citral is a new inducer of caspase-3 in tumor cell lines. **Planta Med**, v. 71, n. 5, p. 484-488, 2005.

ESPINOLA, L. C. Cerrado: Fonte de descoberta de novos medicamentos. **Brasília Médica**, v. 44, p. 193-198, 2007.

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

Ferreira, J. L. P. et al. **Diferenciação micrográfica entre três espécies de “erva cidreira”**, *II Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, Belo Horizonte (MG): 18, 1999.*

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

FERREIRA, T. M. et al. Atividade antifúngica do citral em leveduras do gênero *Candida* isoladas de pacientes hospitalizados. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, n.1, p. 118-125, 2009.

FERREIRA, M. S. C, FONTELLES, M. C. **Anais do III Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental**, 287, Set. 1985.

FIGUEIREDO, F. B. et al. Leishmaniose tegumentar americana em felino doméstico no município do Rio de Janeiro, Brasil – Relato de caso. **Revista de Clínica Veterinária**, v. 74, p. 58-60, 2008.

FIORI, A. C. G. et al. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. **Journal Phytopathology**, v. 148, p. 483-487, 2000.

FOURNET, A. et al. *In vitro* and *in vivo* leishmanicidal studies of *Peperomia galioides* (Piperaceae). **Phytomedicine**, v. 3, p. 271-275, 1996.

FREITAS, T. P. T. et al. **A ecoepidemiologia das leishmanioses: levantamento de flebotomíneos em Cuiabá e investigação quanto a participação de roedores e marsupiais em Rondonópolis, Mato grosso**. Dissertação de Mestrado. Cuiabá: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso, 2010. 98p.

FUMAROLA, L.; SPINELLI, R.; BRANDONISIO, O. *In vitro* assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. **Research in Microbiology**, v. 155, n.4, p. 224-30, 2004.

GACHET, M. S. Assessment of anti-protozoal activity of plants traditionally used in Ecuador in the treatment of leishmaniasis. In: **Journal Ethnopharmacol**, v. 128, n.1, 184-187, 2010.

GAVGANI, A. et al. Domestic dog ownership in Iran is a risk factor for human infection with *Leishmania infantum*. **American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 67, n. 5, p. 511-515, 2002.

GIEMSA, G. Farbenmethoden für Malariaparasiten. **Zentralblatt Bakteriologie**, v. 1, n. 31, p. 307-313, 1902.

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

GIFFONI, J. H.; ALMEIDA, C. E.; SANTOS, S. O. Evaluation of 65% permethrin spot-on for prevention of canine visceral leishmaniasis: effect on disease prevalence and the vectors (Diptera: Psychodidae) in a hyperendemic area. **Veterinary Journal**, v. 3, 4, p. 485-492, 2002.

GIL, S.; PAULA, J. R.; NASCIMENTO, F. R. F.; BEZERRA, J. C. B. Natural products with leishmanicide potential. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl**, v. 29, 3, p. 223-230, 2008.

GOMES-CARNEIRO, M. R.; FELZENSZWALB, I.; PAUMGARTTEN, F. J. Mutagenicity testing (+/-)-camphor, 1, 8-cineole, citral, citronellal, (-)-menthol and terpineol with the Salmonella/microsome assay. **Mutat Res**, v. 416, n. 1-2, p. 129-136, July. 1998.

GONZÁLEZ U. et al. Interventions for Old World cutaneous leishmaniasis (Review). **The Cochrane Library**, Issue 4. 2008.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite and [15 N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126. p. 131-138, mar.1982.

GUIMARÃES E. L. **Perfil socioeconômico do paciente de leishmaniose visceral, em Campo Grande, MS, Brasil**. Monografia. Campo Grande: Escola de Saude Publica de Mato Grosso do Sul, 2008. 96p.

HAILU, A. et al. Visceral Leishmaniasis. In: **New Health Tools Are needed**, v. 2, n. 7 p. 211: 0590-0594, 2005.

HEIMERDINGER, A. **Extrato alcoólico de capim-cidreira (*Cymbopogon citratus*) no controle do carrapato (*Boophilus microplus*) de bovinos leiteiros**. Dissertação. Universidade Federal de Santa Maria – UFSM. Santa Maria, RS – Brasil. 2005. 64p.

HOSTETTMANN, K.; QUIEROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. Princípios de plantas superiores, São Carlos: **EdUFSCar**, v. 1, p. 9-13, 2003.

HUMBERG, R. M. P. ***Leishmania* sp. em animais silvestres de cativeiro e de vida livre**. Dissertação. Campo Grande: Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2009. 98p.

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

IERSEL, M. L. Inhibition of glutathione S-transferase activity in human melanoma cells by α , β -unsaturated carbonyl derivatives. Effects of acrolein, cinnamaldehyde, citral, crotonaldehyde, curcumin, ethacrynic acid, and trans-2-hexenal. **Chem Biol Interact**, v. 102, n. 2, p. 117-132, 1996.

JARVIS, E. K.; RUTLEDGE, L. C. Laboratory observations on mating and leklike aggregations in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 29, p. 171-177, 1992.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **Trends in Parasitology**, v. 22, 9, p. 439-445, 2006.

KILLINCK-KENDRICK, R.; MAROLI, M.; KELLICK-KENDRICK, M. Bibliography on the colonization of Phlebotomine sand flies. **Parasitologia**, v. 33, p. 321-333, 1991. KIMA, P. E. The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. **International Journal for Parasitology**, v. 37, p. 1087-1096, 2007.

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

KOLB, N. et al. **Evaluación de la aptitud del espartillo para su explotación comercial. Universidad Nacional de Misiones, 2007.** Disponível em: <http://www.unam.edu.ar/index.php?option=comcontent&tark=view&id=243&Itemid=123>. Acesso em: 10 de set de 2010.

KOSHIMA, F. A. T.; MING, L. C.; MARQUES, M. O. M. Produção de Biomassa, Rendimento de Óleo Essencial e de Citral em Capim-limão, *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf, com Cobertura Morta nas Estações do Ano. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 4, n. 8, p. 112-116, 2006.

KOSSUNGA, M. H. **Metabólitos Secundários Bioativos de Invertebrados Marinhos: Isolamento, Determinação Estrutural e Atividades Biológicas.** Dissertação. São Paulo. Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo – USP, 2008. 98p.

KOTHAR, H. et al. Possibility of membrane modification as a mechanism of antimony resistance in *Leishmania donovani*. **Parasitol International**, v. 56. p. 7-89, 2007.

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

KULKARNI, M. M. et al. Antimicrobial peptide-induced apoptotic death of *Leishmania* results from calcium-dependent, caspase-independent mitochondrial toxicity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 15496-15504, 2009.

KHARAZMI, A. et al. T-cell response in human leishmaniasis. **Immunology Letters**, v. 65, p.105-108, 1999.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 811-827, 2005.

LAM, L. K. T.; Zheng, B. Effects of essential oils on glutathione S-transferase activity in mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n. 4, p. 660-662, 1991.

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.

LEE, H J. Inhibitory effect of citral on NO production by suppression of iNOS expression and NF- κ B activation in RAW264.7 cells. **Archives of Pharmacal Research**, v. 31, n. 3, p. 342-349, 2008.

MACHADO, M. et al. Activity of essential oils on the growth of *Leishmania infantum* promastigotes. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, p. 156-160, May/June. 2010.

MAHMOUD, A. L. E. Antifungal action and antiaflatoxigenic properties of some essential oil constituents. **Letters in Applied Microbiology**. Oxford, v. 19, p. 110-113, 1994.

MAIA – ELKHOURY, A. N. S. et al. Visceral leishmaniasis in Brazil: Trends and challenges. **Caderno de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 1498-1507, 2008.

MAIA, J. G. S.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A. **Plantas Aromáticas na Amazônia e seus Óleos Essenciais**, Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 2001.

MALAFAI, G. Captação de ferro pelos parasitos do gênero *Leishmania*. **Revista Biociência**. UNITAU, v. 14, n. 1, p. 4, 2008.

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

MALA N, MAHAJAN RC. Pathophysiology of visceral leishmaniasis: some recent concepts. **Indian J Med Res**, v. 123, p. 267-74. 2006

MALTEZOU, H. C. Drug Resistance in *Visceral Leishmanias* In: **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 18, p. 1-8, 2010.

MARCHESE, R. M. **Atividade de constituintes micromoleculares de *Renalmia alpinia* (Rottb) Maas (Zingiberaceae) sobre *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi***. Dissertação de mestrado, programa de Pós-Graduação em Ciência da Saúde da Universidade de Brasília (UNB), Brasília, Distrito Federal, Brasil, 2009. 96p.

MARCONDES, C. B. **Entomologia Medica e Veterinária**. São Paulo: Atheneu. p. 13-30, 2005.

MAROLI, M. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v.145, n. 3-4, p. 357-60, 2007.

MARTINEZ, F. O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: An immunologic functional perspective. **Annual Reviews of Immunology**, v. 27, p. 451-483, 2009.

MARTINS, E. R. **Plantas Mediciniais**. Viçosa: UFV, 2000, 200 p.

MARUYAMA, N. Suppression of neutrophil accumulation in mice by cutaneous application of geranium essential oil, **J. Inflamm**, v. 2, n. 1, p. 34-39, Jun. 2005.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F.; SCHUBACH, A. O. Leishmaniose visceral americana. In: CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. **Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais**. 2. Ed. São Paulo. Ed. Atheneu, 2008. p. 65-78.

MAURICIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, v. 16, p. 188–189, 2000.

MEEVATEE, U. Antimutagenic activity of lemon grass. In: Boontim S, editor. Man and Environment. **Chiang Mai University Press**, p. 346, 1993.

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

MELO, S .F. Effect of the *Cymbopogon citratus*, *Maytenus ilicifolia* and *Baccharis genistelloides* extracts against the stannous chloride oxidative damage in *Escherichia coli*. **Mutation Research**, v. 496, n. 1-2, p. 33-38, 2001.

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

MONTEIRO, E. M. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 38, n. 2, p. 47-52, 2005.

MORAIS, S. M. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de Croton do nordeste do Brasil, **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.

MOREIRA JUNIOR, E. D. et al. Peridomestic risk factors for canine leishmaniasis in urban dwellings: new findings from a prospective study in Brazil. **American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 69, n. 4, p. 393-7, 2003.

MOREIRA, F. V. Chemical composition and cardiovascular effects induced by the essential oil of *Cymbopogon citratus* DC. Stapf, Poaceae, in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 904-909, 2010.

MORENO, E. C. Risk factors for *Leishmania chagasi* infection in an urban area of Minas Gerais State. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 6, p. 456-63, 2005.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunological Methods**, v 65, p. 55-63, 1983.

MUKHERJEE, A. et al. Roles for mitochondria in pentamidine susceptibility and resistance in *Leishmania donovani*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 145, p.1-10, 2006.

MURRAY, H. W. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, p.1561-1577, 2005.

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

NAKAMURA, Y. A phase II detoxification enzyme inducer from lemongrass: identification of citral and involvement of electrophilic reaction in the enzyme induction. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 302, n. 3, p. 593-600, 2003.

NASCIMENTO, I. B. Efeito do horário de corte no óleo essencial de capim-santo. **Revista Ciência Agronômica**, v. 34, n. 2, p. 169-172, 2003.

NEGRE, E. et al. Antileishmanial drug targeting through glycosylated polymers specifically internalized by macrophage membrane lectins. **Antimicrobial Agents Chemother**, v. 36, n.10, p. 2228-2232, 1992.

NEITZKE, H. C. Research of natural infection of phlebotomines for *Leishmania*, in the State of Paraná. In: **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n.1 p. 17-22, 2008.

NERIO, L. S.; VERBEL, J. O.; STASHENKO, E. Repellent activity of essential oils: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 372-378, 2010.

NEUBER, H. Leishmaniasis. **Journal Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v.6, p. 754-765, 2008.

OLLIARO, P.L.; BRYCESON, A.D.M. Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. **Parasitology Today**, v. 9, p. 323-328, 1993.

OLIVEIRA, M. M. M. et al. Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon* **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. Botucatu**, v.13, n.1, p.8-16, 2011.

OLIVEIRA, R. A. G. et al. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n.1, p. 77-82, 2006.

OLIVEIRA, V. C. et al. Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham., and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes. **Parasitology Research**, v. 104, p. 1053-1059, 2009.

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

ONAWUNMI, G. O.; YISAK, W. A.; OGUNLANA, E. O. Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. **Journal Ethnopharmacol**, v. 12, p. 279-286, 1984.

ORDONEZ – GUTIÉRREZ, L. et al. *In vitro* effect of new formulation of amphotericin B on amastigote and promastigote from of *Leishmania infantum*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, p. 325-329, 2007.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE SALUD OPAS. **El Control de las Enfermedades Transmisibles en el Hombre**. Publicación Científica n.507. 14. ed. Washington, E.U.A. 1987.

OSÓRIO, E. et al. Antiprotozoal and cytotoxic activities *in vitro* of Colombian Annonaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 111, p. 630-635, 2007.

OUELLETTE M; DRUMMELSMITH J; PAPADOPOULOU B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resist Updat**, v. 7, n. 4-5, p. 257-266, 2004.

PALUMBO, E. Oral miltefosine treatment in children with visceral leishmaniasis: a brief review. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p. 2-4, 2008.

PANARO, M. A. et al. Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in *Leishmania infantum* – infected human macrophages simulated with interferon – gamma and bacterial lipopolysacchar. **International Journal of Clinical & Laboratory Research**, v. 29, n. 3, p.122-127, 1999.

PEREIRA, R. P. et al. Antioxidant effects of different extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*. **Neurochemical Research**, v. 34, n. 5, p. 973-983, 2008.

PILLA, M. A. C.; AMOROZO, M. C. de M.; FURLAN, A. Obtenção e uso das plantas medicinais no distrito de Martim Francisco, Município de Mogi Mirim, SP, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, v. 20, p. 789-802, 2006.

PINTO, P. S. Phylogenetic relationships among species of *Lutzomyia*, subgenus *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 47, n. 1, p. 16-21, 2010.

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

PUATANACHOKCHAI, R. Inhibitory effects of lemon grass (*Cymbopogon citratus*, Stapf) extract on the early phase of hepatocarcinogenesis after initiation with ethylnitrosamine in male Fischer 344 rats. **Cancer Letters**, v. 183, p. 9-15, 2002.

QUINTANS-JUNIOR, L. J. et al. Citral reduces nociceptive and inflammatory response in rodents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 3, 2011.

RABBANI, S. I. et al. Citral, a component of lemongrass oil inhibits the clastogenic effect of nickel chloride in mouse micronucleus test system. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 19, n. 2, p. 108-113, 2006.

RABINOVITCH, M. et al. Leishmanicidal activity of amino acid and peptide esters: an update. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83 (Supl1), p. 378-382, 1989.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 4 ed. Rio de Janeiro, RJ. Guanabara Koogan, 2001. 703p.

RATH, S. et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: Estado da arte. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

RESS, N. B. et al. Toxicology and carcinogenesis studies of microencapsulated citral in rats and mice. **Toxicological Sciences** v. 71, n. 2, p. 198–206, 2003.

REY, L. **Parasitologia**. Rio de Janeiro: 4. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

RIOUX, J. A. et al. 1990. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, Paris, v. 65, p.111–125, Jun. 1990.

ROCHA, L. G. et al. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine**, v. 12, p. 514-535, 2005.

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. 88p.

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

ROGERS, M. E. et al. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. **Nature**, v. 430, n. 6998, p. 463-467, 2004.

ROMERO, G. A. S.; BOELAERT, M. Control of Visceral Leishmaniasis in Latin America – A Systematic Review. In: **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 1, p. e584, 2010.

SAHA, A.K; MUKHERJEE, J; BHADURI, A. Mechanism of action of amphotericin B on *Leishmania donovani* promastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 19, p. 195-200, 1986.

SANGWAN, N.K. Nematicidal Activity of some essential plant oils, Pestic. **SCI**, v. 28, p. 331-335, 1990.

SANTIN, M. R. et al. In vitro activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* and its major component (citral) on *Leishmania amazonensis*. **Parasitology Research**, v. 105, p. 1489-1496, 2009.

SANTORO, G. F. et al. *Trypanosoma cruzi*: activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 116, p. 283-290, 2007.

SARTORELLI, P. et al. Isolation of Antileishmanial Sterol from the Fruits of *Cássia fistula* using Bioguided Fractionation. **Phytotherapy Research**, v. 21, n.7, p. 644-647, 2007.

SEMEN, E.; HIZIROGLU. Production, Yield and Derivatives of Volatile Oils from Eastern Redcedar (*Jeniperus virginiana* L.), **American Journal Environmental Sciences**, v. 1, n. 2, p. 133-138, 2005.

SEO, K. A. The monoterpenoids citral and geraniol are moderate inhibitors of CYP2B6 hydroxylase activity. **Chemico-Biological Interactions**, v. 174, n. 3, p. 141–146, 2008.

SERRANO, A. C. M. et al. Leishmaniose em felino na zona urbana de Araçatuba, SP – Relato de caso. **Revista Clínica Veterinária**, v. 76, p. 36-40, 2008.

SILVA, E. A.; ANDREOTTI, R.; HONER, M. R. Comportamento de *Lutzomyia longipalpis*, vetor principal da leishmaniose visceral americana, em Campo Grande,

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

Estado do Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v. 40, n.4, p. 420-425, 2007.

SILVA, M. R. Comparative anticonvulsant activities of the essential oils (EOs) from *Cymbopogon winterianus* Jowitt and *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 381, p. 415-426, 2010.

SILVA, F. M.; DE PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S. Evaluation of the antifungal potential of Brazilian Cerrado medicinal plants. **Mycoses**, v. 52, Issue 6, p. 511–517, 2009

SILVA, M. A. L. et al. Avaliação da composição química de *Cymbopogon citratus* Stapf cultivado em ambientes com diferentes níveis de poluição e a influência na composição do chá, **Maringá**, v. 32, n. 1, p. 67-72, 2010.

SING, U. K. et al. Miltefosine in children with visceral leishmaniasis a prospective, multicentric, cross-sectional study. In: **Pediatric**, v. 73, n.12, p.1077-1080, 2006.

SIMÕES, CM.; SPITZER, V. Óleos essenciais. In: SIMÕES, C. M. O., SCHENCKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P. **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 1999. p. 387-415.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed.Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora UFSC, 2003. p. 496-510.

SIMÕES, C. M. O. SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. Ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2003. p. 467-495.

SING, S.; SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v.10, p. 310-315, 2004.

SOUSA, F. C. F. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 642-654, 2008.

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

SOUZA, A. I. et al. Domestic feline cutaneous leishmaniasis in the municipality of Ribas do Rio Pardo, Mato Grosso do Sul, State, Brazil: A case report. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, . 15, n. 2, p. 359-65, 2009.

SOUZA, N. P. et al. *Leishmania* (Leishmania) *infantum chagasi* em canídeos silvestres mantidos em cativeiro, no Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, 3, p. 333-335, 2010.

SOUZA, M. V. N. Produtos naturais em fase avançada de testes clínicos no tratamento contra câncer. **Revista Fitos**, v. 3, n. 2, p. 25-42, 2007.

STAFFORD JL, NEUMANN NF. BELOSEVIC M. Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, p.187-248, 2002.

STAUBER, L.A.; FRANCHINO, E.M.; GRUN, J. An eight-day method for screening compounds against *Leishmania donovani* in Golden hamsters. **Journal Protozoology**, v. 5, p. 263-273, 1958.

SUAHEYUN, R. Inhibitory effects of lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf) on formation of azoxymethane-induced DNA adducts and aberrant crypt foci in the rat colon. **Carcinogenesis**, v. 18, p. 949-55, 1997.

TADA, H. et al. An improved colorimetric assay for interleukin 2. **Journal of Immunological Methods**, v. 93, p. 157-165, 1986.

TAPIA, A. Free radical scavengers from *Cymbopogon citratus* (DC.) STAPF plants cultivated in bioreactors by the temporary immersion (TIS) principle. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 62, n. 5-6, p. 447-57, 2007.

TEMPONE, A. G, MARTINS DE OLIVEIRA, C.; BERLINCK, R. G. Current Approaches to Discover Marine Antileishmanial Natural products. **Planta Medicinal** 77(6): 572-585, 2011

TEMPONE, A. G. et al. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. **Phytomedicine**, v. 12, p. 382-390, 2005.

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

TEMPONE, A. G. et al. Antileishmanial and antitrypanosomal activity of bufadienolides isolated from the toad *Rhinella jimi* parotoid macrogland secretion, **Toxicon**, 52, p. 13-21, 2008.

TORSSELL, K. B. G. **Natural product chemistry: a mechanistic and biosynthetic approach to secondary metabolism**. Norwich: John Wiley & Sons. 401 p.1983.

URBINA, J. Lipid biosynthesis pathway as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. **Parasitology**, v. 114, p. S91-S99, 1997.

VALE, T. G. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. **Phytomedicine**, v. 9, p. 709-714, 2002.

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

VIANA, G. S. B. Antinocicetive effect of the essential oil from *Cymbopogon citratus* in mice, **Journal Ethnopharmacol**, v. 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**, v. 32, n. 1, p. 89-91, 2006.

VIEGAS, C. J.; BOLZANE, V. S.; BARREIRO, E. J. Os Produtos Naturais e a Quimica Medicinal Moderna, **Quimica Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VINITKETKUMNUEN, U. Antimutagenicity of lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf) to various known mutagens in salmonella mutation assay. **Mutation Research**, v. 341, n. 1, p. 71-75, 1994.

WALKER, J. T.; MELIN, J. B. *Mentha x piperita*, *Mentha spicata* and effects of their essential oils on *Meloidogyne* in soil. **Journal of Nematology**, v. 28, p. 629-635, 1996.

WATANABE, C. H. Extração do óleo essencial de menta (*Mentha arvensis* L.) por destilação por arraste a vapor e extração com etanol, **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 4, p. 76-86, 2006.

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

WOOLF, A. Essential Oil Poisoning, **Journal of Toxicology-clinical Toxicology**, v. 37, p. 721-727, 1999.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Pharmaceutics and phytotherapics: The need for development of the industry of phytopharmaceutics and phytotherapics in Brazil, **Quimica Nova**, v. 24, p. 147-152, 2001.

Referências citadas conforme normas da Associação Brasileira de Normas e Técnicas (ABNT).

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

ANEXOS

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

Anexo 1. Liberação do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP-UNIT.

Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa

Título do Projeto: Óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf., e seu composto majoritário citral, uma possibilidade de tratamento contra leishmaniose visceral.		
Pesquisador Responsável Ana Maria Guedes de Brito		
Data da Versão 16/06/2011	Cadastro 060511R	Data do Parecer 17/06/2011
Grupo e Área Temática III - Projeto fora das áreas temáticas especiais		

Objetivos do Projeto
Objetivo geral
 Avaliar a atividade do óleo essencial obtido das folhas frescas da planta *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., e sua fração majoritária citral como uma alternativa terapêutica para leishmaniose visceral.

Objetivos específicos:

- Coletar o material botânico;
- Extrair o óleo essencial a partir do material botânico coletado e adquirir o citral
- Identificar e quantificar os compostos químicos do óleo essencial obtido e do citral;
- Determinar seus respectivos rendimentos;
- Realizar os ensaios in vivo do óleo essencial e citral contra a forma amastigota intracelular de *Leishmania* (L.) chagasi;
- Delimitar os valores das concentrações 50% (CE50) do óleo essencial e citral contra a forma amastigota de *Leishmania* (L.) chagasi;
- Testar a citotoxicidade do óleo essencial e citral em célula de mamífero;
- Determinar a produção de óxido nítrico pelo óleo essencial e citral em célula de mamífero;
- Avaliar a atividade hemolítica do óleo essencial e citral em eritrócito de BALB/c;
- Diagnosticar alterações na promastigota de *Leishmania* (L.) chagasi desenvolvidas em presença do óleo essencial e citral por microscopia eletrônica;
- Averiguar as possíveis formas de incorporação dos óleos essenciais na preparação de um novo fitoterápico e testar sua dissolução em diferentes meios.

Sumário do Projeto
 Os óleos essenciais são resultantes do metabolismo secundário das plantas aromáticas. Estudos científicos provaram que o óleo essencial da planta *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., bem como seu composto majoritário citral (DC.) são importantes matérias-primas industriais, utilizadas na manufatura de produtos nos setores da perfumaria, cosmética, alimentícia e bebida, farmacêutica, higiene e limpeza. O objetivo desse trabalho será avaliar a atividade do óleo essencial obtidos das folhas frescas da planta supracitada e do citral como uma alternativa terapêutica para leishmaniose visceral. Para tanto, será coletado o material vegetal, extraído seu óleo essencial por arraste de vapor, determinado seu rendimento e adquirido o citral, realizado suas análises qualitativas e quantitativas por cromatografia gasosa acoplada a espectrofotometria de massas, cromatografia gasosa com detector de ionização de chama, avaliado a concentração efetiva de 50% (CE50) para a forma amastigota intracelular de *Leishmania* (L.) chagasi, testado suas citotoxicidades em células de mamífero, as delimitações de produção de óxido nítrico e atividade hemolítica, além de realizar estudos por microscopia eletrônica. A etapa final será a formulação de um fitoterápico contra o protozoário *Leishmania* (L.) chagasi responsável pela leishmaniose visceral que será testado com a meta de verificar sua dissolução para o organismo humano. Através dessa pesquisa espera-se elaborar um fitoterápico eficaz, seguro e de custo acessível contra leishmaniose visceral.

Itens Metodológicos e Éticos	Situação
Título	Comentário
Autores	Adequados
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Não
Aprovação no país de origem	Não necessita

Página 1-2


Bárbara Lima Simioni Leite
 Coord. Comitê de Ética em Pesquisa
 Universidade Tiradentes

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

Local de Realização	Própria instituição
Outras instituições envolvidas	Sim
Condições para realização	Adequadas

Comentários sobre os itens de Identificação
Evitar utilizar abreviaturas ou siglas no títulos.
Instituto Adolfo Lutz de São Paulo

Introdução	Adequada
------------	----------

Comentários sobre a Introdução
Pobre em referenciais teóricos.

Objetivos	Comentário
-----------	------------

Comentários sobre os Objetivos

Pacientes e Métodos	
Delineamento	Ausente
Tamanho de amostra	Total 06 Local 06
Cálculo do tamanho da amostra	Adequado
Participantes pertencentes a grupos especiais	Não
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Não se aplica
Critérios de inclusão e exclusão	Adequados
Relação risco- benefício	Não se aplica
Uso de placebo	Não utiliza
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Não se aplica
Avaliação dos dados	Adequada - quantitativa
Privacidade e confidencialidade	Não se aplica
Termo de Consentimento	Não se aplica
Adequação às Normas e Diretrizes	Sim

Comentários sobre os itens de Pacientes e Métodos

Cronograma	
Data de início prevista	mês 01
Data de término prevista	mês 12
Orçamento	
Fonte de financiamento externa	Não

Comentários sobre o Cronograma e o Orçamento

Referências Bibliográficas	Adequadas
----------------------------	-----------

Comentários sobre as Referências Bibliográficas

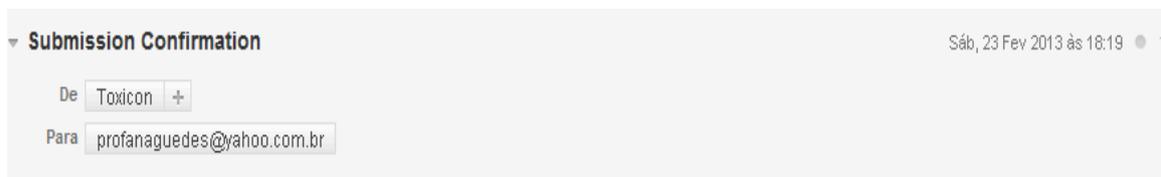
Recomendação

Aprovar

Comentários Gerais sobre o Projeto


Bárbara Lima Simioni Lette
Coord. Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade Tiradentes

Anexo 2. Artigo1- Evaluation of the *in vitro* activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf and Citral on *Leishmania* (L.) *infantum*



Dear Ana,

Your submission entitled "Evaluation of the *in vitro* activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf and Citral on *Leishmania* (L.) *infantum*" has been received by Toxicon

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/toxcon/>.

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/TOXCON/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Toxicon

Anexo 3. Artigo 2 – Anti-Leishmania activity: integrative review from 2000 to 2011.

Journal On Web Pharmacognosy Reviews	
Welcome Ana Maria Brito	Message Close

Dear Prof. Brito,

The Editorial Board of Pharmacognosy Reviews is pleased to inform you that your manuscript entitled PLANTS WITH ANTI-LEISHMANIA ACTIVITY: INTEGRATIVE REVIEW FROM 2000 TO 2011, with manuscript number phrev_39_12, is acceptable for publication in the Journal.

We will be sending you the page proofs through the manuscript management site before publication of the manuscript. At that time, you may place the order for the extra reprints.

If you have not sent the copyright form signed by all the contributors and the images, if any, till now, you are requested to do so at the earliest. Copyright form can be emailed to copyright@medknow.com. Copyright form can be emailed to copyright@medknow.com.

Please note that the journal reserves the rights to make changes in the language, grammar, presentation, etc. to suit the journal's requirements.

We thank you for submitting your valuable research work to Pharmacognosy Reviews.

With warm personal regards,

Yours sincerely,

The Editorial Team

Pharmacognosy Reviews

Anexo 4. Artigo 3 - Aromaterapia: da gênese a atualidade

Imprimir

<http://br.mg5.mail.yahoo.com/neo/launch?.rand=0...>

Assunto: Re: artigo 11_050
De: Revista Brasileira de Plantas Mediciniais RBPM (rbpm.sbp@gmail.com)
Para: profanaguedes@yahoo.com.br;
Data: Quinta-feira, 10 de Maio de 2012 9:25

Prezada Profa Ana Maria,

Confirmo o recebimento do artigo 11_050.

Att,
Michelle WatanukiEm 4 de maio de 2012 16:52, Ana Maria Guedes de Brito
<profanaguedes@yahoo.com.br> escreveu:

Prezada Michelle Watanuki,

Envio em anexo o artigo 11_050 com as correções solicitadas pelos relatores.

att,

Profa. Ana Maria Guedes de Brito

De: Revista Brasileira de Plantas Mediciniais RBPM <rbpm.sbp@gmail.com>
Para: profanaguedes@yahoo.com.br
Enviadas: Sexta-feira, 27 de Abril de 2012 9:05
Assunto: artigo 11_050

Prezada Ana Maria,

Segue anexado o parecer dos relatores do artigo 11_050. Favor considerar as contribuições e enviar o artigo reformulado dentro de 30 dias.

Atenciosamente,
Michelle Watanuki

--

Revista Brasileira de Plantas Mediciniais - RBPM
Sociedade Brasileira de Plantas Mediciniais-SBPM
rbpm.sbp@gmail.com
CPQBA-UNICAMP (19) 2139 2891

Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral

Anexo 5. Resumo aceito no 5º Congresso Mundial de Leishmaniose

[Questions?](#)

Dear SHEYLA ALVES RODRIGUES,

We are pleased to announce that your abstract/abstracts, listed below, was/were accepted for presentation on the 5th World Congress on Leishmaniasis – WORLDLEISH 5, that will be held at the Enotel Resort & SPA's Convention Center from May 13th to 17th 2013, at Porto de Galinhas, Pernambuco, Brazil.

The detailed timetable containing the day, time and place of your presentation/presentations will be later sent by e-mail and announced on the WorldLeish5 official [website](#).

For further information, please contact the Congress Secretariat - Bureau de Eventos Ltda, through the phones: +55 (81) 3463-0206 / +55 (81) 3643-0729 or via e-mail: helpdesk@worldleish5.org.

Have a good conference.

WorldLeish5 Scientific Committee Untitled Document
Please find below the confirmation for your abstract(s) submitted to the 5th World Congress on Leishmaniasis.

Registration	Title	Submitted
1270	EVALUATION OF ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OIL OF CYMBOPOGON CITRATUS (DC.) STAFF AND CITRAL AGAINST VISCERAL LEISHMANIASIS.	19/01/2013
ANA MARIA GUEDES DE BRITO ¹ ; SHEYLA ALVES RODRIGUES ² ; ÉRIKA GRACIELLE RINTOZ; ANDRÉ GUSTAVO TEMPONE ⁴ ; LAURO XAIVER FILHOS. 1,2.UNIVERSIDADE TIRADENTES, ARACAJU - SE - BRASIL; 3,4.INSTITUTO ADOLFO LUTZ, SÃO PAULO - SP - BRASIL; 5.RENORZIO, FORTALEZA - CE - BRASIL.		
Form of presentation : POSTER		

If you want to see your abstract, please access the link below and type in the given code and Password. [ACCESS](#)