

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Daniele da Silva

**ATIVIDADE *IN VITRO* DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE  
*Trypanosoma evansi***

Santa Maria, RS  
2017

**Daniele da Silva**

**ATIVIDADE *IN VITRO* DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE *Trypanosoma evansi***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Silvia Gonzalez Monteiro

Santa Maria, RS  
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Silva, Daniele  
Atividade in vitro de óleos essenciais sobre  
Trypanosoma evansi / Daniele Silva.- 2017.  
56 p.; 30 cm

Orientadora: Silvia Gonzalez Monteiro  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-  
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2017

1. Surra 2. Cinnamomum zeylanicum 3. Eucalyptus  
globulus 4. Zingiber officinale 5. Thymus vulgaris I.  
Gonzalez Monteiro, Silvia II. Título.

---

© 2017

Todos os direitos autorais reservados a Daniele da Silva. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: veterinariadaniele@gmail.com


**Daniele da Silva**

**ATIVIDADE *IN VITRO* DE ÓLEOS ESSENCIAS SOBRE *Trypanosoma evansi***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Aprovada em 08 de fevereiro de 2017:

  
Sílvia Gonzalez Monteiro, D<sup>a</sup>. (UFSM)  
(Presidente/Orientadora)

  
Maristela Lovato, Dra. (UFSM)

  
Luciana Dalla Rosa, Dra. (UNICRUZ)

Santa Maria, RS  
2017

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Maria e Valdomiro (*in memoriam*) e à mana Karine.  
Não existem palavras para descrever a gratidão por tudo que sempre fizeram por mim.  
À minha amada sobrinha Júlia, que enche minha vida de cor e luz,  
me fazendo compreender o que realmente é importante.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Silvia Gonzalez Monteiro, pela oportunidade para continuar meus estudos e por compreender as dificuldades que surgiram, me incentivando a prosseguir.

Ao Dr. Daniel Roulim Staink, que colaborou com minha formação profissional desde a graduação, sempre com muita paciência, competência e profissionalismo.

À equipe LAPAVET, que possibilitou a realização deste projeto, me auxiliando sempre que solicitados, com muita paciência, compreendendo as minhas limitações. Sem vocês eu não teria conseguido. Muito obrigada!

À minha família, por todas as orações e pela compreensão das minhas ausências.

Aos que tornaram possível o que parecia impossível, encurtando distâncias e correndo contra o tempo.

Aos amigos que fizeram esta caminhada comigo, em especial à Daniela de Ávila Bohrz, por sempre me ouvir, apoiar e incentivar, com toda a franqueza e a liberdade que nossos anos de amizade proporcionam; ao Alessandro Casale dos Santos, pelo apoio e momentos de descontração repletos de reflexões! E às minhas fontes de inspiração e energia para concluir esta jornada: Fabiana Ratzlaff, amiga querida, que acreditou em mim quando nem eu mais acreditava, que me deu força (foco e fé!!) para prosseguir; e Herval Vieira, que no breve período de convívio, além da ajuda com os gráficos, trouxe leveza e alegria aos meus dias, me confortando nos momentos de angústia com seu carinho, atenção, paciência e otimismo, “...sempre em frente, foi o conselho que ele me deu...”! Fabi e Herval, vocês tem meu carinho e minha gratidão eternos! Muito obrigada!

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Vencer a si próprio é a maior das vitórias.

(Platão)

## RESUMO

### ATIVIDADE *IN VITRO* DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE *Trypanosoma evansi*

AUTORA: Daniele da Silva

ORIENTADORA: Silvia Gonzalez Monteiro

*Trypanosoma evansi* é um hemoprotozoário transmitido mecanicamente por insetos hematófagos e se encontra na corrente sanguínea dos hospedeiros na forma tripomastigota. Com distribuição cosmopolita e importância econômica na África, Ásia e América Latina, este tripanossoma pode infectar inúmeras espécies de animais domésticos e silvestres, causando em equinos a doença denominada “Surra” ou “Mal das Cadeiras”. No Brasil, os medicamentos disponíveis para tratar esta enfermidade são o aceturato de diminazeno e o cloreto de isometamidium, porém, além de apresentarem hepatotoxicidade e nefrotoxicidade, nem sempre eliminam o parasito. Em alguns casos ocorre reincidência da parasitemia após o tratamento, o que pode estar relacionado à impossibilidade do medicamento atravessar a barreira hematoencefálica ou ao surgimento de cepas resistentes aos fármacos. Os óleos essenciais são cada vez mais estudados para o controle de microorganismos, e a atividade tripanocida de diversos óleos tem sido demonstrada. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia do tratamento *in vitro* dos óleos essenciais de *Citrus bergamia*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon citratus*, *Cedrus atlantica*, *Eucalyptus globulus*, *Zingiber officinale* e *Thymus vulgaris* sobre as formas tripomastigotas de *Trypanosoma evansi*. O isolado de *T. evansi* (LPV-2005) utilizado neste estudo foi originalmente isolado a partir de um cão naturalmente infectado e mantido criopreservado em nitrogênio líquido sob condições de laboratório. Os parasitos mantidos em meio de cultura foram distribuídos em placas de microtitulação (270 µL/poço), seguido da adição do óleo essencial, previamente diluídos em DMSO, nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 1,5% e mantidas em estufa (a 5% de CO<sub>2</sub> e 37°C). Foram usados como grupos controle o DMSO, óleo mineral, meio de cultura e aceturato de diminazeno. Os testes foram realizados em duplicata e os parasitos foram contados em câmara de Neubauer 1, 3 e 6 h após o início do teste. Os óleos essenciais foram quantificados e qualificados. Nosso estudo demonstrou que os óleos essenciais de bergamota (*C. bergamia*), canela (*C. zeylanicum*), capim limão (*C. citratus*), cedro (*C. atlantica*), eucalipto (*E. globulus*), gengibre (*Z. officinale*) e tomilho (*T. vulgaris*) apresentam atividade tripanocida *in vitro* contra tripomastigotas de *T. evansi*. No entanto, quando comparados entre si e com o aceturato de diminazeno, os óleos essenciais de *C. zeylanicum*, *E. globulus*, *Z. officinale* e *T. vulgaris* demonstraram maior eficácia *in vitro* contra tripomastigotas de *T. evansi*. Com base nos resultados encontrados, podemos concluir que os óleos essenciais podem ser alternativas promissoras para o tratamento das tripanossomoses.

**Palavras-chave:** Surra, Mal das Cadeiras, *Cinnamomum zeylanicum*, *Eucalyptus globulus*, *Zingiber officinale*, *Thymus vulgaris*.



## ABSTRACT

### *IN VITRO* ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS ON *Trypanosoma evansi*

AUTHOR: DANIELE DA SILVA  
ADVISOR: SILVIA GONZALEZ MONTEIRO

*Trypanosoma evansi* is a hemoprotozoal transmitted mechanically by hematophagous insects and is found in the bloodstream of hosts in the trypomastigote form. With a cosmopolitan distribution and economic importance in Africa, Asia and Latin America, this trypanosome can infect numerous species of domestic and wild animals, causing in horses the disease called "Surra" or "Mal das Cadeiras". In Brazil, the drugs available to treat this disease are diminazene aceturate and isometamidium chloride, however, in addition to presenting hepatotoxicity and nephrotoxicity, it does not always eliminate the parasite. In some cases, parasitaemia recurrence after treatment, which may be related to the impossibility of the drug crossing the blood-brain barrier or the emergence of drug-resistant strains. Essential oils are increasingly being studied for the control of microorganisms, and the trypanocidal activity of various oils has been demonstrated. In this context, the objective of this study was to evaluate the efficacy *in vitro* treatment of the essential oils *Citrus bergamia*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon citratus*, *Cedrus atlantica*, *Eucalyptus globulus*, *Zingiber officinale* and *Thymus vulgaris* against *Trypanosoma evansi* trypomastigotes. *T. evansi* isolate (LPV-2005) used in this study was originally isolated from a naturally infected dog, and kept cryopreserved in liquid nitrogen under laboratory conditions. The parasites maintained in culture medium were distributed in microtiter plates (270  $\mu$ L / well), followed by the addition of the essential oil, previously diluted in DMSO, at concentrations of 0.5%, 1.0% and 1.5% and kept in an oven (at 5 % CO<sub>2</sub> and 37 ° C). DMSO, mineral oil, culture medium and diminazene aceturate were used as control groups. The tests were performed in duplicate and the parasites were counted in the Neubauer chamber 1, 3 and 6 h after the onset of the experiment. The essential oils were quantified and qualified. Our study demonstrated that essential oils bergamot (*C. bergamia*), cinnamon (*C. zeylanicum*), lemon grass (*C. citratus*), cedar (*C. atlantica*), eucalyptus (*E. globulus*), ginger (*Z. officinale*) and thyme (*T. vulgaris*) trypanocidal activity *in vitro* against *T. evansi* trypomastigotes. However, when compared with each other and with diminazene aceturate, the essential oils of *C. zeylanicum*, *E. globulus*, *Z. officinale* and *T. vulgaris* demonstrated greater *in vitro* efficacy against *T. evansi* trypomastigotes. Based on the results found, we can conclude that essential oils may be promising alternatives for the treatment of trypanosomes.

**Keywords:** Surra, Mal das Cadeiras, *Cinnamomum zeylanicum*, *Eucalyptus globulus*, *Zingiber officinale*, *Thymus vulgaris*.

## LISTA DE FIGURAS

### MANUSCRITO

Figura 1 -	Efeito tripanocida dos óleos essenciais .....	34
------------	---	----

## LISTA DE TABELAS

### ANEXO A

Tabela 1 -	Composição dos óleos essenciais.....	53
------------	--------------------------------------	----

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>13</b>
2.1	<i>Trypanosoma evansi</i> .....	13
2.1.2	<b>Morfologia.....</b>	<b>14</b>
2.1.3	<b>Ciclo biológico.....</b>	<b>14</b>
2.1.4	<b>Distribuição da doença.....</b>	<b>15</b>
2.1.5	<b>Patogenia e sinais clínicos.....</b>	<b>15</b>
2.1.6	<b>Diagnóstico.....</b>	<b>18</b>
2.1.7	<b>Tratamento.....</b>	<b>18</b>
2.1.7.1	<i>Aceturato de diminazeno e cloreto de isometamidium</i> .....	19
2.2	<b>ÓLEOS ESSENCIAIS.....</b>	<b>20</b>
2.2.1	<b>Histórico.....</b>	<b>20</b>
2.2.2	<b>Definição.....</b>	<b>21</b>
2.2.3	<b>Metabolismo secundário dos vegetais.....</b>	<b>22</b>
2.2.4	<b>Aplicação dos óleos essenciais.....</b>	<b>24</b>
2.2.5	<b>Óleo essencial de Bergamota.....</b>	<b>25</b>
2.2.6	<b>Óleo essencial de Canela.....</b>	<b>25</b>
2.2.7	<b>Óleo essencial de Capim Limão.....</b>	<b>25</b>
2.2.8	<b>Óleo essencial de Cedro.....</b>	<b>26</b>
2.2.9	<b>Óleo essencial de Eucalipto.....</b>	<b>26</b>
2.2.10	<b>Óleo essencial de Gengibre.....</b>	<b>27</b>
2.2.11	<b>Óleo essencial de Tomilho.....</b>	<b>27</b>
2.3	<b>USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS COMO TRIPANOCIDAS.....</b>	<b>28</b>
<b>3</b>	<b>MANUSCRITO – ATIVIDADE <i>IN VITRO</i> DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE <i>Trypanosoma evansi</i>.....</b>	<b>30</b>
	<b>RESUMO.....</b>	<b>30</b>
	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>30</b>
	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>31</b>
	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>33</b>
	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>37</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>37</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>40</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>41</b>

## 1 INTRODUÇÃO

*Trypanosoma* é um hemoprotozoário flagelado pertencente ao reino Protista, filo Protozoa, classe Zoomastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, cuja forma tripomastigota encontra-se na circulação sanguínea dos hospedeiros (MONTEIRO, 2011). Possui ciclo biológico digenético, ou seja, necessita de dois hospedeiros, e são divididos em duas seções: Salivaria, aqueles transmitidos por picadas de vetores biológicos ou mecânicos e Stercoraria, pela contaminação da pele ou das mucosas do hospedeiro com as fezes do vetor (HOARE, 1972), causando as tripanossomoses, doença com distribuição cosmopolita e importância econômica na África, Ásia e América Latina (LUN; DESSER, 1995).

O *Trypanosoma evansi* é transmitido mecanicamente por insetos hematófagos e se encontra na corrente sanguínea na forma tripomastigota. Pode infectar inúmeras espécies de animais domésticos e silvestres (SILVA et al., 2007; FRANCISCATO et al., 2007), causando em equinos a doença denominada “Surra” ou “Mal das cadeiras” (ANSCHAU, 2011). Os sinais clínicos mais frequentes são a anemia, edema, letargia, perda de apetite, emagrecimento, febre intermitente, aborto, incoordenação motora e paralisia dos membros posteriores nos estágios terminais da doença (SILVA et al., 2009).

Diversos métodos de controle já foram testados, atualmente continuam sendo usados o controle dos vetores com drogas *pour on* e armadilhas impregnadas com inseticidas e a quimioprofilaxia com aceturato de diminazeno (SÁ RODRIGUES et al., 2016). Pode ocorrer reincidência da parasitemia após o tratamento com o aceturato de diminazeno, o que pode estar relacionado a impossibilidade do medicamento passar a barreira hematoencefálica ou ao surgimento de cepas resistentes ao fármaco (JENNINGS et al., 1977; MASOCHA et al., 2007).

Os óleos essenciais são cada vez mais estudados para o controle de microorganismos, testes *in vitro* tem demonstrado atividade antiparasitária, tornando-os potenciais substâncias para o desenvolvimento de novas drogas antiparasitárias (ANDRADE et al., 2012). Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia do tratamento *in vitro* de sete óleos essenciais (*Citrus bergamia*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon citratus*, *Cedrus atlantica*, *Eucalyptus globulus*, *Zingiber officinale* e *Thymus vulgaris*) sobre as formas tripomastigotas de *Trypanosoma evansi*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Trypanosoma evansi*

A doença causada pela infecção por *Trypanosoma evansi* em equinos é mundialmente conhecida por “Surra”, e na América Latina é também chamada de “Mal das Cadeiras”, “Derrengadera” ou “Peste quebra-bunda” (HOARE, 1972; LEVINE, 1973; WELLS, 1984; SILVA et al., 1995). No passado, *T. evansi* foi também denominado *T. equinum*, *T. hippicum* e *T. venezuelense* (HOARE, 1972). Foi descrito pela primeira vez em 1880 pelo médico veterinário do exército do Reino Unido, Griffith Evans, que visualizou organismos móveis quando examinou ao microscópio lâminas com o sangue de cavalos e camelos doentes (MAUDLIN et al., 1982; FALLIS, 1986).

Um grande número de animais domésticos e selvagens podem ser acometidos pelo *T. evansi*, entre eles, equinos (SEILER et al., 1981), asininos (TUNTASUVAN et al., 2003), bovinos (TUNTASUVAN; LUCKINS, 1998), búfalos (TUNTASUVAN et al., 1997), veados (TUNTASUVAN et al., 2000), cães (COLPO et al., 2005), capivaras (FRANKE et al.; 1994), quatis (HERRERA, 2001), marsupiais, tatus (HERRERA et al., 2001), suínos (TUNTASUVAN et al., 2003), camelos (DELAFOSSÉ; DOUTOUM, 2004), elefantes (HOARE, 1972), felinos, caprinos, ovinos, antas, zebuínos e pequenos roedores silvestres (LEVINE, 1973; SILVA et al., 2002; ATARHOUCHE et al., 2003; HERRERA et al., 2001). Os humanos eram considerados refratários à infecção por *T. evansi*, no entanto, um caso de infecção humana foi relatado por JOSHI et al. (2005) em um agricultor indiano, que não possuía apolipoproteína L1, uma proteína com atividade tripanocida. Foi realizado um levantamento sorológico na aldeia de origem do primeiro caso humano, e os resultados sugerem que a população humana é frequentemente exposta ao *T. evansi* (DESQUESNES et al., 2013).

Houve mais casos suspeitos de tripanossomíase humana causada por *T. evansi*. O de um cientista infectado enquanto pipetava sangue contaminado com o parasito, um caso no Reino Unido, um no Egito e mais quatro casos na Índia, sendo que um destes foi fatal, o que levou o Instituto de Pesquisa para o Desenvolvimento (IRD) e o Centro para Colaboração Internacional em Pesquisa Agrícola para o Desenvolvimento (CIRAD), com o apoio da Organização das Nações Unidas para Alimentação e a Agricultura (FAO), Organização Mundial de Sanidade Animal (OIE), Organização Mundial de Saúde (OMS) e uma série de institutos de pesquisa internacionais e universidades, criarem em 2011 a Rede de Infecção

Humana Atípica Causada por Tripanossomas Animais (NAHIAT), que tem o objetivo de coordenar as informações e pesquisas sobre as infecções humanas atípicas causada por tripanossomas animais (DESQUESNES et al., 2013).

### 2.1.2 Morfologia

*T. evansi* é um hemoprotozoário flagelado pertencente ao reino Protista, Sub-reino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, Subfilo Mastigophora, classe Zoomastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, Seção Salivaria (MONTEIRO, 2011). Este protozoário é monomórfico, ou seja, permanece na forma infectante, denominada de tripomastigota, durante toda sua vida (BRUN et al., 1998).

Seu corpo é alongado e achatado, possui uma membrana ondulante em toda sua extensão, comprimento variando entre 20 a 28 $\mu$ m (mínimo 15 $\mu$ m e máximo 33 $\mu$ m) e largura entre 1,0 a 2,0  $\mu$ m, extremidades afiladas, um flagelo terminal e um núcleo central (BRUN et al., 1998; SILVA et al., 2002). As cepas brasileiras não possuem cinetoplasto ou o apresentam incompleto (BORST et al., 1987; VENTURA et al., 2002).

### 2.1.3 Ciclo biológico

Este protozoário é transmitido de forma mecânica de um hospedeiro infectado para outro não infectado, tendo como vetores principalmente insetos hematófagos dos gêneros *Haematopota* sp., *Lyperosia* sp., *Chrysops* sp. (OGUNDELE et al., 2016), *Glossina* sp., *Stomoxys* sp. e *Tabanus* sp.. Na América Central e do Sul, os morcegos *Desmodus rotundus* (HOARE, 1972; LOSOS, 1980) podem atuar como reservatórios do parasito (HOARE, 1972; URQUHART et al., 1996), pois o protozoário é encontrado na saliva e se multiplica no sangue dos mesmos (RODRIGUES et al., 2016). As sanguessugas também podem ser transmissoras deste protozoário (CARREIRA, 2005). A transmissão oral pode ocorrer em carnívoros que se alimentam da carcaça de animais infectados ou através de ferimentos decorrentes de brigas (RAMIREZ et al., 1979, URQUHART et al., 1996; BARRIGA, 1997; BAZZOLI et al., 2002; HERRERA et al., 2001). A transmissão transplacentária foi demonstrada em ratos experimentalmente infectados, com nascimento de portadores sadios (RODRIGUES et al., 2016).

O protozoário permanece em sua forma tripomastigota na probóscida dos insetos vetores sem desenvolver nenhuma fase do ciclo, desta forma, quanto menor o intervalo de

tempo entre os repastos sanguíneos, maiores são as possibilidades de transmissão do parasito para um novo hospedeiro (SILVA et al., 2002; HOARE, 1972). Os tripanossomas sobrevivem e multiplicam-se nos fluidos extracelulares de seus hospedeiros, especialmente no sangue, onde se dividem assexuadamente por fissão binária (BRUN et al., 1998).

#### **2.1.4 Distribuição da doença**

De todos os tripanossomas patogênicos, *T. evansi* é o que tem a mais ampla gama de hospedeiros e a maior distribuição geográfica (DESQUESNES et al., 2013), sendo encontrado em todas as áreas tropicais e subtropicais do mundo, podendo ocorrer na África, Índia, Malásia, Indonésia, China, Rússia, Filipinas, América Central e América do Sul (LUN; DESSER, 1995). Este protozoário teve sua origem no continente Africano e foi introduzido nas Américas pelos primeiros colonizadores europeus. Presume-se que o *T. evansi* tenha chegado na América do Sul no final do século XIX com a importação de cavalos da Espanha (HOARE, 1972).

No Brasil o *T. evansi* afeta principalmente equinos (HERRERA et al., 2001) e as capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*), coatis (*Nasua nasua*) e morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*) são considerados os principais reservatórios silvestres (NUNES et al., 1993; FRANKE et al., 1994; SILVA et al., 2002). Há relatos de casos isolados ou surtos de tripanossomose em animais domésticos e silvestres, em diversas regiões do país, como no Paraná (KUBIAK e MOLFI, 1954), Mato Grosso do Sul, (MOREIRA; MACHADO, 1985; BRANDÃO et al., 2002), Rio Grande do Sul (COLPO et al., 2005; CONRADO et al., 2005; RODIGUES et al., 2005; FRANCISCATO et al., 2007), Santa Catarina (DA SILVA et al., 2008), Minas Gerais (NUNES et al., 2012) e Pantanal mato-grossense, onde é considerada doença enzoótica (SILVA et al., 1995; AQUINO et al., 1999). Segundo relatos de pecuaristas pantaneiros, a tripanossomíase em equinos geralmente é precedida por surtos da doença em capivaras (SILVA et al. 2002).

#### **2.1.5 Patogenia e sinais clínicos**

O *T. evansi* inicia sua multiplicação no local da picada, principalmente nos espaços teciduais extracelulares (RADOSTITS et al., 2002), levando a manifestações clínicas muito variáveis, podendo apresentar um quadro clínico agudo ou crônico (GARDINER; MAHMOUD, 1990), dependendo da espécie animal acometida, virulência da cepa e fatores



inespecíficos como doenças concomitantes, stress, desnutrição ou condições climáticas adversas (HOARE, 1972; DESQUESNES et al., 2013; OGUNDELE et al., 2016).

A superfície do *T. evansi* é coberta por uma camada glicoproteica antigênica, que é o principal determinante da formação de anticorpos. Contudo, o parasito pode expressar uma camada glicoproteica alterada, apresentando outra superfície antigênica que não será afetada pelos anticorpos já produzidos. Essa variação antigênica do *T. evansi* é o mecanismo primário de evasão da resposta imunológica do hospedeiro, o que leva o hospedeiro a apresentar picos de parasitemia (HERREIRA et al., 2004; HABILA et al., 2012; RODRIGUES et al., 2016). A imunidade inata humana é devida a atividade tripanolítica de uma apolipoproteína humana, ligada a lipoproteínas de alta densidade, conhecida como apolipoproteína L1 (APOL1), que é absorvida pelo parasito por endocitose e desencadeia a formação de canais seletivos nos poros da membrana lisossomal, que induz inchaço osmótico e morte celular (PEREZ-MORGA et al., 2005; PAYS et al., 2006; VANHOLLEBEKE et al., 2006).

A resposta do hospedeiro frente a infecção por *T. evansi* é inflamatória, predominando linfócitos T CD 3+ e linfócitos B. As lesões nos tecidos de animais infectados por *T. evansi* são caracterizadas por infiltrados perivasculares de células inflamatórias, obstrução dos capilares e veias, além da destruição neuronal e focos de desmielinização. A reação imune no sistema nervoso central de equinos infectados é uma inflamação desmielinizante aguda. O aumento na expressão de MHC II pelas células endoteliais está associada a diversas alterações que caracterizam sua ativação, mediada por citocinas no sistema nervoso central na fase inicial da resposta imune (LEMOS et al., 2007). A principal imunoglobulina presente no soro de animais infectados com *T. evansi* é IgM (KLEIN et al., 1967; LUCKINS et al., 1978; OLIVEIRA et al., 1989). As imunoglobulinas podem se depositar nos glomérulos, causando glomerulonefrite (HABILA et al., 2012).

A infecção por *T. evansi* causa nos machos degeneração dos túbulos seminíferos, atrofia e degeneração testicular e diminuição da reserva epididimal de esperma. Nas fêmeas causa aborto, anestro, repetição de cio, nascimento de animais fracos e natimortos. A diminuição dos hormônios associados à reprodução, o aumento de biomarcadores do stress oxidativo e as lesões degenerativas nos testículos podem ser causadas pela febre, anorexia e anemia, e não diretamente pelo parasito, embora o *T. evansi* já tenha sido encontrado nos testículos e sêmen de ovinos (FACCIO et al., 2014). A infecção experimental com *T. evansi* em ratos causa uma redução dos níveis séricos de LH, FSH, estradiol, progesterona e testosterona e aumento dos níveis séricos de Nox, TBARS, AOPP e cortisol (DA SILVA et al., 2012; FACCIO et al., 2014).

A fase aguda da infecção é caracterizada pelo surgimento de febre intermitente, edema subcutâneo, anemia progressiva, cegueira, letargia e alterações hemostáticas (GARDINER; MAHMOUD, 1990), podendo causar a morte dos animais em semanas ou meses. As infecções crônicas podem durar anos (BRUN et al., 1998) e durante esta fase os tripanossomas podem invadir o sistema nervoso central (SNC), levando a uma lesão progressiva, causando edema e pequenas hemorragias (GIBSON, 1998), agravando os sinais clínicos que comumente se apresentam nesta fase, como a caquexia e o edema, levando à incoordenação motora e paralisia de posterior (BRANDÃO et al., 2002; SILVA et al., 2002; RODRIGUES et al., 2005). Os sinais neurológicos têm sido descritos na fase terminal da doença, principalmente em equinos, bovinos, veados e búfalos infectados naturalmente (TUNTASUVAN et al., 1997; TUNTASUVAN; LUCKINS, 1998; TUNTASUVAN et al., 2003; RODRIGUES et al., 2005). A presença de tripanossomas no líquido cefalorraquidiano pode produzir sinais clínicos neurológicos. Nesses casos, os tripanossomas induzem uma resposta inflamatória nos nervos espinhais, mas com pouco envolvimento do sistema nervoso central (RADOSTITS et al., 2002; LUCKINS et al., 2004). A anemia é uma característica clínica comum na tripanossomíase, parece ser predominantemente hemolítica e tem sido implicada no desenvolvimento da maioria das alterações teciduais degenerativas. Há vários relatos sobre os mecanismos de desenvolvimento da anemia, sabe-se que os tripanossomas liberam substâncias que causam hemólise e deprimem a hematopoiese (RODRIGUES et al., 2005).

Os casos mais graves ocorrem em equinos e cães, enquanto casos crônicos são comumente observados em búfalos e bovinos, que nem sempre apresentam sinais clínicos. Equinos experimentalmente infectados apresentam febre intermitente nos últimos estágios da doença, com temperatura constantemente elevada, além de emaciação das patas traseiras, do escroto, de mamas, de abdômen e tórax. A taquicardia e a taquipnéia ocorrem nos períodos febris e nos estágios finais e a dispnéia poucos dias antes da morte. As mucosas conjuntivas inicialmente congestionadas tornam-se amarelas e no estágio final da doença apresentam-se pálidas e com petéquias. Ainda pode ocorrer lacrimejamento e descarga nasal aquosa (FRAZER; SIMONDS, 1909).

Nos bovinos, búfalos e veados, os sinais clínicos são semelhantes aos observados em equinos, geralmente com curso crônico (FRAZER; SIMONDS, 1909; TUNTASUVAN et al., 2000). Bovinos e bubalinos podem abortar do meio até o final da gestação, podendo haver também retenção de placenta, febre alta e diminuição na produção de leite (TUNTASUVAN; LUCKINS, 1998). Em cães descreve-se conjuntivite, febre, conjuntivas pálidas, emaciação

progressiva e aumento dos linfonodos palpáveis. O apetite pode permanecer inalterado e a emaciação deve ser relacionada a outras causas (SILVA et al., 1995; COLPO et al., 2005).

Animais silvestres, como capivaras e quatis podem desenvolver uma forma crônica da doença (NUNES et al., 1993; HERRERA et al., 2001). Suínos podem ter inapetência, febre intermitente, petéquias nas orelhas, patas e escroto. Algumas fêmeas abortam e alguns animais podem desenvolver sinais neurológicos, como convulsão, andar em círculos, excitação, saltos, comportamento agressivo, decúbito lateral, incoordenação e paresia dos membros pélvicos, opistótono, convulsão e morte (TUNTASUVAN; LUCKINS, 1998).

### **2.1.6 Diagnóstico**

O diagnóstico definitivo envolve a análise laboratorial, com identificação direta do agente ou usando técnicas sorológicas ou moleculares para provar contato com o tripanossoma. Na fase aguda da infecção por *T. evansi*, devido a alta parasitemia, é possível a detecção por métodos parasitológicos diretos, enquanto na fase crônica, quando ocorre diminuição da parasitemia, são mais sensíveis e precisos os métodos sorológicos, baseados na detecção de anticorpos específicos, embora estes testes não permitam a diferenciação entre infecções ativas e tratadas (GONZÁLEZ et al., 2006). Os testes sorológicos para anticorpos contra *T. evansi* circulantes, como o ELISA (do inglês, Enzyme Linked Immunosorbent Assay) e RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta), tem mostrado boa sensibilidade (CURY et al., 2010). A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), permite a identificação do parasito mesmo quando a parasitemia é baixa (GONZÁLEZ et al., 2006).

### **2.1.7 Tratamento**

O controle da Surra é realizado principalmente com a utilização de tripanocidas e métodos de proteção dos animais contra a infecção. A escolha da droga, as doses e a via de aplicação dependem da espécie animal, do manejo a ser empregado e da quimiosensibilidade da cepa de tripanossoma (DESQUESNES et al., 2013). O tratamento das tripanossomoses pode ser curativo ou preventivo, dependendo do fármaco utilizado e, em alguns casos, da dosagem administrada (PEREGRINE, 1994). As drogas curativas são usadas quando a incidência é baixa, e a profilaxia é realizada quando os animais estão sob constante risco e quando a enfermidade ocorre em um alto nível durante o ano (SILVA et al., 2002).

Estão disponíveis para o tratamento das tripanossomoses os fármacos suramine, diminazeno, quinapiramina, melarsoprol, homidium e isometamidium. A resistência aos fármacos ocorre frequentemente e pode restringir seu uso (BRUN et al., 1998). O aceturato de diminazeno, suramina e o dipropionato de imidocarb deixam resíduos metabólicos que se depositam no fígado e rim por longos períodos, podendo causar necrose destes órgãos (SPINOSA et al., 1999).

Na América do Sul, nem todos os compostos tripanocidas estão disponíveis comercialmente. No Brasil, apenas o aceturato de diminazeno (DÁVILA et al., 2000) e cloreto de isometamidium (BRASIL, 2016) são comercializados. Estes medicamentos eliminam os tripanossomas da corrente sanguínea algumas horas após sua administração. No entanto, o aceturato de diminazeno não apresenta a eficácia curativa em um grande número de casos, ocorrendo reincidência da parasitemia após o término do período residual do fármaco, que é em média de sete dias, quando utilizado na dose recomendada pelo fabricante (MASOCHA et al., 2007). O retorno da parasitemia após o tratamento pode estar relacionada à impossibilidade do medicamento passar a barreira hematoencefálica, criando um sítio de refúgio para os parasitos durante a fase sistêmica do tratamento ou devido ao uso indiscriminado e/ou errôneo deste fármaco, que pode levar ao surgimento de cepas resistentes (JENNINGS et al., 1977).

Desta forma, destacamos a importância dos estudos com óleos essenciais como novas alternativas no tratamento desta tripanossomose.

#### 2.1.7.1 Aceturato de diminazeno e cloreto de isometamidium

O aceturato de diminazeno (DMZ) é uma diamidina aromática que possui atividade tripanocida, babesicida e bactericida, principalmente para *Brucella* sp. e *Streptococcus* sp., sendo indicada uma dose única de 3,5mg/kg para equinos, bovinos, ovinos e caninos, ocorrendo o desaparecimento dos sinais clínicos em 24 horas (BRENDER et al., 1991). O mecanismo de ação do DMZ não é bem compreendido, mas sabe-se que interfere na glicólise anaeróbica e síntese de DNA e RNA dos parasitos. Também pode interferir na atividade das isoenzimas e da Ca<sup>++</sup>-ATPase (PEREGRINE, 1994).

O cloreto de isometamidium é um composto aminofenantridium, liberado para uso no Brasil no ano de 2016, indicado para o tratamento preventivo e curativo das tripanossomíases bovinas causadas por *T. vivax*, *T. evansi*, *T. congolense* e *T. brucei*, sendo indicada uma dose única de 1 mg/kg como tratamento preventivo, podendo proporcionar de 8 a 16 semanas de

controle, conforme a incidência dos vetores, e uma dose única de 0,5 mg/kg como tratamento curativo. O mecanismo de ação do isometamidium não é totalmente compreendido, surege-se que este fármaco iniba de forma seletiva a topoisomerase A do tipo II no cinetoplasto do parasito (KAMINSKY et al., 1997).

## 2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS

### 2.2.1 Histórico

As primeiras referências históricas sobre o uso de substâncias aromáticas são do Egito, onde os óleos essenciais eram usados para embalsamar múmias, nas oferendas em cerimônias religiosas e eram colocados junto aos túmulos dos grandes faraós. Na tumba de Tutancâmon foram encontrados óleos aromáticos de cedro, mirra e zimbros. Em seu compêndio de história natural “De Materia Medica”, escrito em 450 a.C., e que dominou a medicina por mais de 1500 anos, Dioscorides menciona o uso da turpentina (óleo essencial da planta de mesmo nome) e descreve os métodos utilizados em sua produção. Os gregos adquiriram conhecimentos dos egípcios, e uma de suas práticas era a queima das folhas de tomilho, por ser a planta sinônimo de força, felicidade, coragem e altivez. Os romanos, que receberam os conhecimentos sobre os óleos essenciais dos gregos, consideravam o tomilho antidepressivo. No século XVII, faziam uma sopa com tomilho e cerveja para "curar a timidez". Também adotaram o uso dos óleos essenciais para rituais religiosos e funerários (JAKIEMIU 2008; MACHADO; JUNIOR, 2011).

O conhecimento sobre a utilização das plantas para o tratamento de doenças determinou o surgimento de profissões específicas de saúde, como os curandeiros, que transmitiam esses conhecimentos para as gerações seguintes (IZUMI, 2010). Na Idade Média, os alquimistas perceberam que podiam sentir a presença das plantas aromáticas mesmo quando estas já haviam sido retiradas do recinto, devido ao aroma liberado, o que os levou a buscar a quinta essência da matéria, realizando experiências que contribuíram para o desenvolvimento dos processos de extração. Paracelsus, alquimista do século XVI, usou vapor para conseguir isolar o que ele chamou de “a alma da planta” ou a quinta essência daquele ser. O primeiro relato autêntico de destilação para obtenção de óleos essenciais foi feito pelo físico catalão Arnald de Villanova (1253-1311) que descreve a destilação do óleo de turpentina, entre outros produtos (JAKIEMIU 2008; MACHADO; JUNIOR, 2011).

Os séculos XVII e XVIII ficaram marcados na história da aromaterapia como “época de ouro”, pois os óleos essenciais de absinto, alecrim, noz-moscada, alho e cânfora eram usados como antissépticos contra as doenças deste período. Assim, no século XVIII os óleos essenciais passaram a fazer parte das opções terapêuticas dos médicos. No entanto, essa prática durou pouco tempo, consequência do aparecimento dos medicamentos de síntese química na segunda metade desse século. Os princípios ativos das plantas passaram a ser isolados para produzir substâncias químicas análogas em detrimento do uso desses compostos naturais (FERREIRA, 2014).

O termo aromaterapia foi concebido em 1927 pelo químico francês René Maurice Gattefossé, que teve uma grave queimadura na mão e a mergulhou acidentalmente em óleo essencial de lavanda, observando a melhora do ferimento. Gattefossé levou sua experiência para os hospitais militares, durante a Primeira Guerra Mundial, utilizando os óleos essenciais para prevenir gangrenas e curar queimaduras, promovendo rapidamente a reabilitação dos soldados. Jean Valnet, cirurgião e fisiologista, serviu com as tropas francesas durante a Segunda Guerra Mundial e utilizou óleos essenciais de tomilho, limão, camomila e cravo para tratar os soldados feridos em combate, curando infecções e diminuindo o uso de penicilina. Anos mais tarde, obteve ótimos resultados com o uso dos óleos essenciais em um hospital psiquiátrico (MACHADO; JUNIOR, 2011; CUNHA; ROQUE, 2013).

O desenvolvimento da indústria de óleos essenciais no Brasil foi impulsionado pela escassez de matérias-primas importadas durante e logo após a Segunda Guerra Mundial. Já na segunda metade dos anos 50 e início da década seguinte, diversas empresas produtoras de especialidades químicas e indústrias de alimentos se instalaram no Brasil, incrementando a demanda interna por óleos. O estudo sistemático das fontes de óleos essenciais no Brasil foi iniciado no Instituto de Óleos e os estudos de fitoquímica foram expandidos e diversificados no Instituto de Química Agrícola (IQA), ambos pertencentes ao Serviço Nacional de Pesquisas Agrônomicas, na década de 50 (BIZZO et al., 2009).

### **2.2.2 Definição**

Segundo a RDC nº 2 de 15 de janeiro de 2007, óleos essenciais são produtos voláteis de origem vegetal obtidos por processo físico. Podem se apresentar isoladamente ou misturados, retificados, desterpenados ou concentrados. Entende-se por retificados, os produtos que tenham sido submetidos a um processo de destilação fracionada para concentrar determinados componentes; por concentrados, os que tenham sido parcialmente desterpenados; por

desterpenados, aqueles dos quais tenha sido retirada a quase totalidade dos terpenos (BRASIL, 2007). Conforme a International Standard Organization (ISO) os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. O aroma agradável e intenso presente na maioria dos óleos voláteis faz com que estes sejam chamados de essências. Eles também são solúveis em solventes orgânicos pouco polares, como éter, recebendo, por isso, a denominação de óleos etéreos (RADÜNZ, 2004).

Desta forma, os óleos essenciais são caracterizados por serem uma mistura complexa dos metabólitos secundários das plantas, por apresentarem odor forte, alta volatilidade, instabilidade na presença de luz, oxigênio, substâncias oxidantes, redutoras, meios com pH extremos ou com traços de metais que podem catalisar reações de decomposição e transformação (BANDONI; CZEPAK, 2008; ASTANI; REICHLING; SCHNITZLER, 2009). São límpidos, raramente coloridos, lipossolúveis, solúveis em solventes orgânicos, geralmente tem densidade mais baixa que a da água. Podem ser sintetizados em todos os órgãos do vegetal e são armazenados em células secretoras especializadas (BAKKALI et al., 2008; BIZZO et al., 2009).

Os métodos mais utilizados para obtenção dos óleos essenciais são a extração por arraste a vapor, hidrodestilação, prensagem a frio, extração por solventes orgânicos, extração por alta pressão e extração por CO<sub>2</sub> supercrítico (OKOH et al., 2010). A técnica utilizada para extração interfere no perfil químico dos óleos essenciais (SIMÕES et al., 2007; BANDONI; CZEPAK, 2008).

### **2.2.3 Metabolismo secundário dos vegetais**

Os vegetais e alguns micro-organismos produzem, transformam e acumulam substâncias que não são essenciais para a manutenção da sua vida, denominadas de metabólitos secundários, originadas por um conjunto de reações químicas conhecido como metabolismo secundário, que ocorre a partir da glicose. Esses metabólitos estão envolvidos nas interações ecológicas entre o organismo produtor e o ambiente, conferindo características extras para melhor adaptação às condições ambientais, proporcionando vantagens para sua sobrevivência e para a perpetuação de sua espécie (TAIZ; ZEIGER, 2004; SIMÕES et al., 2007).

A função melhor compreendida dos voláteis produzidos pelas plantas é seu papel semioquímico. Quando o inseto ataca a planta, há interação entre suas secreções orais e os tecidos lesados das plantas, liberando no local da lesão ácidos que provocam a acumulação de

ácido jasmônico, um potente sinalizador para induzir a síntese de metabólitos secundários. Assim, se ativam várias rotas metabólicas que produzem proteinases para tornar os tecidos da planta menos digeríveis para o inseto. Há também a produção de alcalóides ou compostos voláteis que atraem os inimigos naturais do herbívoro, repelem os insetos indesejáveis, atraem os que realizam a dispersão do pólen e atuam como agentes antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inibidores de germinação, no controle da perda de água e do aumento de temperatura (PICHESKY; GANG, 2000; MONTANARI, 2010).

Os óleos essenciais estão divididos em dois grupos de origem biossintética distinta. O grupo dos terpenoides, originado a partir do isopreno, sendo os monoterpênicos os compostos terpenicos mais frequentes nos óleos essenciais (90% dos óleos voláteis), seguido dos sesquiterpenos. Os terpenos, substâncias presentes tanto em plantas como em animais, são descritos como possuidores de uma diversidade considerável de propriedades biológicas, incluindo a ação antimicrobiana, fungicida, antiviral, anti-hiperglicêmica, anti-inflamatória e antiparasitária (MACHADO; JUNIOR, 2011; ANDRADE et al., 2012). E o grupo dos fenilpropanóides, que são compostos aromáticos, presentes em menor quantidade do que os terpenóides. Os principais fenilpropanóides conhecidos são eugenol, metil eugenol, miristicina, elemicina, chavicol, metil chavicol, dilapiol, anetol, estragol e apiol (SANGWAN et al. 2001; ANDRADE et al., 2012).

Os óleos essenciais contêm entre 20 a 60 componentes em concentrações variáveis, de baixo peso molecular, sendo que dois ou três destes componentes estão em concentrações bastante elevadas (20-70%), sendo denominados de compostos majoritários (DELAMARE et al., 2007; BAKKALI et al., 2008). Entre os componentes dos óleos essenciais estão os hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos e raramente compostos com enxofre ou nitrogênio (FARMACOPEIA ITALIANA, 1998; DELAMARE et al., 2007; BAKKALI et al., 2008). Devido a sua complexa composição, os óleos essenciais são susceptíveis a modificações físico-químicas, pois podem ocorrer reações entre seus próprios constituintes ou entre eles e o meio (ANDRADE et al., 2012).

A composição quantitativa e qualitativa dos metabólitos secundários das plantas é alterada durante as fases de crescimento, variando de acordo com a sua idade, espécie, disponibilidade de nutrientes, variações sazonais e ambientais, hora do dia, estado reprodutivo e condições de cultivo, o que pode influenciar diretamente na atividade medicinal das plantas (CASTRO et al., 2010; PORTO, 2015). Desta forma, a composição dos óleos essenciais varia não somente devido a origem botânica, mas também conforme a parte da planta, o estágio do



seu desenvolvimento, procedimento de cultivo, o momento do dia que foi colhida, época de colheita, forma de secagem, origem geográfica, fatores ambientais, entre outros. Portanto, para se obter óleos essenciais de composição padronizada, eles devem ser extraídos sob as mesmas condições, da mesma parte da planta, que tenha crescido no mesmo solo, sob o mesmo clima e colhido na mesma estação (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; SIMÕES et al., 2007; BAKKALI et al., 2008).

O óleo essencial pode ser encontrado em diversas estruturas de armazenamento, que podem ser internas ou externas e o conhecimento dessas estruturas histológicas pode proporcionar o melhor aproveitamento do material vegetal e otimizar o processo de obtenção dos óleos essenciais (ANDRADE et al., 2012).

#### **2.2.4 Aplicação dos óleos essenciais**

Além das funções exercidas na planta, os óleos essenciais também podem ser utilizados pelas indústrias farmacêutica, agronômica, cosmética e alimentícia (BUCHBAUER, 2010), pois seu espectro farmacológico é amplo, como os efeitos antioxidante, antinoceptivo, antiinflamatório, antialérgico, anti-helmíntico, antibacteriano, antiviral e antiparasitário (RAJ, 1975; LEE et al., 2009; ANDRADE et al., 2012; SANTOS et al., 2014). Podem ser empregados como aromas, fragrâncias, fixadores de fragrâncias, em composições farmacêuticas, além de serem comercializados na sua forma bruta ou beneficiada, como as substâncias purificadas limoneno, citral, citronelal, eugenol, mentol e safrol (ANDRADE et al., 2012).

Os produtos naturais são uma fonte crescente de novos fármacos, sendo que até o ano 2006 mais de 20% das substâncias químicas disponíveis comercialmente eram de origem natural ou derivados de produtos naturais (HARVEY, 2007) e 75% dos fármacos utilizados para doenças infecciosas, entre os anos 1981 a 2002, eram de origem natural (NEWMAN et al., 2003). Até o ano 2009 existiam 300 óleos essenciais com importância comercial no mundo e, do total de patentes depositadas, as de óleos essenciais nas áreas de preparações medicinais somaram 13,95%. O Brasil compõe o grupo dos quatro maiores produtores mundiais de óleos essenciais, acompanhado da Índia, China e Indonésia, destacando-se pela produção de óleos essenciais provenientes da prensagem de pericarpos de frutos cítricos, subprodutos da indústria de sucos (BIZZO et al., 2009; ANDRADE et al., 2012).

Neste estudo foram utilizados sete óleos essenciais, os quais são apresentados nos itens subsequentes. Os compostos identificados em cada óleo essencial estão descritos na Tabela 1 (Anexo A).

### **2.2.5 Óleo essencial de Bergamota**

O óleo essencial de *Citrus bergamia*, pertencente à família Rutaceae, é um extrato vegetal obtido através da parte do epicarpo e mesocarpo da fruta fresca. Os compostos majoritários desse óleo incluem uma fração volátil (93-96%) contendo os monoterpenos e hidrocarbonetos sesquiterpenos (limonene,  $\beta$ -terpinen) e derivados oxigenados (linalol, acetato de linalil, neral, geranial) e uma fração não volátil (4-7%) (DUGO et al, 2000; MONDELLO et al, 1993). Esse óleo é amplamente utilizado em perfumaria, cosméticos, na indústria farmacêutica e alimentícia. Além de serem descritos os efeitos analgésicos (BAGETTA et al, 2010; SAKURADA et al, 2009; SAKURADA et al, 2011), ansiolíticos (SAIYUDTHONG; MARSDEN, 2011) e neuroprotetivos (AMANTEA et al, 2009).

### **2.2.6 Óleo essencial de Canela**

O *Cinnamomum zeylanicum* pertence à família Lauraceae e é uma erva medicinal asiática, muito utilizada na Índia como analgésica (KHORY; KATRAK, 1903). Os compostos majoritários desse óleo incluem o cinamaldeído, seguido pelo linalol e o metil eugenol (BOLIGON, 2013). O óleo é utilizado como corretivo de odor e sabor na preparação de alguns medicamentos (COSTA, 1975), mencionado pela sua atividade anti-inflamatória e analgésica (KIRTIKAR et al., 1975), bactericida, antifúngica, inseticida, anti-helmíntica e propriedades antioxidantes (RAJ, 1975; SANLA-EAD et al., 2012).

### **2.2.7 Óleo essencial de Capim Limão**

*Cymbopogon citratus*, pertencente à família Poaceae e originário da Índia, tem sido cultivado há muitos anos para fins medicinais em diversos países. Este óleo é produzido principalmente no Nordeste do Brasil e é caracterizado por apresentar citral como componente majoritário na forma de seus dois isômeros: geranial, que se apresenta em maior proporção, neral e o myrcene (CASTRO et al., 2010; MACHADO; JUNIOR, 2011; BOLIGON, 2013). O citral é utilizado como matéria prima de importantes compostos

químicos, denominados iononas, utilizados na perfumaria e na síntese de vitamina A (CASTRO et al., 2010). O óleo essencial do capim limão possui efeito antidepressivo, antinociceptivo, neurocomportamental, antioxidante, anti-séptico, analgésico, anti-inflamatório, antipirético, diurético, adstringente, bactericida, fungicida, antiviral, antiparasitário e inseticida (MCGUFFIN, 1997; SILVA et al, 2007; HAFFIZ et al. 2013). KAPOVIESSI et al. (2014) demonstraram que os óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* são eficazes contra *Trypanosoma brucei brucei*, mostrando menor atividade contra *Plasmodium falciparum*.

### 2.2.8. Óleo essencial de Cedro

*Cedrus atlantica* pertence à família Pinaceae e é uma planta nativa das montanhas do Marrocos e Argélia. Tem sido importante na economia do Marrocos, sendo sua madeira utilizada para móveis e materiais de construção (AEFACS, 1995). Os compostos majoritários do óleo essencial incluem o  $\alpha$ -Himachalene e  $\beta$ -Caryophyllene (BENABID, 2000). Possui atividade como repelente de insetos, analgésica, desinfetante, anti-espasmóticas, antifúngica e o extrato alcoólico demonstrou atividade anticâncer em carcinoma humano (BENABID, 2000; DHAR et al., 1968; BISHT, 1988; DIKSHIT; DIXIT, 1982).

### 2.2.9 Óleo essencial de Eucalipto

*Eucalyptus globulus* é uma espécie nativa da Austrália, pertence à família Myrtaceae, sendo esta a principal espécie produtora de óleo medicinal no Brasil, enquanto *Eucalyptus citriodora* e a *Eucalyptus staigeriana* são as espécies produtoras de óleo para a perfumaria. Não há produção destacada no país em espécies produtoras de óleos para fins industriais. Em torno de 600 espécies de eucalipto já foram descritas, das quais 20 são citadas para uso comercial (ROCHA; SANTOS, 2007; BIZZO et al., 2009). O óleo de eucalipto é uma mistura de monoterpenos e sesquiterpenos, fenol aromático, éter, álcool, ésteres, aldeídos e cetona. As espécies com fins medicinais apresentam teores de 1,8-cineol acima de 70% e baixos teores de felandreno, enquanto aquelas de aplicação industrial destacam-se pelo teor de felandreno (matéria-prima para desinfetantes e desodorantes) e piperitona (a partir da qual é fabricado o timol, utilizado como preservativo para colas, pastas e gomas) e as de uso na perfumaria são ricas em citronelal, citral ou acetato de geranila (SILVA et al., 2003; CRUZ et al., 2005; CASTRO, 2006; BIZZO et al., 2009).

São descritas atividade anti-inflamatória, analgésica, antioxidante, antibacteriana, fungicida, inseticida, anti-nociceptiva e inibição pronunciada de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em monócitos humanos, o que se deve a seus compostos majoritários como o 1,8-cineole, citronellol, citronellyl acetate, p-cymene, eucamalol, limonene, linalol (NAVARRO et al., 1996; TAKAHASHI et al., 2004; SALARI et al., 2006; CARMELLI et al., 2008; DORSAN et al., 2015). Extratos obtidos a partir das folhas de eucalipto são aprovados para o uso como aditivos alimentares, em formulações cosméticas, para dar sabor em alimentos, como fragrância em cosméticos, inseticida e repelente de insetos. Devido a sua propriedade antiinflamatória, desempenha um papel importante no tratamento de doenças das vias aéreas superiores e inferiores, como a sinusite, bronquite, asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (SILVEIRA et al., 2012; DORSAN et al., 2015).

#### **2.2.10 Óleo essencial de Gengibre**

O *Zingiber officinale* pertence à família Zingiberaceae e é uma das especiarias mais utilizadas mundialmente. Possui valor medicinal e vários autores demonstraram sua ação antibacteriana e antifúngica quando utilizado na preparação dos alimentos (LARSEN et al., 1999). Estudos comprovam sua atividade antioxidante, anti-inflamatória e preventiva contra o câncer (SHUKLA; SINGH, 2007; STOILOVA et al., 2007; THOMSON et al., 2002). Seus compostos majoritários são o  $\alpha$ -Zingiberene, geranial e o ar-Curcumene.

#### **2.2.11 Óleo essencial de Tomilho**

*Thymus vulgaris*, pertencente a família Lamiaceae, é uma planta nativa da região do Mediterrâneo, que compreende 150 gêneros, com cerca de 2800 espécies distribuídas em todo o mundo. Muitas das espécies introduzidas no Brasil são plantas medicinais e produtoras de óleos essenciais, sendo utilizadas como condimentos ou como flores ornamentais. Dentre os gêneros cultivados da família Lamiaceae se destacam várias espécies usadas como condimentos, tais como: sálvia (*Salvia officinalis*), manjeriço (*Ocimum basilicum*), orégano (*Origanum vulgare* L.) e manjerona (*Origanum majorana* L.) (JAKIEMI, 2008).

Os principais constituintes do óleo essencial de tomilho são os compostos fenólicos timol (composto majoritário) presente também em óleos essenciais cítricos, seguido pelo p-cymene e o carvacrol (HUDAIB et al., 2002; BOLIGON, 2013). Possui atividade bactericida, antifúngica, pesticida, anti-espasmódica, carminativa, antioxidante e expectorante (ESSAWI,

2000; PINA-VAZ, 2004; LALL, 1999; JAKIEMIU, 2008). Os antioxidantes fenólicos de origem vegetal, categoria em que pode ser incluído o timol, têm sido relacionados com a baixa mortalidade por problemas cardíacos entre as pessoas que praticam dieta mediterrânea (HUDAIB et al., 2002).

### 2.3 USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS COMO TRIPANOCIDAS

Diversos estudos tem demonstrado a viabilidade do uso de plantas como tripanocidas, MIKUS et al. (2000) relataram o efeito tóxico dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris* e *Melaleuca alternifolia* sobre *Trypanosoma brucei*. HOLETZ et al. (2002) concluíram que *Lippia alba*, *Piper regnellii*, *Stryphnodendron adstringens* e *Tanacetum vulgare* apresentaram atividade antiprotozoário, e que estes vegetais podem ser utilizados como modelos para seleção de plantas que contêm compostos tripanocidas. Estes mesmos pesquisadores verificaram o efeito do óleo essencial obtido de 15 plantas sobre *Herpetomonas samuelpessoai*, um protozoário tripanossomatídeo não patogênico utilizado como modelo de estudo devido às suas semelhanças biológicas com o *Trypanosoma cruzi*. No tratamento da malária mais de 30 espécies de vegetais são utilizadas, sendo algumas com validação médica (HIDALGO, 2003). Há relatos sobre a atividade antiprotozoário de diversos óleos essenciais sobre *Leishmania*, *Trypanosoma* e *Plasmodium* (MIKUS et al, 2000; ROSA et al, 2003; TCHOUMBOUGNAG et al., 2005; UEDA-NAKAMURA et al., 2006; SANTORO et al., 2007; WINK; NIBRET, 2010) e os óleos essenciais *M. alternifolia*, *Copaifera* spp. e *Achyrocline satureoides* demonstraram atividade tripanocida contra *T. evansi* (BALDISSERA et al., 2014, 2016).

Os compostos terpênicos sesquiterpenos e monoterpenos são importantes constituintes dos óleos voláteis, sendo que os sesquiterpenos são o grupo mais diversificado de isoprenoides. Estudos *in vitro* da atividade antiprotozoário em um grupo de 40 lactonas sesquiterpênicas contra *T. brucei rhodesiense* e *T. cruzi* mostraram alta atividade, com um índice de seletividade comparáveis às drogas tripanocidas (SAEIDNIA et al., 2013).

O mecanismo de ação dos monoterpenos envolve, principalmente, efeitos tóxicos à estrutura e à função da membrana celular. Como resultado do caráter lipofílico, os monoterpenos irão, preferencialmente, se deslocar da fase aquosa em direção às estruturas de membrana. O acúmulo dos constituintes dos óleos essenciais na bicamada lipídica da membrana citoplasmática irá conferir a esta uma característica de permeabilidade, dessa forma, danos estruturais à membrana citoplasmática levam ao comprometimento de suas

funções como barreira seletiva e local de ação enzimática e geração de energia. Enzimas como ATPases são conhecidas por se localizarem na membrana citoplasmática e serem envolvidas por moléculas de lipídeos, o que sugere como mecanismo de ação que as moléculas de hidrocarbonetos lipofílicos poderiam acumular-se na bicamada lipídica, alterando a interação lipídeo-proteína, possibilitando uma interação direta dos componentes lipofílicos com partes hidrofóbicas da proteína (SIKKEMA et al., 1995; OLIVEIRA et al., 2011).

A capacidade citotóxica de óleos essenciais, baseados em sua capacidade pró-oxidante, pode fazer deles excelentes anti-sépticos e antimicrobianos, além do que alguns óleos essenciais demonstraram clara capacidade antimutagênica. O geraniol demonstrou inibição da proliferação de células de câncer de cólon, induzindo a membrana destas células à despolarização, interferindo nos canais iônicos e passagens de sinais (MACHADO; JUNIOR, 2011). Componentes de óleos essenciais podem entrar na corrente sanguínea, passar a barreira hematoencefálica e chegar ao sistema nervoso central através de várias vias, sendo alguns exemplos a inalação (BAGETTA et al., 2010), a aplicação dérmica (BROOKER et al., 1997), injeções subcutâneas ou por vias intraperitoneais e administração oral (ORAFIDIYA et al., 2005). TANIDA et al. (2005) detalharam a atuação de óleo essencial no sistema nervoso central.

Os óleos essenciais podem ser usados como alternativas ou adjuntos às terapias anti parasitárias atuais e o surgimento de parasitas resistentes às quimioterapias atuais realça a importância de óleos essenciais de plantas como potenciais novos agentes antiparasitários (HAFFIZ et al., 2013; KAPOVIESSI et al., 2014).

### 3 MANUSCRITO

Manuscrito será submetido à Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ISSN 0102-0935)

#### Atividade *in vitro* de óleos essenciais sobre *Trypanosoma evansi*

[*In vitro* activity of essential oils on *Trypanosoma evansi*]

D. Silva <sup>1\*</sup>, C. B. Oliveira <sup>1</sup>, T. H. Grando <sup>1</sup>, B. Z. Porto <sup>1</sup>, M. F. De Sá <sup>1</sup>, L. F. Cossetin <sup>1</sup>, J. Dillman <sup>1</sup>, S. G. Monteiro <sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Santa Maria - Av. Roraima, 1000

97105-900 – Santa Maria, RS \* Autor para correspondência: veterinariadaniele@gmail.com e sgmonteiro@uol.com.br

#### RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a susceptibilidade *in vitro* do *Trypanosoma evansi* aos óleos essenciais de *Citrus bergamia*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon citratus*, *Cedrus atlantica*, *Eucalyptus globulus*, *Zingiber officinale* e *Thymus vulgaris*. Os testes foram realizados em meio de cultura para *T. evansi*, com os óleos nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 1,5%. Observou-se um efeito dose-dependente para todos os óleos, com a maior mortalidade observada 1h após o início dos testes, assim, foi possível concluir que todos os óleos essenciais testados apresentaram efeito tripanocida, no entanto, *T. evansi* apresentou maior susceptibilidade *in vitro* aos óleos essenciais de *C. zeylanicum*, *E. globulus*, *Z. officinale* e *T. vulgaris*, quando comparados aos outros óleos testados e ao aceturato de diminazeno.

**Palavras-chave:** Surra, *Cinnamomum zeylanicum*, *Eucalyptus globulus*, *Zingiber officinale*, *Thymus vulgaris*.

#### ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the *in vitro* susceptibility *Trypanosoma evansi* to the essential oils *Citrus bergamia*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon citratus*, *Cedrus atlantica*, *Eucalyptus globulus*, *Zingiber officinale* and *Thymus vulgaris*. The tests were carried out in culture medium for *T. evansi*, with the oils in concentrations of 0.5%, 1.0% and 1.5%. It was observed a dose-dependent effect for all oils, with the highest mortality observed 1h from the onset of the experiment, thus, it was possible to conclude that all the essential oils

tested had a trypanocidal effect, however, *T. evansi* showed greater *in vitro* susceptibility to the essential oils of *C. zeylanicum*, *E. globulus*, *Z. officinale* and *T. vulgaris*, when compared to the other oils tested and to the diminazene aceturate.

**Keywords:** Surra, *Cinnamomum zeylanicum*, *Eucalyptus globulus*, *Zingiber officinale*, *Thymus vulgaris*.

## INTRODUÇÃO

*Trypanosoma evansi* é um protozoário hemoflagelado da família Trypanosomatidae, transmitido mecanicamente por insetos hematófagos, principalmente dos gêneros *Stomoxys* sp., *Tabanus* sp., *Chrysops* sp. e *Hematopota* sp. (Hoare, 1972; Rodrigues *et al.*, 2005). É o agente etiológico de uma doença conhecida como Mal das Cadeiras ou Surra, que acomete principalmente equinos, mas pode ocorrer em diversas espécies de animais domésticos e silvestres, como cães, gatos, bovídeos, capivaras, quatis, tatus, pequenos roedores e o homem (Hoare, 1972; Colpo *et al.*, 2005; Joshi *et al.*, 2005).

A doença é caracterizada por perda rápida de peso, anemia, febre intermitente, edema de membros posteriores e comprometimento do sistema nervoso central, podendo ser fatal (Rodrigues *et al.*, 2005). Foram descritas duas formas da doença causada por *T. evansi*, a síndrome aguda, que causa morte rápida em equinos e cães não tratados, e a crônica, que afeta diversos animais silvestres, principalmente capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) e quatis (*Nasua nasua*) (Herrera *et al.*, 2001).

No Brasil, os fármacos disponíveis para o tratamento desta tripanossomose são o cloreto de isometamidium (BRASIL, 2016) e o aceturato de diminazeno, o qual pode ser hepatotóxico e nefrotóxico para o hospedeiro (Spinosa *et al.*, 1999), além de não controlar totalmente a infecção em alguns casos, levando a parasitemia recorrente, o que pode estar relacionado com a impossibilidade deste fármaco atravessar a barreira hematoencefálica, criando um refúgio para os tripanossomas durante a fase sistêmica do tratamento ou devido ao surgimento de cepas resistentes (Jennings *et al.*, 1977).

O espectro farmacológico dos óleos essenciais é amplo, apresentam efeitos antioxidante, antinoceptivo, antiinflamatório, antialérgico, antihelmíntico, antibacteriano, antiviral e antiparasitário (Santos *et al.*, 2014). Diversos estudos demonstraram a atividade tripanocida de óleos essenciais (Mikus *et al.*, 2000; Baldissera *et al.*, 2014) além da capacidade de alguns atravessarem a barreira hematoencefálica (Bagetta *et al.*, 2010). Neste contexto, foi testada a atividade tripanocida *in vitro* dos óleos essenciais de bergamota (*Citrus bergamia*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), capim limão (*Cymbopogon citratus*), cedro (*Cedrus atlantica*),



eucalipto (*Eucalyptus globulus*), gengibre (*Zingiber officinale*) e tomilho (*Thymus vulgaris*) sobre tripomastigotas de *T. evansi*.

## MATERIAL E MÉTODOS

O isolado de *T. evansi* (LPV-2005) utilizado neste estudo foi originalmente isolado a partir de um cão naturalmente infectado (Colpo *et al.*, 2005) e mantido criopreservado em nitrogênio líquido sob condições de laboratório. Um rato (R1) foi infectado por via intraperitoneal com o sangue criopreservado em nitrogênio líquido, para se obter uma maior quantidade de parasitos para os testes *in vitro*.

O meio de cultura para *T. evansi* foi formulado de acordo com o método de Baltz (1985), modificado por Dalla Rosa *et al.* (2012), permanecendo refrigerado a 10°C até a estabilização, realizada com a adição, em 10 ml do meio de cultura, de 1µl/ml de hipoxantina 50mM (dissolvida em NaOH 0,1M) e 2µl/ml de 2-mercaptoetanol 1,2mM e levado à estufa (37°C a 5% de CO<sub>2</sub>) por 2 horas antes do início do teste (Oliveira, 2014).

Quando R1 apresentou alta parasitemia (10<sup>7</sup> tripanossomas/µL), quatro dias após a infecção, foi anestesiado com isoflurano em câmara anestésica para coleta de sangue através de punção cardíaca. As amostras de sangue foram armazenadas em tubos contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético 10%). Para a separação dos tripanossomas, 200 µL de sangue foram diluídos em 200 µL de meio de cultura, acondicionados em microtubos e centrifugados durante 10 min a uma velocidade de 400g. O sobrenadante, onde estavam os parasitos, foi removido e resuspenso em meio de cultura.

A contagem do número de parasitos foi realizada em câmara de Neubauer, baseada na metodologia de Gillingwater *et al.* (2010). O meio de cultura com os parasitos foi distribuído em placas de microtitulação (270 µL/poço), seguido da adição de cada óleo essencial nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 1,5%. Para ajustar o volume a ser utilizado para os testes *in vitro* os óleos essenciais foram diluídos em DMSO (sulfóxido de dimetilo 1%). As placas de microtitulação foram mantidas em estufa (a 5% de CO<sub>2</sub> e 37°C).

Para validar os testes, foram usados como grupos controle o DMSO, óleo mineral, meio de cultura e aceturato de diminazeno. O aceturato de diminazeno foi preparado conforme a diluição do fármaco comercial e DMSO (Gomes-Cardoso *et al.*, 1999). Os testes foram realizados simultaneamente e em duplicata com cada óleo essencial, e os parasitos foram contados em câmara de Neubauer (Baltz *et al.*, 1985) 1, 3 e 6 h após o início do teste.

Os óleos essenciais de bergamota (*C. bergamia*), canela (*C. zeylanicum*), capim limão (*C. citratus*), cedro (*C. atlantica*), eucalipto (*E. globulus*) e tomilho (*T. vulgaris*) foram obtidos da

empresa Ferquima. O óleo essencial de gengibre (*Z. officinale*) foi extraído através da técnica de arraste de vapor. Os rizomas utilizados para extração foram obtidos no comércio do município de São Pedro do Sul/RS. Em balão de vidro de fundo redondo e 2 L de capacidade, foram misturados 1 L de água destilada e 1000 g de gengibre picado. O balão foi conectado a um separador de fases – o extrator de Clevenger – e este a um condensador. O balão foi aquecido à temperatura de ebulição e mantido nessas condições durante 3 horas, conforme AOAC (1984). O óleo obtido foi acondicionado em microtubos e armazenado à temperatura de -10°C para posterior análise.

A caracterização dos óleos foi realizada através de cromatografia gasosa (GC), conforme descrito por Baldissera *et al.* (2014). A identificação dos componentes foi efetuada com base no índice de retenção (RI), determinada com referência à série homóloga de n-alcenos (C7-C30), sob condições experimentais idênticas, em comparação com a pesquisa da biblioteca de espectros de massa (NIST e Wiley), e com os dados da literatura de espectro de massa de Adams (1995). As quantidades relativas dos componentes individuais foram calculadas com base na área do pico CG (FID resposta).

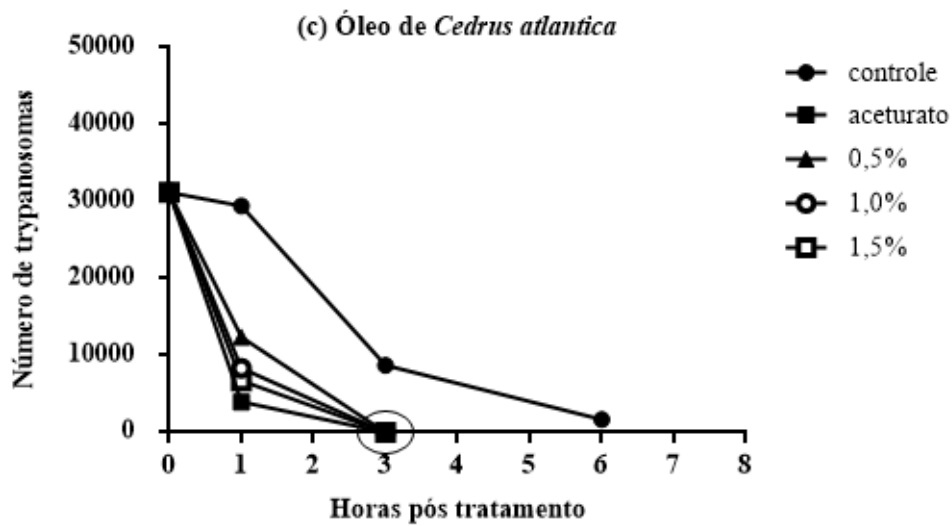
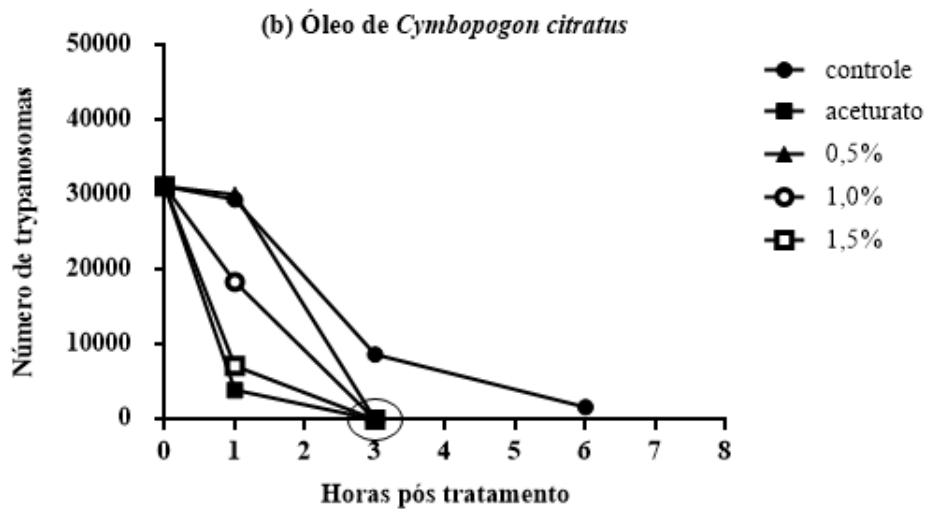
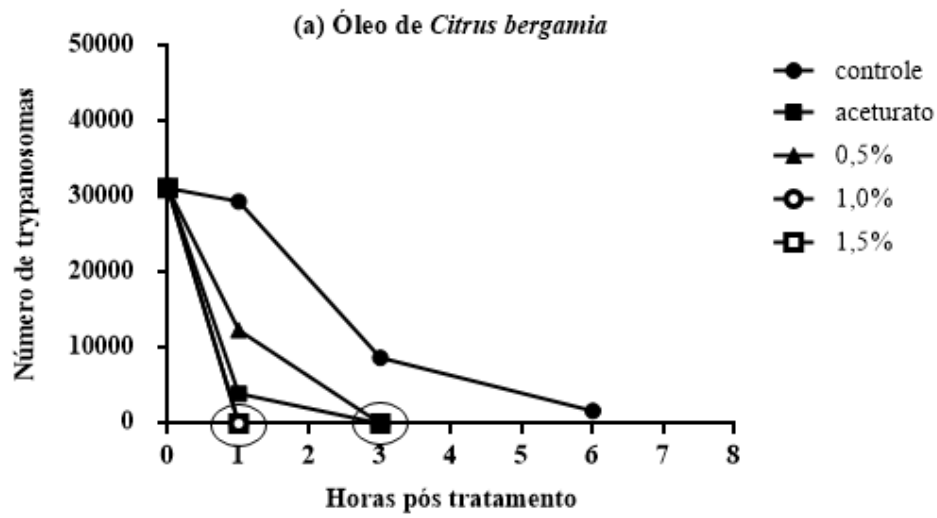
Os compostos majoritários identificados nos óleos essenciais utilizados neste estudo foram: do óleo de *C. bergamia* o limonene (30,17%) e linalyl acetate (24,67%); de *C. zeylanicum* o cinnamaldehyde (41,27%) e linalool (13,05%); *C. citratus* o geranial (46,51%) e neral (31,75%); *C. atlantica* o  $\alpha$ -Himachalene (19,74%) e  $\beta$ -caryophyllene (13,74%); *E. globulus* o 1,8 cineol (80,75%) e limonene (9,14%); *Z. officinale* o  $\alpha$ -zingiberene (26,47%) e geranial (12,09%) e do óleo de *T. vulgaris* thymol (49,27%) e p-cymene (20,18%).

Os dados foram analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) e pelo teste de Tukey. Os gráficos foram feitos pelo Graphpad Prism 6. Os resultados foram considerados significantes quando  $p < 0,05$ .

O referido trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) sob o número de protocolo 9261240415.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do efeito tripanocida dos óleos testados neste estudo foram proporcionais à dose, como mostra a Figura 1.



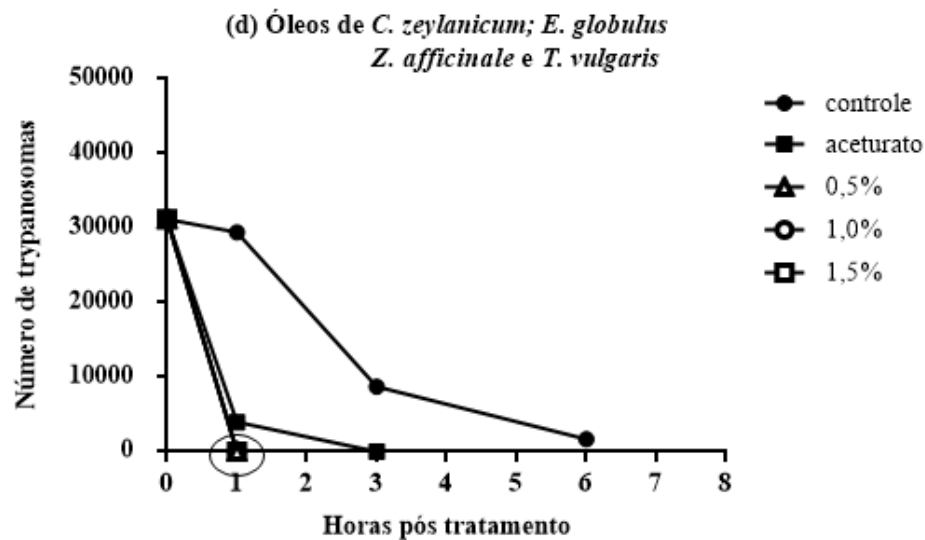


Figura 1. Atividade *in vitro* das diferentes concentrações dos óleos essenciais de (a) *C. bergamia*, (b) *C. citratus*, (c) *C. atlântica* e (d) *C. zeylanicum*, *E. globulus*, *Z. officinale* e *T. vulgaris* (estes óleos essenciais apresentaram a mesma atividade tripanocida, portanto os seus resultados foram agrupados em um mesmo gráfico) contra *T. evansi*. Os resultados dentro de um círculo não apresentaram diferença estatística significativa ( $P > 0,05$ ), ao mesmo tempo.

Neste estudo, os óleos essenciais de *C. zeylanicum*, *E. globulus*, *Z. officinale* e *T. vulgaris* levaram a uma maior mortalidade de tripanosomas em um efeito dose-dependente, pois foram capazes de causar a mortalidade de todos os parasitos após 1 hora do início do teste, nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 1,5%. Quando utilizadas as mesmas concentrações para os óleos de *C. citratus* e *C. atlântica*, observou-se uma redução do número de tripomastigotas 1 hora após o início do teste.

No óleo essencial de *C. bergamia* na concentração de 0,5% houve uma redução no número de parasitos vivos 1 hora após o início do teste, entretanto, apresentou uma maior mortalidade de tripanosomas em um efeito dose-dependente nas concentrações de 1,0% e 1,5%, quando comparados aos óleos essenciais de *C. citratus* e *C. atlântica*, pois foi houve mortalidade de todos os tripomastigotas 1 hora após o início do teste, diferente do observado para os óleos essenciais de *C. citratus* e *C. atlântica* nas mesmas concentrações. Três horas após o início do teste todos os óleos essenciais, nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 1,5%, foram capazes de

eliminar todos os tripanossomas, assim como observado no grupo com aceturato de diminazeno.

A atividade tripanocida *in vitro* dos óleos essenciais tem sido demonstrada por diversos pesquisadores, sendo que os monoterpenos e sesquiterpenos provenientes de outras plantas já demonstraram efeito tripanocida *in vitro* contra *T. cruzi*, *T. brucei* e *T. evansi* (Saeidnia *et al.*, 2013; Baldissera *et al.*, 2016). Todavia, os mecanismos de ação dos óleos essenciais ainda não estão bem esclarecidos. Este foi o primeiro estudo a investigar o desempenho dos óleos essenciais de *C. bergamia*, *C. zeylanicum*, *C. citratus*, *C. atlantica*, *E. globulus*, *Z. officinale* e *T. vulgaris* em tripomastigotas de *T. evansi*.

Observou-se neste estudo um efeito tripanocida *in vitro* dose-dependente de todos os óleos essenciais testados, entretanto, os óleos essenciais de *C. zeylanicum*, *E. globulus*, *Z. officinale* e *T. vulgaris* apresentaram um efeito tripanocida mais rápido do que os demais óleos e também do que o aceturato de diminazeno. Santoro *et al.* (2007) e Mikus *et al.* (2000) demonstraram a atividade tripanocida *in vitro* do óleo essencial de *T. vulgaris* contra *T. cruzi* e *T. brucei*, sendo que a atividade tripanocida foi atribuída aos danos causados à membrana celular (Mikus *et al.*, 2000). Monzote *et al.* (2012) e Kapoviessi *et al.* (2014) relataram a atividade tripanocida *in vitro* do óleo essencial de *C. citratus* contra *T. brucei*.

Baldissera *et al.* (2014), sugeriram que o mecanismo de ação responsável pela atividade tripanocida dos óleos essenciais de *Copaifera* spp. e *Achyrocline satureoides* contra *T. evansi* estivesse relacionado aos danos na membrana causados pelos compostos terpenicos. Sikkema *et al.* (1995) e Oliveira *et al.* (2011), demonstraram o mecanismo de ação dos monoterpenos, que envolve principalmente efeitos tóxicos à estrutura e a função da membrana celular, comprometendo as funções de barreira seletiva, local de ação enzimática e geração de energia, o que também foi observado por Machado e Junior (2011) com o geraniol, que induziu a membrana celular a despolarização, interferindo nos canais iônicos e passagens de sinais.

Entretanto, Dorsan *et al.* (2015) demonstraram que o monoterpeno 1,8-cineol, componente majoritário do óleo de *E. globulus*, induziu dano oxidativo ao DNA celular. Baldissera *et al.* (2016) sugeriram que os compostos terpênicos de *M. alternifolia* tem como alvo as mitocôndrias, levando ao aumento das espécies reativas de oxigênio através do transporte de elétrons, causando danos na membrana celular e a morte dos tripomastigotas de *T. evansi*. Saeidnia *et al.* (2013) demonstraram atividade antiprotozoário de 40 lactonas sesquiterpênicas contra *T. brucei rhodesiense* e *T. cruzi*, e atribuíram a atividade tripanocida dos sesquiterpenos à sua atuação nas mitocôndrias, levando ao aumento das espécies reativas de

oxigênio através da cadeia de transporte de elétrons, causando danos à membrana celular e ao DNA, resultando na morte do parasito.

Os óleos essenciais utilizados neste estudo são constituídos principalmente por compostos terpenicos (monoterpenos e sesquiterpenos), formados a partir do metabolismo secundário das plantas (Andrade et al., 2012). Deste modo, as hipóteses que podem explicar a atividade tripanocida *in vitro* dos óleos essenciais contra tripomastigotas de *T. evansi* observada neste estudo são o dano que os componentes dos óleos induzem na membrana celular e a capacidade pró-oxidante dos compostos terpênicos.

### CONCLUSÕES

Este estudo mostrou que os óleos essenciais de bergamota (*C. bergamia*), canela (*C. zeylanicum*), capim limão (*C. citratus*), cedro (*C. atlantica*), eucalipto (*E. globulus*), gengibre (*Z. officinale*) e tomilho (*T. vulgaris*) apresentam atividade tripanocida *in vitro* contra tripomastigotas de *T. evansi*. São necessários estudos subsequentes, mas os óleos essenciais podem ser uma alternativa promissora no tratamento desta tripanossomose, especialmente os óleos essenciais de *C. zeylanicum*, *E. globulus*, *Z. officinale* e *T. vulgaris*, que apresentaram o melhor desempenho neste estudo, quando comparados aos outros óleos testados e ao aceturato de diminazeno.

### REFERÊNCIAS

- ADAMS, R.P., 1995. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Illinois USA, p.456.
- ANDRADE, M.A., CARDOSO, M.G., BATISTA, L.R., et al. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. Revista Ciência Agronômica, v.43, n. 2, p.399-408, 2012.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis. 14<sup>a</sup> ed. Virgínia, 1984.
- BAGETTA, G., MORRONE, L.A., ROMBOLÀ, L., et al. Neuropharmacology of the essential oil of bergamot. Fitoterapia, v.81, p.453–461, 2010.
- BALDISSERA, M.D., SILVA, A.S., OLIVEIRA, C.B., et al. Using of essential oils in the treatment of mice infected with *Trypanosoma evansi*. Rev. MVZ, v.19, n.2, p.4109-4115, 2014.

- BALDISSERA, M.D., GRANDO, T.H., SOUZA, C.F., et al. *In vitro* and *In vivo* action of terpinen-4-ol,  $\gamma$ -terpinene and  $\alpha$ -terpinene against *Trypanosoma evansi*. *Experimental Parasitology*, v.162, p.43-48, 2016.
- BALTZ, T., BALTZ, D., GIROUD, C. et al. Cultivation in a semi-defined medium of animal infective forms of *Trypanosoma brucei*, *T. equiperdum*, *T. evansi*, *T. rhodesiense* and *T. gambiense*. *EMBO Journal*, v.4, p.1273-1277, 1985.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Departamento de Fiscalização de Insumos Pecuários Coordenação de Fiscalização de Produtos Veterinários. Ato 02/2016 – CPV/DFIP. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em 13 fev. 2017.
- COLPO, C.B., MONTEIRO, S.G., STAINKI, D.R., et al. Infecção Natural por *Trypanosoma evansi* em cão no Rio Grande do Sul. *Ciência Rural*, v.35, p.717-719, 2005.
- DALLA ROSA, L., DA SILVA, A., GRESSLER, L.T, et al. Cordycepin (3'-deoxyadenosine) pentostatin (deoxycofomycin) combination treatment of mice experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. *Parasitology*, v.1, p.1-9, 2012.
- DÖRSAM, B., WU, C., EFFERTH, T., et al. The eucalyptus oil ingredient 1,8-cineol induces oxidative DNA damage. *Arch Toxicol*, v.89, p.797–805, 2015.
- GILLINGWATER, K., KUMAR, A., MOHAMED, A.I., et al. *In vitro* activity and preliminary toxicity of various diamidine compounds against *Trypanosoma evansi*. *Veterinary Parasitology*, v.169, p. 264-272, 2010.
- GOMES-CARDOSO, L., ECHEVARRIA, A., AGUIAR-ALVES, F., Amidine derivatives are highly effective against *Trypanosoma evansi* trypomastigotes. *Microbios*, v.100, p.181-187, 1999.
- HERRERA, H. M., AQUINO, L., MENEZES, R.F., et al. *Trypanosoma evansi* experimental infection in South american coati (*Nasua nasua*): clinical, parasitological and humoral immune response. *Veterinary Parasitology*, v.102, p.209-216, 2001.
- HOARE, C. A. The Trypanosomes of mammals: a zoological monograph. Oxford: Blackwell, 1972. 749p.
- JENNINGS, F.W., WHITELAW, D.D., URQUHART, G.M. The relationship between duration of infection with *T. brucei* in mice and the efficacy of chemotherapy. *Parasitology*, v.75, p.145–153, 1977.
- JOSHI, P. P., SHEGOKAR, V.R., POWAR, R.M., et al. Human Trypanosomosis caused by *Trypanosoma evansi* in India: the first case report. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, London, v.73, n.3, p.491-495, 2005.

- KAMINSKY, R., SCHMID, C., LUN, Z.R. Susceptibility of dyskinetoplastic *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum* to isometamidium chloride. *Parasitol Res*, v.83, p.816-818, 1997.
- KPOVIESSI, S., BEROB, J., AGBANID, P., et al. Chemical composition, cytotoxicity and in vitro antitrypanosomal and antiplasmodial activity of the essential oils of four *Cymbopogon* species from Benin. *Journal of Ethnopharmacology*, v.151, p.652–65, 2014.
- MACHADO, B.F.M., JUNIOR, A.F. Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. *Cad. acad.*, v.3, n.2, p. 105-127, 2011.
- MIKUS, J., HARKENTHAL, M., STEVERDING, D., et al. *In vitro* effect of essential oils and isolated mono- and sesquiterpenes on *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*. *Planta Med*, v.66, p.366–368, 2000.
- MONZOTE, L., ALARCÓN, O., SETZER, W.N. Antiprotozoal activity of essential oils. *Agric. conspec. sci.*, v.77, n.4, p. 167-175, 2012.
- OLIVEIRA, C.B. *Aceturato de diminazeno lipossomal no tratamento da infecção por trypanosoma evansi: testes in vitro e in vivo*. 2014. 100p. Tese (Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva) – Curso de Pós Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.
- OLIVEIRA, M.M.M., BRUGNERA, D.F., CARDOSO, M.G., et al. Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. *Rev. Bras. Pl. Med.*, v.13, n.1, p.8-16, 2011.
- RODRIGUES, A., FIGHERA, R.A., SOUZA, T.M. et al. Outbreaks of trypanosomiasis in horses by *Trypanosoma evansi* in the state of Rio Grande do Sul, Brazil: epidemiological, clinical, hematological, and pathological aspects. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.25, p. 239-249, 2005.
- SAEIDNIA, S., GOHARI, A.R., HADDADI, A. Biogenic trypanocidal sesquiterpenes: lead compounds to design future trypanocidal drugs – a mini review. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.21, n.35, p.1-9, 2013.
- SANTORO, G.F., CARDOSO, M.G., GUIMARÃES, L.G.L., et al. Effect of oregano (*Origanum vulgare L.*) and thyme (*Thymus vulgaris L.*) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. *Parasitol Res*, v.100, p.783–790, 2007.
- SPINOSA, H.S., GÓRNIK, S.L., BERNARDI, M.M. *Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 692 p, 1999.



#### 4 CONCLUSÕES

Com base nos resultados encontrados, podemos concluir que os óleos essenciais de bergamota (*Citrus bergamia*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), capim limão (*Cymbopogon citratus*), cedro (*Cedrus atlantica*), eucalipto (*Eucalyptus globulus*), gengibre (*Zingiber officinale*) e tomilho (*Thymus vulgaris*) apresentam atividade tripanocida *in vitro* contra tripomastigotas de *T. evansi*.

No entanto, quando comparados entre si e com o aceturato de diminazeno, os óleos essenciais de *C. zeylanicum*, *E. globulus*, *Z. officinale* e *T. vulgaris* demonstraram maior eficácia *in vitro* contra tripomastigotas de *T. evansi*.

Neste estudo foi claramente demonstrado o potencial dos óleos essenciais como tripanocidas, todavia são necessários estudos subsequentes avaliando os compostos dos óleos essenciais e também a atividade tripanocida *in vivo*.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy**. Allured Publishing Corporation, Illinois USA. 1995. p. 456.
- ADMINISTRATION DES EAUX ET FORETS ET DE LA CONSERVATION DES SOLS). **Bilan de la compagne des reboisements**. Ministère de l’Agriculture et de la Réforme Agraire, Rabat, Morocco. 1995.
- AMANTEA, D. et al. Prevention of glutamate accumulation and upregulation of phospho-Akt may account for neuroprotection afforded by bergamot essential oil against brain injury induced by focal cerebral ischemia in rat. **International Review of Neurobiology**, v. 85, p. 389–405, 2009.
- ANDRADE, M. A. et al. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 43, n. 2, p. 399-408, 2012.
- ANDRADE, M. A. **Óleos essenciais de Cinnamodendron dinisii schwacke e Siparuna guianensis aublet: composição química, caracterização das estruturas secretoras e avaliação do potencial biológico**. 2013. 227p. Tese (Área de concentração: Agroquímica) – Curso de Pós Graduação em Agroquímica, Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, 2013.
- ANSCHAU, V. **Estresse oxidativo e parâmetros hematológicos como biomarcadores da infecção experimental com *Trypanosoma evansi* em ratos Wistar**. 2011. 94 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Estado de Santa Catarina, SC, 2011.
- AQUINO, L. P. C. T. et al. Clinical, parasitological and immunological aspects of experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 255-260, 1999.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 14<sup>a</sup> ed. Virgínia, 1984.
- ASTANI, A. et al. Screening for antiviral activities of isolated compounds from essential oils. **Evidence-Based Complementary and Alterantive Medicine**, n. 3, p. 1-8, 2009.
- ATARHOUCHE, T. et al. Camel trypanosomosis in Morocco 1: results of a first epidemiological survey. **Veterinary Parasitology**, v. 111, n. 4, p. 277-286, 2003.
- BAGETTA, G. et al. Neuropharmacology of the essential oil of bergamot. **Fitoterapia**, v. 8, p. 453–61, 2010.
- BAKKALI F. et al. Biological effects of essential oils—a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.

BALDISSERA, M. D. et al. Using of essential oils in the treatment of mice infected with *Trypanosoma evansi*. **Rev.MVZ**, v. 19, n. 2, p. 4109-4115, 2014.

BALDISSERA, M. D. et al. *In vitro* and *In vivo* action of terpinen-4-ol,  $\gamma$ -terpinene and  $\alpha$ -terpinene against *Trypanosoma evansi*. **Experimental Parasitology**, v. 162, p. 43-48, 2016.

BALTZ, T. et al. Cultivation in a semi-defined medium of animal infective forms of *Trypanosoma brucei*, *T. equiperdum*, *T. evansi*, *T. rhodesiense* and *T. gambiense*. **EMBO Journal**, v. 4, p. 1273-1277, 1985.

BANDONI, A. L.; CZEPACK, M. P. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil**. Vitória: Edufes, 2008. 624p.

BARRIGA, O. O. The class mastigophora or flagellates. In: \_\_\_\_\_. **Veterinary parasitology for practioners**. 2nd ed. Minnessota: Burgers International Group. cap. 25, p. 25.1-25.12, 1997.

BAZZOLI, R. S. et al. Transmissão oral de *Trypanosoma evansi* em cães. **ARS Veterinária, Jaboticabal**, v. 18, n. 2, p. 148-152, 2002.

BENABID, A. **Flore et cosystèmes du Maroc**. Éditions Ibis Press, Paris, France. 2000.

BISHT, L.S.B. et al. Comparative study of herbal agents used for fumigation in relation to Formalin. **Ancient Science of Life**, v. 28, n. 2, p. 125–132, 1988.

BIZZO, H. et al. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BOLIGON, A. A. et al. Antioxidant and antimicrobial properties of *Guzuma ulmifolia* essential oil. **American Journal of Essential Oils and Natural Products**, v. 1, p. 23-27, 2013.

BORST, P. et al. Kinetoplast DNA of *Trypanosoma evansi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 23, p. 31-38, 1987.

BRANDÃO, L. P. et al. Infecção Natural pelo *Trypanosoma evansi* em cão – Relato de caso. **Clínica Veterinária**, v. 7, p. 23-26, 2002.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. **Resolução - RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 30 out. 2016.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Departamento de Fiscalização de Insumos Pecuários Coordenação de Fiscalização de Produtos Veterinários. **Ato 02/2016 – CPV/DFIP**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em 13 fev. 2017.

BRENDER, G. C. et al. **Veterinary applied pharmacology & therapeutics**, 5 rd End. ToroBallière Tindall/Saunders, 1991.

- BROOKER, D. J. et al. Single case evaluation of the effects of aromatherapy and massage on disturbed behaviour in severe dementia. **Br J Clin Psychol**, v. 36, p. 287–96, 1997.
- BRUN, R. et al. *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). **Veterinary Parasitology**, v. 79, p. 95–107, 1998.
- BUCHBAUER G. **Handbook of Essential oils. Science, Technology and Applications**, (Eds: K.H.C. Baser, G. Buchbauer), CRC Press, Taylor & Francis, Boca Raton, London, New York, 2010, p. 235-280.
- CARMELLI, C. et al. Effect of Eucalyptus Essential Oil on Respiratory Bacteria and Viruses. **Current microbiology**, v. 56, n. 1, p. 89-92, 2008.
- CARREIRA, J. C. **Sanguessugas podem transmitir o mal das cadeiras, doença de equinos que tem grande importância econômica no Brasil**. Disponível em: <[http://www.fiocruz.br/ccs/novidades/abr05/sanguessuga\\_adr.htm](http://www.fiocruz.br/ccs/novidades/abr05/sanguessuga_adr.htm)>. Acesso em: 15 set. 2016.
- CASTRO, H. G. et al. Avaliação do teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.) em diferentes épocas de colheita. **Rev. Ciênc. Agron.**, v. 41, n. 2 p. 308-314, 2010.
- CASTRO, N. E. A. **Caracterização fitoquímica de óleos essenciais de eucalipto e seu efeito sobre o protozoário tripanossomatídeo *Herpetomonas samuelpessoai***. 2006. 97p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade federal de Lavras, MG, 2006.
- COLPO, C. B., et al. Infecção Natural por *Trypanosoma evansi* em cão no Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 35, p. 717-719, 2005.
- CONRADO, A. C. et al. Infecção natural por *Trypanosoma evansi* em cavalos na região central do Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 35, p. 928-931, 2005.
- COSTA, A. F. **Farmacognosia**. Vol I, Fundação Calouste Gulbenkian (3ª ed.), Lisboa. 1975. 295 p.
- CRUZ, J. M. et al. Anti-oxidant activity of isolates from acid hydrolysates of *Eucalyptus globulus* wood. **Food Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 503-511, 2005.
- CUNHA, A. P.; ROQUE, O. R. **Aromaterapia - Fundamentos e Utilização**, Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian. 2013.
- CURY, L. P. et al. Antigenic characterization of *Trypanosoma evansi* using sera from experimentally and naturally infected bovines, equines, dogs, and coatis. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 19, n. 2, p. 112-118, 2010.
- DALLA ROSA, L. et al. Cordycepin (3'-deoxyadenosine) pentostatin (deoxycoformycin) combination treatment of mice experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. **Parasitology**, v. 1, p. 1-9, 2012.

- DA SILVA, A.S. et al. Aceturato de diminazeno e dipropionato de imidocarb no controle de infecção por *Trypanosoma evansi* em *Rattus norvegicus* infectados experimentalmente. **Ciência Rural**, v. 38, p. 1357-1362, 2008.
- DA SILVA, A.S. et al. Trypanocidal activity of human plasma on *Trypanosoma evansi* in mice. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 21, n. 1, p. 55-59, 2012.
- DÁVILA, A. M. R. et al. The seroprevalence of equine trypanosomosis in the Pantanal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 199-202, 1999.
- DELAFOSSÉ, A.; DOUTOUM, A. A. Prevalence of *Trypanosoma evansi* infection and associated risk factors in camels in eastern Chad. **Veterinary Parasitology**, v. 119, n. 2-3, p. 155-164, 2004.
- DELAMARE, A. P. L. et al. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in south Brazil. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 603-608, 2007.
- DESQUESNES, M. et al. *Trypanosoma evansi* and surra: a review and perspectives on transmission, epidemiology and control, impact, and zoonotic aspects. **Bio Med. Res. Int.**, v. 2013, 20 p., 2013.
- DHAR, R. et al. Effect of volatiles from neem and other natural products on gonotrophic cycle and oviposition of *Anopheles stephensi* and *An. Culicifacies* (Diptera: Culicidae). **Journal Medical Entomology**, v. 33, p. 195-201, 1996.
- DIKSHIT, A.; DIXIT, S.N. Cedrus oil: a promising antifungal agent. **Indian Perfumery**, v. 26, n. 2-4, p. 216-227, 1982.
- DÖRSAM, B. et al. The eucalyptus oil ingredient 1,8 cineol induces oxidative DNA damage. **Arch Toxicol**, v. 89, p. 797-805, 2015.
- DUGO, P. et al. LC-MS for the identification of oxygen heterocyclic compounds in citrus essential oils. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p. 147-54, 2000.
- ESSAWI, T.; SROUR, M. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. **Journal Ethnopharmacology**, v. 70, p. 343, 2000.
- FACCIO, L. et al. Relationship between testicular lesion and hormone levels in male rats infected with *Trypanosoma evansi*. **An Acad Bras Cienc**, v. 86, n.3, p. 1537-1546, 2014.
- FALLIS, A. M. Discoverer of the first pathogenic trypanosome - Griffith Evans 1835-1935. **Canadian Veterinary Journal**, v. 27, p. 336-338, 1986.
- FARMACOPEA UFFICIALE DELLA REPUBBLICA ITALIANA. X Edizione. **Istituto Poligrafico e Zecco dello Stato**. Roma, v. 1, p. 206-210, 1998.
- FERREIRA, A. R. A. **Uso de óleos essenciais como agentes terapêuticos**. 2014. 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014.

FRANCISCATO, C. et al. Dog naturally infected by *Trypanosoma evansi* in Santa Maria, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, n. 1, p. 288-291, 2007.

FRANKE, C. R. et al. Investigations on naturally occurring *Trypanosoma evansi* infections in horses, cattle, dogs and capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) in Pantanal de Pocone (Mato Grosso, Brazil). **Acta Tropica**, v.58, p. 159-169, 1994.

FRAZER, H.; SYMONDS, S. L. Surra in federated Malay states. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, v. 22, p.185-192, 1909.

GARDINER, P.R.; MAHMOUD, M.M. **Salivarian trypanosomes causing disease in Livestock Outside Sub-Saharan Africa Parasitic Protozoa**. New York: Academic Press, 1990. 68 p.

GIBSON, W. African trypanosomosis. In: \_\_\_\_ **Zoonoses. Biology, clinical practice, and public health control**. New York: Oxford University Press, cap. 41, p. 501-512, 1998.

GILLINGWATER, K. et al. *In vitro* activity and preliminary toxicity of various diamidine compounds against *Trypanosoma evansi*. **Veterinary Parasitology**, v. 169, p. 264-272, 2010.

GOBBO-NETO, L; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, mar/abr. 2007.

GOMES-CARDOSO, L. et al. Amidine derivatives are highly effective against *Trypanosoma evansi* trypomastigotes. **Microbios**, v. 100, p. 181-187, 1999.

GONZÁLEZ, F. H. D; SILVA, S. C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. UFRGS, Porto Alegre, 2006, 198 p.

HABILA, N. et al. Pathogenic mechanisms of *Trypanosoma evansi* infections. **Research in Veterinary Science**, v. 93, p. 13–17, 2012.

HAFFIZ, M. et al. Chemical composition and in vitro antitrypanosomal activity of fractions of essential oil from *Cymbopogon nardus* L. **Tropical Biomedicine**, v. 30, p. 9–14, 2013.

HARVEY, A.L. Natural products as a screening resource. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.11, p.480-484, 2007.

HERRERA, H. M. et al. *Trypanosoma evansi* experimental infection in South american coati (*Nasua nasua*): clinical, parasitological and humoral immune response. **Veterinary Parasitology**, v. 102, p. 209-216, 2001.

HERRERA, H. M. et al. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 125, p. 263-275, 2004.

HOARE, C. A. **The Trypanosomes of Mammals: A Zoological Monograph**. Oxford: Blackwell, 1972. 749p.

- HOLETZ, F. B. et al. Effect of plant extractus in folk medicine on cell growth na d differentiation of *Herpetomonas samuelpessoai* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) cultivated in defined médium. **Acta Scientiarum**, v.24, n.3, p.657-662, 2002.
- HUDAIB, M. et al. Evaluation of thyme (*Thymus Vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 29 p. 691–700, 2002.
- IZUMI, E. **Efeitos do óleo de copaíba e constituintes em Trypanosoma cruzi**. 2010. 93 p. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 2010.
- JAKIEMIU, E. A. R. **Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de tomilho (*Thymus vulgaris* L.)**. 2008. 90 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- JENNINGS, F.W. et al. The relationship between duration of infection with *T. brucei* in mice and the efficacy of chemotherapy. **Parasitology**, v.75, p.145–153, 1977.
- JOSHI, P. P. et al. Human trypanosomosis caused by *Trypanosoma evansi* in India: the first case report. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, p. 491-495, 2005.
- KAMINSKY, R. et al. Susceptibility of dyskinetoplastic *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum* to isometamidium chloride. **Parasitol Res**, v. 83, p. 816-818, 1997.
- KAPOVIESSI, S. et al. Chemical composition, cytotoxicity and *in vitro* antitrypanosomal and antiplasmodial activity of the essential oils of four Cymbopogon species from Benin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, p. 652–659, 2014.
- KHORY, R. N.; KATRAK, N. N. **Materia medica of India and their therapeutics**. Delhi: Neeraj Publishing House, 1903.
- KIRTIKAR, B.; BASU, E. **Indian medicinal plants**. Dehra Dun: Bishen Singh Mahendra Pal Singh, 1975.
- KLEIN, F. et al. Slowly sedimenting serum components reacting with anti-IgM. **Immunology**, v. 13, p. 641-647, 1967.
- KUBIAK, G. V. L.; MOLFI, A. **Tripanosomíase equína (Mal das Cadeiras)**. Boletim n.33. Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas do Estado do Paraná. Tip. João Haupt & Cia. Ltda. – Curitiba, 51 p., 1954.
- LARSEN, K. et al. **Gingers of Peninsular Malaysia and Singapore**. Singapore: Natural history publications (Borneo), 1999. 135 p.
- LEE, C. L. et al. Influenza A (H1N1) antiviral and cytotoxic agents from *Ferula assa-foetida*. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 1568-1572, 2009.

- LEMOS, K. R. et al. Immunohistochemical characterization of mononuclear cells and MHC II expression in the brain of horses with experimental chronic *Trypanosoma evansi* infection. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 16, n. 4, p. 186-192, 2007.
- LEVINE, N. D. **Protozoan parasites of domestic animals and of man**. 2nd ed. Minneapolis: Burgess Publishing Company, p. 406, 1973.
- LOSOS, G. J; CROCKETT, E. **Toxicity of beril in the dog**. Veterinary Record, v. 85, 196 p., 1969.
- LUCKINS, A. G. Et al. Comparison of the diagnostic value of serum immunoglobulin levels, an enzyme-linked immunosorbent assay and a fluorescent antibody test in experimental infections with *Trypanosoma evansi* in rabbits. **Ann. trop. Med. Parasit.**, v. 72, p. 429-441, 1978.
- LUCKINS, A. G. et al. Dourine. In: \_\_\_\_ **Infectious diseases of livestock**. 2nd ed. South Africa: Oxford University Press. v. 1, p. 297-304, 2004.
- LUN, Z. R.; DESSER, S. S. Is the broad range of hosts and geographical distribution of *Trypanosoma evansi* attributable to the loss of maxicircle kinetoplast DNA? **Parasitology Today**, v. 11, n. 4, p. 131-133, 1995.
- MACHADO, B. F. M.; JUNIOR, A. F. Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. **Cad. acad.**, v. 3, n. 2, p. 105-127, 2011.
- MASOCHA, W. et al. Migration of African Trypanosomes across the blood-brain barrier. **Physiology & Behavior**, v. 92, 110-114, 2007.
- MAUDLIN, I. **The Trypanosomiasis**. Wallingford: CABI Publishing. 2004. 640p.
- MCGUFFIN, M. et al. **American herbal products association botanical safety handbook**. Boca Raton: CRC press; 1997.
- MERRIL, C. R. et al. Simplified silver protein detection and image enhancement methods in poly-acrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 3, p. 17– 23, 1982.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Ato 02/2016**.
- MIKUS, J. et al. *In vitro* effect of essential oils and isolated mono and sesquiterpenes on *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*. **Planta Med**, v. 66, p. 366–368, 2000.
- MONDELLO, L. et al. The composition of the coumarins and psoralens of calabrian bergamot essential oil (*Citrus bergamia* Risso). **Flavour and Fragrance Journal**, v. 8, p. 17–24, 1993.
- MONTANARI, R. M. **Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais de espécies de Anacardiaceae, Siparunaceae e Verbenaceae**. 2010. 173. Tese (Doutorado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2010.



- MONTEIRO, S. G. **Parasitologia na Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro: Roca, 2011. 370 p.
- MONZOTE, L. et al. Antiprotozoal activity of essential oils. **Agric. conspec. sci.**, v. 77, n. 4, p. 167-175, 2012.
- MOREIRA, R. D.; MACHADO, R. Z. Identificação e isolamento do *Trypanosoma equinum* em um cão do município de Camapuã-MS. In: \_\_\_\_ **Encontro de Pesquisas Veterinárias**. Resumos. v. 10, p. 66, 1985.
- NAVARRO, V. et al. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 53, n. 3, p. 143-147, 1996.
- NEWMAN, D. J. et al. Natural products as sources of new drugs over the period, 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1022-1032, 2003.
- NUNES, J. T. S. et al. Occurrence of *Trypanosoma evansi* in horses in the state of Minas Gerais, Brazil. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, n. 4, p. 205-207, 2012.
- NUNES, V. L. B. et al. Investigação epidemiológica sobre *Trypanosoma* (Trypanozoon) *evansi* no Pantanal Sul-Mato-Grossense. Estudo de reservatórios. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 2, p. 41-44, 1993.
- OGUNDELE, F. A., et al. Semen characteristics and reaction time of Yankasa rams experimentally infected with *Trypanosoma evansi* infection. **Theriogenology**, v. 86, p. 667-673, 2016.
- OKOH, O. O. et al. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. **Food Chemistry**, v. 120, p. 308-312, 2010.
- OLIVEIRA, C. B. **Aceturato de diminazeno lipossomal no tratamento da infecção por trypanosoma evansi: testes in vitro e in vivo**. 2014. 100p. Tese (Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva) – Curso de Pós Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2014.
- OLIVEIRA, M. M. M. et al. Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 13, n. 1, p. 8-16, 2011.
- OLIVEIRA, T. C. G. et al. Estudo sorológico de infecções experimentais por *Trypanosoma evansi*, em cobaias. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 31, p. 95-99, 1989.
- ORAFIDIYA, L. O. et al. Studies on the acute and sub-chronic toxicity of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. leaf. **Phytomedicine**, v. 11, p. 71-76, 2004.
- PAYS, E. et al. The trypanolytic factor of human serum. **Nat Rev Microbiol**, v. 4, p. 477-486, 2006.

PEREGRINE, A. S. Chemotherapy and delivery systems: haemoparasites. **Veterinary Parasitology**, v. 54, p. 223–248, 1994.

PÉREZ-MORGA D., et al. Apolipoprotein L-I promotes trypanosome lysis by forming pores in lysosomal membranes. **Science**, v. 309, p. 469-472, 2005.

PICHERSKY, E.; GANG, D. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. **Trends in Plant Science Perspectives**, v. 5, p.439-445, 2000.

PINA-VAZ, C. et al. Antifungal activity of Thymus oils and their major compounds. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 18, p. 73, 2004.

PORTO, B. C. Z. **Atividade ovicida e larvicida de óleos essenciais em *Sarconesia chlorogaster* (Diptera: Calliphoridae)**. 2015. 60 p. Dissertação. (Mestrado em Farmacologia) – Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2015.

RADOSTITS, O. M. et al. Doenças causadas pelos protozoários. In: \_\_\_\_ **Clínica Veterinária: Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p. 1156-1202, 2002.

RADÜNZ, L. L. **Efeito da temperatura do ar de secagem no teor e na composição dos óleos essenciais de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) e hortelã-comum (*Mentha x villosa* Huds)**. 2004. 90 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Departamento de Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, MG, 2004.

RAJ, R. K. Screening of indigeneus plants for anthelmintic action against human *Ascaris lumbricoides*: part II. **Indian Journal Physiologic and Pharmacology**, v. 19, n. 1, 1975.

RAMIREZ, L. E., et al. **La tripanosomiasis in los animals domesticos em Colombia**. Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1979.

ROCHA, M. E. N.; SANTOS, C. L. O uso comercial e popular do eucalipto *Eucalyptus globulus* Labill- Myrtaceae. **Saúde & Ambiente em Revista**, v. 2, n. 2, p. 23-34, 2007.

RODRIGUES, A. et al. Outbreaks of trypanosomiasis in horses by *Trypanosoma evansi* in the state of Rio Grande do Sul, Brazil: epidemiological, clinical, hematological, and pathological aspects. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, p. 239-249, 2005.

RODRIGUES, R. P. S. et al. Análise epidemiológica, clínica e patológica da tripanossomíase “Mal das Cadeiras”. **PUBVET**, v. 10, n. 2, p.118-124, 2016.

ROSA, M. S. S. et al. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 47, p. 1895–1901, 2003.

SAEIDNIA, S. et al. Biogenic trypanocidal sesquiterpenes: lead compounds to design future trypanocidal drugs – a mini review. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.21, n. 35, p. 1-9, 2013.

- SAIYUDTHONG, S.; MARSDEN, C.A. Acute effects of bergamot oil on anxiety-related behaviour and corticosterone level in rats. **Phytotherapeutic Research**, v. 25, p. 858–62, 2011.
- SAKURADA, T. et al. Intraplantar injection of bergamot essential oil into the mouse hindpaw: effects on capsaicin-induced nociceptive behaviors. **International Review Neurobiology**, v. 85, p. 237–48, 2009.
- SAKURADA, T. et al. Intraplantar injection of bergamot essential oil induces peripheral antinociception mediated by opioid mechanism. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 97, n. 436–43, 2011.
- SALARI, M. H. et al. Antibacterial effects of *Eucalyptus globulus* leaf extract on pathogenic bacteria isolated from specimens of patients with respiratory tract disorders. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. 2, p. 194-196, 2006.
- SANGWAN N. S. et al. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**. v. 34, p. 3–21, 2001.
- SANLA-EAD, N. et al. Antimicrobial activity of cinnamaldehyde and eugenol and their activity after incorporation into cellulose-based packaging films. **Packing Technology and Science**, v. 25, p. 7-17, 2012.
- SANTORO, G. F. et al. Effect of oregano (*Origanum vulgare L.*) and thyme (*Thymus vulgaris L.*) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. **Parasitol Res**, v. 100, p. 783–790, 2007.
- SANTOS, R. C. V. et al. Antimicrobial activity of tea tree oil nanoparticles against American and European foulbrood diseases agents. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 17, n. 3, p. 343-347, 2014.
- SÁ RODRIGUES, R. P. et al. Análise epidemiológica, clínica e patológica da tripanossomíase “Mal das Cadeiras”. **PUBVET**, v.10, n. 2, p. 118-124, 2016.
- SEILER, R. J. et al. Meningoencephalitis in naturally occurring *Trypanosoma evansi* infection (Surra) of horses. **Veterinary Pathology**, v. 18, n. 1, p. 120- 122, 1981.
- SHUKLA, Y.; SINGH, M. Cancer preventive properties of ginger: A brief review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 5, p. 683–690, 2007.
- SIKKEMA-GUIMARÃES, D. A.; FARIA, A. R. Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n. 3, p. 455-465, 2007.
- SILVA, A. S. et al. Infecção via oral por *Trypanosoma evansi* em animais de laboratório. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p.897-900, 2007.
- SILVA, A. S. et al. Aceturato de diminazeno no tratamento de equinos infectados naturalmente por *Trypanosoma evansi* no município de Cruz Alta – RS, Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, n. 1, p. 74-79, 2009.

SILVA, J. et al. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, n. 2-3, p. 277-283, 2003.

SILVA, R. A. M. S. et al. Outbreak of trypanosomosis due to *Trypanosoma evansi* in horses of Pantanal Mato-grossense, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 60, p. 167-171, 1995.

SILVA, R. A. M. S. et al. ***Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax* – Biologia, Diagnóstico e Controle**. Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/Livro015, 2002>>. Acesso em 15 set. 2016.

SILVEIRA, S. M. et al. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Eucalyptus paniculata* (eucalipto) e *Lavandula angustifolia* (lavanda). **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 71, p. 471-480, 2012.

SIMÕES, C. M. D. O. et al. **Farmacognosia: daplanta ao medicamento**. 6<sup>th</sup> ed. Porto Alegre: UFSC/UFRGS, 2007. 1104 p.

SPINOSA, H. S. et al. **Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 692 p, 1999.

STOILOVA, I. et al. Antioxidant activity of a ginger extract (*Zingiber officinale*). **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p. 764–770, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 5<sup>a</sup> ed. E.U.A.: Sinauer Associates, Inc. pp.369-400.

TAKAHASHI, T. et al. Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculata*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 60-64, 2004.

TANIDA, M. et al. Olfactory stimulation with scent of essential oil of grapefruit affects autonomic neurotransmission and blood pressure. **Brain Research**, n. 1058, n. 1-2, p. 44-55, 2005.

TCHOUMBOUGNANG, F. et al. *In vitro* antimalarial activity of essential oils from *Cymbopogon citrates* and *Ocimum gratissimum* on mice infected with *Plasmodium berghei*. **Planta Medica**, v. 71, p. 20–23, 2005.

THOMSON, M. et al. The use of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) as a potential antiinflammatory and antithrombotic agent. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 67, n. 6, p. 475–478, 2002.

TUNTASUVAN, D. et al. Cerebral trypanosomiasis in native cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 73, n. 3-4, p. 357-363, 1997.

TUNTASUVAN, D. et al. Detection of *Trypanosoma evansi* in brains of the naturally infected hog deer by streptavidine-biotin immunohistochemistry. **Veterinary Parasitology**, v. 87, n. 2-3, p. 223-230, 2000.

TUNTASUVAN, D., et al. Chemotherapy of Surra in horses and mules with diminazene aceturate. **Veterinary Parasitology**, v. 110, p. 227-233, 2003.

TUNTASUVAN, D.; LUCKINS, A. G. Status of Surra in Thailand. **Journal of the Tropical Medicine and Parasitology**, v. 21, n. 2, p. 1-8, 1998.

UEDA-NAKAMURA, T. et al. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitology International**, v. 55, p. 99–105, 2006.

URQUHART, G. M. et al. Veterinary protozoology. In: \_\_\_\_\_ **Veterinary Parasitology**. 2nd ed. Oxford: Blackwell Science, 1996. p. 207-255.

VANHOLLEBEKE, B., et al. Human *Trypanosoma evansi* infection linked to a lack of apolipoprotein LI. **New England Journal of Medicine**, v. 355, p. 2752-2756, 2006.

VENTURA R.M., et al. Genetic relatedness among *Trypanosoma evansi* stocks by random amplification of polymorphic DNA and evaluation of a synapomorphic DNA fragment for species-specific diagnosis. **Int. J. Parasitol**, v. 32, p. 53-63, 2002.

WELLS, E. A. Animal trypanosomiasis in south America. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 2, p. 31-41, 1984.

WINK, M.; NIBRET, E. Trypanocidal and anti luekaemic effect of the essential oils of *Hagenia abyssinica*, *Leonotis ocymifolia*, *Moringa stenopetala*, and their main individual constituents. **Phytomedicine**, v. 17, p. 911–920, 2010.

## ANEXO A

Tabela 1. Compostos dos óleos essenciais.

Componentes	Bergamota	Canela	Capim limão	Cedro	Eucalipto	Gengibre	Tomilho
$\alpha$ -cadinene							0.17
$\alpha$ -thujene	0.15	0.31					0.75
$\alpha$ -pinene	1.48	1.54			2,78		1.62
$\alpha$ -camphene	0.07						1.23
$\beta$ -pinene	5.36	0.36				0.05	0.57
$\beta$ -myrcene	2.48	0.73					0.34
$\alpha$ -terpinene	0.15	0.07					1.27
p-cymene	0.28	0.42		1.06	1,76	0.36	20.18
1.8 cineole		1.14			80,75	4.25	0.95
camphor		8.12					0.18
$\gamma$ -terpinene	6.45	0.25					1.45
Linalool	13.05	13.05	0.94	1.70	0,98	0.79	1.11
Borneol				1.46		1.61	0.71
Terpin-4-ol						0.87	1.09
$\alpha$ -terpineol	0.93	0.13					2.43
thymol							49.27
carvacrol							11.86
Thymol acetate							0.09
$\beta$ -caryophyllene	0.20	3.10		13.74			2.57
germacreno D	0.11	0.46		0.19		2.32	0.25
$\alpha$ -humelene	0.09	0.39					0.39
Caryophyllene oxide	0.18	0.51	1.47				0.41
Geranil propionato							0.08
camphene		0.09				4.87	
sabinene	1.09	1.78					
$\alpha$ -phellandrene		0.51				7.19	
limonene	30.17	3.00			9,14		
Trans- cinnamaldehyde		0.29					
cinnamaldehyde		41.27					
$\alpha$ -cubebene		3.16					
eugenol		7.03					
$\alpha$ -copaene		0.16				2.85	
Methyl eugenol		10.87					
aromadendrene		0.71					
$\beta$ -bisabolene	1.05	0.07					
$\gamma$ -bisabolene	0.32	0.24					
$\alpha$ -cadinol		0.09					
Citronellal	2.81		2.76		1,54		

Neral	5.62	31.75	
Linalyl acetate	24.67		
Geranial	0.49	46.51	12.09
Citronellyl acetate	0.13		
Neryl acetate	0.61		
Geranyl acetate	0.17	0.56	
$\gamma$ -Elemene	0.45		1.53
Trans- $\alpha$ -bergamotene	1.36		
Decanone			0.35
Nerol			1.09
Geraniol		1.83	0.16
Decanal			0.54
$\beta$ -Elemene			0.42
Aromandrene		4.81	1.25
$\gamma$ -Himachalene		0.57	1.37
$\gamma$ -Muurolene		1.13	0.29
Ar-Curcumene			10.88
$\alpha$ -Zingiberene			26.47
(E,E)- $\alpha$ -farnesene			4.61
$\beta$ -esquiphellandrene			7.68
Z-nerolidol			0.45
Elemol			0.77
$\alpha$ -Eudesmol		2.07	0.04
$\beta$ -Phellandrene		0.25	
Isoborneol		3.68	
Naphthalene		2.03	
Bornyl acetate		0.81	
$\alpha$ -Longipinene		0.58	
$\alpha$ -Ylangene		1.29	
Isodene		0.94	
Isolongifolene		1.73	
Longifolene		2.87	
$\alpha$ -Gurjunene		3.96	
$\alpha$ -Cedrene		7.43	
$\alpha$ -Guaiene		1.64	
$\alpha$ -Himachalene		19.74	
$\delta$ -Gurjunene		2.49	
Calamenene		0.67	
$\gamma$ -Cadinene		1.82	
$\alpha$ -Calacorene		3.27	
Viridiflorol		4.36	
$\beta$ -himachalene oxide		5.60	
Cubenol		1.91	
Myrcene		11.58	

(Z)- $\beta$ -Ocimene									0.47
Menth-3-em-8-ol									0.25
2-Undecanone									0.19
E-Caryophyllene									1.47
<b>Total %</b>	<b>99,92</b>	<b>99,94</b>	<b>98,79</b>	<b>96,38</b>	<b>96,91</b>	<b>99,37</b>	<b>99,97</b>		