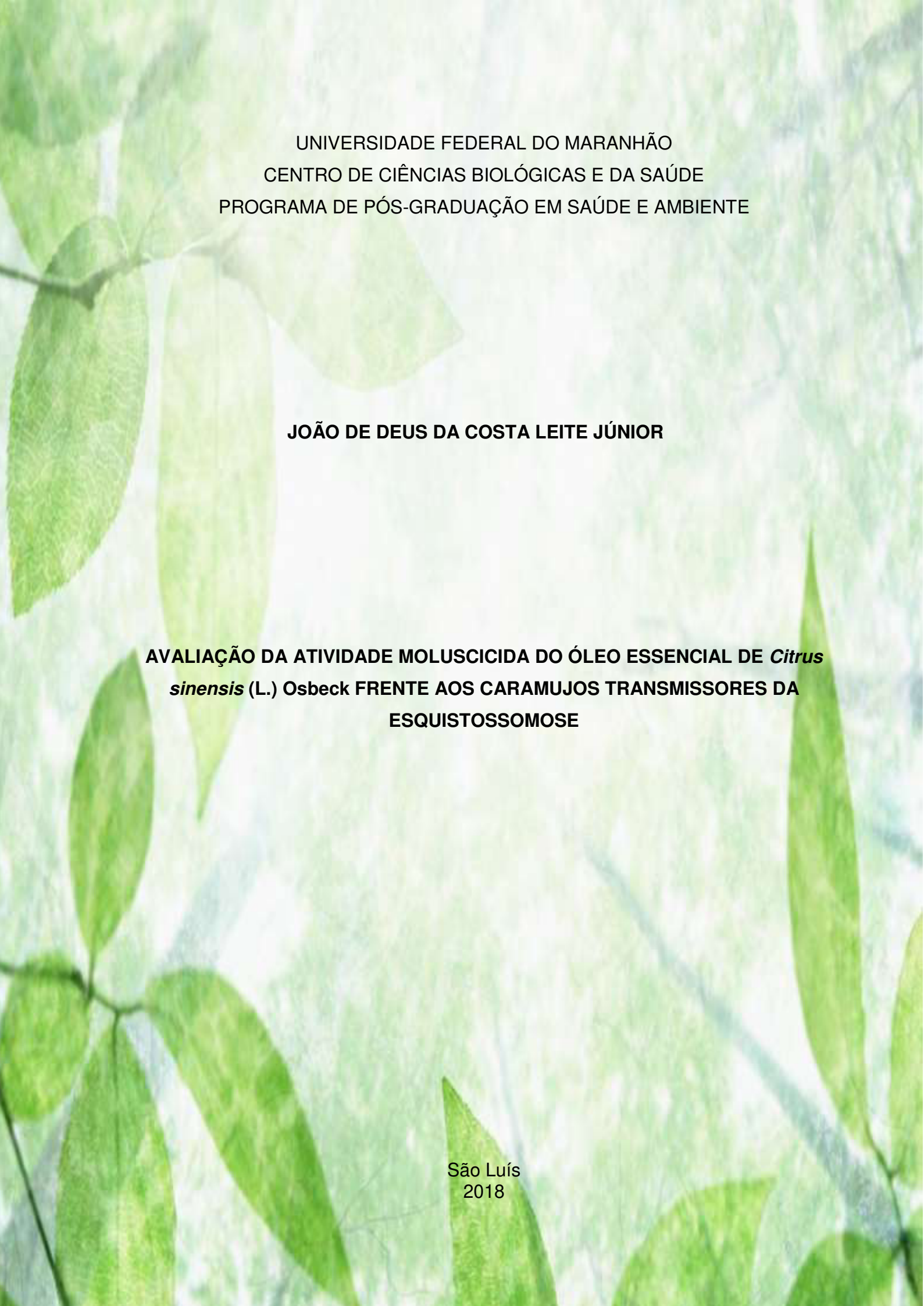


The background of the entire page is a soft-focus photograph of green leaves, likely from a citrus tree, with some leaves in sharp focus and others blurred, creating a natural and fresh aesthetic.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

JOÃO DE DEUS DA COSTA LEITE JÚNIOR

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MOLUSCICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus sinensis* (L.) Osbeck FRENTE AOS CARAMUJOS TRANSMISSORES DA ESQUISTOSSOMOSE

São Luís
2018

JOÃO DE DEUS DA COSTA LEITE JÚNIOR

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MOLUSCICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus sinensis* (L.) Osbeck FRENTE AOS CARAMUJOS TRANSMISSORES DA ESQUISTOSSOMOSE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente da Universidade Federal do Maranhão para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho.

Coorientadora: Prof^a. Dra. Denise Fernandes Coutinho.

Área de concentração: Saúde das Populações.

São Luís
2018

JOÃO DE DEUS DA COSTA LEITE JÚNIOR

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MOLUSCICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus sinensis* (L.) Osbeck FRENTE AOS CARAMUJOS TRANSMISSORES DA ESQUISTOSSOMOSE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do título de Mestre em Saúde e Ambiente.

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho (Orientador)
Doutor em Química
Universidade Federal do Maranhão

Prof^a. Dra. Adenilde Nascimento Mouchrek
Doutora em Ciências dos Alimentos
Universidade Federal do Maranhão

Prof^a. Dra. Ivone Garros Rosa
Doutora em Bioquímica
Universidade Federal do Maranhão

Prof^a. Dra. Débora Luana Ribeiro Pessoa
Doutora em Biotecnologia
Universidade Federal do Maranhão

À minha família, meus pais, João de Deus e Maria Messias, pela minha formação pessoal e profissional. Aos meus irmãos, Mário Lúcio e Paulo Ricardo, pelo apoio mesmo que à distância.

À minha esposa, Aniele Simões Costa, pela compreensão nos momentos ausentes e no suporte na atenção com nossos filhos, João Hélio e Maria Julia, nossa herança e frutos de amor puro e verdadeiro.

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, pela sua proteção e por permitir que os meus sonhos coincidam com a sua vontade celestial.

A minha família como um todo, em especial aos meus pais, peças fundamentais do meu alicerce como ser humano, pela formação do meu caráter e por todo o suporte emocional e financeiro que me deram ao longo da minha vida.

A minha esposa e filhos, pelo seu amor, paciência e tolerância nos meus momentos de ausência ao conciliar as minhas atividades acadêmicas com a minha vida profissional.

Aos meus amigos, pela força em algumas etapas da realização desse trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Saúde e Ambiente e sua coordenação, representada pela professora Dra. Denise Fernandes Coutinho Moraes, por todos os conhecimentos compartilhados.

A turma 13, pelo companheirismo.

A toda equipe do Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada (NIBA), em especial a professora Dra. Ivone Garros, professor Walbert, Aline, Karla, Edna, pelo suporte, parceria e acolhimento incondicionais sempre quando precisei.

A toda equipe do Pavilhão tecnológico, com especial afeição ao meu orientador professor Dr. Victor Mouchrek Filho, por sua sabedoria, paciência e disponibilidade. Ao Rayone, Dionney, Ana Patrícia e Gilson (mesmo à distância), pelo apoio e suporte em meio aos seus afazeres.

Muito obrigado!

“A responsabilidade de todos é o único caminho para a sobrevivência humana.”

Dalai Lama

RESUMO

A esquistossomose mansônica é uma doença endêmica infecto-parasitária causada pelo *Schistosoma mansoni*. Segundo a Organização Mundial de Saúde uma das formas de combate dessa doença é o controle da população de moluscos do gênero *Biomphalaria*, vetores intermediários da doença. Considerando a importância da descoberta de novas substâncias que apresentem potencial moluscicida esta pesquisa fez um estudo do óleo essencial das cascas da espécie *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. O óleo essencial foi extraído por meio da técnica de hidrodestilação, determinando-se as propriedades físico-químicas e o teor dos componentes majoritários e minoritários pela técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Os caramujos utilizados nos testes foram coletados no bairro do Sá Viana nos meses de fevereiro e agosto de 2017, após a identificação de acordo com metodologia adotada os moluscos foram submetidos aos testes de positividade para infecção pelo *Schistosoma mansoni*. O óleo foi testado como agente moluscicida e quanto a sua toxicidade (ensaio de letalidade com *Artemia salina*), utilizando o critério de Dolabela, através de técnica preconizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Os resultados mostraram um rendimento (m/m) de 0,7 %, comparando os valores das propriedades físico-químicas do óleo essencial estudado com os da literatura, pode-se observar que há uma similaridade entre eles, no que diz respeito aos parâmetros analisados. As análises cromatográficas mostraram que o óleo possui 81,50 % de d-limoneno (constituente majoritário), no tempo de retenção (TR) de 7,6 min. O óleo estudado quanto à toxicidade foi considerado atóxico apresentando CL₅₀ de 511,6 µg/mL. A atividade moluscicida do óleo essencial obteve resultado referente à concentração letal de CL₅₀ e CL₉₀ de 83,33 µg/mL e 168,75 µg/mL, respectivamente. De acordo com os critérios da OMS (1983) o óleo estudado não é considerado ideal por apresentar valor da CL₉₀ maior que o estabelecido (100 µg/mL). Estudos como este revelam a importância da busca de compostos bioativos com atividade moluscicida no combate sustentável à esquistossomose enquanto doença negligenciada, uma vez poderá favorecer ao desenvolvimento biotecnológico por meio do conhecimento científico e do potencial econômico de espécies da flora maranhense.

Palavras-chave: Esquistossomose. Óleos voláteis. *Citrus sinensis*. Limoneno.

ABSTRACT

Schistosomiasis *mansoni* is an endemic infectious-parasitic disease caused by *Schistosoma mansoni*. According to the World Health Organization (WHO) one way to tackle this disease is through the population control of the *Biomphalaria* kind of snails, the disease intermediary vectors. Considering the importance of the discovery of new substances which present potencial molluscicide, this research has done a study on the essential oil from the peels of the *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. The essential oil was extracted through the hydrodistillation technique, physical-chemical properties and the amount of the major and minor components were determined through the gaschromatography technique coupled to mass spectrometry (CG-EM). The snails used in the tests were collected at Sá Viana neighborhood in February and August, 2017, after the identification according to the adopted methodology, the snails were submitted to positivity infection tests through *Schistosoma mansoni*. The oil was tested with respect to toxicity testing for lethality with *Artemia salina*), using Dolabela criterion, and as molluscicide agent through technique proposed by World Health Organization (WHO). The results show an output (m/m) of 0,7% compared to the values of the physical-chemical properties of the essential oil studied in the literature, it was observed that there are similarities among them, in regard to the parameters examined. The chromatography analyses showed that the oil has 81,50% of d-limonene (major component) in a retention time (TR) of 7,6 minutes. The studied oil, with respect to toxicity, was considered non-toxic presenting CL₅₀ of 511,6 µg /mL. The essential oil molluscicide activity had a result regarding a lethal concentration of CL₅₀ and CL₉₀ of 83,33 µg/mL and 168,75 µg/mL, respectively. According to the WHO criteria (1983) the studied oil is not considered ideal because it presents a bigger CL₉₀ value than what is established (100 µg/mL). Studies like this reveal the importance of bioactive compounds with molluscicide activity on the sustainable combat to schistosomiasis as it is a neglected disease, once been able to promote the biotechnological development through the scientific knowledge and the economical potencial of the Maranhão flora species.

Keywords: Schistosomiasis. Volatile oils. *Citrus sinensis*. Limonene.

LISTA DE FOTOGRAFIAS

Fotografia 1	-	Árvore de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck.....	31
Fotografia 2	-	Frutos de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck.....	32
Fotografia 3	-	Campus do IFMA.....	37
Fotografia 4	-	Extrator de Clevenger.....	38
Fotografia 5	-	Cascas frescas de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck.....	39
Fotografia 6	-	Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa.	40
Fotografia 7	-	Cultura de <i>Artemia salina</i> Leach.....	42
Fotografia 8	-	Criadouros de planorbídeos no bairro do Sá Viana.....	43
Fotografia 9	-	Coleta dos caramujos.....	43
Fotografia 10		Análises das características conquiliológicas e da morfologia interna.....	44
Fotografia 11	-	Exposição dos caramujos à luminosidade de lâmpadas de 60 W.....	45
Fotografia 12	-	Teste piloto em solução aquosa do óleo essencial de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck nas concentrações de 100, 150 e 200 µg/mL e dimetilsulfóxido (DMSO) 0,1%.....	46
Fotografia 13	-	Exsicata da espécie <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck.....	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Países e áreas de risco da esquistossomose no mundo.....	18
Figura 2	- Distribuição da esquistossomose, de acordo com a faixa de positividade, por município. Brasil, 2010-2015.....	20
Figura 3	- Ciclo de transmissão da Esquistossomose mansônica.....	22
Figura 4	- Ovos (a) e Miracídio (b) de <i>Schistosoma mansoni</i>	23
Figura 5	- Cercária de <i>Schistosoma mansoni</i>	23
Figura 6	- Espécies de caramujos <i>B. glabrata</i> (a), <i>B. straminea</i> (b) e <i>B.</i> <i>Tenagophila</i> (c).....	25
Figura 7	- Estruturas enantioméricas do Limoneno.....	33

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	- Cromatograma do óleo essencial extraído das cascas da espécie <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck e os 15 picos selecionados e identificados pela espectrometria de massas.....	49
Gráfico 2	- Correlação Linear de Pearson para o teste de CL ₅₀ entre a mortalidade de <i>Artemia salina</i> e a concentração do óleo essencial da espécie <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck.....	54
Gráfico 3	- Frequência da mortalidade de <i>Biomphalaria glabrata</i> em função de diferentes concentrações do óleo essencial da espécie <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck para o teste piloto.....	55
Gráfico 4	- Correlação Linear de Pearson para o teste de CL ₅₀ entre a mortalidade de caramujos e a concentração do óleo essencial da espécie <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	-	Constituintes identificados na amostra do óleo essencial extraídos das cascas de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck. São Luís, MA, 2017.....	50
Tabela 2	-	Parâmetros físico-químicos obtidos do óleo essencial das cascas de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck. São Luís, MA, 2017.....	51
Tabela 3	-	Frequência da mortalidade de <i>Artemia salina</i> em função de diferentes concentrações do óleo essencial da espécie <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck.....	53
Tabela 4	-	Atividade moluscicida do óleo essencial extraído da casca da espécie <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

B.L.U - Base Livre de Umidade

CuSO₄ - Sulfato de cobre

CL - Concentração letal

CG-EM - Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa

CNPMF - Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura

DMSO - Dimetilsulfóxido

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Agropecuária

ISO - International Standard Organization

IFMA - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão

Na₂SO₄ - Sulfato de sódio

NIBA - Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada

OMS - Organização Mundial de Saúde

OXM - Oxamniquine

PZQ - praziquantel

PCE - Programa de Controle da Esquistossomose

PCR - Reação em Cadeia de Polimerase

TR - Tempo de retenção

UFMA - Universidade Federal do Maranhão

USP - Universidade de São Paulo

WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo geral.....	17
2.2	Objetivos específicos.....	17
3	REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1	Esquistossomose mansônica	18
3.1.1	Epidemiologia e aspectos ecológicos	18
3.1.2	O ciclo de evolutivo do <i>Schistosoma mansoni</i>	21
3.1.3	Hospedeiros intermediários de importância epidemiológica.....	24
3.1.4	Tratamento, diagnóstico, controle e profilaxia da doença.....	26
3.2	Considerações gerais sobre os óleos essenciais	27
3.3	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	29
3.4	Moluscicidas	33
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1	Coleta e Amostragem.....	37
4.2	Identificação botânica.....	38
4.3	Extração do óleo essencial de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck.....	38
4.4	Análise química do óleo essencial por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM)	40
4.5	Determinação das propriedades físico-químicas do óleo essencial de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	41
4.6	Teste de toxicidade	41
4.6.1	Bioensaio <i>in vitro</i> com <i>Artemia salina</i> Leach	41
4.7	Obtenção, acondicionamento e identificação dos caramujos	42
4.8	Teste de positividade para infecção pelo <i>Schistosoma mansoni</i> nos caramujos da espécie <i>B. glabrata</i>.....	44
4.9	Avaliação da atividade moluscicida do óleo essencial frente aos caramujos da espécie <i>Biomphalaria glabrata</i>.....	45
4.10	Análise estatística e organização dos resultados	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1	Identificação botânica da espécie <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck.....	48

5.2	Avaliação das características químicas do óleo essenciais obtida por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM).....	48
5.3	Avaliação dos parâmetros físico-químicos do óleo de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	51
5.4	Teste de toxicidade	52
5.5	Atividade moluscicida.....	55
5.5.1	Avaliação do teste piloto.....	55
5.5.2	Avaliação frente aos caramujos do gênero <i>Biomphalaria glabrata</i>	55
6	CONCLUSÃO.....	58
	REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose mansônica é uma doença infecto-parasitária causada pelo helminto *Schistosoma mansoni*. É de veiculação hídrica, pois uma parte do seu ciclo de transmissão ocorre em meio aquático, infestado por cercárias eliminadas por caramujos do gênero *Biomphalaria*, hospedeiros intermediários do helminto. É prevalente em regiões tropicais, com uma área endêmica no Brasil que se estende do Maranhão a Minas Gerais, além de estar presente em outros estados de forma localizada, distribuindo-se mais intensamente numa faixa de terras contínuas e contíguas, ao longo de quase toda a costa litorânea da região Nordeste, seguindo o trajeto de importantes bacias hidrográficas (BRASIL, 2008b).

Também é qualificada como uma doença negligenciada de alta relevância no Brasil, uma vez que está relacionada à situação socioeconômica da população mais acometida por essa enfermidade (VITORINO et al., 2013). No Maranhão, a esquistossomose mansônica data desde 1920 e se constitui num relevante problema de saúde. Sabe-se que, nesse estado, essa parasitose abrange atualmente 48 dos 217 municípios existentes (CANTANHEDE, 2010).

A presença dos hospedeiros intermediários, representado por caramujos pertencentes à família planorbidae, especialmente a espécie *Biomphalaria glabrata*, constitui condição necessária e indispensável para que se desenvolva o ciclo do parasita e o estudo destes hospedeiros é importante, para que se possa interpretar corretamente o papel que possuem na transmissão da doença e orientar medidas de controle adequadas a cada localidade (BRASIL, 2008c).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), uma das formas de combate a helmintose que se desenvolve em moluscos, é o controle da população de caramujos. Esta ação normalmente tem sido realizada a partir da aplicação de moluscicidas sintéticos, como a niclosamida, que é o moluscicida recomendado pela OMS, uma vez que já demonstrou ser mais efetivo e menos danoso ao meio ambiente que outros moluscicidas inorgânicos ou sintéticos. Porém, sua ação biocida, o elevado custo de sua aplicação em áreas extensas e a dificuldade de seu transporte para distantes áreas rurais, torna necessário o investimento em pesquisas que busquem novas alternativas mais bem sucedidas no controle desses caramujos (BRASIL, 2008b).

As plantas medicinais são definidas como aquelas capazes de produzir princípios ativos que possam alterar o funcionamento de órgãos e sistemas,

restaurando o equilíbrio orgânico ou a homeostasia nos casos de enfermidades (FERRO, 2008). Os moluscicidas de origem vegetal foram testados pela primeira vez na década de 1930 (BRASIL, 2008a). Desde então várias espécies já foram estudadas, Melo (2010), por exemplo, testando o óleo essencial de *Citrus limon* em *Biomphalaria glabrata*, obteve 100% de mortalidade dos caramujos em todas as concentrações testadas (25, 50, 75 e 100 ppm).

Dessa forma, considerando-se toda a problemática de doenças negligenciadas como a esquistossomose, torna-se importante a investigação e a descoberta de novos compostos bioativos provenientes de plantas que apresentem potencial moluscicida, assim o objetivo deste estudo foi verificar a ação moluscicida do óleo essencial da espécie *Citrus sinensis* (L.) Osbeck frente aos caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*, principais transmissores da esquistossomose no Maranhão.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial moluscicida do óleo essencial da espécie *Citrus sinensis* (L.) Osbeck frente aos caramujos transmissores da esquistossomose.

2.2 Objetivos específicos

- a) Analisar a composição química do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck através de técnicas padronizadas;
- b) Determinar as características físico-químicas do óleo essencial;
- c) Avaliar a toxicidade do óleo essencial;
- d) Selecionar os caramujos não infectados pelo *Schistosoma mansoni*;
- e) Identificar os caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*;
- f) Investigar a atividade moluscicida do óleo essencial;

3 REFERENCIAL TEÓRICO

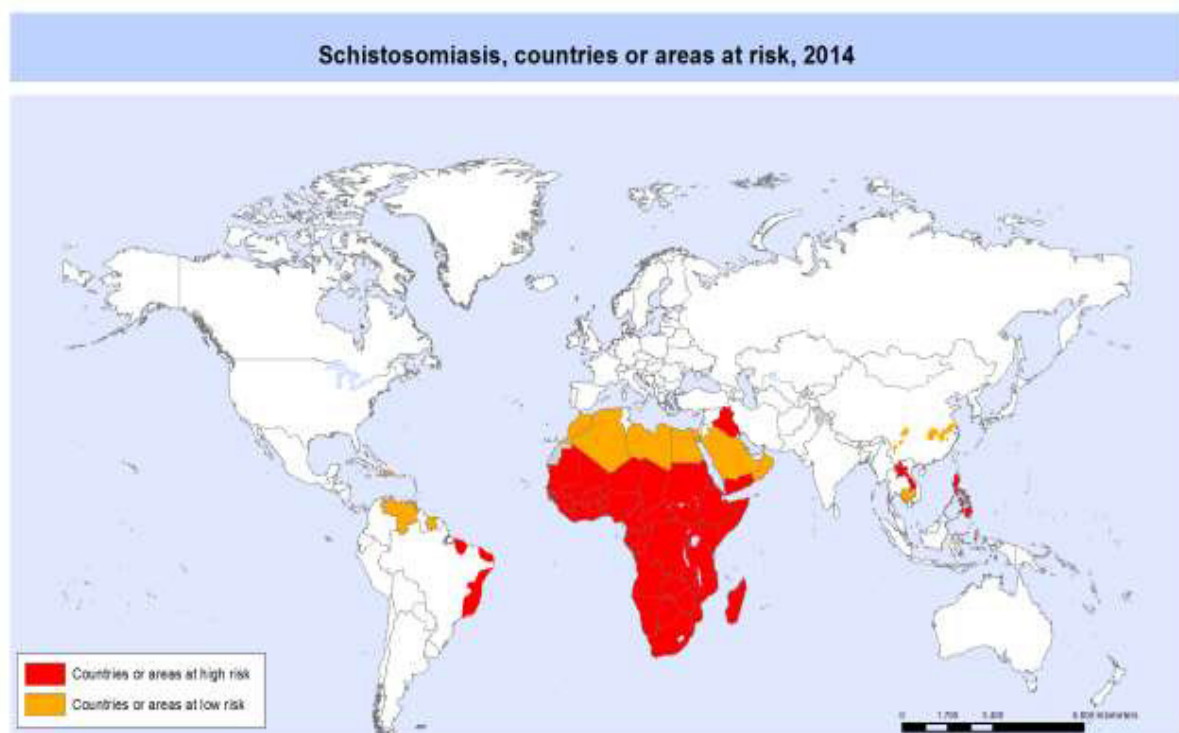
3.1 Esquistossomose mansônica

3.1.1 Epidemiologia e aspectos ecológicos

A esquistossomose origina-se nas bacias dos rios Nilo, na África, e do Yangtze, na Ásia. Ovos de *Schistosoma* foram encontrados em vísceras de múmias egípcias cuja origem remonta a 1.250 a.C., conforme comprovou Ruffer, em 1910. Igualmente, existem relatos de que na cidade de Cehang-Iha, na China, foram encontrados ovos de *Schistosoma japonicum* em cadáver de cerca de 2.000 anos (BRASIL, 2014).

A esquistossomose é uma das parasitoses mais disseminadas no mundo (Figura 2). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que aproximadamente 240 milhões de pessoas estão infectadas e mais de 700 milhões vivem em áreas com risco de infecção, em 78 países (WHO 2016a, 2016b).

Figura 1 - Países e áreas de risco da esquistossomose no mundo.



Fonte: World Health Organization (2014).

A esquistossomose ocorre em localidades sem saneamento ou com saneamento básico inadequado, sendo adquirida pela pele e pelas mucosas devido ao contato do homem com águas contaminadas com as formas infectantes de *S. mansoni* (BRASIL, 2007b).

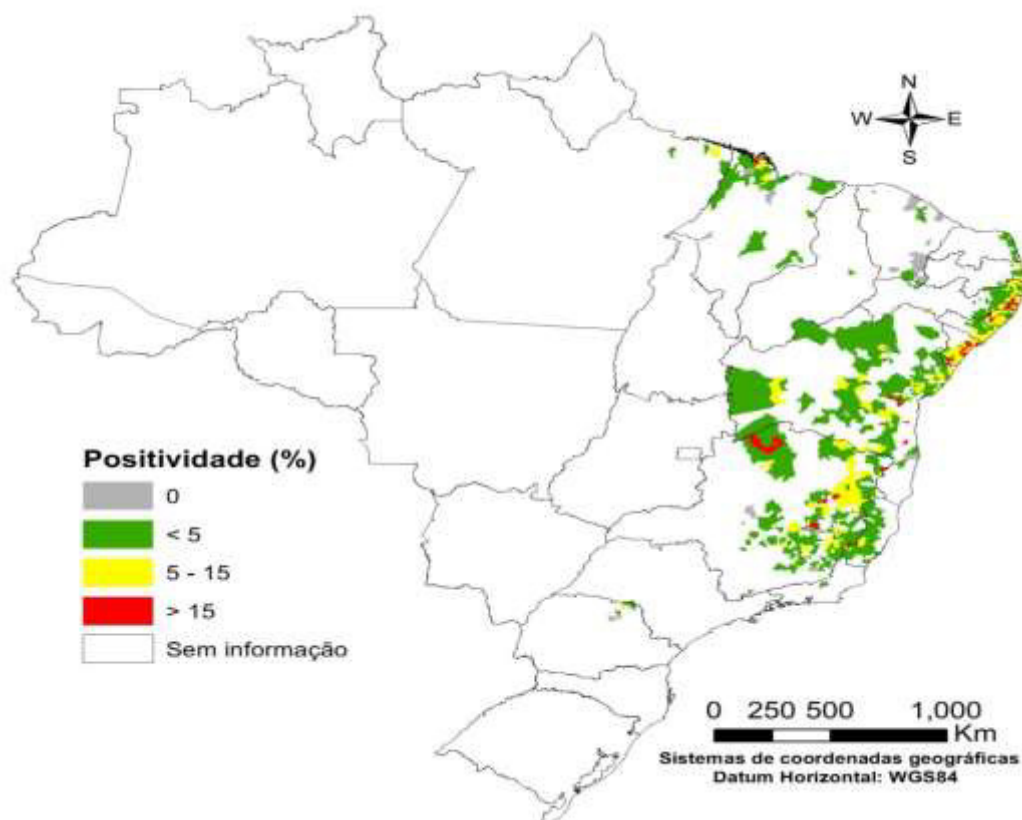
Segundo Souza e Melo (2012) os efeitos do processo de urbanização e desenvolvimento dos grandes centros urbanos levaram à diminuição de espaços favoráveis a ocupação e ao aumento da dificuldade de exploração de recursos naturais. Esse crescimento desordenado produziu grandes distúrbios ambientais que resultou na disseminação de várias doenças, as quais inicialmente estavam restritas a determinadas áreas, mas que depois se espalharam para diferentes regiões do Brasil. Neste contexto, percebe-se que a interface homem e o seu tipo de relação com o meio ambiente, é também um fator determinante na dinâmica da morbimortalidade.

No Brasil, a esquistossomose distribui-se mais intensamente sobre uma faixa de terras contínuas e contíguas, ao longo de quase toda a costa litorânea, seguindo o trajeto de importantes bacias hidrográficas. Atualmente, o Ministério da Saúde recomenda a identificação oportuna dessas condições, quais sejam: área geográfica de distribuição dos caramujos; movimentos migratórios de pessoas oriundas de áreas endêmicas; deficiência de saneamento domiciliar e ambiental; e deficiência de educação em saúde (BRASIL, 2014).

Por apresentar caráter continental é uma helmintíase de ocorrência tropical e subtropical que afeta mais de 200 milhões de pessoas em diversos continentes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008). Atualmente, a transmissão da esquistossomose ocorre em todas as regiões do país, as áreas endêmicas e focais abrangem 19 estados, onde as maiores taxas de incidência ou prevalência têm sido registradas nas regiões Nordeste e Sudeste (BRASIL, 2016).

No Brasil, o cálculo é de que 4 a 6 milhões de pessoas estão infectadas, sendo que outras 25 milhões estão em áreas com risco de infecção (LAMBERTUCCI 2010; LEAL et al. 2012).

Figura 2 - Distribuição da esquistossomose, de acordo com a faixa de positividade, por município. Brasil, 2010-2015.



Fonte: Brasil (2017).

No Maranhão, a presença desta parasitose data desde o ano de 1920 (ALVIM, 1980; RAMOS, 2007). Segundo o inquérito epidemiológico realizado pelo Ministério da Saúde/Secretária de Vigilância em Saúde, a transmissão da esquistossomose no Maranhão é endêmica em 20 e focal em 29 dos 217 municípios (BRASIL, 2011; OLIVEIRA; NOVA; ASSIS, 2012). Os campos alagados da Baixada Maranhense e o litoral ocidental do estado, possuem notoriedade por serem os focos mais antigos e apresentarem áreas periodicamente alagadas e cobertas por vegetação, o que favorece a reprodução e manutenção de caramujos transmissores (SILVA-SOUZA, 2001). De acordo com Araújo (2005), São Luís, a capital do estado, apresenta vários bairros com grande número de casos de esquistossomose. No período de 1998 a 2004, os bairros do Coroadinho e do Barreto apresentaram o maior número de casos (428 e 287, respectivamente). Segundo esse mesmo autor, a justificativa plausível para esse fato consiste no processo de ocupação irregular dos bairros, com ocorrência de migrações de indivíduos oriundos, em sua maioria,

da região da Baixada Ocidental Maranhense. O bairro do Sá Viana, segundo dados da Secretaria Estadual de Saúde, através do resumo das atividades de coproscopia e tratamento do Programa de Controle da Esquistossomose (PCE) no ano de 2016 apresentou uma prevalência de 0,31%, ficando atrás apenas dos bairros do Coroadinho com 0,38 % e Salina do Sacavém com 1,10 % (MARANHÃO, 2017).

Atrelada às condições socioambientais, e com uma maior prevalência em estados do nordeste, a esquistossomose é uma doença negligenciada de considerável importância no que se refere às ações de políticas públicas, uma vez que medidas de controle da doença estão voltadas também às melhorias do saneamento básico, coleta regular de lixo, abastecimento sistemático de água, entre outros. Segundo King (2010), tal doença faz parte do ciclo doença-empobrecimento-pobreza.

Segundo Silva, Chieffi e Carrilho (2005) é uma doença cujo agente etiológico são trematódeos do gênero *Schistosoma* que têm como hospedeiros intermediários caramujos de água doce do gênero *Biomphalaria*. A fase inicial das esquistossomoses é, em geral, assintomática. Entretanto, se não tratada a infecção inicial, os portadores da infecção pelo *Schistosoma* podem evoluir para formas clínicas extremamente graves, podendo chegar ao óbito.

3.1.2 O ciclo de evolutivo do *Schistosoma mansoni*

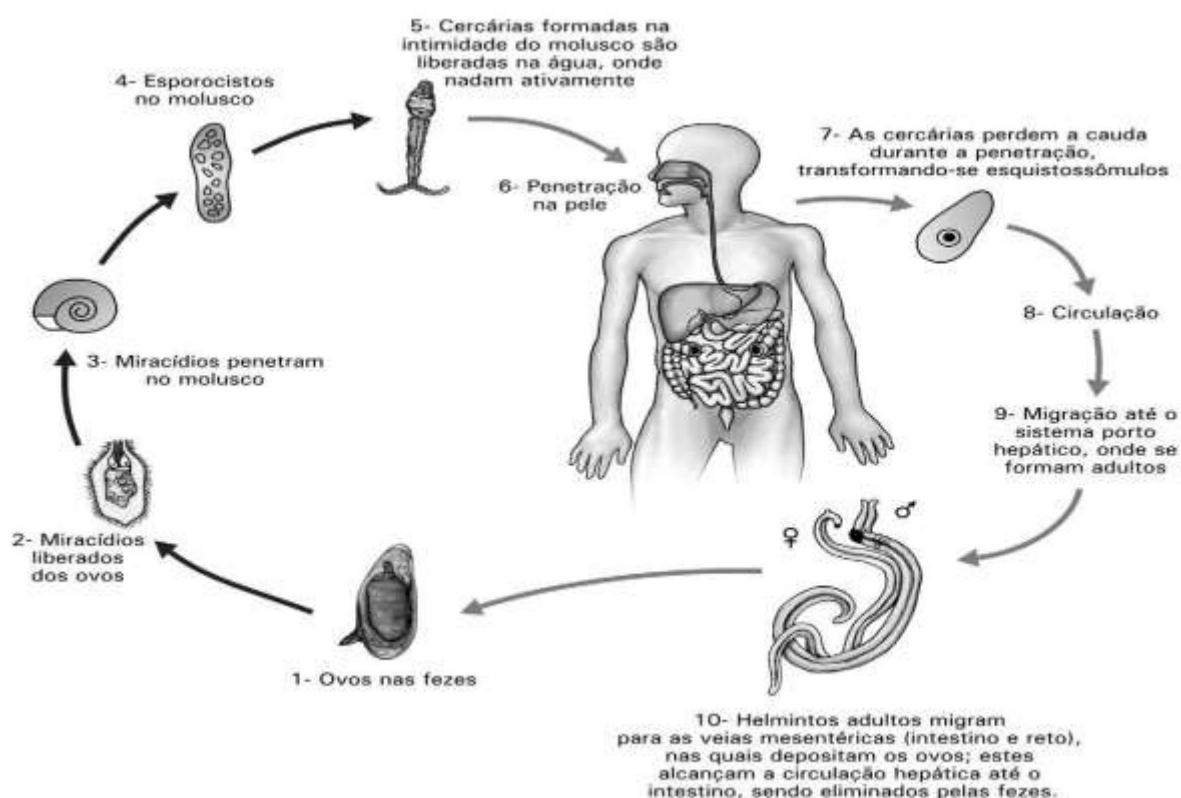
De acordo com Brasil (2005), o homem é o principal reservatório da esquistossomose, mas no Brasil o *Schistosoma mansoni* também foi naturalmente encontrado em alguns roedores, marsupiais, carnívoros silvestres e ruminantes, porém, ainda não está bem definida a participação destes hospedeiros na transmissão da doença.

Os parasitos do gênero *Schistosoma* apresentam dimorfismo sexual e possuem um complexo ciclo de vida heteroxênico. A reprodução é sexuada no hospedeiro definitivo (humano) e a assexuada no hospedeiro intermediário (moluscos) (LEWIS; TUCKER, 2014).

Já foi comprovada a presença de infecção natural por *Schistosoma mansoni* em alguns animais, como o rato-porco (*Oxymycterus angularis*), o rato de esgoto (*Rattus norvegicus*), marsupiais (gambá) e ruminantes (boi). As espécies de roedores silvestres *Holochilus brasiliensis* Thomas, 1897, *H. scireus*, *Nectomys squamipes* e *Nectomys rattus* também têm desempenhado papel importante no ciclo de transmissão do trematódeo (BRASIL, 1998; SILVA-SOUZA, 2012).

O *Schistosoma mansoni* geralmente instala-se nas vênulas do sistema porta, mesentéricas superiores e inferiores, do plexo hemorroidário e porção intra-hepática da veia porta. Uma vez presente no canal ginecóforo do macho, a fêmea é fecundada e inicia a postura dos ovos. O tempo de vida dos ovos maduros nos tecidos é de aproximadamente 20 dias. A maioria dos ovos encontrados nas fezes contém miracídios que são embriões maduros. Uma vez expulsos com as fezes, os ovos vão necessitar de contato com a água para continuarem o desenvolvimento. Caso as fezes permaneçam úmidas e protegidas da luz solar, os ovos podem permanecer viáveis por vários dias (BRASIL, 2010b). O ciclo de transmissão da doença tem início quando as fezes contendo ovos do parasito entram em contato com a água (Figura 4).

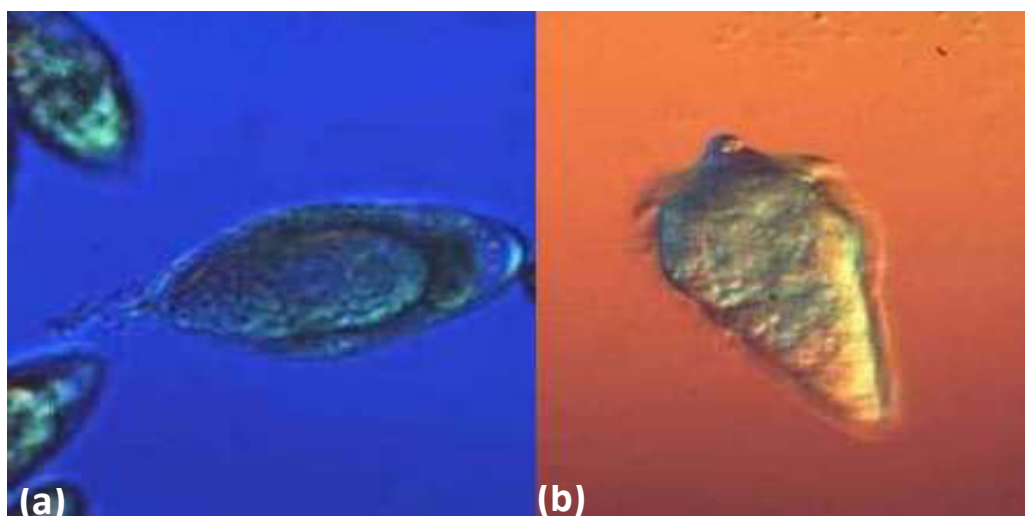
Figura 3 - Ciclo de transmissão da Esquistossomose mansônica.



Fonte: Souza et al. (2011).

Os ovos se rompem e liberam o miracídio que penetra o caramujo dando origem às cercárias (Figura 5).

Figura 4 - Ovos (a) e Miracídio (b) de *Schistosoma mansoni*



Fonte: Sinclair...([2017?]).

A infecção consiste na penetração das cercárias pela pele ou mucosas do homem, estas perdem a cauda e transformam-se em esquistossômulos, que através da corrente sanguínea e/ou linfática atingem o ventrículo direito, sendo levados ao coração e aos pulmões e, posteriormente, migram para o fígado, onde os parasitos se alimentam e tornam-se adultos (Figura 6). O ciclo se completa quando os parasitos adultos migram para os vasos mesentéricos do hospedeiro e iniciam a oviposição (KATZ; ALMEIDA, 2003; LAMBERTUCCI; SERUFO, 2001).

Figura 5 - Cercária de *Schistosoma mansoni*.



Fonte: Sinclair...([2017?]).

O período de incubação é de duas a seis semanas após a infecção, desde a penetração das cercárias até o aparecimento dos primeiros sintomas. O período de transmissão, que compreende a passagem do esquistossoma entre o homem e o ambiente, pode chegar até a mais de 20 anos (BRASIL, 2010a).

A primeira fase da doença corresponde a uma dermatite urticariforme, edema e prurido. A esquistossomose aguda ou febre de Katayama ocorre 3 a 7 semanas após a infecção, evidenciada por febre, anorexia, mal-estar, podendo ocorrer também dor abdominal, diarreia, cefaleia e hepatoesplenomegalia (BRASIL, 2008b).

Após o período da fase aguda da esquistossomose, a infecção pode evoluir para a forma crônica. O parasitismo por si só não causa grandes complicações, sendo os ovos os causadores da morbidade da forma crônica. Aqueles que não alcançam o ambiente externo ficam retidos, primeiramente, nas paredes do intestino grosso ou da bexiga urinária (*S. haematobium*) (BARSOU et al. 2013).

3.1.3 Hospedeiros intermediários de importância epidemiológica

O molusco envolvido na transmissão da esquistossomose mansônica é encontrado em vários tipos de coleções hídricas: naturais ou artificiais de água doce, água parada ou de baixa correnteza. É capaz de sobreviver em condições adversas, como alta temperatura, falta de alimentos e baixo teor de oxigênio. Nestas condições, se retrai para o interior de sua concha, atingindo um estado caracterizado pela diapausa e anidrobiose, processo interrompido quando entra novamente em contato com a água (PIERI; FAVRE, 2008; PIERI; JURBERG, 1991; TUAN, 2009).

O controle desses moluscos é difícil, devido à capacidade de dessecação e autofecundação. A dessecação é uma estratégia adaptativa que os moluscos possuem de sobreviver fora da água por períodos superior a seis meses, embora a redução no número de moluscos seja alta. No período da seca, os caramujos se retraem para o interior da concha. Esta ação diminui os efeitos da dessecação e provoca redução do seu metabolismo a níveis mínimos, com limitado consumo de oxigênio, água e energia. As três espécies de caramujos hospedeiros intermediários do *S. mansoni* possuem, em graus diferentes, a capacidade de resistir à dessecação (BRASIL, 1998; TUAN, 2009). Uma característica peculiar específica da espécie *B. glabrata*, é que esta pode apresentar no período de estiagem, além da retração, o espessamento da concha,

formação de lamelas, antecipando-se à dessecação dos criadouros e permanecendo em diapausa (PIERI; FAVRE, 2008; TUAN, 2009).

Os caramujos transmissores da esquistossomose mansoni no Brasil pertencem ao Filo Mollusca, Classe Gastropoda, Subclasse Pulmonata, Ordem Basommatophora, Família Planorbidae, Gênero *Biomphalaria*. São discóides e apresentam uma depressão que lembra o umbigo (NEVES, 2005).

A Família Planorbidae engloba o Gênero *Biomphalaria* que apresenta concha geralmente planispiral, com diâmetro variando em indivíduos adultos de 7 mm a 40 mm. A cor natural é amarelo-palha e devido às substâncias dissolvidas na água dos criadouros, como o óxido de ferro, pode variar do marrom ao negro. O nome do gênero tem origem no latim e refere-se a bis (duas vezes) e omphalos (umbigo), devido ao aprofundamento do giro central em ambos os lados da concha (PARAENSE, 1975).

Atualmente, existem dez espécies e uma subespécie do gênero *Biomphalaria* e, destas, três são hospedeiras intermediárias naturais (*B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*) e duas (*B. amazonica* e *B. peregrina*) são hospedeiras intermediárias potenciais, uma vez que só se infectam experimentalmente (Figura 7) (BRASIL, 1995).

Figura 6 – Espécies de caramujos *B. glabrata* (a), *B. straminea* (b) e *B. Tenagophila* (c).



Fonte: Brasil (2008d).

As espécies *B. glabrata* e *B. straminea* têm área de ocorrência preferencialmente na região Nordeste e no Estado de Minas Gerais, enquanto *B. tenagophila* ocupa principalmente, as regiões Sudeste e Sul (CARVALHO; CALDEIRA, 2004).

Das três espécies de *Biomphalaria* transmissoras de *S. mansoni* no Brasil, a *B. glabrata* se destaca como a mais importante, por se mostrar altamente suscetível

em decorrência da compatibilidade entre parasito-hospedeiro, e por sua distribuição geográfica em cerca de dezesseis estados do Brasil, além do Distrito Federal (BRAGA, 2012). Apresenta vasta distribuição nos Estados de Alagoas, Bahia, Sergipe, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Maranhão, Paraíba, Pará, Distrito Federal, Goiás, Espírito Santo, Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e Paraná (BRASIL, 1998).

3.1.4 Tratamento, diagnóstico, controle e profilaxia da doença

O tratamento de escolha para a esquistossomose consiste na utilização de duas drogas, o oxamniquine e o praziquantel, ambos com a mesma equivalência e segurança terapêutica. O oxamniquine (OXM) é de uso exclusivo para tratar esquistossomose intestinal na África e Sul da América (GARFIELD, 1986). O praziquantel (PZQ) é a droga de escolha para os tipos de esquistossomose que não sejam causadas pelo *S. mansoni*, devido ao custo benefício (BRASIL, 2005b). Além de ser efetivo contra todas as formas de esquistossomose, é bem tolerado pelos pacientes e beneficia milhões de pessoas em todo mundo (GARFIELD, 1986).

O diagnóstico da esquistossomose baseia-se em dados clínicos e laboratoriais, sendo que no exame clínico é considerado os sinais e sintomas da doença, estilo de vida, já o laboratorial é constituído dos métodos diretos (Exame parasitológico de fezes, raspado retal, biopsia retal, biopsia hepática, biopsia cirúrgica), sendo o mais usado o exame parasitológico de fezes, além de não ser agressivo não necessita de instrumento especializado (GONÇALVES et al., 2005).

A realização de exame coprológico é feito de forma rápida e fácil, com destaque para a técnica de Kato-Katz, que é a recomendada pelos Programas de controle da esquistossomose. Outras técnicas são Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), métodos de sedimentação espontânea (HOFFMAN; PONS; JANER, 1934), biopsia retal, testes sorológicos e a ultrassonografia, esta última é usada no auxílio de casos de hepatoesplenomegalia (BRASIL, 2010c; KATZ; ALMEIDA, 2003).

No Brasil a gravidade dos problemas de saúde levou o Ministério da Saúde estabelecer um PCE. O objetivo do programa era a redução da prevalência em áreas endêmicas, redução da morbidade e mortalidade, prevenção e redução da disseminação da esquistossomose e a eliminação da doença em áreas isoladas e com baixa intensidade de transmissão (CARVALHO et al., 1998; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

A política de controle dessa doença é baseada, em parte, em um modelo matemático simplificado de transmissão do parasito, o qual sugere que o tratamento farmacológico isolado, principalmente se focalizado em crianças em idade escolar, deve ser suficiente para eliminar a transmissão do parasito. O que pode não ser verdade, pois as campanhas de tratamento em massa tiveram pouco impacto no controle da transmissão do parasito em locais que apresentavam alto risco de contaminação (SATAYATHUM, 2006).

Foi demonstrado que a integração de medidas de controle tais como quimioterapia preventiva, educação em saúde, o fornecimento de água potável e saneamento básico e o controle dos moluscos hospedeiros intermediários é a melhor forma de controle da esquistossomose (XU et al. 2013; LEE et al. 2015).

3.2 Considerações gerais sobre os óleos essenciais

O termo óleo essencial deriva do nome *Quinta essentia*, proposto para essa substância, em meados do século XVI, pelo reformador da medicina Paracelsus Von Hohenheim (BURT, 2004).

Segundo Navarrete et al. (2011) os óleos essenciais são compostos químicos voláteis, menos densos e mais viscosos que a água à temperatura ambiente, podendo ser extraídos a partir de uma grande variedade de plantas, sendo normalmente encontrados, em baixas concentrações, em glândulas especiais da planta, denominadas tricomas.

Os óleos essenciais são misturas complexas de diversos compostos, podendo conter em sua constituição cerca de 20 a 60 componentes em concentrações muito diferentes. São caracterizados, na maioria das vezes, por dois ou três componentes em concentrações bastante elevadas, ou seja, compostos majoritários (20-70%), em comparação com os outros componentes presentes em pequenas quantidades (BAKKALI et al., 2008).

As diversas espécies de plantas acumulam elementos voláteis em regiões anatômicas específicas. Do ponto de vista de exploração da biodiversidade vegetal, quando esta região representa um substrato renovável (ex: resina, folha, flor, fruto, semente), é possível extrair-se a essência sem eliminar a planta. Isso a torna uma fonte de óleo essencial ecologicamente correta. No entanto, a grande parte dos óleos essenciais mundialmente comercializados são atualmente oriundos de cultivos

racionalizados e, sempre que possível, estabilizados genética e climaticamente, o que garante a reprodutibilidade do perfil químico do produto (SIANI et al., 2000).

Utilizam-se diferentes métodos de extração para isolar tais óleos, devendo-se ressaltar que, dependendo do método, a composição do óleo pode variar significativamente (CASSEL et al., 2009), alguns dos métodos de extração mais utilizados são: hidrodestilação, extração por solventes orgânicos, destilação a vapor, extração por fluido supercrítico, enfloração, prensagem a frio, dentre outros. A proporção de óleos essenciais extraídos por destilação a vapor é de 93%, enquanto que os 7% restantes são extraídos utilizando os outros métodos (YUSOFF et al., 2011).

As principais características de um óleo essencial são sua fragrância e suas atividades antimicrobianas e antioxidantes, portanto, é largamente utilizado em indústrias de perfume, de aditivos naturais para aromatizar alimentos, indústrias farmacêuticas, por conter estruturas fenólicas que o tornam ativo contra microorganismos e em indústrias de cosméticos (NAVARRETE et al., 2011).

Flores, folhas, cascas, rizomas e frutos são matérias-primas para sua produção, a exemplo dos óleos essenciais de rosas, eucalipto, canela, gengibre e laranja, respectivamente. Possui grande aplicação na perfumaria, cosmética, alimentos e como coadjuvantes em medicamentos. São empregados principalmente como aromas, fragrâncias, fixadores de fragrâncias, em composições farmacêuticas e orais e comercializados na sua forma bruta ou beneficiada, fornecendo substâncias purificadas como o limoneno, citral, citronelal, eugenol, mentol e safrol (BIZZO et al., 2009).

Para uma mesma espécie de planta, o número de compostos, suas quantidades relativas e o rendimento de óleos essenciais variam consideravelmente. Isto pode ser atribuído ao método de extração do óleo essencial, além das diferenças climáticas, localização e fatores agronômicos como fertilização, irrigação, colheita e especialmente a fase de desenvolvimento da planta na data da colheita (BAKKALI et al., 2008).

Segundo Franz (2010), o descobrimento e a elucidação das centenas de componentes dos óleos essenciais nas últimas décadas, tem sido possível entender a complexidade e a diversidade que existe neste grupo de produtos naturais. Dentre eles têm-se hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpênicos, aldeídos, cetonas,

fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e compostos com enxofre. Normalmente, numa mistura, um dos compostos apresenta maior concentração, outros compostos apresentam menores teores e alguns em quantidades muito pequenas, chamados traços (FILIPPIS, 2001).

O perfil terpênico apresenta normalmente substâncias constituídas de moléculas de 10 e de 15 carbonos (monoterpenos e sesquiterpenos), mas, dependendo do método de extração e da composição da planta, terpenos menos voláteis podem aparecer na composição do óleo essencial (assim como podem se perder os elementos mais leves) (SIANI et al., 2000). A composição do óleo essencial varia consideravelmente de espécie para espécie, em função de parâmetros climáticos e de fatores agrônômicos, como fertilização, irrigação e, especialmente, a fase de desenvolvimento na planta durante a colheita (PAVIANI, 2004).

Bakkali et al. (2008), afirmam que os gêneros capazes de elaborar os constituintes que compõem os óleos essenciais estão divididos em várias famílias, tais como: *Myrtaceae*, *Lauraceae*, *Rutaceae*, *Lamiaceae*, *Asteraceae*, *Apiaceae*, *Cupressaceae*, *Zingiberaceae*, *Poaceae*, *Myristicaceae*, *Piperaceae*, dentre outras. Geralmente, a síntese e o acúmulo dos óleos essenciais estão associados à presença de estruturas histológicas especializadas, localizadas sobre ou nas proximidades da superfície da planta, tais como em pêlos glandulares (*Lamiaceae*), células parenquimáticas diferenciadas (*Laureaceae*, *Piperaceae*, *Poaceae*), canais oleíferos (*Apiaceae* e *Asteraceae*) ou glândulas secretoras (*Myrtaceae*). Os óleos essenciais podem armazenar-se em todos os órgãos vegetais, tais como: nas flores (laranjeira, bergamoteira), folhas (capim-limão, eucalipto, louro) ou ainda nas cascas dos caules (canelas), madeira (sândalo, pau-rosa), raízes (vetiver), rizomas (cúrcuma, gengibre), frutos (anis-estrelado, funcho, erva doce) ou sementes (noz-moscada) (SIMÕES et al., 2007).

São muitas as atividades biológicas atribuídas aos óleos essenciais e que decorrem da grande variedade e diversidade de suas composições químicas. A literatura atual apresenta vários relatos sobre atividades de óleos essenciais, a exemplo de ação antioxidante (MIRANDA et al., 2016), larvicida (DIAS et al., 2015), antibacteriana (MILLEZI et al., 2014) e anti-inflamatória (SILVA DE ARAUJO et al., 2016), demonstrando grande potencial para diversas utilizações farmacêuticas.

No entanto, o incremento do volume de trocas comerciais nos mercados de óleos essenciais, as normas de controle de qualidade têm tido crescente importância, em especial na identificação e na padronização dos níveis de qualidade dos óleos essenciais mais utilizados, sendo dada grande atenção aos óleos utilizados para o consumo humano (BOVILL, 2010).

3.3 *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

O gênero *Citrus* representa o ponto mais alto de um longo período evolutivo, cujo início remonta a mais de 20 milhões de anos, na Austrália (TURRA; GHISI, 2003). Segundo a Associação Brasileira dos Exportadores Cítricos (2008), uma das árvores frutíferas mais conhecidas, cultivadas e estudadas em todo o mundo é a laranjeira. Como todas as plantas cítricas, a laranjeira é nativa da Ásia, mas a região de origem é motivo de controvérsia. Esse mesmo gênero pertence à família Rutaceae e consiste em cerca de 150 gêneros e 2000 espécies, incluindo algumas espécies importantes, como *C. sinensis* (L) Osbeck (Laranja), *C. paradisi* Macfad. (Toranja), *C. limon* (L.) Burm. (Limão), *C. reticulata* Blanco (Tangerina), *C. aurantium* L. (Laranja azeda), *C. medica* L. (Citron), e *C. aurantifolia* (Christm) Swingle (lima). As plantas da maioria das espécies de *Citrus* são sempre grandes arbustos verdes ou pequenas árvores, 5-15 m de altura (ANWAR et al., 2008).

A laranja é o fruto produzido pela laranjeira (*Citrus sinensis*), uma árvore pertencente à divisão Magnoliophyta, subdivisão Magnoliophytina, classe Magnoliopsida, subclasse Rosidae, ordem Sapindales (CRONQUIST, 1988). Mattos Júnior et al. (2005) afirma ainda que a laranja é um fruto híbrido, criado na antiguidade a partir do cruzamento do pomelo (*Citrus maxima*) com a tangerina (*Citrus reticulata*). É, também, amplamente divulgada como digestiva, expectorante, diurética e hipotensora na medicina tradicional, embora sua eficácia não tenha sido comprovada cientificamente. Ao chá das folhas atribui-se propriedades sudorífera, antigripal, carminativa, calmante e antiespasmódica. O chá da casca e dos frutos é indicado contra má digestão (LORENZI; MATOS, 2002; MATOS et al., 1999).

O *Citrus sinensis* (L.) Osbeck variação pera é a mais importante variedade cítrica brasileira, sendo utilizada pela indústria e para os mercados internos e externos de fruta fresca. Para indústria, seu rendimento é muito bom, e as qualidades de seu suco tornaram-na preferida, além de sua época de produção, entre as precoces e as tardias. Menor que as outras variedades, a laranja pêra tem casca fina e lisa, de cor

amarelo-avermelhada e polpa succulenta. Tem sabor adocicado, e é especial para o preparo de sucos e geléias (BENELLI, 2010).

A laranja, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck é um dos mais favorecidos frutos do mundo. A árvore tem uma copa arredondada dos ramos delgados (Fotografia 1). Os galhos quando jovens são retorcidos e angulados e podem ostentar espinhos. As flores são brancas e docemente perfumadas e em arranjo de um a seis (MATTOS JÚNIOR et al., 2005).

Fotografia 1 - Árvore de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.



Fonte: O autor (2017).

Contêm frutos do tipo baga contendo vesículas preenchidas por um suco de grande interesse comercial (Fotografia 2) (MAGALHÃES JUNIOR; NEGRI; PALHARES JUNIOR, 2005). O odor liberado *in natura* pela laranja é devido ao d-limoneno, substância responsável pela fração oleosa e componente mais expressivo, presente na casca da fruta, que atua como potente inibidor de leveduras, em concentrações definidas (YAMANAKA, 2005).

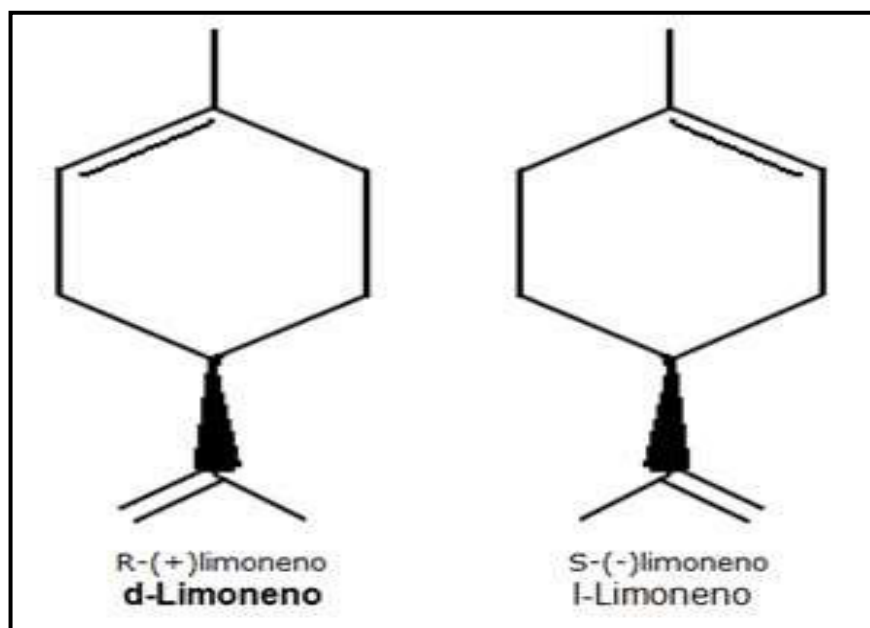
Fotografia 2 - Frutos de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.



Fonte: O autor (2017).

Sendo o constituinte majoritário do óleo essencial da *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, o d-Limoneno (Figura 1), de nomenclatura 4-isoprenil-1-metil-ciclo-hexeno, é um monoterpeno monocíclico que faz parte da estrutura de 300 vegetais. Os dois enantiômeros do limoneno são os mais abundantes monoterpenos na natureza. *S*-(-) limoneno é principalmente encontrado em uma variedade de plantas e ervas como *Mentha* spp, enquanto *R*-(+) limoneno é o componente majoritário dos óleos das cascas de limão e laranja e do óleo essencial de alcarávia, sendo a prevenção da desidratação e a inibição de crescimento microbiano suas funções naturais nos vegetais (DEMYTTENAERE; KIMPE, 2001).

Figura 7 - Estruturas enantioméricas do Limoneno.



Fonte: Assunção (2013).

De acordo com Silva-Santos (2002), o óleo essencial de laranja, extraído do pericarpo do fruto, é um subproduto da indústria do suco. Derivados de óleo essencial de laranja são usados em perfumaria, sabonetes e na área farmacêutica em geral, além de materiais de limpeza, em balas e bebidas. O rendimento máximo de extração de óleos cítricos é de 0,4%, ou seja, para cada tonelada de fruta processada são obtidos 4 kg de óleo.

3.4 Moluscicidas

O interesse pelo uso de moluscicidas de origem vegetal no controle da esquistossomose data da década de 1930, quando foi sugerido o plantio de *Balanites aegyptiaca* L., Balanitaceae, uma árvore típica do deserto, nas margens dos focos de transmissão, no Sudão. Os frutos, ao caírem das árvores, inibiam a densidade populacional de caramujos (ARCHIBALD, 1933). No Brasil, as primeiras pesquisas com moluscicidas naturais demonstraram atividade de extratos aquosos do caule de *Sejania* sp. (cipó-timbó) e *Sapindus saponaria* L. (saboneteira) em *B. glabrata* (PINTO; ALMEIDA, 1994).

Uma substância poderá ser considerada moluscicida quando nas condições ambientais em que o caramujo vive elimina todas as fases do seu ciclo de vida, desde o ovo até a fase adulta, sendo que essas substâncias devem ser utilizadas em

pequenas concentrações, devem ainda apresentar baixo custo, ser estável no armazenamento em condições tropicais; fácil de transportar e aplicar; no transporte, manuseio e aplicação deve ser atóxico; ter ação letal seletiva a caramujos, ser inócuo para o homem, animais domésticos, peixes e plantas, não sofrer decomposição na água e no solo e ser estável em condições de temperatura e irradiação solar (PAULINI, 1965).

Podendo ser classificadas como de origem sintética ou natural, moluscidas são substâncias usadas para exterminar moluscos, principalmente caramujos que vivem e se alimentam de folhagens em estufas, jardins, lavouras e campos (SANTOS, 2005). Também são utilizados para controlar caramujos vetores de parasitos importantes em saúde pública, como é o caso dos vetores de parasitos do gênero *Schistosoma* (SILVA et al., 2008).

Entre as décadas de 1960 e 1970, o controle dos hospedeiros intermediários de *Schistosoma* spp. foi uma das principais medidas utilizadas nos programas de controle da esquistossomose, em diversas áreas endêmicas no mundo (KING; BERTSCH, 2015).

Os moluscidas sintéticos são utilizados em programas de controle da esquistossomose com o objetivo de combater os caramujos vetores. Estima-se que mais de 7.000 produtos químicos já foram testados com esta finalidade, mas poucos merecem destaque. Podemos citar, entre eles sulfato de cobre (CuSO_4), Gramaxone, hidróxido de cálcio, N-tritilmorfolina (Frescon) e niclosamida (Bayluscid) (NEVES, 2005; REY, 2001). O moluscida utilizado atualmente é a niclosamida (Bayluscid) que possui alta toxicidade para moluscos na concentração de 1 mg/L, causando 100% de mortalidade para *Biomphalaria glabrata* e *Bulinus*, se o contato for de pelo menos 8 h (REY, 2001).

O envenenamento de caramujos com moluscidas provoca a retração da massa cefalopodal para o interior da concha ou um inchaço com consequente prolongamento de sua massa cefalopodal para fora da concha devido à quebra do equilíbrio osmótico que está sob controle neuro-hormonal (MCCULLOUGH et al., 1980). Entretanto, o uso de moluscidas sintéticos tem gerado preocupação em relação a três fatores: o desenvolvimento de resistência dos caramujos a essas substâncias, a baixa seletividade que apresentam (atuando sobre outras espécies da fauna causando uma significativa alteração no ecossistema aquático) e o custo

relativamente elevado desses produtos, sendo inviáveis para países de terceiro mundo onde a doença apresenta-se de forma endêmica (MARSTON; HOSTETTMANN, 1985; MCCLLOUGH et al., 1980).

Dessa forma, a necessidade de se investigar moluscidas eficientes e ecologicamente aceitáveis ganhou um novo destaque. A tendência de pesquisar nas plantas substâncias ativas que possam ser utilizadas no desenvolvimento de produtos alternativos tem crescido cada vez mais. Este esforço visa à obtenção de um produto alternativo mais econômico, biodegradável, seguro e disponível localmente para controle das populações de caramujos (BRASIL, 2007a; VASCONCELLOS et al., 2005).

No sentido de adquirir produtos com alto teor moluscida a partir de extratos vegetais, muitos autores se dedicaram à pesquisa com plantas regionais, sendo que muitas espécies ornamentais, tóxicas e medicinais foram avaliadas quanto à possível ação moluscida (BABILI et al., 2006; LEYTON; HENDERSON; MASCARA, 2005; MENDES et al., 1984). Mas, segundo Singh e Singh (1999), o uso de moluscidas requer o entendimento do mecanismo de ação dessas substâncias frente aos moluscos, uma vez que a elucidação de todo o processo necessita de estudos que possam revelar os detalhes referente ao perfil fitoquímico do vegetal e a fisiologia do molusco frente a essas substâncias.

A OMS estabelece critérios específicos para a realização dos *screening* de moluscidas e recomenda teores de toxicidade e bioatividade medidas pelos índices DL_{90} e DL_{50} (ambos em ppm) e pela taxa de mortalidade dos caramujos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1993). Os derivados vegetais podem apresentar riscos quando utilizados em ambientes onde coexistam outras espécies de animais, segundo Luna et al. (2005) e Santos et al. (2007), é necessário realizar testes de toxidade das plantas que demonstram atividade moluscida.

Testes de toxicidade são ensaios laboratoriais, realizados sob condições experimentais específicas e controlados, utilizados para estimar a toxicidade de substâncias, efluentes industriais e amostras ambientais (águas ou sedimentos). Nesses ensaios, organismos-testes são expostos a diferentes concentrações de amostra e os efeitos tóxicos produzidos sobre eles são observados e quantificados (DORNFELD, 2002; RIBO, 1997).

Compostos bioativos são quase sempre tóxicos em altas doses. Desta maneira, a avaliação da letalidade em um organismo animal menos complexo pode ser usada para um monitoramento simples e rápido durante o fracionamento de extratos. O ensaio de letalidade para larvas de *Artemia salina* tem sido introduzido na rotina de muitos grupos de pesquisa envolvidos com isolamento, purificação e elucidação estrutural, já que muitos laboratórios de fitoquímica não estão preparados para a realização de ensaios biológicos (FALKENBERG; BAUMGARTEN; SIMIONATO, 1999; MACIEL; PINTO; VEIGA JUNIOR, 2002; MCLAUGHLIN, 1991; RUIZ et al., 2005). Os cistos de *Artemia salina* são de baixo custo e facilmente encontrados no comércio, além de permanecerem viáveis por anos no estado seco (MEYER et al., 1982). Essas vantagens contribuíram para a popularização do bioensaio, sobretudo a partir da década de 90.

O microcrustáceo, *Artemia salina*, faz parte da ordem Anostracea. Esta espécie é utilizada em testes de toxicidade devido à sua capacidade de formar cistos dormentes, fornecendo desse modo material biológico que pode ser armazenado durante longos períodos de tempo sem perda de viabilidade e sem necessidade de se manterem culturas contínuas de organismo-teste. É uma espécie de fácil manipulação em laboratório e baixo custo econômico (CALOW, 1993).

O bioensaio de toxicidade com *Artemia salina* é em geral simples, rápido, sensível e barato, e consiste na estimativa da concentração de uma substância através da medida de uma resposta biológica, na qual existem apenas dois parâmetros envolvidos: vida ou morte. Os ensaios de letalidade com o microcrustáceo *Artemia salina* têm larga aplicação para verificação da toxicidade de compostos bioativos presente em extratos vegetais, mas também vem sendo empregados em ensaios de toxicidade de alguns extratos frente a organismos marinhos de pequeno porte, como peixes e pequenos crustáceos (SILVA, 2015).

Nesses termos, embora o Brasil possua a maior diversidade genética de espécies vegetais do mundo, o conhecimento sobre sua flora ainda é considerado insuficiente. Acredita-se que menos de 10% dos vegetais tenham sido avaliados quanto às suas características biológicas, e menos de 5% com relação a estudos fitoquímicos detalhados (LUNA et al., 2005), o que nos mostra que ainda são escassos os estudos envolvendo essa temática, tornando a pesquisa da atividade moluscicida em novas espécies, um território que pode ser ainda muito explorado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta e Amostragem

As amostras (frutos) da espécie vegetal *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, foram coletadas no campus do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão (IFMA) - Maracanã, localizado na Avenida dos Curiós, S/Nº, Vila Esperança, (2°36'32.81"S; 44°16'3.25"W) (Fotografia 3). As mudas cultivadas da espécie em questão foram concedidas e certificadas pelo Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura (CNPMPF) da Empresa Brasileira de Agropecuária (EMBRAPA), localizado em Cruz das Almas no estado da Bahia, estando registrada no IFMA pelo setor de fruticultura, como D-25 (laranja doce, variação: pera). Os frutos foram obtidos manualmente, no dia 06 de Outubro de 2016 e encaminhados ao Laboratório de Pesquisa e Aplicação de Óleos Essências do Pavilhão Tecnológico da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), onde foram separados e acondicionados para posterior processamento.

Fotografia 3 - Campus do IFMA.



Fonte: Google Earth (2017). (Aplicativo baixado no celular Google Earth).

4.2 Identificação Botânica

Para a identificação foram coletadas partes das estruturas vegetativas representativas e reprodutivas (flores e frutos) e encaminhadas ao Herbário Ático Seabra do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

4.3 Extração do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

O método escolhido para extrair o óleo essencial da espécie *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, foi a hidrodestilação. A hidrodestilação é um método antigo e versátil no qual o material vegetal permanece em contato com a água em ebulição, o vapor força a abertura das paredes celulares e ocorre a evaporação do óleo que está entre as células da planta. O vapor, que consiste na mistura de óleo e água, passa por um condensador, onde ocorre seu resfriamento (SILVA, 2011) e, como os componentes voláteis e a água são imiscíveis, ocorre à formação de duas fases líquidas que podem ser separadas (SARTOR, 2009).

Foi montado um sistema extrator de Clevenger de vidro, este foi acoplado a um balão de fundo redondo de 6000 mL, com uma manta elétrica aquecedora mantida a uma temperatura de 100°C (Fotografia 5), (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

Fotografia 4 - Extrator de Clevenger.



Fonte: O autor (2017).

Para a extração foram utilizadas 120 gramas das cascas frescas do fruto com 1200 mL de água destilada na proporção de (1:10), em um balão redondo acoplado ao sistema Clevenger que fora montado (Fotografia 6). Após 4 horas de destilação, recolheu-se o óleo essencial, onde o mesmo foi seco com sulfato de sódio (Na_2SO_4) anidro e armazenado em coletor de vidro envolto em papel alumínio sob refrigeração.

Fotografia 5 - Cascas frescas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.



Fonte: O autor (2017).

O rendimento da extração do óleo foi avaliado através da relação massa/massa pela medida da densidade expressa em percentagem, observando o volume máximo obtido de óleo por massa (g) da espécie estudada (FABROWSKI, 2002; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). Dessa forma, calculou-se o rendimento através da relação do volume, obtido com a massa do material da espécie vegetal utilizada na hidrodestilação, com a base do material livre de umidade (b.l.u.), subtraindo-se da massa de amostra a quantidade de água, conforme fórmula abaixo:

$$\% R = (V.d/m) \times 100$$

Onde:

V = volume total de óleo extraído (mL)

d = densidade do óleo (g/mL)

m = massa da espécie vegetal seca (em g), após determinação com base do material livre de umidade de (b.l.u.)

4.4 Análise química do óleo essencial por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM)

Os constituintes do óleo essencial foram identificados na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP) por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), a análise dos constituintes voláteis foi realizada em cromatógrafo a gás da marca SHIMADZU, acoplado a um espectrômetro de massa CG/EM QP5050A equipado com coluna capilar fenilpolisifenileno-siloxano de BPX 5%, (30 m comprimento x 0,25 mm de espessura e 0,25 μ m de espessura do filme), utilizando-se o hélio como gás de arraste (Fotografia 4). A temperatura do injetor e interface do CG com detector seletivo será mantida em 280°C com fluxo na coluna de 2,7 mL/min, programada para operar em 50°C. Para as análises, serão injetadas alíquotas com volume de 1 mL em acetato de etila.

Fotografia 6 - Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa.



Fonte: Assunção (2013).

4.5 Determinação das propriedades físico-químicas do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

As propriedades físico-químicas analisadas do óleo essencial foram: a densidade, a avaliação da solubilidade em etanol a 90% e o índice de refração. Para a avaliação da densidade, segundo a norma NBR 5784 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 1985a) foi utilizado um picnômetro de 1,0 mL, previamente seco, tarado e aferido, onde a amostra do óleo essencial foi adicionada e pesada. Para a determinação da solubilidade em etanol a 90%, conforme norma NBR 5791 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 1989), foi preparada uma solução de etanol/água a 90% (v/v), mantendo-se constante o volume do óleo de 25 microlitros em um tubo de ensaio, ao qual adicionou-se proporcionalmente o mesmo volume da solução alcoólica, até atingir a completa solubilização. O índice de refração foi determinado com o auxílio do refratômetro de ABBÉ seguindo a norma NBR 5785 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 1985b).

4.6 Teste de toxicidade

4.6.1 Bioensaio *in vitro* com *Artemia salina* Leach

Para a cultura, utilizou-se a metodologia recomendada por Meyer et al. (1982). Esta tem sido uma das metodologias mais citadas e utilizadas para adaptações para avaliação de extratos e frações de produtos naturais. Os cistos de *Artemia salina* foram transferidos para um aquário contendo solução salina (60 g de sal marinho/1000 mL de água destilada) e saturação de oxigênio, obtido com auxílio de bomba de ar (Fotografia 7). O aquário foi dividido em dois compartimentos interligados, os cistos ficaram em um dos compartimentos, deixando o segundo compartimento sob iluminação artificial de uma lâmpada de 100 W. Após 24 h, verificou-se a eclosão dos cistos e a migração das larvas, por fototropismo positivo, para o compartimento com iluminação. As larvas foram transferidas para um aquário, contendo solução e ficando sob observação por mais 24 horas.

Fotografia 7 - Cultura de *Artemia salina* Leach.



Fonte: O autor (2017).

Para o teste de toxicidade propriamente dito foi preparada uma solução salina estoque de cada óleo essencial na concentração de 10.000 $\mu\text{g/mL}$ e DMSO a 0,1 %. Alíquotas de 5, 50, 125, 250 e 500 μL desta solução foram transferidas para recipientes e completados com solução salina já preparadas anteriormente até 5 mL, obtendo-se no final concentrações de 10, 100, 250, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas, onde dez larvas na fase metanúplio foram transferidas para cada um dos recipientes. Para o controle positivo utilizou-se 5 mL de solução de dicromato de potássio a 3 $\mu\text{g/mL}$ e para o controle negativo 5 mL de uma solução 4 $\mu\text{g/mL}$ de DMSO 0,1%. Após 24 horas de exposição, realizou-se a contagem das larvas vivas, considerando-se mortas aquelas que não se movimentaram durante a observação e nem com a leve agitação do frasco.

4.7 Obtenção, acondicionamento e identificação dos caramujos

Os caramujos foram coletados no bairro do Sá Viana do município de São Luís-MA (2° 33' 35.1"S; 44° 18' 05.3" W) nos meses de Fevereiro e Agosto de 2017. Segundo (FRANÇA, 2011), essa localidade apresenta criadouros de planorbídeos com índices de caramujos positivos para *Schistosoma mansoni* (Fotografia 8). De acordo com Brasil (2007a), a coleta foi feita efetuando-se uma varredura com uma concha em áreas submersas e diferentes pontos dos possíveis criadouros, os caramujos capturados foram acondicionados em um recipiente de vidro com tampa, com água do próprio criadouro (Fotografia 9). Após o término da coleta, os caramujos foram

mantidos no infectório do Núcleo de Imunologia Básica e Aplicados (NIBA) da UFMA, sendo acondicionados em aquários contendo água desclorada e alimentados com alface *in natura*. A confirmação da espécie foi feita de acordo com metodologia adotada por Paraense (1975), onde foram feitas análises das características conquiliológicas e da morfologia interna (Fotografia 10).

Fotografia 8 - Criadouros de planorbídeos no bairro do Sá Viana.



Fonte: O autor (2017).

Fotografia 9 - Coleta dos caramujos.



Fonte: O autor (2017)

Fotografia 10 - Análises das características conquiliológicas e da morfologia interna.



Fonte: O autor (2017)

4.8 Teste de positividade para infecção pelo *Schistosoma mansoni* nos caramujos da espécie *B. glabrata*

Por um período de 40 dias e sendo analisados a cada 07 dias, os caramujos *Biomphalaria glabrata* coletados e identificados foram submetidos a testes de positividade no intuito de avaliar a infecção pelo *Schistosoma mansoni*. Para a realização do teste 05 caramujos foram colocados em recipientes de vidro transparente, contendo 25 mL de água desclorada, na proporção de 5 mL por caramujo, e expostos à luz de lâmpadas de 60 W por um período de 02 horas para estimular a liberação das cercárias (Fotografia 11). Após a exposição, foram observados com auxílio de estereomicroscópio, para verificar se houve eliminação de cercárias de *Schistosoma mansoni* o que representa sua positividade (SMITHERS; TERRY, 1965 apud SOUZA, 1992). Apenas os caramujos negativos foram submetidos aos testes com o óleo essencial de *Citrus sinensis*.

Fotografia 11 - Exposição dos caramujos à luminosidade de lâmpadas de 60 W.

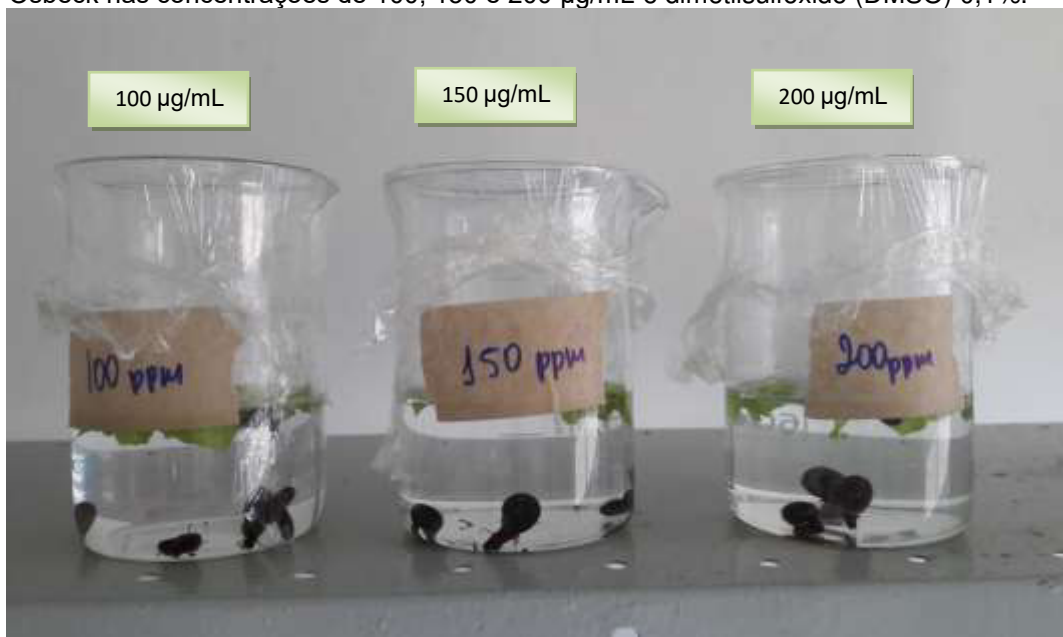


Fonte: O autor (2017).

4.9 Avaliação da atividade moluscicida do óleo essencial frente aos caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*.

Para avaliação da atividade moluscicida foi utilizada a metodologia preconizada pela Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1965). Foram realizados dois testes em sequencia, no primeiro, denominado de teste piloto, 05 caramujos *Biomphalaria glabrata* foram colocados em soluções aquosas do óleo essencial nas concentrações de 100, 150 e 200 $\mu\text{g/mL}$ e dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,1% por 24 horas (Fotografia 12).

Fotografia 12 - Teste piloto em solução aquosa do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck nas concentrações de 100, 150 e 200 $\mu\text{g/mL}$ e dimetilsulfóxido (DMSO) 0,1%.



Fonte: O autor (2017)

Após 24 horas de exposição nas referidas soluções os caramujos foram lavados, introduzidos em aquários com água desclorada e alimentados com alface, ficando sob observação por mais 24 horas. Durante essa etapa, foram retirados e registrados os caramujos mortos. Apenas as soluções que apresentaram mortalidade de 90-100% dos caramujos nas concentrações abaixo de 200 $\mu\text{g/mL}$ foram consideradas e submetidas aos demais testes.

Num segundo momento, 10 caramujos foram acondicionados em recipientes de vidro tampados com filmes plásticos, contendo soluções do óleo essencial em concentrações que variaram de 25 a 200 $\mu\text{g/mL}$ na proporção de 50 mL por caramujo. Deu-se continuidade a metodologia empregada no início, diferindo apenas na evidência da mortalidade que mudou de 24 para 48 horas. No segundo teste, denominado de concentração letal (CL), foram preparadas soluções do óleo num volume de 500 mL nas concentrações de 25, 50, 75, 100, 125, 150 e 200 $\mu\text{g/mL}$ em DMSO 0,1%, utilizando-se a mesma metodologia aplicada no teste piloto.

Para o controle negativo, foram utilizados cinco moluscos mantidos em solução aquosa de DMSO 0,1%. O procedimento de exposição dos moluscos ao DMSO foi o mesmo empregado aos moluscos expostos ao óleo essencial.

4.10 Análise estatística e organização dos resultados

Todos os dados desta pesquisa foram expostos em gráficos e tabelas descritivas para melhor visualização dos mesmos. Para o cálculo estatístico, foi utilizado o programa Statistica 7.0, admitindo-se um nível de significância de 0,05. Possíveis correlações entre a taxa de mortalidade da *Artemia salina* Leach, bem como a taxa de mortalidade dos caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* e as concentrações do óleo essencial da laranja pera doce, foram testadas através do teste de Correlação Linear de Pearson.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação botânica da espécie *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

A espécie estudada já possuía exsicata depositada no Herbário Ático Seabra do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Maranhão com identificação botânica de numeração 01484 (Fotografia 13).

Fotografia 13 - Exsicata da espécie *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.



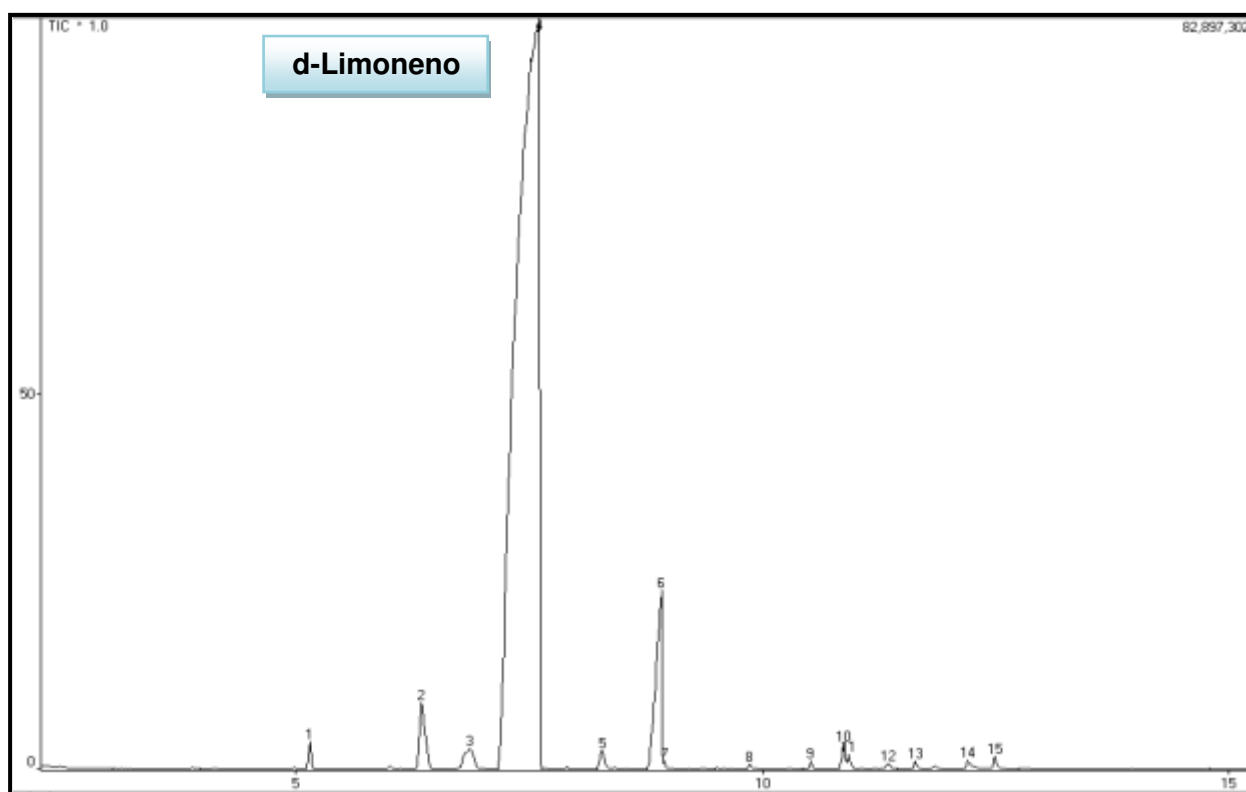
Fonte: Assunção (2012).

5.2 Avaliação das características químicas do óleo essencial obtidas por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

Os constituintes majoritários e minoritários do óleo essencial extraído das cascas da espécie *Citrus sinensis* (L.) Osbeck foram definidos por 15 constituintes com concentrações que variaram de 0,06 a 81,50% correspondendo a 100% da composição do óleo (Gráfico 1) (Tabela 1). O monoterpeneo d-Limoneno, apresentou uma concentração de 81,50%, sendo considerado o composto majoritário do óleo estudado. Segundo Otha e Hirose (1966) os monoterpenos como, por exemplo, o d-limoneno chegam a representar mais de 90% da composição de alguns óleos

essenciais de *Citrus*, ficando o percentual do óleo estudado bem próximo dessa concentração. Shaw (1979) ao analisar quantitativamente o óleo essencial das cascas de *Citrus sinensis* encontrou 97 % do constituinte limoneno.

Gráfico 1 - Cromatograma do óleo essencial extraído das cascas da espécie *Citrus sinensis* (L.) Osbeck e os 15 picos selecionados e identificados pela espectrometria de massas.



Fonte: O autor (2017).

Tabela 1 - Constituintes identificados na amostra do óleo essencial extraídos das cascas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.

Pico ¹	TR ² (minutos)	Componentes	Teor (%)
1	5,155	α -Pineno	0,33
2	6,350	β -Mirceno	2,95
3	6,861	Octanal	1,93
4	7,610	d-Limoneno	81,50
5	8,287	1, Octanol	0,46
6	8,919	Linalol	6,36
7	8,959	Nonanal	1,08
8	9,866	Citronelal	0,06
9	10,523	Terpineol	0,12
10	10,873	α -Terpineol	1,39
11	10,926	Decanal	0,25
12	11,352	β -Citronelol	0,08
13	11,643	Neral	1,13
14	12,210	Citral	1,17
15	12,496	1,Ciclohexeno	1,20

Nota: ¹pico pela ordem de eluição da coluna; ² Tempo de retenção dos compostos na coluna em minutos.

Fonte: O autor (2017).

Vékey (2001) afirma que a cromatografia pode ser combinada a diferentes sistemas de detecção, tratando-se de uma das técnicas analíticas mais utilizadas e de melhor desempenho. O acoplamento de um cromatógrafo a um espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade).

Critérios adotados pela Farmacopéia Européia e ISO estabelecem uma faixa de valores para o constituinte d-limoneno de 92 a 97% e 93 a 96%, respectivamente (MARTINS, 2011). Pesquisadores como, Song et al. (2006) na Coréia; Dharmawan, Kasapis e Curran (2007) na Indonésia; Sharma e Tripathi (2008) na Índia; Minh Tu et al. (2002) no Vietnã; Cheng e Chou (1984) no Taiwan, por exemplo, ao analisarem óleo essencial das cascas da laranja pera doce obtiveram teores de d-limoneno nos percentuais de 91,8 %, 95,6 %, 84,2 %, 94,7% e 68,5%, respectivamente. É sabido que as condições ambientais são capazes de influenciar na fisiologia vegetal e comprometer a síntese e as proporções do óleo essencial de uma espécie, tornando-se este um dos responsáveis por essa variabilidade de

concentrações do monoterpene d-limoneno frente a ambientes com peculiaridades climáticas bem distintas.

Percebe-se, ainda, na literatura que outros constituintes podem apresentar-se como composto majoritário, Njoroge et al. (2005), por exemplo, ao estudar uma amostra coletada no Quênia, identificou que o composto majoritário do óleo das cascas da laranja doce foram o α -pineno, α -terpineno e β -pineno e sabineno. Em outro estudo realizado no Vietnã em 2002 por Minh Tu et al. (2002), o sabineno, foi constituído como composto majoritário. Essas discrepâncias podem ocorrer devido à parte da planta que foi utilizada nos estudos, Simões et al. (2007) afirma que a produção natural dos óleos voláteis e a sua composição nas plantas é determinada geneticamente, sendo, geralmente, específica para um determinado órgão e característica para o seu desenvolvimento.

De acordo com os dados da composição química para o óleo essencial extraído das cascas da laranja doce reportados na literatura, o d-Limoneno foi evidenciado como composto majoritário, especificamente em amostras coletadas no Brasil. Por outro lado, para outras partes da planta revelaram que os componentes majoritários variaram de acordo com a região de coleta, sendo que o d-Limoneno está presente em maior proporção nas cascas (CLÁUDIO JÚNIOR, 2009).

5.3 Avaliação dos parâmetros físico-químicos do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

A Tabela 2 apresenta as propriedades físico-químicas do óleo essencial extraído das cascas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.

Tabela 2 - Parâmetros físico-químicos obtidos do óleo essencial das cascas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.

Parâmetros Físico-Químicos	Óleo de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck
Densidade (g/mL)	0,850
Solubilidade em etanol a 90%	1:5
Índice de refração (ND 25°)	1,476
Cor	Incolor
Aspecto	Límpido
Odor	Característico
Rendimento (% m/m)	2,47

Fonte: O autor (2017).

Mesmo existindo algumas variáveis que determinam a qualidade de um óleo essencial, o óleo estudado apresentou densidade de 0,850 g/mL. Martins (2011) cita que a Farmacopéia Européia e International Standard Organization (ISO) estabelecem o intervalo de 0,842-0,850, estando esse parâmetro físico-químico dentro dessa variação aceitável. O óleo estudado foi solúvel em álcool, na proporção de 1:5 por partes do óleo para partes da solução alcoólica, respectivamente. Outro parâmetro avaliado foi o índice de refração ($n_D^{25^\circ}$). Segundo Mouchrek Filho (2000), tal índice é muito importante para definir as características analíticas dos óleos essenciais e também no reconhecimento de falsificações. O valor do índice obtido no óleo estudado foi de 1,476, ficando dentro da faixa de 1,470 a 1,476, recomendada também pela Farmacopéia Européia e ISO. Esse mesmo valor do índice está dentro da faixa do índice do padrão d-Limoneno, cujo valor, segundo Co (2006), é de 1,473. No que diz respeito às propriedades organolépticas, o óleo estudado apresentou a cor, o aspecto e o odor característicos e semelhantes ao do padrão d-Limoneno.

Calculado a partir da base livre de umidade (b.l.u), o rendimento obtido de 2,47 % (m/m) foi bem considerável tendo por base a densidade apresentada e a comparação com a extração de outras espécies vegetais.

Mesmo o perfil de cada óleo essencial sendo determinado geneticamente, alterações na fisiologia vegetal podem comprometer as propriedades físico-químicas provocando variabilidades químicas numa mesma espécie. A avaliação dos parâmetros físico-químicos dos óleos essenciais é de suma importância para verificarmos não somente a qualidade, mas também o controle de sua pureza, pois de acordo com Simões et al. (2003), os óleos essenciais na presença de oxigênio, luz, calor, umidade e metais são muito instáveis, sofrendo inúmeras reações de degradação, o que dificulta a sua conservação, fazendo com que o seu processo de armazenamento seja fundamental para a manutenção de sua qualidade.

5.4 Teste de toxicidade

No bioensaio com as larvas de *Artemia salina* Leach, a avaliação da toxicidade do óleo essencial foi feita através da correlação linear de Pearson e os dados expressos em concentração letal (CL_{50}) conforme mostra Tabela 3.

Tabela 3 - Frequência da mortalidade de *Artemia salina* em função de diferentes concentrações do óleo essencial da espécie *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.

Réplica	Concentração de óleo (µg/mL)	Vivos (n)	Mortos (n)	Mortalidade (%)
1	10	10	0	0
2	10	10	0	0
3	10	10	0	0
1	100	8	2	20
2	100	8	2	20
3	100	8	2	20
1	250	6	4	40
2	250	6	4	40
3	250	6	4	40
1	500	4	6	60
2	500	4	6	60
3	500	4	6	60
1	1000	2	8	80
2	1000	3	7	70
3	1000	3	7	70

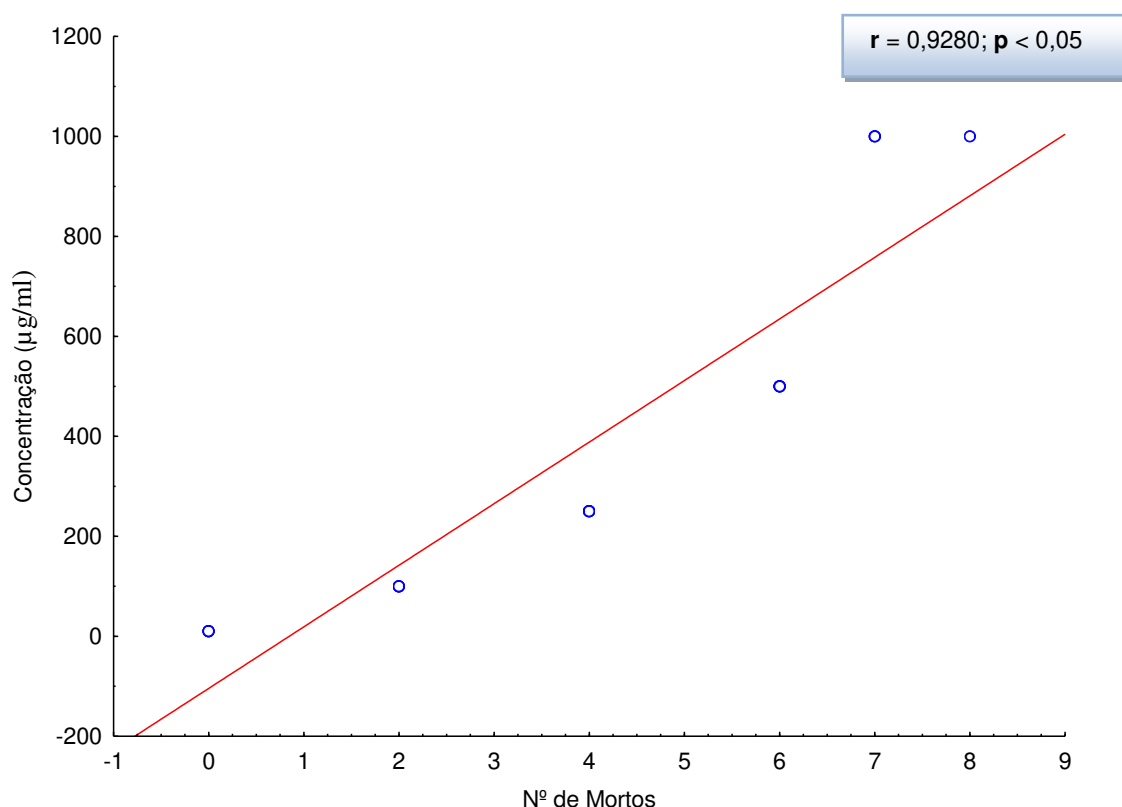
Fonte: Autor (2017)

De acordo com o valor de p encontrado ($r^2 = 0,8479$; $r = 0,9280$; $p < 0,05$), onde r^2 = coeficiente de determinação, r = índice de correlação linear de Pearson e p = probabilidade do teste, há correlação linear significativa positiva forte entre a taxa de mortalidade de *Artemia salina* e as diferentes concentrações do óleo extraído laranja utilizadas no experimento (Gráfico 2). Desta forma, quanto maior a concentração do óleo, maior é a taxa de mortalidade do microcrustáceo. A CL_{50} calculada a partir da equação da reta estimada pelo índice de correlação de Pearson foi de 511,602 µg/mL.

Em geral, segundo Rahman, Choudhary e Thomson (2001), os compostos bioativos são tóxicos às larvas de *Artemia salina* Leach. Assim, a letalidade a este microcrustáceo pode ser utilizada como um teste preliminar rápido e simples, durante o isolamento de produtos naturais. O critério estabelecido por Dolabela (1997) para classificação da toxicidade dos óleos essenciais considera um produto altamente tóxico quando $CL_{50} \leq 80$ µg/mL, moderadamente tóxico para $80 \mu\text{g/mL} \leq CL_{50} \leq 250$ µg/mL e levemente tóxico ou atóxico quando $CL_{50} \geq 250$ µg/mL. Dessa forma, a amostra testada apresenta leve toxicidade ou atoxicidade frente ao teste realizado. Alguns testes utilizando como bioindicador a *Artemia salina* já foram realizados por

pesquisadores como, Ruiz et al. (2005), Santos et al. (2007), Silva-Filho et al. (2009). O óleo essencial estudado foi submetido ao bioensaio com *Artemia salina* para verificar a toxicidade frente a outros organismos que coabitam com caramujos. Portanto, ensaios usando *Artemia salina* Leach como um indicador de letalidade frente a compostos bioativos oriundos de espécies vegetais, devem ser considerados.

Gráfico 2 - Correlação Linear de Pearson para o teste de CL₅₀ entre a mortalidade de *Artemia salina* e a concentração do óleo essencial da espécie *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.



Fonte: O autor (2017).

A comprovação da atoxicidade do óleo essencial estudado foi significativa, uma vez que este não pode interferir na integridade fisiológica de seres vivos que coabitam o mesmo ecossistema do caramujo do gênero *Biomphalaria*. É relevante observar que a niclosamida, substância aprovada pela ANVISA-MS mostrou-se tóxica para espécies aquáticas como crustáceos do zooplâncton (OLIVEIRA-FILHO; PAUMGARTEN, 2000).

Os valores normalizados pela World Health Organization (WHO),

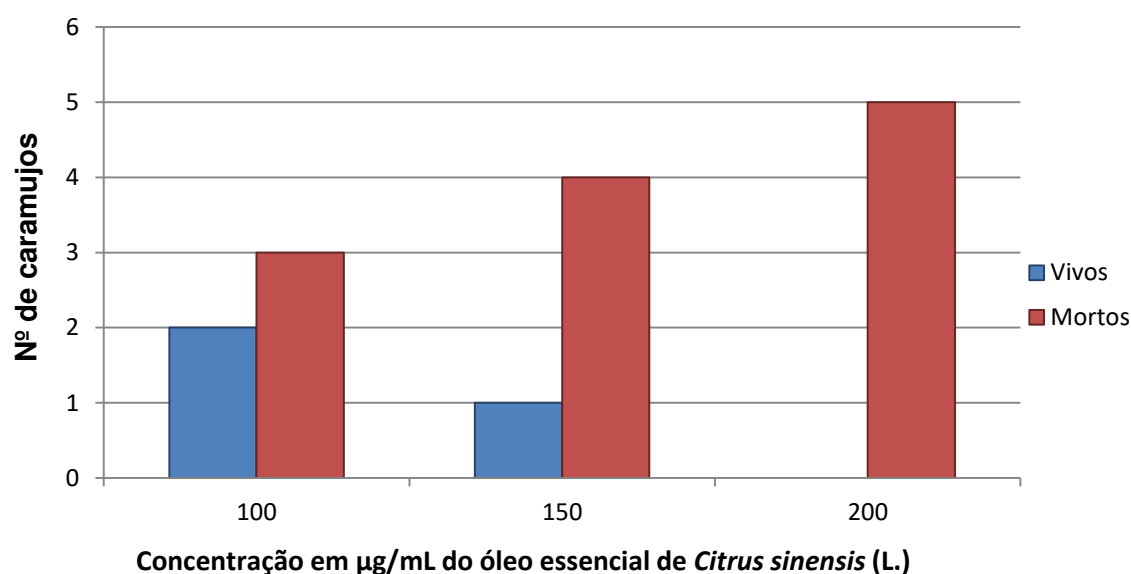
teoricamente sugerem um limite para que os efeitos tóxicos causados pelos compostos presentes no vegetal sejam os menores possíveis em organismos não alvos. Assim, quanto menor for concentração na dose letal (90-100% de letalidade dos caramujos), melhores serão as condições de uso desses compostos no meio ambiente, e uma menor quantidade do material será utilizada (MOREIRA; ZANI; ALVES, 2010).

5.5 Atividade moluscicida

5.5.1 Avaliação do teste piloto

O teste piloto foi realizado com soluções do óleo essencial nas concentrações de 100, 150 e 200 µg/mL a fim de verificar a existência ou não da atividade moluscicida. O quantitativo de mortalidade dos caramujos nas diferentes concentrações de exposição pode ser observado no Gráfico 3.

Gráfico 3 - Frequência da mortalidade de *Biomphalaria glabrata* em função de diferentes concentrações do óleo essencial da espécie *Citrus sinensis* (L.) Osbeck para o teste piloto.



Fonte: O autor (2017)

5.5.2 Avaliação frente aos caramujos do gênero *Biomphalaria glabrata*

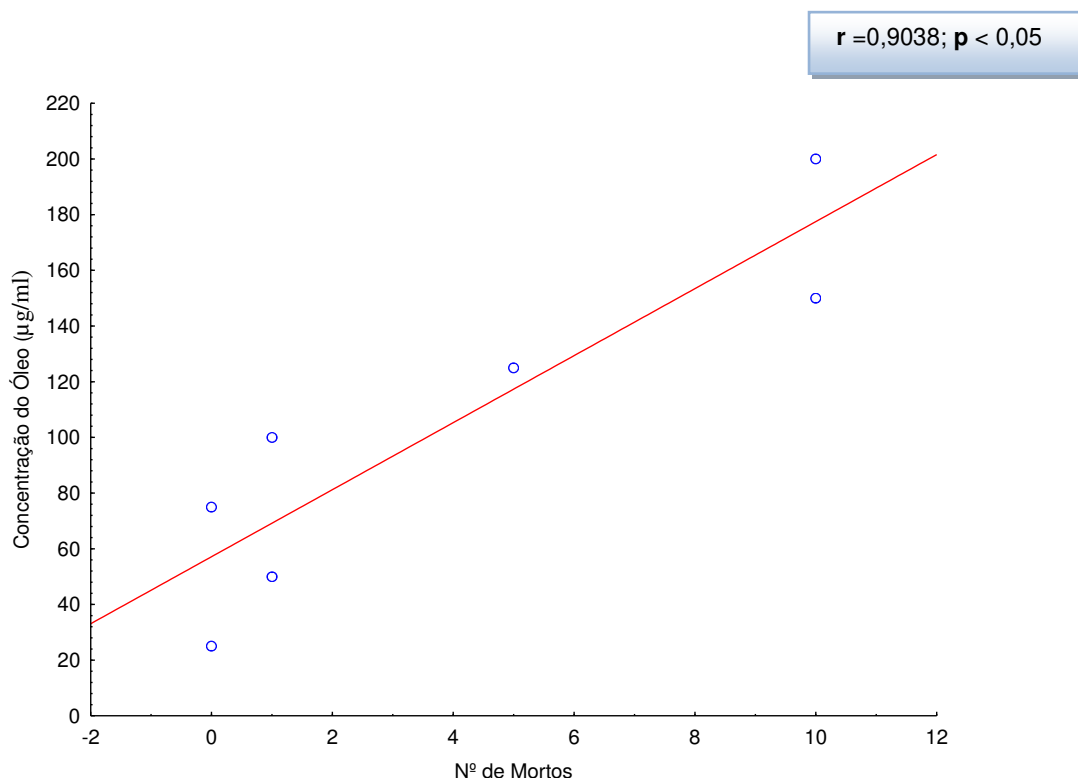
Neste trabalho, foram apresentados os resultados dos estudos com o óleo essencial extraído da casca da espécie *Citrus sinensis* (L.) Osbeck quanto a sua atividade moluscicida. Vale ressaltar que, embora outros estudos referentes às atividades biológicas para *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, já terem sido avaliados, nenhum dado de literatura foi observado para essa planta no que se refere a estudos de atividade moluscicida do seu óleo essencial.

De acordo com o valor de p encontrado ($r^2 = 0,8168$; $r = 0,9038$; $p < 0,05$), onde: r^2 = coeficiente de determinação; r = índice de correlação linear de Pearson; p = probabilidade do teste, houve correlação linear significativa entre a taxa de mortalidade dos caramujos e as diferentes concentrações do óleo da espécie estudada utilizadas no experimento. Portanto, quanto maior a concentração do óleo essencial, maior a mortalidade dos caramujos (Gráfico 4).

O comportamento dos moluscos do grupo controle negativo DMSO 0,1 % e dos moluscos que não sofreram nenhum tipo de tratamento foi utilizado como referência para se determinarem características anormais de comportamento para os expostos ao óleo essencial pesquisado.

Moluscos do controle DMSO 0,1 % se mantiveram ativos (motilidade considerada normal) durante as 24 horas de exposição, demonstrando forte adesão às paredes dos recipientes e apresentando rápida resposta ao estímulo ao serem tocados por pinça. Nas 24 horas de recuperação, essas características se mantiveram e os moluscos se alimentaram normalmente. Todos os moluscos sobreviveram ao ensaio e não houve ovoposição neste período.

Gráfico 4 - Correlação Linear de Pearson para o teste de CL₅₀ entre a mortalidade de caramujos e a concentração do óleo essencial da espécie *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.



Fonte: O autor (2017).

Na avaliação da atividade moluscicida estudada os valores capazes de provocar a mortalidade de 50 % e 90 % dos caramujos submetidos aos testes foram 83,3 µg/mL e 168,75 µg/mL, respectivamente (Tabela 4). Segundo a World Health Organization (1983), uma planta com propriedade moluscicida é considerada ativa se ocasionar 90% de mortalidade, em concentrações de até 100 µg/mL. Percebe-se, que o valor da CL₉₀ obtido foi acima do que é preconizado.

O composto majoritário obtido nesse presente estudo foi o d-limoneno, este é encontrado em frutas cítricas (cascas principalmente de laranjas), é volátil e responsável pelo cheiro que essas frutas apresentam. Estudos similares sobre a avaliação dessa mesma atividade foram realizados com a espécie *Citrus limon* Linneo, Ghelardini et al. (1999), Bisset e Wichtl (2001), Vekiari et al. (2002) afirmam inclusive que a constituição química dos óleos essenciais de frutas cítricas compreende hidrocarbonetos monoterpênicos e sesquiterpênicos e monoterpênicos oxigenados. O óleo volátil da casca do fruto e das folhas de *Citrus limon* L. é rico em l-limoneno, b-pineno, g-terpineno, terpinoleno, neral e geranial.

Tabela 4 - Atividade moluscicida do óleo essencial extraído da casca da espécie *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.

Concentração (µg/mL)	Mortalidade* (%)	CL₅₀ (µg/mL)	CL₉₀ (µg/mL)
DMSO 0,1 %	0		
25	0		
50	10		
75	10	83,33 µg/mL	
100	60		
125	75		
150	80		168,75 µg/mL
200	100		

*10 moluscos por grupo
Fonte: O autor (2017).

6 CONCLUSÃO

Frente aos resultados obtidos após a caracterização química e avaliação da atividade moluscicida do óleo essencial da espécie *Citrus sinensis* (L.) Osbeck podemos concluir que:

- a) Os parâmetros físico-químicos do óleo essencial estudado apresentaram valores compatíveis com os obtidos pela literatura;
- b) A caracterização por CG-EM permitiu identificar os componentes majoritários e minoritários do óleo essencial extraído das cascas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, sendo o limoneno o majoritário com 81,50%;
- c) O óleo essencial extraído da casca de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck apresentou atividade moluscicida contra moluscos da espécie *B. glabrata*, com concentrações letais a 50% (CL₅₀) e 90% (CL₉₀) de 83,33 µg/mL e 168,75 µg/mL respectivamente, porém, de acordo com os critérios da World Health Organization (1983), esse óleo essencial não é considerado ideal por apresentar valor de CL₉₀ maior que o máximo estabelecido (100 µg/mL);
- d) O ensaio biológico com *Artemia salina* Leach para a concentração letal 50% (CL₅₀) realizado com o óleo essencial em estudo mostrou que o extraído das cascas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, apresentou resultado de 511,6 µg/mL, sendo considerado atóxico, segundo critérios de Dolabela (1997), indicando a importância deste ensaio;
- e) Estudos envolvendo pesquisas do potencial moluscicida de espécies vegetais revelam a importância da busca de compostos bioativos sustentáveis que possam ser usados no combate de doenças negligenciadas com a esquistossomose, uma vez poderá favorecer ao desenvolvimento biotecnológico por meio do conhecimento científico e do potencial econômico de espécies da flora maranhense.

REFERÊNCIAS

- ALVIM, M. C. A esquistossomose no Maranhão. **Hiléia Médica**, n. 2, p. 151-157, 1980.
- ANWAR, F. et al. Physico-Chemical Characteristics of Citrus Seeds and Seed Oils from Pakistan. **J. Am Oil Chem So**, v. 85, p. 321-330, 2008.
- ARAÚJO, A. M. **Geoprocessamento e Saúde**: distribuição espacial da esquistossomose mansônica em São Luís-MA, no período de 1997 a 2004. Maranhão: EDUFMA, 2005.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 5784**: Óleos essenciais, determinação da massa específica e densidade relativa, método de ensaio. Rio de Janeiro, 1985a.
- _____. **NBR 5785**: Óleos essenciais, determinação do índice de refração, método de ensaio. Rio de Janeiro, 1985b.
- _____. **NBR 5791**: Óleos Essenciais, determinação da solubilidade em etanol. Rio de Janeiro, 1989.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS EXPORTADORES DE CÍTRICOS. 2008. Disponível em: <<http://www.abecitrus.com.br>>. Acesso: 10 dez. 2012.
- ASSUNÇÃO, G. V. de. **Caracterização química e avaliação da atividade larvicida frente ao *Aedes aegypti* do óleo essencial da espécie *Citrus sinensis* L. Osbeck (laranja doce)**. 2013. 97 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2013.
- BABILI, F. E. et al. Molluscicidal activity against *Bulinus truncatus* of *Croton campestris*. **Fitoterapia**, v. 77, p. 384-387, 2006.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BARSOUM RS. Urinary Schistosomiasis: Review. *J Adv Res* 4: 453–9, 2013.
- BENELLI, P. **Agregação de valor ao bagaço de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) mediante obtenção de extratos bioativos através de diferentes técnicas de extração**. 2010. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.
- BISSET, N. M.; WICHTL, M. **Herbal drugs and phytopharmaceuticals**. 2.ed. Medpharm: Boca Raton, 2001.
- BIZZO, H. R. et al. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p.588-594, 2009.

BOVILL, H. Trade of essential oils. In: BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. (Ed.). **Handbook of essential oils: science, technology and applications**. Boca Ration: CRC Press, 2010. p. 895-902.

BRAGA, L. B. ***Biomphalaria tenagophila guaibensis* (MOLLUSCA: PLANORBIDAE): avaliação da suscetibilidade a *Schistosoma mansoni* e do status de subespécie**. 2012. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta pública nº 73, de 16 de julho de 2010a. **Formulário Nacional Fitoterápico**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/5b996d8047458f699895dc3fbc6735/CP+N%C2%BA+73+COFAR.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 21 mar. 2017.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Diretrizes Técnicas do Programa de Controle da Esquistossomose**. 3. ed. Brasília, DF, 2010b.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Sistema Nacional de Vigilância em Saúde, Relatório de Situação, Maranhão**. Brasília, DF, 2010c.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília, DF, 1995. Disponível em: <www.saude.gov.br/svs>. Acesso em: 15 jan. 2017.

_____. Ministério da Saúde. **Controle da esquistossomose: diretrizes técnicas**. Brasília, DF, 1998.

_____. Ministério da Saúde. Distribuição da esquistossomose, de acordo com a faixa de positividade, por município. Brasil, 2010-2015. 2017. Disponível em: <<http://portal.arquivos.saude.gov.br/images/png/2017/setembro/14/mapa-distribuicao-esquitossomose-2010-1015.png>>. Acesso em: 15 jan. 2017.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 6. ed. Brasília, DF, 2005.

_____. Fundação Nacional de Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica. Programa de vigilância e controle da Esquistossomose (PCE): diretrizes técnicas**. 2. ed. Brasília, DF, 2007a. No prelo.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: diretrizes técnicas: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE)**. 2. ed. Brasília, DF, 2007b.

_____. Ministério da Saúde. **Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: diretrizes técnicas: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE)**. 2. ed. Brasília, DF, 2008a.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Vigilância em Saúde: Dengue, Esquistossomose, Hanseníase, Malária, Tracoma e Tuberculose**. 2. ed. rev. Brasília, DF, 2008b. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cab_n21_vigilancia_saude_2ed_p1.pdf>. Acesso em: 22 ago. 2017.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Vigilância em Saúde: Dengue, Esquistossomose, Hanseníase, Malária, Tracoma e Tuberculose. 2. ed. Brasília, DF, 2008c. v. 21.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Surveillance and Control of Mollusks with Epidemiological Importance: technical directives: Schistosomiasis Control and Surveillance Program**. Brasília, DF, 2008d.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Sistema Nacional de vigilância em saúde: relatório de situação: Maranhão**. 5. ed. Brasília, DF, 2011.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Vigilância da esquistossomose mansoni: diretrizes técnicas**. 4. ed. Brasília, DF, 2014.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de vigilância em Doenças Transmissíveis. **Campanha Nacional de Hanseníase, Verminoses, Tracoma e Esquistossomose 2016: Informe Técnico**. Brasília: Ministério da Saúde, 2016. 23p.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 223-253, Aug. 2004.

CALOW, P. Marine and estuarine invertebrate toxicity tests. In: HOFFMAN, D. et al. **Handbook in cytotoxicology**. Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1993. p. 1-5.

CANTANHEDE, S. P. D. **Esquistossomose mansônica no Maranhão: relações com variáveis socioeconômicas e ambientais**. [S.l.: s.n.], 2010.

CARVALHO, E. M. F. de et al. Evolução da esquistossomose na Zona da Mata Sul de Pernambuco. Epidemiologia e situação atual: controle ou descontrole? **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 4, p. 787-795, out./dez. 1998.

CARVALHO, O. S.; CALDEIRA, R. L. **Identificação morfológica de *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni***. Belo Horizonte: Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, 2004.

CASSEL, E. et al. E. Steam distillation modeling for essential oil extraction process. **Industrial Crops and Products**, v. 29, p. 171-176, 2009.

CAVALCANTE, M. F. et al. Síntese de 1,3,5 - triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* leach. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 1, 2001.

CHENG, Y.; CHOU, C. Composition of peel essential oils from eight citrus species. **Journal of the Chinese Chemical Society**, Taiwan, v. 31, n. 1, p. 93-6, 1984.

CLÁUDIO JUNIOR, P. A. **Composição química e atividade biológica dos óleos essenciais de frutas cítricas**. 2009. 80 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Pós-Graduação em Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.

CO, S. A. **Aldrich Handbook of fine chemicals and laboratory equipment**. United Kingdom: Sigma-Aldrich, 2006.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. New York: The New York Botanical Garden, 1988.

DEMYTTENAERE, J.; KIMPE, N. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 11, p. 265-270, 2001.

DHARMAWAN, J.; KASAPIS, S.; CURRAN, P. Characterization of volatile compounds in selected citrus fruits from Asia - part II: peel oil. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 20, n. 1, p. 21-24, 2007.

DIAS, C. N. et al. "Chemical composition and larvicidal activity of essential oils extracted from Brazilian Legal Amazon plants against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae)," **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 8, 2015.

DOLABELA, M. F. **Triagem in vitro para a atividade antitumoral e anti- T.cruzi de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas**. 1997. 128p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1997.

DORNFELD, C. B. **Utilização de análises limnológicas, bioensaios de toxicidade e macroinvertebrados bentônicos para o diagnóstico ambiental do reservatório de Salto Grande (Americana, SP)**. 2002. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

FABROWSKI, F. J. **Eucaliptus smithii R. T. BAKER (Myrtaceae) como espécie produtora de óleo essencial no sul do Brasil**. 2002. 225f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

FALKENBERG, M.; BAUMGARTEN, D.; SIMIONATO, C. Screening of some Brazilian medicinal plants with the brine shrimp assay. **Acta Hortic**, v. 502, p. 401-404, 1999.

FARMACOPEIA BRASILEIRA IV. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2010. Parte 1.

FERRO, D. **Fitoterapia: conceitos clínicos**. São Paulo: Atheneu, 2008.

FILIPPIS, F. de M. **Extração com CO2 supercrítico de óleos essencial de Honsho e Ho-sho- experimentos e modelagem**. 2001. 114 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.

FRANÇA, C. R. C. **Presença de caramujo e aspectos ambientes que favorecem o desenvolvimento da esquistossomose no Sá -Viana, bairro da periferia de São Luís, Maranhão – Brasil**. 2011. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2011.

FRANZ, C. M. Essential oil research: past, present and future. **Flavour Fragrance Journal**, v. 25, p. 112-113, 2010.

GARCIA, A. P. M. Alimentos funcionais: contribuindo para a saúde e prevenindo doenças. **Qual. Alim. Nutr.**, São Paulo, v. 1, n. 19, jun./set. 2004.

GARFIELD, E. Schistosomiasis: The scourge of the Third World. Part 2. Diagnosis and treatment. Current comments. **Essays of an Information Scientist**, v. 9, n. 10, p. 3-13, Mar. 1986.

GHELARDINI, C. et al. Local anesthetic activity of the essential oil of *Lavandula angustifolia*. **Planta Med**, v. 65, p. 700-703, 1999.

GONÇALVES, M. M. L. et. al. Fatores sócio-culturais e éticos relacionados com os processos de diagnóstico da esquistossomose mansônica em área de baixa endemicidade. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 1, p. 92-100, jan./fev. 2005.

HOFFMAN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. The sedimentation-concentration method in schistosomiasis mansoni. *Puerto Rico J Pub Health Trop Med*, v. 9, p. 281-98, 1934.

KATZ, N.; ALMEIDA, K. Esquistossomose, Xistosa, Barriga d'água. **Ciência & Cultura**, São Paulo, v. 55, n. 1, p. 652-656, jan./mar. 2003.

KING, C. H. Parasites and poverty: the case of schistosomiasis. **Acta Trop.**, v. 113, n. 2, p. 95-104, Fev. 2010.

KING CH, BERTSCH D. Historical Perspective: Snail Control to Prevent Schistosomiasis. *PLoS Negl Trop Dis* 9: 2015.

LAMBERTUCCI, J. R.; SERUFO, J. C. Esquistossomose Mansônica. In: GAYOTTO, L. C. C.; ALVES, V. A. F. (Ed.). **Doenças do Fígado e Vias Biliares**. São Paulo: Atheneu, 2001. p. 815-835.

LAMBERTUCCI JR. Acute schistosomiasis mansoni: Revisited and reconsidered. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105: 422–35, 2010.

LEAL DAG, FRANCO RMB, NEVES MF, SIMÕES LF, BASTOS LAD, ALLEGRETTI SM, et al. Acute Schistosomiasis in Brazilian Traveler: The Importance of Tourism in The Epidemiology of Neglected Parasitic Diseases. *Case Rep Infect Dis* 2012: 1–3, 2012.

LEYTON, V.; HENDERSON, T. O.; MASCARA, D. Atividade moluscicida de princípios ativos de folhas de *Lycopersicon esculentum* (Solanales, Solanaceae) em *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Planorbidae). *Iheringia Ser Zool*, v. 95, p. 213-216, 2005.

LEE Y-H, JEONG HG, KONG WH, LEE S-H, CHO H-I, NAM H-S, et al. Reduction of Urogenital Schistosomiasis with an Integrated Control Project in Sudan. *PLoS Negl Trop Dis* 9: 2015.

LEWIS FA, TUCKER MS. Schistosomiasis. In: *Digenetic Trematodes*. New York. Springer New York, 2014.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

LUNA, J. de S. et al. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 199-206, 2005.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JÚNIOR, V. F. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos interdisciplinares. **Quim Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

MAGALHÃES JUNIOR, D. M.; NEGRI, J. D. P.; PALHARES JUNIOR, J. **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2005.

MARANHÃO. Secretaria de Saúde do Estado. Programa de Controle da Esquistossomose. **Resumo das atividades de coproscopia e tratamento por localidade**. São Luís, 2017.

MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Review article number 6: Plants moluscicidas. **Phytochemistry**, v. 24, n. 6, p. 639-652, 1985.

MARTINS, A. P. Requisitos de Qualidade em Óleos Essenciais: a importância das monografias da Farmacopeia Europeia e das normas ISO. **Revista de Fitoterapia**, v. 11, n. 2, p. 35-50, 2011.

MATOS, F. J. A. et al. Essential oil of *Mentha x villosa* Huds. from Northeastern Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 11, p. 41-44, 1999.

MATTOS JÚNIOR, D. et al. **Citros: principais informações e recomendações de cultivo**. [S.l.: s.n.], 2005.

MCCULLOUGH, F. S. et al. Molluscicides in schistosomiasis control. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 58, n. 5, p. 681-689, 1980.

MCLAUGHLIN, J. L. Crown gall tumours on potato discs and brine shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractions. In: DEY, P. M.; HARBONE, J. B. (Ed.). **Methods in Plant Biochemistry**. New York: Academic Press, 1991. p. 1-32.

MENDES, N. M. et al. Ensaios preliminares em laboratório para verificar a ação moluscicida de algumas espécies da flora brasileira. **Rev. Saúde Pública**, v. 18, p. 348-354, 1984.

MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Med**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MELO, A. V. **Avaliação do efeito moluscicida do óleo de *Citrus limon* Linneo frente ao hospedeiro intermediário da esquistossomose (*Biomphalaria* sp)**. 2010. Monografia (Especialização em Imunologia) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2010.

MINH TU, N. et al. Volatile constituents of Vietnamese pummelo, orange, tangerine and lime peel oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 17, n. 3, p. 169- 174, 2002.

MIRANDA, C. A. S. F. et al. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. **Rev. Ciênc. Agron.**, Fortaleza, v. 47, n. 1, p. 213-220, Mar. 2016. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-66902016000100213&lng=en&nrm=iso>. access on 02 May 2016.

MILLEZI, A.F. et al . Caracterização química e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Rev. bras. plantas med.**, Botucatu, v. 16, n. 1, p. 18-24, Mar. 2014. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722014000100003&lng=en&nrm=iso>. access on 05 May 2016.

MOREIRA, C. P. S.; ZANI, C. L.; ALVES, T. M. A. Atividade moluscicida do látex de *Synadenium carinatum* Boiss. (Euphorbiaceae) sobre *Biomphalaria glabrata* e isolamento do constituinte majoritário. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 8, n. 3, p. 16-27, 2010.

MOUCHREK FILHO, V. E. **Estudos Analíticos e modificações químicas por metilação e acetilação do eugenol contido no óleo essencial extraído das folhas da espécie *Pimenta dioica* Lindl**. 124p. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2000.

MURPHY, B. T. **Isolation and structure elucidation of antiproliferative natural products from Madagascar**. 2008. 182f. Dissertação (Mestrado) – Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Chemistry, 2008.

NAVARRETE, A. et al. Improvement of Essential Oil Steam Distillation by Microwave Pretreatment. **I&EC Research**, v. 50, p. 4667-4671, 2011.

NJOROGE, S. et al. Essential oil constituents of three varieties of Kenyan sweet oranges (*Citrus sinensis*). **Flavour and Fragrance Journal**, Chischester, v. 20, n. 1, p. 80-85, 2005.

OLIVEIRA, V. M.; NOVA, M. X. V.; ASSIS, C. R. D. Doenças tropicais negligenciadas na região nordeste do Brasil. **Scire Salut**, v. 2, p. 29-48, 2012.

OLIVEIRA-FILHO, E. C.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Toxicity of *Euphorbia milii* latex and niclosamide to snails and nontarget aquatic species. **Ecotox Environ Safe**, v. 46, p. 342-350, 2000.

OTHA, Y.; HIROSE, Y. Constituents of Cold-Pressed oil of *Citrus natsudai* Hayata. **Agric. Biol. Chem.**, v. 30, p. 1196-1201, 1966.

PARAENSE, W. L. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. **Arq. Mus. Nac.**, Rio de Janeiro, v. 55, p. 105-128, 1975.

PAULINI, E. Estado atual do conhecimento composition of the leaf essential oil of *Cinnamomum verum* (Lauraceae) from Fiji islands. Journal of Essential Oil-Bearing Plants, sobre moluscidas. **Rev. Bras. Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 4, n. 15, p. 355-62, 1965.

PAVIANI, T. C. **Extração com CO₂ a altas pressões e fracionamento do óleo essencial de capim-limão utilizando peneiras moleculares**. 2004. 92 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, Rio Grande do Sul, 2004.

PIERI, O. S.; FAVRE, T. C. Diapausa em *Biomphalaria glabrata*. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. **Schistosoma mansoni e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. 20. ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2008. cap. 12.

PIERI, O. S.; JURBERG, P. Aspectos etiológicos na sobrevivência dos caramujos vetores da Xistosomose ao tratamento com moluscidas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 76, n. 1, p. 47-55, 1991.

PINHEIRO, A. L. **Produção de óleos essenciais**. Viçosa: CPT, 2003.

PINTO, C.; ALMEIDA, A. F. Um novo método para a profilaxia da esquistossomose mansoni. **Mem I Oswaldo Cruz**, v. 40, p. 291-311, 1994.

RAGHAVAN, N. et al. Comparative gene analysis of *Biomphalaria glabrata* hemocytes pre-and post-exposure to miracidia of *Schistosoma mansoni*. **Molecular&Biochemical Parasitology**, n. 126, p. 181-191, 2003.

RAHMAN, A.; CHOUDHARY, M. I.; THOMSON, W. J. Bioassay techniques for drug development. **Harwood academic publishers**, 2001.

- RAMOS, C. M. **Ocorrência e positividade de *Biomphalaria glabrata* por *Schistosoma mansoni* no bairro da Vila Embratel e sua relação com o ambiente**. 2007. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2007.
- REY, L. **Parasitologia**: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- RIBO, J. M. Interlaboratory Comparison studies of the Luminescent Bacteria Toxicity Bioassay. **Environ. Toxicol. Water Qual.**, v. 12, p. 283-294, 1997.
- ROY, A.; SARAF, S. Limonoids: overview of significant bioactive triterpenes distributed in plants kingdom. **Biol Pharm Bull**, v. 29, n. 2, p.191-201, 2006.
- RUIZ, A. L. T. G. et al. Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (Cyperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 98-102, 2005.
- SANTOS, A. F. **Determinação da atividade anti-esquistossomótica dos extratos de substâncias puras obtidas de plantas**. 2005. Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2005.
- SANTOS, A. F. et al. The lethality of *Euphorbia conspicua* to adults of *Biomphalaria glabrata*, cercaria of *Schistosoma mansoni* and larvae of *Artemia salina*. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 135-139, 2007.
- SARTOR, R. B. **Modelagem, Simulação e Otimização de uma Unidade Industrial de Extração de Óleos Essenciais por Arraste a Vapor**. 2009. Dissertação (Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos) – Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.
- SATAYATHUM, S. A. et al. Factors affecting infection or reinfection with *Schistosoma haematobium* in Coastal Kenya: survival analysis during a nine-year, school-based treatment program. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 75, n. 1, p. 83-92, 2006.
- SERAFINI, L. A. et al. **Extrações e aplicações de óleos essenciais de plantas aromáticas e medicinais**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002.
- SHAW, P. E. Review of Quantitative Analyses of Citrus Essential Oils. **J. Agric. Chem**, v. 27, p. 246-257, 1979.
- SHARMA, N.; TRIPATHI, A. Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. **Microbiological Research**, v. 163, p. 337-344, 2008.
- SIANI, A. C. et al. Óleos Essenciais: potencial antiinflamatório. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 3, n. 16, p. 38-43, 2000.

SILVA E. M. F., Estudo in vitro do potencial citotóxico da *Annona muricata* L. Egidi Mayara Firmino Silva,*; Renata Barreto de Castro Nascimento; Francisco Stefânio Barreto; Manoel Odorico de Moraes Filho; Samara de Almeida Souza Griz³; Aldenir Feitosa dos Santos; Kristiana Cerqueira Mousinho, *Rev Ciênc Farm Básica Apl.*, 2015;36(2):277-283 ISSN 1808-4532

SILVA-FILHO, C. R. M. et al. Avaliação da bioatividade dos extratos de cúrcuma (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae) em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata*. **Rev. bras. farmacogn.** v. 19, n. 4, 2009.

SILVA, L. C. da; CHIEFFI, P. P.; CARRILHO, F. J. Schistosomiasis mansoni - clinical features. **Gastroenterol Hepatol**, v. 28, n. 1, p. 30-9. Jan. 2005.

SILVA, M. G. F. **Atividade antioxidante e antimicrobiana in vitro de óleos essenciais e extratos hidroalcóolicos de manjerona (*Origanum majorana* L.) e manjerição (*Ocimum basilicum* L.)**. 2011. 70 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Industrial) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2011.

SILVA, N. F. S. et al. Bioensaio de atividade moluscicida adaptado para a avaliação de extratos de plantas medicinais. **Arq Ciências Vet Zool**, v. 11, p. 179-181, 2008.

SILVA-SANTOS, A. da. **Análise Técnica, Econômica e de Tendências da Indústria Brasileira de Óleos Essenciais**. Rio de Janeiro: Papel Virtual, 2002.

SILVA-SOUZA, N. **Esquistossomose no Maranhão: uma abordagem sobre roedores, análise proteômica e moluscos vetores**. 2012. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2012.

_____. **Mobilidade e patologia de *Holochilus brasiliensis* (Rodentia: Cricetidae) infectados com *Schistosoma mansoni* (Schistosomatida: Schistosomatidae) em laboratório**. 2001. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2001.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2003.

_____. _____. Porto Alegre: UFRGS, 2007.

SINCLAIR Stammers Micromacro. [2017?]. Disponível em: <<http://micromacro.co.uk/index.htm>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

SINGH, S.; SINGH, D. K. Molluscicidal activity of *Abrus precatorius* Linn. and *Argemone mexicana* Linn. **Chemosfere**, v. 38, p. 3319-3328, 1999.

SILVA DE ARAUJO, S. et al. Prospecção de patentes biotecnológicas com óleo essencial em microemulsão como agente anti-inflamatório **GEINTEC - Gestão, Inovação e Tecnologias**, v.5, n2, p. 2058-2065, Jun. 2015. Disponível em

<<http://revistageintec.net/portal/index.php/revista/article/view/414/549>>. Acesso em 01 Mai 2016.

SONG, H. et al. Volatile profiles in cold-pressed peel oil from Korean and Japanese Shiranui (*Citrus unshiu* Marcov.) (*C. sinensis* Osbeck) (*C. reticulata* Blanco). **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 70, n. 3, p. 737-739, 2006.

SOUZA, F. P. C. et al. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. **Rev Bras Clin Med.**, São Paulo, v. 9, n. 4, p. 300-7, jul./ago. 2011.

SOUZA, M. A. A. de; MELO, A. L. de. Ecological aspects of *Biomphalaria* in endemic areas for schistosomiasis in Brazil. In: ROKNI, M. B. **Shistosomiasis** Croatia: Rijeka, 2012. p. 193-208..

SOUZA, N. da S. **Visão Parasitológica da cepa humana de schistosoma mansoni em roedor silvestre**. 1992. Monografia (Graduação em Farmácia) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 1992.

TUAN, R. Distribuição e diversidade de espécies do gênero *Biomphalaria* em microrregiões ocalizadas no Médio Paranapanema. **Biota Netrop**, v. 9, n. 1, p. 279-276, 2009.

TURRA, C.; GHISI, F. **Laranja Orgânica no Brasil: produção, mercado e tendências**. [S.l.: s.n.], 2003.

VASCONCELLOS, M. L. et al. Baylis-Hillman adducts with molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata*. **Pest Manag Sci**, v. 3, p. 288-292, 2005.

VÉKEY, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **J Chromatogr A.**, v. 921, n. 2, p. 227-36, Jul. 2001.

VEKIARI, S. A. et. al. Composition and seasonal variation of the essential oil from leaves and peel of a Cretan lemon variety. **J Agric Food Chem**, v. 50, p. 147-153, 2002.

VITORINO, R. R. et al. Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle. **Rev. Soc. Bras. Clín. Méd.**, v. 10, n. 1, p. 39-45, 2012. Disponível em: <<http://files.bvs.br/upload/S/1679-1010/2012/v10n1/a2676>>. Acesso em: 8 set. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Elimination of schistosomiasis from low-transmission areas: report of a WHO informal consultation. Salvador, Bahia, Brazil 18-19, 2008**. Genebra, 2009.

_____. **Global plan to combat neglected tropical diseases 2008-2015**. Geneva, 2007.

_____. Memoranda: molluscicide screening and evaluation. **Bull World Health Organ**, v. 33, p. 567-576, 1965.

_____. **Report of the Scientific working Group on Plant Molluscicide & Guidelines for evaluation of plant molluscicides**. Geneva: 1983.

_____. **The control of schistosomiasis. Second report of the Who expert Committee, Who Technical Report Series**. Genebra, 1993.

_____. *Schistosomiasis*. 2016a. Disponível em:
<http://www.who.int/schistosomiasis/en/>. Acesso em: 17/05/2016.

_____. *Situation and trends*. 2016b. Disponível em:
http://www.who.int/gho/neglected_diseases/schistosomiasis/en/. Acesso em: 17/05/2016

_____. Schistosomiasis, countries or áreas at risk. 2014. Disponível em:
<<http://www.who.int/ith/en/>>. Acesso em: 03 fev. 2017.

_____. Schistosomiasis and Epidemiology. 2008. Disponível em:
<www.who.in/topics/schistosomiasis/en.>. Acesso em: 18 jun. 2017.

XU J, XU J-F, LI S-Z, ZHANG L-J, WANG Q, ZHU H-H, et al. Integrated control programmes for schistosomiasis and other helminth infections in P.R. China. *Acta Trop* 141: 1–10, 2013.

YAMANAKA, H. T. **Sucos cítricos**. São Paulo: CETESB, 2005. Disponível em:
<<http://www.cetesb.sp.gov.br>>. Acesso em: 15 jan. 2013. Série P+L.

YUSOFF, Z. M. et al. Characterization of Down-Flowing Steam Distillation System using Step Test Analysis. **IEEE CSGRC**, p. 197-201, 2011.

