



Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde



MESTRADO

**POTENCIAL DE PRODUTOS VEGETAIS DE *Tagetes erecta* L.
NO CONTROLE DA ESQUISTOSSOMOSE:**

atividade moluscicida e cercaricida

JOSÉ ANTONIO COSTA LEITE

São Luís - MA
2019

JOSÉ ANTONIO COSTA LEITE

**POTENCIAL DE PRODUTOS VEGETAIS DE *Tagetes erecta* L.
NO CONTROLE DA ESQUISTOSSOMOSE:
atividade moluscicida e cercaricida**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Flavia Maria Mendonça do Amaral

São Luís - MA
2019

Leite, José Antonio Costa.

Potencial de produtos vegetais de *Tagetes erecta* L. no controle da esquistossomose: atividade moluscicida e cercaricida / José Antonio Costa Leite. - 2019.

86 f.

Orientador (a): Flavia Maria Mendonça do Amaral. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/CCBS, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2019.

1.*Biomphalaria glabrata*. 2.*Schistosoma mansoni*. 3.*Artemia salina*. 4. *Danio rerio*.

I. Amaral, Flavia Maria Mendonça do. II. Título.

JOSÉ ANTONIO COSTA LEITE

**POTENCIAL DE PRODUTOS VEGETAIS DE *Tagetes erecta* L.
NO CONTROLE DA ESQUISTOSSOMOSE:**

atividade moluscicida e cercaricida

Dissertação apresentada ao Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

BANCA EXAMINADORA

Aprovado em: / /

Prof.^a Dr.^a Flavia Maria Mendonça do Amaral
Doutora em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
(Orientadora)

Prof.^a Dr.^a Denise Fernandes Coutinho
Doutora em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
(Examinadora)

Prof.^o Dr.^o Neuton Silva Souza
Doutor em Biotecnologia de Parasitos
(Examinador)

Prof.^o Dr.^o Victor Elias Mouchrek Filho
Doutor em Química Analítica
(Examinador)

Prof.^a Dr.^a Maria do Socorro de Sousa Cartágenes
Doutora em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
(Examinador suplente)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, primeiramente, pela força, proteção e bênçãos concedidas, sem Ele não seria capaz de concluir esta vitória.

Aos meus familiares que sempre me apoiaram nas minhas decisões, e com quem sempre pude compartilhar as minhas vitórias e derrotas, em especial aos meus pais, Antônio e Joana que muito fizeram e ainda fazem por mim, e a minha namorada Daianne.

À Prof. Dra. Flávia Maria Mendonça do Amaral que me acolheu junto ao seu laboratório, aceitando me orientar, assim como aos alunos do laboratório de Fitoterapia e Homeopatia: Jéssica, Talison, Orlene, Izolda, Cíntia e Nilson, muito obrigado! À Prof. Dra. Denise Fernandes Coutinho e toda a equipe dos Laboratórios de Farmacognosia I e II: Edilene, Samara, Tássio, Daniella e Ludmilla, por toda ajuda e empenho, vocês são pessoas especiais para mim.

À Prof. Dra. Nilce Ribeiro por disponibilizar a estrutura do Laboratório de Farmacognosia I.

Ao Prof. Dr. Victor Elias Moucherek Filho por todo apoio ao meu trabalho e disponibilidade.

Ao Raimundo Nonato (Horto Ático Seabra) pelo cuidado no cultivo das mudas utilizadas na realização deste trabalho. À Ariadna (UFMA) pela identificação botânica da espécie, pessoas que fizeram o trabalho acontecer. À amiga Mônica Neves, que muito contribui com os ajustes necessários e apoio ao desenvolvimento do estudo.

A todos os amigos que ganhei no mestrado, em especial a Irla, Paula, Gustavo, Roberta: Pessoas essas que compartilhei de momentos alegres e também difíceis nesta jornada de dois anos. Pessoas com quem apreendi muito e levarei além da academia.

À Universidade Federal do Maranhão, CAPES e FAPEMA, pelo apoio necessário em infraestrutura e financeiramente nas pesquisas e divulgação dos nossos trabalhos.

RESUMO

A esquistossomose mansônica é uma doença parasitária causada pelo helminto *Schistosoma mansoni* Sambon (1907), com alta ocorrência no Brasil e áreas endêmicas no Maranhão. Para a transmissão da doença, o parasita necessita de um hospedeiro intermediário que são caramujos do gênero *Biomphalaria* responsáveis pela liberação das cercárias que são as larvas infectantes ao homem. A Organização Mundial de Saúde determina que umas das formas de evitar a transmissão da doença, é realizar o controle do hospedeiro intermediário e bloquear as formas de disseminação do helminto, através do uso de moluscicida e cercaricidas. Visto que o uso de substâncias moluscicidas e cercaricidas sintéticos apresenta desvantagens como baixa seletividade e alto custo financeiro, a utilização de produtos naturais representa uma alternativa promissora. A espécie *Tagetes erecta* L. (Asteraceae), popularmente conhecida como cravo-de-defunto, tem amplo e diversificado emprego na prática popular com rica composição química e fácil cultivo. Considerando a problemática da esquistossomose, a alta incidência de vetores, a baixa seletividade dos produtos utilizados atualmente, bem como a resistência já apresentada à niclosamida, este trabalho visa realizar a caracterização química de extrato hidroetanólico das folhas e flores, do óleo essencial das folhas e do óleo essencial das flores de *Tagetes erecta*; investigar a atividade do extrato hidroetanólico, do óleo essencial das folhas e do óleo essencial das flores de *Tagetes erecta* contra *Biomphalaria glabrata* e frente cercárias de *Schistosoma mansoni*, avaliar parâmetros de toxicidade dos produtos vegetais contra organismos não-alvos. O extrato de *Tagetes erecta* foi obtido pelo método de percolação na relação droga: solvente de 1/12 m/v com rendimento de 26%. A análise química apresentou compostos fenólicos com destaque a classe dos flavonoides dos quais apresentaram três flavonas glicosiladas. O óleo essencial das folhas e o óleo essencial das flores foram extraídos por destilação por arraste de vapor em aparelho de clevenger. O rendimento dos óleos essenciais foram de 1,6% para o óleo essencial das folhas e de 1,2% para o óleo essencial das flores. A comparação da constituição química dos óleos demonstrou diferença no perfil de composição, monoterpenos prevaleceram no óleo essencial das folhas com o composto majoritário piperitona e no óleo essencial das flores prevaleceram os sesquiterpenos com destaque para o composto cariofileno. Os bioensaios foram realizados com os moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e com as cercárias do helminto *Schistosoma mansoni* de acordo com metodologias descritas na literatura. Nos testes de toxicidade contra organismos não - alvos utilizou-se o microcrustáceo *Artemia salina* Leach e o peixe *Danio rerio* Hamilton-Buchanan. O extrato hidroetanólico apresentou ação cercaricida frente as larvas infectantes do helminto *Schistosoma mansoni*, além de demonstrar segurança para utilização nos testes de toxicidade contra organismos não – alvos. O óleo essencial das folhas demonstrou atividade cercaricida promissora e segurança nos testes de toxicidade contra organismos não - alvos. Já o óleo essencial das flores demonstrou atividade contra os moluscos e cercárias de *Schistosoma mansoni*, porém apresentou-se como produto inseguro de utilização frente *Artemia salina* e *Danio rerio*. Esses resultados indicam que óleos essenciais e extrato hidroetanólico de *Tagetes erecta* possuem potencial para desenvolvimento de produto para o controle da esquistossomose demonstrando maior segurança que o produto recomendado pela Organização Mundial de Saúde.

Palavras-chave: *Biomphalaria glabrata*; *Schistosoma mansoni*; *Artemia salina*; *Danio rerio*

ABSTRACT

Schistosomiasis *mansoni* is a parasitic disease caused by the helminth *Schistosoma mansoni* Sambon (1907), with high occurrence in Brazil and endemic areas in Maranhão. For the transmission of the disease, the parasite needs an intermediate host that are snails of the genus *Biomphalaria* responsible for the release of the cercariae that are the infective larvae to the man. The World Health Organization determines that one of the ways to prevent transmission of the disease is to control the intermediate host and to block the forms of helminth dissemination through the use of molluscicidal and cercaricidal. Since the use of molluscicidal substances and synthetic cercaricidal presents disadvantages such as low selectivity and high financial cost, the use of natural products represents a promising alternative. The species *Tagetes erecta* L. (Asteraceae), popularly known as Marigold, has ample and diversified use in popular practice with rich chemical composition and easy cultivation. Considering the problematic of schistosomiasis, the high incidence of vectors, the low selectivity of the products currently used, as well as the resistance already presented to niclosamide, this work aims to perform the chemical characterization of hydroethanolic extract of the essential oil of the leaves and the essential oil of the flowers of *Tagetes erecta*; to investigate the activity of the essential oil hydroethanolic extract of the leaves and the essential oil of the *Tagetes erecta* flowers against *Biomphalaria glabrata* and cercaria fronts of *Schistosoma mansoni*, to evaluate parameters of toxicity of the vegetal products against non-target organisms. The extract of *Tagetes erecta* was obtained by the percolation method in the drug: solvent ratio of 1/12 m / v with yield of 26%. The chemical analysis showed phenolic compounds with highlight the class of flavonoids from which they presented three glycosylated flavones. The essential oil of the leaves and the essential oil of the flowers were extracted by steam distillation in a cleverger apparatus. The yield of the essential oils was 1.6% for the essential oil of the leaves and 1.2% for the essential oil of the flowers. The comparison of the chemical composition of the oils showed a difference in the composition profile, monoterpenes prevailed in the essential oil of the leaves with the major compound piperitone and in the essential oil of the flowers prevailed the sesquiterpenos emphasizing the compound caryophyllene. The bioassays were performed with the molluscs of the species *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) and with the cercariae of the helminth *Schistosoma mansoni* according to methodologies described in the literature. Already in the toxicity tests against non - target organisms the microcrustacean *Artemia salina* Leach and the fish *Danio rerio* Hamilton-Buchanan. The hydroethanolic extract presented cercaricidal action front infective larvae of the helminth *Schistosoma mansoni* and demonstrated safety for use in non - target organisms toxicity tests. Leaf essential oil demonstrated promising cercaricidal activity and safety in toxicity tests against non - target organisms. However, the essential oil of the flowers showed activity against the molluscs and cercariae of *Schistosoma mansoni*, but presented as an insecure product of use against *Artemia salina* and *Danio rerio*. These results indicate that essential oils and the hydroethanolic extract of *Tagetes erecta* have potential for product development for the control of schistosomiasis demonstrating greater safety than the product recommended by the World Health Organization.

Keywords: *Biomphalaria glabrata*; *Schistosoma mansoni*; *Artemia salina*; *Danio rerio*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de óbitos por esquistossomose no Brasil no período de período: 1996-2015.....	6
Tabela 2. Percentual (%) dos compostos majoritários dos óleos essenciais das folhas e óleos essenciais das flores de <i>Tagetes erecta</i> L. relatados na literatura.....	23
Tabela 3. Avaliação qualitativa e semiquantitativa dos constituintes químicos do extrato hidroetanólico das folhas e flores de <i>Tagetes erecta</i> L.....	31
Tabela 4. Principais constituintes do óleo essencial das folhas de <i>Tagetes erecta</i> (OFO) e do óleo essencial das flores de <i>Tagetes erecta</i> (OFL) identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.....	36
Tabela 5. Concentrações letais (CL ₅₀ e CL ₉₀) do óleo essencial das folhas (OFO) e do óleo essencial das flores (OFL) frente <i>Biomphalaria glabrata</i> (Say 1818).....	40
Tabela 6. Concentrações letais (CL ₅₀) do óleo essencial das folhas (OFO), óleo essencial das flores (OFL) e extrato hidroetanólico das folhas e flores (EHE) frente cercárias de <i>Schistosoma mansoni</i> Sambon (1907).....	41
Tabela 7. Concentrações letais (CL ₅₀) do óleo essencial das folhas (OFO), óleo essencial das flores (OFL) e extrato hidroetanólico das folhas e flores (EHE) em ensaios de toxicidade frente <i>Artemia salina</i> Leach.....	42
Tabela 8. Concentrações Letais (CL ₁₀ , CL ₅₀ e CL ₉₀) do óleo essencial das folhas (OFO), óleo essencial das flores (OFL) e extrato hidroetanólico das folhas e flores (EHE) frente <i>Danio rerio</i>	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição da esquistossomose, de acordo com a faixa de positividade, por município. Brasil, 2010 – 2015.....	7
Figura 2. Representação esquemática do ciclo de vida do helminto <i>Schistosoma mansoni</i> Sambon (1907).....	9
Figura 3. Representação esquemática da morfologia da cercária de <i>Schistosoma mansoni</i> Sambom (1907).....	10
Figura 4. Caramujo <i>Biomphalaria glabrata</i> (Say, 1818).....	12
Figura 5. Partes aéreas <i>Tagetes erecta</i> L.....	20
Figura 6. Cromatograma (comprimento de onda 270 nm) do extrato hidroetanólico das folhas e flores de <i>Tagetes erecta</i> L. Pico 1 - 10,3 minutos, Pico 2 - 14,9 minutos, Pico 3 - 20,6 minutos, Pico 4 - 23,7 minutos e Pico 5 - 29,3 minutos.....	32
Figura 7. Espectros de massas dos compostos do extrato hidroetanólico das folhas e flores de <i>Tagetes erecta</i> L. (ESI- MS ⁻). Pico 1: Patuletina-O-Galoil-Hexosídeo ; íon molecular m/z 645; íons fragmentos; MS ² (493, 478, 331, 313, 169); MS ³ (493, 478, 331, 169).....	33
Figura 8. Espectros de massas dos compostos do extrato hidroetanólico das folhas e flores de <i>Tagetes erecta</i> L. (ESI- MS ⁻). Pico 2: 4-O-p-Coumaroilquínico ; íon molecular m/z 337; íons fragmentos; MS ² (191, 173, 155, 111); MS ³ (191, 173, 155, 111, 93), Pico 3: Caempferol-O-Rutinosídeo ; íon molecular m/z 593; íons fragmentos; MS ² (593, 431, 285, 257, 151); MS ³ (593, 285, 257, 151).....	34
Figura 9. Espectros de massas dos compostos do extrato hidroetanólico das folhas e flores de <i>Tagetes erecta</i> L. (ESI- MS ⁻). Pico 4: Quercetagetina ; íon molecular m/z 317; íons fragmentos; MS ² (317, 299, 271, 191, 167, 111); MS ³ (299, 271, 191, 167), Pico 5: Miricetina-3-Galactosídeo ; íon molecular m/z 479; íons fragmentos; MS ² (359, 317, 316, 151); MS ³ (317, 316, 151).....	35
Figura 10. Espectros de massas dos compostos majoritários do óleo essencial das folhas de <i>Tagetes erecta</i> L. (ESI- MS ⁻). A: Piperitona (82, 95, 110, 137); B: D – Limoneno (67, 68, 93, 94); C: 4-careno (91, 93, 121, 136).	38

Figura 11. Espectros de massas dos compostos majoritários do óleo essencial das flores de *Tagetes erecta* L. (ESI- MS⁻). **A: Cariofileno** (69, 91, 93, 133); **B: D – Limoneno** (67, 68, 93, 94); **C: Piperitona** (82, 95, 110, 137). 39

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
CEUA – Comitê de Ética para o Uso de Animais
CG/EM - Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa
CL₁₀ – Concentração Letal capaz de matar 10% dos indivíduos testados
CL₅₀ – Concentração Letal capaz de matar 50% dos indivíduos testados
CL₉₀ – Concentração Letal capaz de matar 90% dos indivíduos testados
DMSO – Dimetilsulfóxido
ESI - Electrospray ionization
EHE – Extrato Hidroetanólico de *Tagetes erecta* L.
GC/MS – Gas Chromatography / Mass Spectrometry
IC – Intervalo de Confiança
OFO – Óleo essencial das folhas de *Tagetes erecta* L.
OFL – Óleo essencial das flores de *Tagetes erecta* L.
OMS – Organização Mundial da Saúde
WHO – Word Health Organization
MS – Íon precursor
MS2 – Íon fragmento 1
MS3 – Íon fragmento 2
m/z – Relação Massa/Carga

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1 Esquistossomose	4
2.1.1 <i>Schistosoma mansoni</i> Sambon (1907).....	8
2.1.2 <i>Biomphalaria glabrata</i> (Say, 1818)	11
2.1.3 Controle da esquistossomose	12
2.1.3.1 Tratamento	13
2.1.3.2 Profilaxia.....	14
2.2 Plantas com atividade moluscicida e cercaricida	16
2.2.1 <i>Tagetes erecta</i> L.....	19
3 OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo geral.....	24
3.2 Objetivos específicos	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Obtenção do material vegetal e identificação botânica	25
4.2 Obtenção do extrato hidroetanólico e óleos essenciais	25
4.3 Investigação da composição química do extrato hidroetanólico e dos óleos essenciais.....	25
4.3.1 Análises qualitativas do extrato hidroetanólico das folhas e flores de <i>Tagetes erecta</i> L.	25
4.3.2 Análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência do extrato hidroetanólico das folhas e flores de <i>Tagetes erecta</i> L.	26
4.3.3 Identificação dos compostos por Espectrometria de Massas ESI- Modo Negativo.....	26
4.3.4 Caracterização dos óleos essenciais por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG/EM).....	27
4.4 Atividades biológicas.....	27
4.4.1 Atividade biológica frente <i>Biomphalaria glabrata</i> (Say, 1818) e cercárias de <i>Schistosoma mansoni</i> Sambon (1907)	27
4.4.1.1 Coleta, manutenção e identificação dos moluscos	27
4.4.1.2 Análise da positividade de infecção pelo helminto <i>Schistosoma mansoni</i> Sambon (1907) nos caramujos	28

4.4.1.3 Ensaio moluscicida frente <i>Biomphalaria glabrata</i> (Say, 1818).....	28
4.4.1.4 Ensaio cercaricida frente <i>Schistosoma mansoni</i> Sambon (1907).....	28
4.4.2 Ensaio de toxicidade contra organismos não – alvos.....	29
4.4.2.1 Ensaio de toxicidade ambiental com <i>Artemia salina</i> Leach.....	29
4.4.2.2 Ensaio de toxicidade frente o peixe <i>Danio rerio</i> Hamilton-Buchanan	30
5 RESULTADOS	31
5.1 Rendimento do extrato hidroetanólico das folhas e flores, do óleo essencial das folhas e do óleo essencial das flores de <i>Tagetes erecta</i> L.	31
5.2 Avaliação química do extrato hidroetanólico das folhas e flores, do óleo essencial das folhas e do óleo essencial das flores de <i>Tagetes erecta</i> L.	31
5.3 Análises das atividades biológicas.....	40
5.3.1 Avaliação moluscicida frente <i>Biomphalaria glabrata</i> (Say, 1818)	40
5.3.2 Avaliação cercaricida frente <i>Schistosoma mansoni</i> Sambon (1907)	41
5.3.3 Avaliação da toxicidade contra organismos não - alvos	42
5.3.3.1 Avaliação da toxicidade frente <i>Artemia salina</i> Leach.....	42
5.3.3.2 Avaliação da toxicidade aguda frente <i>Danio rerio</i>	42
6 DISCUSSÃO	44
7 CONCLUSÃO	53
8 REFERÊNCIAS.....	54
 ANEXO I - Certificado Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA	 74

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose mansônica, doença infecto-parasitária provocada pelo helminto trematódeo *Schistosoma mansoni* Sambon (1907), integra o grupo das doenças tropicais negligenciadas, apontada como a segunda doença parasitária mais devastadora socioeconomicamente, ficando atrás apenas da malária, e que afeta cerca de 260 milhões de pessoas em todo mundo (CUNHA; GUEDES, 2012; WHO, 2016). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), pelo menos 249 milhões de pessoas precisam de tratamento (WHO, 2017).

No Brasil, essa helmintíase foi descrita pelo menos em 18 estados e no Distrito Federal, com destaque para estados das regiões nordeste, sudeste e centro-oeste, sendo os mais afetados os estados de Alagoas, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Paraíba, Sergipe, Espírito Santo e Minas Gerais (KATZ, 2018). Entre os anos de 1996 e 2017, a doença foi responsável por cerca de 11.111 mortes no país (BRASIL, 2019). Em 2016, de acordo com o programa de controle da esquistossomose (PCE), 12.009 casos da doença foram notificados sendo que na região nordeste foram 11.102 casos (BRASIL, 2018).

O Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geohelmintoses publicado em 2018 realizados com estudantes na faixa etária de 7 a 17 anos demonstra que no total de 521 municípios brasileiros examinados em 137 foram encontrados casos positivos de esquistossomose. E que 2.664 alunos foram positivados para o helminto *Schistosoma mansoni* (KATZ, 2018). No estado do Maranhão, entre os anos de 2000 e 2015 foram notificados 72.538 casos da doença (BRASIL, 2016a). No ano de 2016, cerca de 920 pessoas foram acometidas por esquistossomose (BRASIL, 2018).

A esquistossomose é considerada uma doença de veiculação hídrica, uma vez que o parasito *Schistosoma mansoni* Sambon 1907 necessita da participação de um hospedeiro intermediário para completar seu ciclo vital. No Brasil, este hospedeiro é representado por caramujos de água doce do gênero *Biomphalaria*, especialmente *Biomphalaria glabrata* Say (1818) e *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848), sendo a primeira espécie reconhecida como a mais importante, em decorrência da extensa distribuição geográfica e da eficiência na transmissão do parasito (SCHOLTE et al., 2012); essas espécies vetores do parasito *Schistosoma mansoni* no Brasil, ocorrem no estado do Maranhão (DAVID et al., 2018). Além disso, já foi comprovado que roedores

silvestres com hábitos semiaquáticos são capazes de estabelecer uma infecção produtiva do parasita e, assim como o homem, estão propensos a disseminar a doença em áreas endêmicas (MIRANDA et al., 2017).

Dessa forma, a transmissão da esquistossomose depende da existência do portador humano ou animal eliminando ovos do parasito, da presença de planorbídeos do gênero *Biomphalaria*, considerado hospedeiro intermediário da doença e, finalmente, do contato do homem com águas contaminadas pelas larvas do parasito, as cercárias. Este processo está vinculado às precárias condições socioambientais que atuam tanto no surgimento quanto na manutenção da infecção pelo helminto *Schistosoma mansoni* (DOS SANTOS et al., 2016).

Em 2012, a OMS lançou o Programa de Treinamento em Doenças Tropicais que incluía o controle do caramujo vetor como estratégia de controle da doença (WHO, 2012; BRASIL, 2014). Na estratégia de controle do hospedeiro intermediário, destaca-se o uso de moluscicidas como forma de impedir o ciclo de vida desse parasito. A substância sintética niclosamida é o produto mais utilizado e recomendado pela OMS, mas devido ao alto custo, alta toxicidade frente organismos não-alvos coabitantes, bem como a resistência apresentada, tem seu uso restrito aos casos de aumento da população malacológica infectada, somado ao aumento de casos de pessoas infectadas em determinada região (BRASIL, 2008; FELIZARI, 2011).

Nesse sentido, as plantas apresentam uma diversidade de substâncias, com destaque os metabólitos secundários, que lhes garante importantes ações biológicas. Dentre os produtos oriundos de espécies vegetais, merecem destaque os componentes dos óleos essenciais, formados por metabólitos secundários, principalmente monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides (SIMÕES et al., 2017).

Os óleos essenciais apresentam vasta diversidade na composição química e atividades biológicas comprovadas onde se pode destacar as atividades anti-inflamatória (PARASTOO et al., 2014), larvicida (BASKAR et al., 2018), moluscicida (COSTA et al., 2015) e antimicrobiana (BRIJESH et al., 2012). Além destes, merecem destaque também outras classes de metabólitos secundários como os flavonoides, já testados e comprovados como importantes agentes moluscicidas (VASCONCELLOS et al., 2006; CANTANHEDE et al., 2010).

Assim, por apresentarem uma provável diversidade de composição química com atividades biológicas importantes, perspectiva de fácil biodegradação e ocorrências em

diversas regiões do país, as espécies vegetais podem representar potencial fonte para a descoberta de novos compostos ou produtos com ação moluscicida e cercaricidas (VASCONCELLOS et al., 2006; CANTANHEDE et al., 2010).

Tagetes erecta L. é uma espécie vegetal herbácea, ramificada, bastante utilizada na ornamentação, com destaque na medicina tradicional dado amplo e diversificado uso no tratamento do reumatismo, cefaléia, dismenorréia, bronquite e helmintíase (LOPES; RITTER, 2009). O óleo essencial das partes aéreas já apresentou atividades antioxidante (GUTIERREZ et al., 2006) e antibacteriana comprovadas (LOPES; RITTER, 2009).

Este estudo se baseou na hipótese que os óleos essenciais das folhas, óleos essenciais das flores e extrato hidroetanólico de folhas e flores de *Tagetes erecta* apresentam atividade tóxica-seletiva contra *Biomphalaria glabrata* e frente larvas de *Schistosoma mansoni*, com base na diversidade de atividades biológicas já apresentadas por plantas do gênero *Tagetes*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Esquistossomose

O padrão de saúde, doença e longevidade humana foi, ao longo do tempo, influenciado por uma diversidade de fatores evidenciando as distintas realidades existentes em diferentes regiões do mundo (CANTANHEDE et al., 2010).

A partir do desenvolvimento do mundo moderno e início do século XIX começaram a ficar mais evidentes as intervenções no âmbito da saúde pública e de aspectos socioeconômicos nos quais foram contempladas de forma eficaz nos países desenvolvidos, o que contribuiu para a redução das doenças infecciosas e, conseqüentemente, para o aumento da expectativa de vida. Por outro lado, os países pobres e/ou em desenvolvimento ainda vivenciam uma experiência limitada no que diz respeito a tais intervenções, sendo que a disseminação e a prevalência de doenças infecciosas e transmissíveis consolidam-se como um processo contínuo (MCMICHAEL, 2001; WALDMA; SATO, 2016).

Como exemplo, tem-se a esquistossomose representando uma das doenças parasitárias mais comuns em áreas tropicais e subtropicais permanecendo como uma importante doença no contexto da saúde pública mundial, especialmente no Brasil (SOUZA et al., 2011). A doença é causada pelo parasito *Schistosoma mansoni* Sambon (1907), ocorrendo principalmente em comunidades rurais, com expansão para os centros urbanos, estando intimamente relacionada com precárias condições higiênicas e inadequados recursos sanitários (FREITAS et al., 2014).

A esquistossomose mansônica tem sido notificada na África, Ásia e na América do Sul. No continente americano, tem alta prevalência na Venezuela, no Suriname, Porto Rico, República Dominicana, algumas ilhas das Antilhas e no Brasil (REY, 2017).

No Brasil essa doença é conhecida mais popularmente como barriga d'água, e também chamada de xistosa ou doença do caramujo. Uma das teorias mais aceitas para que a esquistossomose mansônica se instalasse é a de que a sua chegada no país tenha acontecido com a vinda de escravos africanos trazidos pela Colônia Portuguesa a partir do século XVII (KATZ; ALMEIDA, 2003; RIBEIRO et al., 2004; NEVES, 2016; REY, 2017).

A exaustiva exploração da mão-de-obra negra escrava na lavoura canavieira, aliada a condições insalubres de trabalho em atividade que utilizava grande aporte hídrico,

somada às péssimas condições de vida oferecidas aos mesmos e à existência dos hospedeiros definitivos e intermediários contribuiu para estabelecimento da doença no país (SILVEIRA, 1989; REY, 2017). Ainda que os escravos africanos estivessem infectados por duas espécies do parasito, tanto por *Schistosoma mansoni* quanto por *Schistosoma haematobium* (Bilharz, 1852), apenas a primeira se desenvolveu no país. Diferentemente do primeiro, o ciclo evolutivo do *Schistosoma haematobium* não teve continuidade no continente americano devido à falta do hospedeiro intermediário específico dessa espécie, os moluscos do gênero *Bulinus* (KATZ; ALMEIDA, 2003; D'ALMEIDA, 2008; NEVES, 2016).

A esquistossomose, acomete aproximadamente 240 milhões de pessoas em todo o mundo e com 700 a 800 milhões de pessoas vivendo em risco de infecção (GRYSEELS et al., 2006; COLLEY et al., 2014); sendo que, 25 milhões de pessoas estão expostas ao risco de contrair a doença no Brasil, com estimativa que existam 6 milhões de casos de indivíduos infectados (BRASIL, 2014). A Tabela 1 demonstra o número de óbitos por esquistossomose no país, no período de 1996 a 2015; esses altos índices de letalidade anual são agravados pela situação social e econômica do país que conjugados aos fatores ecológicos promovem uma maior dispersão da doença (ALENCAR et al., 2016).

As regiões nordeste e sudeste são as mais atingidas quando há moluscos transmissores, no entanto, de acordo com relatório da Vigilância da Esquistossomose Mansônica (2014), a doença é encontrada em todas as regiões do país. Os focos isolados ocorrem nos estados do Piauí, Pará, Goiás, Distrito Federal, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Figura 1) (COURA; AMARAL, 2004; BRASIL, 2016b; BARRETO et al., 2016). A doença parece estar em expansão em virtude da migração nordestina para os estados do sul e sudeste do país e por receptividade ecológica (presença do planorbídeo), condições precárias de saneamento e baixo nível socioeconômico (VITORINO et al., 2012).

O nordeste brasileiro é uma região apropriada para a doença e para seu hospedeiro intermediário, pois além do índice de pobreza, observam-se as condições naturais necessárias para o seu habitat (FREITAS et al., 2014). Para tanto, vários estados do nordeste brasileiro são endêmicos para esta parasitose, já tendo sido relatada em Pernambuco, Bahia e Maranhão (FERREIRA et al., 1998; ROCHA et al., 2000; BINA; PRATA, 2003; TELES, 2005).

Tabela 1. Número de óbitos por esquistossomose no Brasil no período de período: 1996-2015. Fonte: Sistema de Informações de Mortalidade, 2017.

Região/Unidade da Federação	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Região Norte	2	8	4	10	7	1	5	3	5	1	7	1	5	3 -	-	-	-	3	2	2
.. Rondônia	1	5	4	7	4	1	4	3	5	1 -	-	1	2 -	-	-	-	-	3	2	2
.. Acre	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 -	-	-	-	-	-	-	-	-	-
.. Pará	1	2 -	-	-	2 -	-	-	-	-	-	4 -	-	3	3 -	-	-	-	-	-	-
.. Tocantins	-	1 -	-	3	1 -	-	1 -	-	-	-	2 -	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Região Nordeste	274	303	306	289	323	385	394	315	328	345	370	358	365	324	327	366	309	297	306	300
.. Maranhão	3	7	7	4	5	11	2	7	2	12	11	6	8	8	1	3	6	10	8	7
.. Piauí	-	-	-	-	-	-	1	1 -	-	-	1	1	1 -	-	2	1	-	1	-	-
.. Ceará	4	5	7	5	7	8	7	2	9	5	2	4	2	12	3	2	2	2	7	1
.. Rio Grande do Norte	5	3	2	5	2	3	5	4	7	5	5	2	3	4	3	3	5	4	7	4
.. Paraíba	8	10	9	8	8	7	9	18	14	17	14	16	11	15	14	23	4	15	13	11
.. Pernambuco	151	157	129	135	158	136	141	176	202	192	205	205	206	153	196	174	158	141	140	137
.. Alagoas	56	79	114	75	93	165	193	62	47	54	52	68	49	54	28	62	52	49	50	62
.. Sergipe	10	9	7	10	8	11	3	10	13	18	11	13	20	18	20	25	21	15	19	16
.. Bahia	37	33	31	47	42	44	33	35	34	42	69	43	65	60	60	73	61	60	62	62
Região Sudeste	160	185	150	134	138	178	157	134	176	154	168	164	157	160	175	169	167	152	161	147
.. Minas Gerais	32	38	32	34	43	52	65	46	56	62	61	58	60	49	66	59	77	69	73	79
.. Espírito Santo	21	15	14	13	9	9	8	9	9	7	12	13	12	10	15	14	18	8	10	10
.. Rio de Janeiro	22	19	17	11	13	16	22	12	13	11	15	19	17	14	17	13	10	11	12	5
.. São Paulo	85	113	87	76	73	101	62	67	98	74	80	74	68	87	77	83	62	64	66	53
Região Sul	5	6	11	5	5	5	4	5	4	6	1	3	8	4	4	2	3	3	2	1
.. Paraná	5	5	10	4	3	4	4	4	4	6	1	3	7	4	4	1	3	3	2	1
.. Santa Catarina	-	1	1 -	-	1	1 -	-	-	-	-	-	-	1 -	-	-	1 -	-	-	-	-
.. Rio Grande do Sul	-	-	-	1	1 -	-	-	1 -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Região Centro-Oeste	9	3	8	8	11	14	8	7	6	8	8	8	6	7	8	9	9	13	9	9
.. Mato Grosso do Sul	2 -	-	2	1	1 -	-	1 -	-	3 -	-	-	-	1 -	-	1	1	1	1	3	0
.. Mato Grosso	2 -	-	1	1	5	6	1	1 -	-	1	3	1 -	-	2	2	2 -	-	2	1	0
.. Goiás	1 -	-	3	3	2	5	2	5 -	-	3	1	2	2	2	1	4	5	4	4	5
.. Distrito Federal	4	3	2	3	3	3	4	1	3	4	4	5	3	3	4	2	3	6	1	4
Total	450	505	479	446	484	583	568	464	519	514	554	534	541	498	514	546	488	468	480	459

*Número de óbitos ano 2016 – 509, Número de óbitos ano 2017 – 508 (BRASIL, 2019).

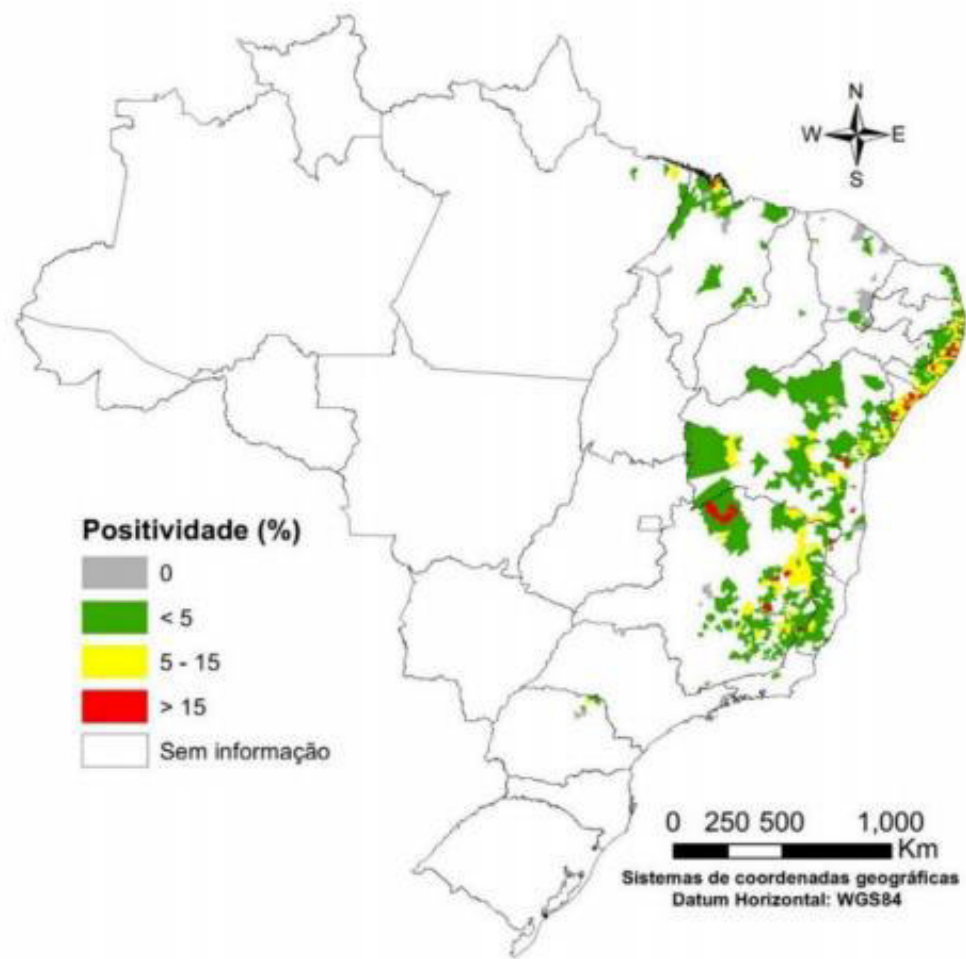


Figura 1. Distribuição da esquistossomose, de acordo com a faixa de positividade, por município, Brasil, 2009 – 2014. Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde/MS, 2016.

No Maranhão, a esquistossomose vem sendo registrada desde o início do século passado mais precisamente a partir de 1920 (COURA; AMARAL, 2004), com alta prevalência nas regiões da costa norte e região noroeste do Estado (RESENDES et al., 2005; CANTANHEDE, 2015; LIRA et al., 2017). Espécies de *Biomphalaria* encontradas no Maranhão incluem *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) *Biomphalaria schrammi* (Crosse, 1864), mas somente as duas primeiras são capazes de eliminar cercárias em seus ambientes naturais, portanto, transmissoras da esquistossomose mansônica no estado (NEVES, 2016; CANTANHEDE, 2015). Em São Luís, capital do estado do Maranhão, localizada na região litorânea, há ocorrências de hospedeiros intermediários do helminto *Schistosoma mansoni* em bairros da periferia, devido principalmente as condições sanitárias precárias nesses locais (DAVID et al., 2018).

De acordo com os dados do Ministério da Saúde, a esquistossomose no Maranhão é endêmica em 20 e focal em 29 dos 217 municípios existentes. Nas zonas do litoral norte e na baixada maranhense são encontrados os focos mais antigos e as prevalências mais elevadas (SANTOS; MELO, 2011; BRASIL, 2014). A baixada maranhense abrange 21 municípios do Maranhão, caracteriza-se com uma das localidades economicamente mais pobres do Estado. Alguns hábitos rotineiros de seus habitantes como a pesca, caça, agricultura de subsistência e criação de animais, associada à infraestrutura deficiente torna a população susceptível à contaminação por *Schistosoma mansoni* (CANTANHEDE, 2015; DAVID et al., 2018). Estudo transversal realizado na baixada ocidental maranhense no ano de 1993 demonstrou taxa de infecção por *Schistosoma mansoni* próximo a 19% (CUTRIM et al., 1998).

Entretanto, a grande dificuldade para contenção de endemias está intrinsicamente relacionada à falta de saneamento básico e educação sanitária; tendo como fator primordial para intensificação dessa adversidade o fato de 45% da população brasileira não ter acesso a tratamento de esgoto (BRASIL, 2017). Sendo necessário o tratamento de indivíduos infectados, que consiste em curar a doença, reduzir a carga parasitária do hospedeiro, impedir a evolução para as formas graves e, também, minimizar a produção e eliminação dos ovos como uma forma de prevenção primária da transmissão da esquistossomose (VITORINO et al. 2012; BRASIL, 2014).

2.1.1 *Schistosoma mansoni* Sambon (1907)

A esquistossomose ou bilharzioses são doenças produzidas por helmintos trematódeos do gênero *Schistosoma* que têm como agentes etiológicos, para o homem, as espécies: *Schistosoma haematobium* (Bilharz, 1852); *Schistosoma japonicum* Katsurada, 1904; *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907; *Schistosoma intercalatum* Fischer, 1934; *Schistosoma mekongie*, Voge, Brickner e Bruce, 1978 e *Schistosoma malayensis* Greer, Ow-Yang e Yong, 1988. Sendo os três primeiros os principais agentes etiológicos ao homem (NEVES, 2016; REY, 2017).

São vermes digenéticos, ou seja, são organismos que, no decorrer do seu ciclo biológico, passam por formas de reprodução sexuada e assexuada. São delgados, de coloração branca e sexos separados que é uma característica desta família, onde a fêmea adulta é mais alongada, infecta o ser humano e, ocasionalmente, outros animais vertebrados (SILVA-SOUZA; VASCONCELOS, 2005; BRASIL, 2014, REY, 2017).

O parasito *Schistosoma mansoni* tem um ciclo de vida complexo (Figura 2) que envolve um hospedeiro intermediário, o molusco aquático do gênero *Biomphalaria*, e um hospedeiro definitivo vertebrado (homem, podendo parasitar outros mamíferos) (REY, 2017).



Figura 2. Representação esquemática do ciclo de vida do helminto *Schistosoma mansoni* Sambon (1907) Fonte: Carvalho et al. (2008) e modificado pelo autor.

Esse helminto desenvolve a fase adulta parasitando a luz dos vasos sanguíneos de seus hospedeiros mamíferos, onde habita preferencialmente as vênulas do plexo hemorroidário superior e nas ramificações mais finas das veias mesentéricas, principalmente a inferior, local de oviposição das fêmeas. A produção de ovos, cerca de 150 a 300 ovos por dia, tem início 4 a 6 semanas após a infecção e continua por toda a vida do verme, que pode ser mais de 15 anos no hospedeiro definitivo (NEVES, 2016).

Após atravessarem a mucosa intestinal, cerca de metade dos ovos são eliminados com as fezes atingindo o meio externo e os outros 50% são carreados pela circulação portal e ficam retidos nos mais diversos tecidos do hospedeiro, podendo induzir a formação de granulomas hepáticos e intestinais, hepatoesplenomegalia e fibrose periportal (NEVES, 2016; REY, 2017). O trajeto dos ovos entre a oviposição e a eliminação nas fezes demora cerca de uma semana (RESENDES et al., 2005).

Os ovos eliminados pelas fezes que contém as larvas desenvolvidas e em sua forma viável, ao entrarem em contato com a água doce e sob intensa luminosidade, altas temperaturas e oxigenação, sofrem ruptura transversal e liberam suas larvas denominadas miracídios. Estes, após eclosão, nadam em círculos por algumas horas até encontrar moluscos aquáticos do gênero *Biomphalaria*. Essas larvas penetram nos tecidos moles do caramujo por ação de enzimas proteolíticas, instalam-se no corpo desse animal e sofrem sucessivas modificações dando origem a outro estágio larval do verme denominado de cercárias (Figura 3) (LENZI et al., 2008; NEVES, 2016; REY, 2017).

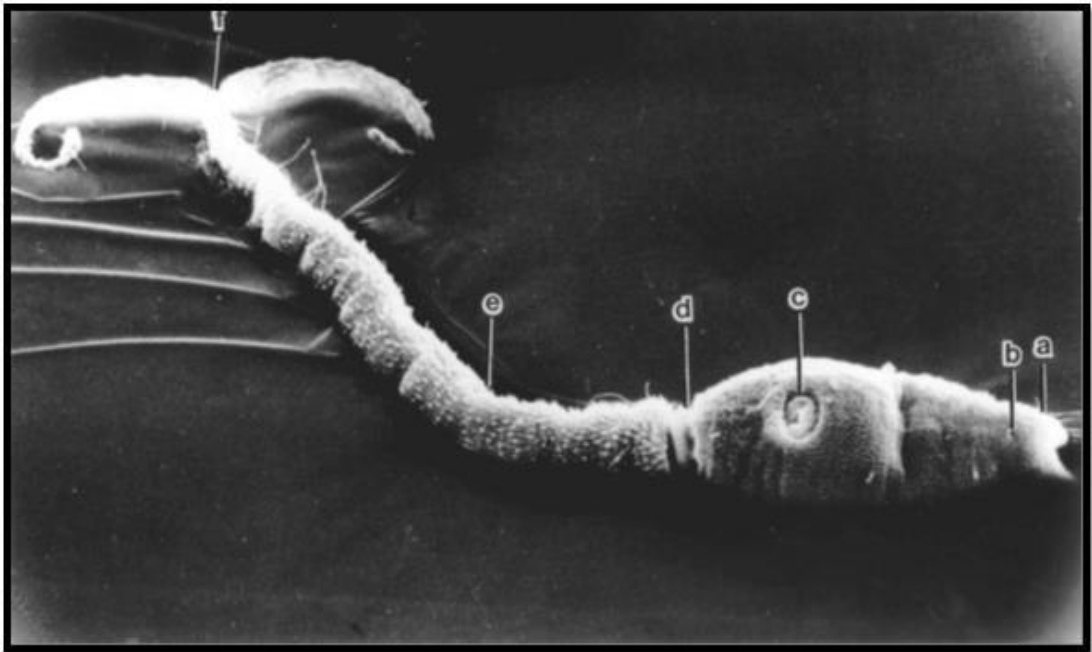


Figura 3. Representação esquemática da morfologia da cercária de *Schistosoma mansoni* Sambom (1907). Ventosa oral (a). Boca (b). Acetábulo (c). Junção do talo (d). Bifurcação do talo (e). Fonte: Dorsey et al. (2002).

A formação de cercárias, até sua emergência para o ambiente aquático, pode ocorrer dentro de um período de 27 a 30 dias, em condições ideais de temperatura (cerca de 28 °C). As cercárias mais diferenciadas no interior do molusco predominam na região cefalopodal, porém,

as várias etapas de diferenciação dessas larvas ocorrem nos locais usualmente mais parasitados, como as glândulas digestivas, ovotéstis e túbulos renais. Entretanto, elas podem ser encontradas em locais pouco comuns, como no coração, glândula nidamental e nas glândulas do albúmen. Podem ocorrer também por volta de 55 dias, a liberação de grande número de cercárias completamente desenvolvidas que migram para os vasos sanguíneos principais e vão a caminho de deixar o molusco (LENZI et al., 2008; NEVES, 2016). As cercárias, ao serem liberadas, podem infectar o homem, completando a sua evolução para verme adulto e restabelecendo o ciclo biológico do helminto (SILVA et al., 2006; REY, 2017).

As cercárias exibem uma série de características que permitem localizar o hospedeiro intermediário. A duração do ato de penetração das cercárias na pele varia de hospedeiro para hospedeiro: no homem e em cães jovens costuma ser de 15 minutos aproximadamente, mas pode variar de 3,1 a 17 minutos na pele humana e de 0,7 a 19 minutos na pele de outros animais como camundongo, rato e macaco, a depender do sítio de infecção e das condições físicas e da idade do animal. O processo de penetração da cercária na pele humana pode produzir como sinal clínico uma irritação, de intensidade variável de indivíduo para indivíduo conhecida como dermatite cercariana (LENZI et al., 2008 REY, 2017). Essa é a fase inicial da doença. Após aproximadamente dois meses, aparecem os sintomas de fase aguda: febre, cefaléia, anorexia, náusea, astenia, mialgia, tosse e diarreia. Na fase crônica, o doente pode desenvolver diferentes manifestações, sendo que a inflamação do fígado e do baço resulta em hepatoesplenomegalia, que provoca uma distensão abdominal característica da doença (BRASIL, 2008; NEVES, 2016; REY, 2017).

2.1.2 *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818)

A distribuição da espécie *Schistosoma mansoni* está relacionada à migração de indivíduos infectados e a presença de moluscos do gênero *Biomphalaria* (CRIBB et al., 2003; NOMURA et al., 2007; SOUZA et al., 2008).

No Brasil, existem 11 espécies de *Biomphalaria*: *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818); *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848); *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835); *Biomphalaria intermedia* (Paraense & Deslandes, 1962); *Biomphalaria occidentalis* Paraense, 1981; *Biomphalaria schrammi* (Crosse, 1864); *Biomphalaria oligoza* Paraense, 1975; *Biomphalaria kuhniana* (Clessin, 1883); *Biomphalaria tenagophila guaibensis*; *Biomphalaria amazonica* Paraense, 1966 e *Biomphalaria peregrina* (d'Orbigny, 1835). Sendo as três primeiras espécies possivelmente infectadas por *Schistosoma mansoni* no ambiente e as duas últimas apenas em condições laboratoriais. Não há relato de infecção das outras espécies

(TELES et al., 1991; CABELLO, 1994; BARBOSA, 1995; LEÃO, 1997; CARVALHO et al., 2005; MORAES et al., 2009; REY, 2017). Destas espécies, a de maior importância no nordeste é *Biomphalaria glabrata* (Figura 4), encontrada em coleções hídricas próximas do litoral (PAZ, 1997; ARAÚJO et al., 2007, BRASIL, 2014).



Figura 4. Caramujo *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). Fonte: (Leite, 2019).

A instalação do ciclo do helminto *Schistosoma mansoni* no Brasil foi favorecida pelo encontro de bons hospedeiros e condições ambientais adequadas. Esses moluscos, durante a reprodução, depositam cápsulas contendo os ovos embrionados envoltos em uma substância gelatinosa de cor amarelada (RAPADO, 2007). Cada cápsula pode conter desde um único ovo até números superiores a 100 que em condições laboratoriais e temperatura de 25 °C eclodem em sete dias e alcançam maturidade sexual em torno de 30 dias após a eclosão (SOUZA; LIMA, 1990; RAPADO, 2007).

A inserção deste molusco hospedeiro intermediário em regiões litorâneas urbanizadas faz com que este tenha maior possibilidade de contato com ambientes poluídos e com condições biofísicas diferentes daquele encontrado em regiões rurais. Esse novo ambiente pode, por meio de seleção natural, separar linhagens do hospedeiro intermediário que estejam adaptadas às condições locais possibilitando completar o ciclo da esquistossomose (SILVA et al., 2006; ANDRADE, 2009).

2.1.3 Controle da esquistossomose

O surgimento de um programa de controle específico para a doença, no Brasil, ocorreu em 1975, com a criação do Programa Especial de Controle da Esquistossomose (PECE), pela Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (SUCAM), sendo substituído,

posteriormente, pelo Programa de Controle da Esquistossomose (PCE), na década de 1980. Com a descentralização das ações de vigilância e controle de doenças, em 1999, a execução das ações do PCE passou a ser de responsabilidade compartilhada, quando os municípios passaram a exercer um papel fundamental (BRASIL, 1999; FAVRE et al., 2001; NEVES, 2016).

É importante lembrar que a evolução da esquistossomose no Brasil não está associada apenas a pobreza e ausência de acesso a informação acerca da doença pela população, mas, também, pelo progresso, desenfreado e desorganizado das zonas urbanas. Torna-se necessário que os profissionais de saúde compreendam que a plena abordagem da helmintíase inclui a explicação do modo de infecção bem como as medidas preventivas e a sua reinfecção (VITORINO et al., 2012).

Desse modo, como formas de controle que devem ser adotados para minimizar infecções da esquistossomose são indicados: controle do hospedeiro intermediário; redução da contaminação da água ou do contato com esta; modificação das condições de vida das populações expostas; educação para a saúde (WHO, 2012).

2.1.3.1 Tratamento

A terapêutica da esquistossomose é realizada através do tratamento sintomático (inespecífico) e específico com drogas esquistossomicidas ou, se necessário, o tratamento cirúrgico (CARMO; BARRETO, 1994; BRASIL, 2007; NEVES, 2016).

O tratamento específico é feito com os fármacos praziquantel e oxamniquina (BRASIL, 2007; KATZ, 2008). Ambas as drogas são administráveis em dose única. A dosagem do praziquantel é 50 mg por quilo de peso corporal (mg/Kg) em adultos e 60 mg/kg para crianças até 15 anos, enquanto a oxamniquina é administrável na dosagem de 15 mg/kg de peso para adultos e 20 mg/kg para crianças até 15 anos (KATZ, 2008; NEVES, 2016).

O praziquantel é um derivado do núcleo isoquinoleínico-pirazínico de amplo espectro anti-helmíntico. Sua ação esquistossomicida ocorre dentro de 15 minutos após administração (TAVARES, 2009), atuando na permeabilidade ao cálcio nas células do helminto. Este medicamento aumenta a concentração desse íon, provocando vacuolização e destruição tegumentar (DA SILVA, 1993). A cura da esquistossomose com o uso do praziquantel exhibe índices que variam de 60% a 90% (MARTINS-LEITE et al., 2008) associada à expressiva redução da carga parasitária e de produção de ovos pelo helminto *Schistosoma mansoni* (ROSS et al., 2002).

O oxamniquina é um derivado da tetraidroquinoléinico, com ação estrita sobre o parasito *Schistosoma mansoni*, atuando em todos os seus estágios evolutivos (QUINTAS et al., 1993).

Tavares (2009) demonstrou a eficácia clínica do oxamniquina no tratamento da esquistossomose, atingindo índices de cura entre 80% e 95%. Entretanto, o mecanismo de ação desse composto ainda é pouco conhecido e, supostamente, o fármaco se liga ao material genético do helminto. Sob o efeito do medicamento os vermes adultos cessam a oviposição e são levados pela circulação porta ao fígado, onde são envolvidos pelo processo inflamatório e fagocitados (PORDEUS et al., 2008).

Além dos tratamentos específicos, algumas especificidades devem ser consideradas na terapêutica dos diferentes estágios evolutivos da esquistossomose (agudo e crônico). Na fase aguda da doença, geralmente aparece dermatites cercarianas, no qual deve ser tratada com anti-histamínicos locais e corticosteroides tópicos, associados à terapêutica com fármacos específicos (HUGGINS et al., 1998; LAMBERTUCCI et al., 2005). Quanto aos casos de febre toxêmica que podem aparecer nessa fase, já requer maior cuidado com necessidade de internação hospitalar, com indicação de repouso, hidratação adequada, uso de antitérmicos, analgésicos e antiespasmódicos (LAMBERTUCCI et al., 2005). Entretanto, em pacientes em condições críticas, a administração de corticosteroides pode aliviar a resposta inflamatória decorrente da morte do verme *Schistosoma mansoni* (MAHMOUD, 2008).

A fase crônica é muito característica das formas intestinais, hepatointestinal e hepatoesplênica no qual requer medidas para amenizar o quadro diarreico (quando presente) e os fenômenos dispépticos. Na forma hepatoesplênica, condutas para redução do risco de hemorragias digestivas, como a escleroterapia de varizes de esôfago e o uso de betabloqueadores são extremamente relevantes (PRATA, 2005).

2.1.3.2 Profilaxia

A esquistossomose não deve ser compreendida como um problema restrito apenas à área da saúde, mas sim com claras repercussões nos campos econômico, social e ambiental. Assim, para o controle da esquistossomose, as medidas de saneamento básico e ambiental devem ser tomadas em todas as localidades, independente do nível de prevalência, medidas estas de responsabilidade de órgãos municipais com participação da comunidade local (BARRETO et al., 2016).

Diante das problemáticas que envolvem a continuidade de transmissão da esquistossomose no Brasil, o Centro de Vigilância Epidemiológica (2007) elaborou um manual de instruções, orientações e técnicas para os profissionais de saúde envolvidos na vigilância epidemiológica da doença e às equipes de vigilância e autoridades de saúde. Assim, demonstra ações relacionadas ao saneamento ambiental aplicado ao controle da doença, tais como:

identificar e tratar os portadores das doenças; maximizar as condições adversas à proliferação e ao desenvolvimento dos hospedeiros intermediários (caramujos do gênero *Biomphalaria*) e reduzir a possibilidade de contato do homem com o agente patógeno (BRASIL, 2014; BARRETO et al., 2016).

Quanto às ações de saneamento básico, é necessário: adequação de sistemas de irrigação; monitoramento das coleções hídricas visando impedir a sua contaminação por dejetos humanos; drenagem ou retificação de leitos; monitoramento de coleções hídricas que sejam criadouros de moluscos, como o controle de represamento de águas (BARBOSA et al., 2012; BARRETO et al., 2016).

Para o controle dos caramujos *Biomphalaria* são utilizados diversos produtos e substâncias químicas. Os principais objetivos do uso desses produtos são: redução da densidade populacional dos moluscos; eliminação tanto de caramujos infectados quanto de larvas infectantes liberadas no ambiente, reduzir o potencial de infecção por caramujos e humanos (WHO, 2013), quebrando assim o ciclo de vida do helminto (NEVES, 2016). A eliminação dos caramujos infectados é uma estratégia importante para o controle da esquistossomose e, atualmente, representa o método mais confiável para obter reduções drásticas na densidade populacional de caramujos em curto prazo e na eliminação da esquistossomose (WHO, 2017).

Dentre as substâncias sintéticas utilizadas destaca-se o pentaclorofenato de sódio, o termofosfato magnésiano, produto de uso na correção da acidez do solo, o metaldeído e o hidróxido de cálcio, um subproduto do carbureto para a produção de acetileno. A indústria desenvolveu o hexabutildistanoxano (TBTO®), a N-tritilmorfolina ou trimenfort (Frescon®) e a niclosamida (Bayluscide®), o produto que foi o mais recomendado e utilizado em todo o mundo (CANTANHEDE et al., 2010).

A niclosamida é um pó molhável para aplicação na forma diluída, por aspersão ou gotejamento, em quantidades proporcionais ao volume da coleção hídrica. Entretanto, o uso de moluscicidas sintéticos tem gerado preocupação em relação à três fatores: o desenvolvimento de resistência dos caramujos à 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 (MCCLLOUGH et al., 1980; MARSTON & HOSTETTMANN, 1985).

Nesse contexto torna-se iminente a necessidade de busca de substâncias facilmente biodegradáveis com potencial moluscicida/cercaricida, o que tem estimulado a pesquisa com espécies vegetais, com relatos na literatura de princípios ativos de origem vegetal com eficácia

no controle da transmissão da esquistossomose (DOS SANTOS et al., 2007; CANTANHEDE et al., 2010; ALVES, 2013).

Desse modo, considerando o potencial tóxico da niclosamida, o alto custo das aplicações em áreas extensas e as dificuldades de transporte para áreas rurais distantes, torna-se necessário a busca e o investimento em pesquisa, desenvolvimento e inovação de produtos com atividade moluscicida e cercaricida, que sejam facilmente biodegradáveis e com baixa toxicidade frente organismos não-alvos para o combate desses hospedeiros intermediários (ROCHA et al., 2013).

2.2 Plantas com atividade moluscicida e cercaricida

A preocupação com o desenvolvimento de resistência dos caramujos as substâncias empregadas, a baixa seletividade já que atuam sobre outras espécies da fauna e também da flora, podendo perturbar o equilíbrio ecológico local e, ainda, a procura de substâncias facilmente biodegradáveis têm aumentado o interesse pelo uso de moluscicidas de origem vegetal (CANTANHEDE et al., 2010). Várias espécies vegetais vem sendo estudadas ao longo dos anos quanto ao potencial moluscicida (HOSTETTMANN et al., 2000; AKINMOLADUN et al., 2007; DOS SANTOS et al., 2007; CANTANHEDE et al., 2010).

Os estudos com moluscicidas vegetais iniciaram em 1930 no continente africano, estudos laboratoriais e de campo com *Balanites aegyptiaca* (L.) Delile, (1812) uma árvore típica de regiões áridas, que quando presente nas margens de rios e lagos focos de transmissão da esquistossomose no Sudão, constatou que os frutos, ao caírem das árvores, reduziam a densidade populacional de caramujos transmissores da doença. Em laboratório conseguiu chegar a relação de 5 gramas de frutos da espécie em 30 litros de água, porém observou, em campo, a toxicidade dessa espécie frente outros organismos não-alvos como peixes e girinos (ARCHIBALD, 1933).

Pinto; Almeida (1944) e Barbosa (1952) publicaram os primeiros trabalhos no Brasil sobre espécies vegetais como moluscicidas. Estudos de triagem de ação contra *Biomphalaria glabrata* desenvolvidos com a planta conhecida popularmente como saboeiro (*Sapindus saponaria* L.) espécie com composição química rica no metabolito secundário saponina.

Em 1965, ocorreu a padronização dos estudos com produtos vegetais como moluscicidas quando a Organização Mundial de Saúde (OMS) elabora o guia com metodologias para o desenvolvimento da técnica em nível laboratorial. De acordo com esse guia um bom moluscicida é aquele que causa a morte de 90 a 100% dos moluscos adultos em concentração menor ou igual a 100 mg/L (WHO, 1965). Além disso, recomenda que o produto responsável

pela toxicidade esteja presente em partes de fácil regeneração da planta em estudo, como folhas, flores, frutos e sementes (WHO, 1983).

Rouquayrol et al. (1972) em estudos moluscicidas laboratoriais desenvolvidos com espécies vegetais do nordeste brasileiro destacaram: *Pithecellobium multiflorum* (Kunth) Benth., *Croton* sp., *Eucalyptus citriodora* Hook., *Lippia aff sidoides* - D. Dietr. e *Piper tuberculatum* Jacq., como as espécies mais promissoras.

Marston; Hostettmann (1985) descrevem os principais produtos de origem vegetal e também classes de metabólitos secundários com atividade moluscicida, até então conhecidas, destacaram os óleos essenciais como os sesquiterpenos e os monoterpenos, flavonoides, taninos, alcaloides, além de saponinas. Marston et al. (1988) demonstraram ser possível isolar por fracionamento com cromatografia “flash” em coluna três tipos de saponinas com conhecida atividade moluscicida.

Vasconcellos; Schall (1986) com estudos da família *Euphorbiaceae* descreveram a atividade moluscicida do látex de *Euphorbia milii* Des Moul., uma planta ornamental amplamente disseminada no Brasil, conhecida como popularmente como coroa-de-cristo. Com o aprofundamento dos estudos químicos desta espécie foi possível chegar ao mais potente produto natural moluscicida, a miliamina L, cuja concentração letal para os caramujos de laboratório *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila* (CL₉₀) foi de 0,5 µg/L.

Mendes et al. (1990) avaliaram hidrolatos e óleos essenciais de diferentes espécies de *Eucalyptus* sobre caramujos adultos e desovas de *Biomphalaria glabrata* e contra cercárias de *Schistosoma mansoni*, apresentando resultados promissores os óleos essenciais e hidrolatos obtidos de *Eucalyptus deanei* Maiden, que foram ativos sobre caramujos, desovas e cercárias.

Chifundera et al. (1993) realizaram triagem fitoquímica e avaliaram o potencial moluscicida de espécies presentes na farmacopéia do Zaire, atualmente República Democrática do Congo. Destacaram extratos aquosos e etanólicos de cinco plantas: *Maesa lanceolata* Exell., *Chenopodium ugandae* Aellen., *Asparagus racemosus* Willd., *Phyllanthus nummulariifolius* Willd. e *Crinum zeylanicum* (L.) L., apresentaram alta taxa de mortalidade contra *Biomphalaria pfeifferi* (Krauss, 1848). As atividades foram atribuídas à presença de terpenoides, esteróides e saponinas nos extratos vegetais, no entanto, as plantas mostraram efeito tóxico em peixes e insetos aquáticos, demonstrando assim serem moluscicidas não seguros de utilização.

Extrato das folhas de *Sesbania sesban* (L.) Merr. e extrato metanólico das raízes de *Dolichos kilimandscharicus* Taub. possuem atividade moluscicida e a investigação fitoquímica das partes aéreas revelou a presença de mais de quatro tipos de saponinas. Outra espécie com atividade promissora para o controle da esquistossomose foi *Bobgunnia madagascariensis*

(Desv.) J.H.Kirkbr. & Wiersema, por produzir frutos grandes que se mostraram tóxicos para *Biomphalaria glabrata*; demonstrando que os extratos aquosos exerceram significativa atividade moluscicida contra os caramujos até diluições de 100 mg de vagens moídas por litro. Extrato da casca de *Cussonia spicata* Thunb, oriundo do Malaui, foi ativo contra *Biomphalaria glabrata* na concentração de 12,5 µg/mL. *Diospyros usambarensis* F. White., também é uma planta com forte atividade moluscicida (4 µg/mL) como demonstrado em estudos com extrato da espécie (HOSTETTMANN et al., 2000).

Elamin et al. (2005) avaliaram a dose tóxica do extrato do fruto de *Balanites aegyptiaca* (L.) Delile, (1812) quando aplicado naturalmente contra *Bulinus truncatus* e *Bulinus pfeifferi*. O estudo primário mostrou que, a pulverização de 8 kg de extrato de frutos da espécie em canais (largura de 5 metros) causou 100% de mortalidade dos caramujos alvos, enquanto a CL₉₀ de ambos os tipos de caramujos foi de 9 µg/mL.

Howida (2005) investigou sementes, caules e folhas de *Jatropha aceroide*s (Pax & K. Hoffm.) Hutch. por sua atividade moluscicida contra *Bulinus truncatus*, demonstrando que o extrato aquoso das sementes possuem CL₁₀₀ de 100 µg/mL, enquanto a mesma concentração da folha matou 80% dos caramujos e o extrato do caule mostrou CL₅₀ de 100 µg/mL.

O látex de *Euphorbia conspicua* N.E. Br. possui atividades moluscicida e cercaricida, a mesma exibiu altas atividades contra *Biomphalaria glabrata* adultos com CL₉₀ valores de 4,87 µg/mL e mostrou um efeito letal para a cercária de *Schistosoma mansoni*, a concentrações de 100 µg/mL (DOS SANTOS et al., 2007).

Rapado et al. (2011) determinaram a ação moluscicida de extratos de 13 espécies de Piperaceae contra *Biomphalaria glabrata*. As espécies, *Piper aduncum* L., *Piper crassinervium* Kunth, *Piper cuyabanum* C. DC., *Piper diospyrifolium* (Kunth) Kunth ex C. DC. e *Piper hostmannianum* (Miq.) C. DC., demonstraram 100% de mortalidade de caramujos adultos em concentrações variando de 10 a 60 µg/mL. Estes extratos foram também testados em estágios embrionários de *Biomphalaria glabrata* e os extratos das espécies *Piper cuyabanum* e *Piper hostmannianum* mostraram 100% de ação ovicida na concentração de 20 µg/mL.

O interesse na pesquisa de novas alternativas de origem vegetal moluscicida, miracida e cercaricida tem estimulado estudos na área, com comprovação que constituintes fitoquímicos bioativos tem ação fisiológica definida no organismo alvo (AKINMOLADUN et al., 2007); com destaque aos alcaloides, taninos, flavonoides, terpenóides saponinas e compostos fenólicos (CANTANHEDE et al., 2010).

Estudos de revisão no tema vêm sendo publicados comprovando tal afirmação, permitindo uma visualização do perfil dos produtos naturais moluscicidas de diversas famílias,

gêneros, espécies e classes de metabólitos secundários com maior potencial para serem usados no controle dos caramujos *Biomphalaria glabrata*, na perspectiva de impedir a continuidade da transmissão da esquistossomose, a exemplo de estudos do Grupo de Produtos Naturais da Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

Nesse contexto, revisão de Cantanhede et al. (2010) demonstra atividade moluscicida de extratos de 38 espécies vegetais, distribuídas em 24 gêneros e 17 famílias botânicas, demonstrando mortalidade de 50 a 90% de caramujos do gênero *Biomphalaria*.

Estudo posterior desenvolvido por Alves (2013) evidenciou que 259 extratos de plantas, 16 frações e 66 compostos isolados foram testados em *Biomphalaria glabrata*, dos quais 60% dos extratos vegetais e 75% das frações estudadas demonstraram atividade moluscicida; predominando a efetividade moluscicida das espécies das famílias Asteraceae, Solanaceae, Euphorbiaceae e Fabaceae; os compostos naturais isolados que apresentaram ação sobre caramujos transmissores da esquistossomose foram, principalmente, as saponinas (44,7%), diterpenos (37,3%), alcaloides (2,9%), monoterpenos iridoides (2,9%), sesquiterpenos (1,4%), taninos (1,4%) e cumarinas (1,4%).

2.2.1 *Tagetes erecta* L.

A família Asteraceae, caracteristicamente aromática, tem destaque pela importância econômica, com diversas espécies empregadas na produção de medicamentos, fabricação de cosméticos e ornamentação de ambientes; a exemplo dos gêneros *Helianthus*, *Artemisia*, *Baccharis* e *Tagetes* (BORA; SHARMA 2011; SINGH et al., 2016; CAMPOS et al., 2016; GUO et al., 2017). Espécies vegetais dessa família possuem ampla distribuição, dada boa adaptação as condições ambientais extremas, sendo de grande ocorrência em regiões tropicais (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005).

O gênero *Tagetes* se destaca com mais de 56 espécies distribuídas por todo o continente americano. Na prática popular, as plantas deste gênero costumam ser utilizadas em cerimônias religiosas, como ornamentais, na produção de óleos essenciais (GARCIA-SÁNCHEZ et al., 2012), como larvicida natural (MACEDO et al., 1997), inseticida e acaricida (TOMOVA et al., 2005; MOYO et al., 2009), antibacteriano (SOUZA et al., 2000; SHAHZADI; SHAH, 2015). Estudos indicam amplo uso no alívio da inflamação respiratória, como antioxidante e citotóxico (OLIVEIRA et al., 2015), antidiabético e antilipidêmico (WANG et al., 2016).

Os óleos essenciais das espécies do gênero *Tagetes* possuem composição química consistente nos diferentes locais geográficos já estudados (CHAMORRO et al., 2008). Nos extratos obtidos do gênero *Tagetes* já foram isolados flavonoides, taninos, terpenoides,

esteroides, dentre outras classes de compostos que já se mostraram ativos contra *Biomphalaria glabrata* (CHIFUNDERA et al., 1993; CANTANHEDE et al., 2010; SHAHZADI; SHAH, 2015).

O gênero *Tagetes*, família Asteraceae, contém mais de 56 espécies das quais *Tagetes minuta* L., *Tagetes tenuifolia* (KUNTH), *Tagetes lunata* (ORTEGA) e *Tagetes erecta* L., são as espécies anuais mais cultivadas como ornamentais em todo mundo; sendo cultivadas no México há mais de dois milênios (SOULE; JANICK, 1996), usadas como ornamento, em rituais e como planta medicinal (NUTTALL, 1920).

A espécie *Tagetes erecta* (Figura 5) no Brasil é conhecida popularmente por “cravo-de-defunto”. Nos países de língua inglesa, ela é denominada marigold e africanmarigold. No México, na América Central e nos demais países da América do Sul é conhecida como cempasuchi, amarillo e flor de muerto (SOWBHAGYA et al., 2004; TONUCCI et al., 2012).



Figura 5. Partes aéreas de *Tagetes erecta* L. Fonte: (Leite, 2019).

É uma erva ramosa, pode chegar até 1,50 m de altura, possui folhas opostas ou alternadas, profundamente dilaceradas e aromáticas. Apresenta capítulos grandes de pedúnculos intumescidos no ápice, solitários e multifloros. Aquênio linear multiestriado com sementes pretas. Há variedades de flores dobradas, grandes, até sete centímetros de diâmetro, cor amarela-citrino e amarelo-enzofre (BRAGA, 1976).

Representa planta herbácea de fácil cultivo, com florescimento na primavera e verão (LORENZI; SOUZA, 2008). É uma erva que já demonstrou tolerar bem o estresse hídrico

(YOUNIS et al., 2017). Possui cultivo economicamente atraente para as indústrias, sendo evidenciado aumento do uso de extratos das flores de *Tagetes erecta* em alimentos funcionais, cosméticos e na indústria farmacêutica devido a sua rica composição (NGKASUPART et al., 2015).

Na prática popular, é comumente usada para tratar bronquite, dor reumática e doenças respiratórias, sendo ainda empregadas como estimulantes e relaxantes musculares. A parte aérea é indicada para dores estomacais, vômito, diarreia, gastrite e enfermidades do baço. As folhas quando cozidas ou em infusão são usadas no tratamento de ataques epiléticos, bronquite, dor de cabeça, febre e afecções hepáticas. É usada também como anti-espasmódico e anti-helmíntico. As flores cozidas são usadas externamente no tratamento de infecções da pele (LOPEZ et al., 2001).

Estudos farmacológicos recentes têm comprovado algumas propriedades medicinais atribuídas popularmente, tais como:

a) Atividade antimicrobiana - extratos etanólicos de folhas, raízes e flores apresentaram significativa atividade antibacteriana contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, enquanto extratos de caules demonstraram atividade antimicrobiana mínima (PREETI; ARCHANA, 2012). Kazibwe et al. (2017) demonstraram que o extrato aquoso provocou danos nas membranas de *Streptococcus mutans* e *Pseudomonas aeruginosa*. Já Goel et al., (2018) demonstraram o potencial biopesticida do extrato aquoso de *Tagetes erecta* na doença bacteriana do tomateiro;

b) Ação no sistema nervoso central - diversos trabalhos vêm sendo desenvolvidos a fim de conhecer os efeitos causados, como os trabalhos de Bashir; Gilani (2008) e Khulbe et al. (2013) que exploraram preliminarmente a atividade analgésica e antidepressiva com resultados promissores. Ortega et al. (2017) demonstraram as propriedades ansiolíticas e sedativas de *Tagetes erecta* reafirmando o uso para este fim na medicina tradicional, este grupo de pesquisa supõe que o mecanismo responsável por essa ação envolve a neurotransmissão serotoninérgica, devido à presença em parte de flavonoides e de terpenoides;

c) Ação espasmolítica - atividade biológica comprovada por estudos Ventura-Martínez et al. (2018) com uso do modelo animal *Cavia porcellus* L. gerou resultados que embasam o uso popular de *Tagetes erecta* como um espasmolítico e sugerem que a quercetina presente no extrato aquoso pode ser parcialmente responsável por este efeito e ainda afirma que essa ação envolve o bloqueio dos canais de cálcio dependentes de voltagem;

d) Antimalárico - é relatado que os extratos orgânicos de raízes de *Tagetes erecta* exibiram alta atividade anti-*plasmodium* contra cepas de *Plasmodium* resistentes e *Plasmodium falciparum* sensível à cloroquina (GUPTA; VASUDEVA, 2010).

Outras atividades biológicas importante com o óleo essencial das folhas de *Tagetes erecta* comprovam propriedades esquistossomicidas (TONUCI et al., 2012). O uso como anti-helmíntico na região da Amazônia (NEHER, 1968; STASI; HIRUMA-LIMA, 2002). Foram verificadas ações inseticida (MACEDO et al., 1997), larvicida (PATHAK et al., 2000; MARQUES et al., 2011), fungicida (DU et al., 2017), antioxidante (GUTIERREZ et al., 2006) e antibacteriana (MAE SRI; HARTATI et al., 1999; LOPES; RITTER, 2009).

Tonuci et al. (2011) relataram atividade do óleo essencial das folhas de *Tagetes erecta* cultivada no estado de São Paulo, Brasil, em testes contra vermes adultos de *Schistosoma mansoni*, com diminuição motora em 24 horas, após aplicação de 50 µg/mL, causando morte e a separação dos parasitos acoplados aos pares em machos e fêmeas a 100 µm/mL durante 24 horas de exposição. Além disso, foi demonstrado que a viabilidade dos vermes tratados com o óleo essencial foi similar a viabilidade dos tratados com praziquantel. É importante ressaltar que ainda não há dados na literatura que apontem para atividades do vegetal em estudo para outras fases de vida do helminto ou mesmo com ênfase no controle do hospedeiro intermediário.

Estudos da composição química dos extratos de *Tagetes erecta* relataram a presença de alcaloides (SANDEEP; DEEPA, 2017). Flavonoides como Caempferol, quercetina, patuletina, quercetagetina, miricetina e luteolina, ácido m-cumárico (BOHM; STUESSY, 2001). Além do carotenoide luteína (LI et al., 2007; HOJNIK et al., 2008; XU et al., 2012; AYUB et al., 2017).

A composição do óleo essencial tem sido objeto de várias investigações, a Tabela 2 demonstra os principais compostos majoritários descritos na literatura.

Nos óleos das flores já foram identificados D-Limoneno, *Cis*-ocimeno, *E*-oscimeno, linalol como os principais constituintes. Investigações da composição química relataram também o isolamento de limoneno, cariofileno. Além disso, 1,8-cineol, tagetona, α - e β -pinenos e mentol foram relatados em menores concentrações (TRIPATHI et al., 2012).

Em trabalho realizado com o óleo das flores de *Tagetes erecta*, obtido de exemplar cultivado na Hungria, foi comprovado presença de limoneno, beta-ocimeno, piperitona e cariofileno como os principais constituintes (HETHELYI et al., 1986). Já em trabalhos com óleos de exemplar da espécie cultivada no Brasil foi relatado a presença de terpinoleno, (E) - beta-ocimeno, limoneno, piperitona, timol, carvacrol, indol, cariofileno e nerolidol (MARQUES et al., 2011; TONUCI et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2015).

Tabela 2. Percentual (%) dos compostos majoritários dos óleos essenciais das folhas e óleos essenciais das flores de *Tagetes erecta* L. relatados na literatura

Referências	Compostos (%)												
	D – Limoneno	L – Limoneno	<i>trans</i> -β-ocimeno	<i>cis</i> -β-Ocimeno	<i>cis</i> -ocimenona	<i>trans</i> -tagetona	diidrotagetona	terpinoleno	piperitona	piperitenona	cariofileno	beta-ocimeno	n – ácido hexadecanóico
Sefidkon et al. (2004)				10,4 13,7 ^a	12,6 9,8 ^a			18,4		10,4	35,2 ^a		
Ogunwande et al. (2006)			6,7						50,7	13,2			
Marques et al.(2011)	9,7								45,7	5,9			
Armas et al. (2012)	8,8							22,2	35,9				
Tonuci et al. (2012)	10,4				12,9		11,8	17,9		9,6			
Tripathi et al. (2012)		11,2		12,1	1,8 ^a	4,6					6,9 ^a	1,8 ^a	2,5 ^a
Oliveira et al. (2015)	10,4				13		11,8	18,1		8,8			

^a Compostos majoritários dos óleos essenciais das flores de *Tagetes erecta*

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a eficácia e segurança do extrato hidroetanólico de *Tagetes erecta* (EHE) e do óleo essencial das folhas de *Tagetes erecta* (OFO), óleo essencial das flores de *Tagetes erecta* (OFL) como moluscicida contra *Biomphalaria glabrata* e cercaricida frente *Schistosoma mansoni*.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar a caracterização química do EHE, do OFO e OFL;
- Investigar a atividade do EHE, do OFO e do OFL contra *Biomphalaria glabrata* e frente cercárias do helminto *Schistosoma mansoni*;
- Avaliar parâmetros de toxicidade do EHE e dos óleos essenciais em estudo contra organismos não-alvos (*Artemia salina* Leach e *Danio rerio* Hamilton-Buchanan).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção do material vegetal e identificação botânica

O material vegetal foi coletado nas primeiras horas da manhã, para preservação dos constituintes voláteis (CORRÊA JUNIOR, 2013), no Horto Berta Langes de Morretes da Universidade Federal do Maranhão – UFMA (2°33'13.5" S 44°18'20.8" W), no Campus Dom Delgado no Bacanga, na cidade de São Luís, estado do Maranhão durante o mês de agosto de 2018. A exsicata da espécie vegetal foi confeccionada e identificada pelo Botânico Dr. Eduardo Bezerra de Almeida Júnior, depositada no Herbário do Maranhão da UFMA, com o registro n.º 9724.

4.2 Obtenção do extrato hidroetanólico e óleos essenciais

O extrato foi preparado com folhas e flores da espécie *Tagetes erecta* a partir de material seco a temperatura ambiente e pulverizado em turbolizador até a granulometria de pó grosso (BRASIL, 2010). A partir de 227 gramas de material vegetal seco extraiu pelo método de percolação, empregando etanol 70% na relação droga/solvente 1:12 (m/v). A solução extrativa foi concentrada em rotaevaporador, obtendo o extrato hidroetanólico de *Tagetes erecta* (EHE) em seguida acondicionado em frasco de vidro, hermeticamente fechados e posteriormente conservados em ambiente refrigerado (SIMÕES et al., 2017).

Os óleos essenciais foram extraídos, separadamente, a partir 180 gramas de folhas secas (OFO) e 109 gramas de flores secas (OFL) a temperatura ambiente pulverizada em turbolizador, utilizando método de hidrodestilação, empregando o aparelho de Clevenger acoplado ao banho termostato (temperatura menor que 12°C) (BRASIL, 2010; SIMÕES et al., 2017). Os óleos foram centrifugados e secos com sulfato de sódio anidro e acondicionados em ampola de vidro âmbar, hermeticamente fechados e posteriormente conservado em ambiente refrigerado, entre 5-10°C (COUTINHO, 2006).

4.3 Investigação da composição química do extrato hidroetanólico e dos óleos essenciais

4.3.1 Análises qualitativas do extrato hidroetanólico das folhas e flores de *Tagetes erecta* L

O EHE foi submetido a métodos de avaliação qualitativos e semiquantitativos quanto aos seus constituintes químicos, sendo realizados testes para identificação alcaloides, compostos fenólicos, cumarinas, saponinas, taninos condensados, taninos hidrolisáveis,

esteroides, triterpenos, antocianinas, antocianidinas, flavonas, flavonóis, xantonas, chalconas, flavononóis, catequinas e flavononas (MATOS, 2009).

4.3.2 Análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência do extrato hidroetanólico das folhas e flores *Tagetes erecta* L.

Após solubilização do EHE foram analisados por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) empregando cromatógrafo Shimadzu® (Shimadzu Corp. Quioto, Japão), constituído por um módulo de injeção de solvente com uma bomba LC-20AD Shimadzu e detector UV-Vis (SPDA-20A) – Shimadzu. A coluna utilizada foi Phenomenex Luna C-18 (250x4.6mm – 5µm). Os solventes de eluição utilizados foram A (água + ácido fórmico a 0,02%) e B (metanol + ácido fórmico a 0,02%). As amostras foram eluídas de acordo com o seguinte gradiente: 20% a 100% de B em 60 min e de 100% a 100% de 60 a 80 min. O fluxo foi de 1 mL/min, a temperatura da coluna foi de 25°C. O volume de injeção da amostra foi de 20 µL. Os dados foram recolhidos e processados utilizando o *software* LC Solution (Shimadzu). Nas condições empregadas, obteve-se separação de linha base para os principais componentes da amostra numa corrida cromatográfica de 80 minutos avaliadas com um comprimento de onda 270 nm.

4.3.3 Identificação dos compostos por Espectrometria de Massas ESI- Modo Negativo

A identificação dos compostos foi realizada por infusão da amostra por fluxo direto em um espectrômetro de massas com analisador do tipo ion trap linear (Amazon Speed ETD - Bruker), equipado com uma fonte electrospray (ESI), em modo negativo (Thermo, San Jose, CA, EUA). Foi utilizado um tubo capilar de aço inoxidável a 280°C, uma voltagem do spray de 6,00 kV, tensão capilar de -75 V, lentes de tubo de -100 V e um fluxo de 8 µL/min. A análise completa da varredura foi registada na faixa de m/z de 100-1000 Daltons. As fragmentações em estádios múltiplos (ESI-MS_n) foram realizadas utilizando o método de dissociação induzida por colisão contra o gás Hélio para ativação de íons. O primeiro evento de varredura foi um espectro de massa completo para adquirir dados sobre íons nessa faixa de m/z. O segundo evento de varredura foi um experimento MS/MS², MS³ utilizando uma varredura de dados dependente nas moléculas [M-H]⁻ do composto de interesse com energia de colisão de 30% e tempo de ativação de 30 ms. Os íons produzidos foram então submetidos a uma maior fragmentação nas mesmas condições, até não serem observados mais fragmentos. A identificação dos compostos foi feita comparando os dados de massas da literatura e de padrões de referência.

4.3.4 Caracterização dos óleos essenciais por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG/EM).

As análises dos OFO e OFL foram realizadas em cromatógrafo à gás acoplado a espectrômetro de massas, realizada em equipamento Shimadzu tipo quádruplo modelo GCMS-QP2010s (Shimadzu, Japão) e equipado com coluna capilar BPX5 (5% fenil polissilenileno-siloxano, 30m x 0,25 mm id, espessura do filme de 0,25 µm). As condições de injeção foram temperatura do injetor de 250°C, injetor do tipo splitless com pressão da coluna de 160 Kpa, fluxo total de 78,1 mL/min fluxo da coluna de 2,52 mL/min e velocidade linear de 58,2 cm/seg, fluxo de purga de 3.0 mL/min razão de split de 30.0 e tempo de corrida da coluna de 50 min. A programação da temperatura foi de 50°C à 150°C/2,5°C/min, seguida de 150°C à 250°C/25°C/min e logo 15 min à 250°C. O espectro de massas foi programado para realizar leituras em uma faixa de 33 a 750 Daltons, com energia de ionização de 70 eV e temperatura de 260°C na câmara de íons, da interface e do detector. Foi diluído 10 µL do óleo em 300 µL de acetona e injetado no CG 1 µL da amostra. A identificação dos componentes foi feita pela comparação de seus espectros de massas e índices de retenção (IR) presentes nas bases de dados do equipamento e buscas na literatura (NIST, 2011; ADAMS, 2007).

4.4 Atividades biológicas

4.4.1 Atividade biológica frente *Biomphalaria glabrata* Say (1818) e cercárias de *Schistosoma mansoni* Sambon (1907)

4.4.1.1 Coleta, manutenção e identificação dos moluscos

Para realização da coleta em campo foi necessário a paramentação com jaleco manga longa, luvas de procedimentos e pinças metálicas longas para evitar possíveis contatos com animais infectados por *Schistosoma mansoni*.

Os moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata* Say 1818 foram coletados no bairro Sá Viana, São Luís - Maranhão, (2 ° 33' 30.38 " S; 44 ° 18' 12.46 " W), localidade que apresenta criadouros dos planorbídeos em estudo (DAVID et al., 2018). Os caramujos capturados foram quantificados e mantidos em quarentena no moluscário do laboratório de Farmacognosia II – Departamento de Farmácia - UFMA em aquários de vidro com capacidade de 25 litros contendo água filtrada isenta de cloro, sob aeração constante, a temperatura de 25°C e alimentados com alface *in natura*. Durante a quarentena dos moluscos, realizou amostragem com a coleta de 10%

do total de caramujos para a identificação e confirmação da espécie, através da análise de características conquiliológicas e da morfologia interna, conforme a metodologia de Paraense (1975).

4.4.1.2 Análise da positividade de infecção pelo helminto *Schistosoma mansoni* Sambon (1907) nos caramujos

Semanalmente, os moluscos *Biomphalaria glabrata* coletados (4.4.1.1) foram examinados para verificar possível infecção por *Schistosoma mansoni*. Foram colocados individualmente em recipientes de vidro com água filtrada isenta de cloro, expostos à luz e calor de lâmpadas de 100 W, durante aproximadamente duas horas e meia. Em seguida foram observados, com auxílio de estereomicroscópio, para verificar se houve eliminação de cercárias do parasito *Schistosoma mansoni*. Dentre os caramujos não infectados, foram selecionados os adultos com conchas de diâmetro de 15 a 20 mm, para os testes de atividade moluscicida. Os caramujos infectados foram selecionados para o ensaio cercaricida frente *Schistosoma mansoni*.

4.4.1.3 Ensaio moluscicida frente *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818)

Caramujos não infectados por *Schistosoma mansoni* foram submetidos aos ensaios de atividade moluscicida de acordo com as recomendações da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1965).

Na avaliação da atividade moluscicida do extrato hidroetanólico de folhas e flores de *Tagetes erecta* (EHE) foram colocados 150 caramujos separados em aquários com 10 animais em 5 concentrações (100, 250, 500, 750, 1000 µg/mL) em triplicata, com volume total do aquário de 1 L e expostos por 24 horas. Foi empregado como controle positivo (sulfato de cobre 50 mg/L) e negativo (água filtrada isenta de cloro).

Para análise da atividade moluscicida do OFO e do OFL foram colocados 300 caramujos, separados em aquários com 10 animais, em 5 concentrações (25, 50, 75, 100, 125 µg/mL), em triplicata, utilizando Dimetilsulfóxido (DMSO) 0,1% como diluente e com volume total do aquário de 1 L, expostos por 24 horas. Utilizando como controle positivo (sulfato de cobre 50 mg/L) e negativo água filtrada isenta de cloro e DMSO 0,1%.

A avaliação da mortalidade dos caramujos *Biomphalaria glabrata* utilizadas nos testes foi indicada pela descoloração da concha, retração total da massa cefalopodal para dentro da concha, ausência de contração muscular, hemorragia e deterioração da massa cefalopodal.

Após o período de experimentação, todos os caramujos, vivos ou mortos, foram expostos diretamente à solução concentrada de hipoclorito de sódio para completa letalidade.

Os resultados foram expressos em função da CL50 e CL90, calculadas por regressão linear, com índice de confiança de 95%.

4.4.1.4 Ensaio cercaricida frente *Schistosoma mansoni* Sambon (1907)

As cercárias do helminto *Schistosoma mansoni* obtidas no exame de positividade dos caramujos (4.4.1.2) foram capturadas com micropipeta para avaliação da atividade cercaricida dos produtos vegetais EHE, OFO e OFL. Os ensaios seguem adaptações da metodologia descrita por Abass; Mostafa (2005) que consistiram na imersão de 20 cercárias em soluções aquosas do extrato e na solução aquosa dos óleos a 0,1% de DMSO, nas concentrações de 10, 25, 50, 75 e 100 µg/mL. O controle negativo foi realizado com a exposição das cercárias a água filtrada isenta de cloro juntamente com 0,1% DMSO para os óleos essenciais. Para o extrato utilizou-se água filtrada isenta de cloro. O controle positivo consistiu em sulfato de cobre 50 mg/L. O ensaio foi realizado em triplicata. A observação quanto à mortalidade das cercárias foi executada em 15, 30, 60 e 120 minutos, com auxílio de estereomicroscópio após a exposição ao EHE, OFO e OFL. Os resultados foram expressos em função da CL₅₀, calculadas por regressão linear, com índice de confiança de 95%.

4.4.2 Ensaio de toxicidade contra organismos não-alvos

4.4.2.1 Ensaio de toxicidade ambiental com *Artemia salina* Leach

O ensaio de toxicidade frente *Artemia salina* seguiu metodologia descrita por Meyer (1982) adaptada por Ruiz et al. (2005) e ABNT NBR16530 (2016a), com adaptações.

Em um aquário contendo 1 L de solução salina sintética (60 g de sal marinho/litro água filtrada isenta de cloro) foi adicionado 200 mg de cistos de *Artemia salina* obtidos comercialmente, mantendo esse sistema saturado com gás oxigênio por meio de auxílio de bomba de ar e temperatura controlada de 25°C, além de iluminação lateral e artificial, feita com uma lâmpada de 100 W. Em 48 h houve a eclosão dos ovos e larvas (náuplios) que migraram em direção a parte mais iluminada do aquário, por apresentarem fototropismo positivo. Estas larvas foram transferidas para um béquer contendo a solução salina sintética e mantidas em incubação por mais 24 h, sob as mesmas condições de iluminação e oxigenação, para que, 72 horas após a eclosão, as larvas se desenvolvessem para o estágio de metanáuplio (CARVALHO et al., 2009; ABNT, 2016a).

Para a avaliação da letalidade de *Artemia salina*, do OFO e do OFL partiu-se de uma solução estoque de 10.000 µg/mL, do óleo, DMSO (0,1%) e água salina artificial de onde foram

retiradas alíquotas para a preparação de soluções de 5 mL em 5 (cinco) concentrações 50, 75, 100, 250, 500 µg/mL.

A avaliação da letalidade de *Artemia salina*, do EHE partiu-se de uma solução estoque de 10.000 µg/mL, do extrato e água salina artificial de onde foram retiradas alíquotas para a preparação de soluções de 5 mL em 5 (cinco) concentrações 50, 75, 100, 250, 500 µg/mL.

Dez larvas, na fase metanúpio, foram transferidas para cada um dos frascos com suas respectivas concentrações. O controle negativo consistiu em salina sintética com DMSO (0,1%) para os óleos essenciais e para o extrato somente solução salina sintética. O controle positivo foi realizado com 3 µg/mL de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$). Após 24 horas de incubação foi realizada a contagem das larvas vivas, considerando mortos aqueles microcrustáceos que não se movimentaram durante a observação e nem com a leve agitação do frasco. O ensaio foi realizado em triplicata. A CL_{50} foi calculada por regressão linear, com índice de confiança de 95%, obtida da correlação entre a porcentagem de indivíduos mortos e a concentração dos EHE, OFO e do OFL (CARVALHO et al., 2009; ABNT, 2016a).

4.4.2.2 Ensaio de toxicidade frente o peixe *Danio rerio* Hamilton-Buchanan

O projeto para testes em animais (peixe) foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Maranhão (CEUA/UFMA), sob o número 23115.009327/2017-10 (Anexo I).

Quarenta e oito peixes adultos da espécie *Danio rerio* foram separados em 4 (quatro) grupos contendo quatro peixes por aquário (1 L) expostos a soluções do EHE diluído em água filtrada isenta de cloro, nas concentrações de 250, 375, 500 e 750 µg/mL, em triplicata. A mortalidade foi avaliada em 24 e 48 horas após aplicação (ABNT, 2016b). Foram calculadas as CL_{10} , CL_{50} , CL_{90} por regressão linear. Como controle negativo foi empregado água filtrada isenta de cloro e controle positivo sulfato de cobre a 50 mg/L.

Noventa e seis peixes adultos da espécie *Danio rerio* foram separados em 4 (quatro) grupos contendo quatro peixes por aquário (1 L) expostos a soluções do OFO e do OFL com Dimetilsulfóxido (DMSO) 0,1% diluídos em água, em concentrações que variam de 25 a 250 µg/mL, em triplicata. A mortalidade foi avaliada em 24 e 48 horas após aplicação (ABNT, 2016b). Foram calculadas as CL_{10} , CL_{50} , CL_{90} por regressão linear. Como controle negativo foi empregado água filtrada isenta de cloro e DMSO 0,1% e controle positivo sulfato de cobre a 50 mg/L.

5 RESULTADOS

5.1 Rendimento do extrato hidroetanólico das folhas e flores, do óleo essencial das folhas e do óleo essencial das flores de *Tagetes erecta* L.

O extrato hidroetanólico de folhas e flores de *Tagetes erecta* apresentou rendimento de 26,8%. O óleo essencial das folhas e o óleo essencial das flores de *Tagetes erecta* apresentou rendimento de 1,6% e 1,2%, respectivamente.

5.2 Avaliação química do extrato hidroetanólico das folhas e flores, do óleo essencial das folhas e do óleo essencial das flores de *Tagetes erecta* L.

A prospecção química no extrato hidroetanólico das folhas e flores de *Tagetes erecta* demonstrou resultados positivos para compostos fenólicos, cumarinas, saponinas, taninos condensados, flavonas, flavonóis, xantonas, catequinas e flavonas; sendo comprovados resultados negativos para alcaloides, heterosídeos cianogênicos, antocianinas, antocianidinas, chalconas, leucoantocianidinas (Tabela 3).

Tabela 3. Avaliação qualitativa e semiquantitativa dos constituintes químicos do extrato hidroetanólico das folhas e flores de *Tagetes erecta* L.

METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	EXTRATO HIDROETANÓLICO *
alcaloides	ausente
compostos fenólicos	presente
cumarinas	presente
heterosídeos cianogênicos	ausente
saponinas	presente
taninos condensados	presente
antocianinas e antocianidinas	ausente
flavonas, flavonóis e xantonas	presente
chalconas	ausente
flavononois	presente
leucoantocianidina	ausente
catequinas	presente
flavononas	presente

*Resultados expressos como média dos ensaios de avaliação qualitativa e semiquantitativa de constituintes químicos realizados em triplicata no extrato hidroetanólico das folhas e flores de *Tagetes erecta* obtido por percolação na relação de hidromódulo 1:12 m/v.

A identificação e caracterização química dos compostos presentes no EHE são apresentadas a seguir. A Figura 6 mostra o perfil da eluição cromatográfica do extrato com tempo de duração de 35 minutos obtendo cinco picos onde se concentraram a maioria dos compostos presente no extrato. Sendo o pico 1 detectado a 10,3 minutos, pico 2 a 14,9 minutos, pico 3 a 20,6 minutos, pico 4 a 23,7 minutos e pico 5 a 29,3 minutos. A identificação posterior foi por espectrometria de massa sendo possível observar e identificar cinco compostos denominados de pico 1 a 5 cuja estrutura e identidade foram obtidas por estudos de espectrometria de massa em modo negativo (Figura 7 - 9).

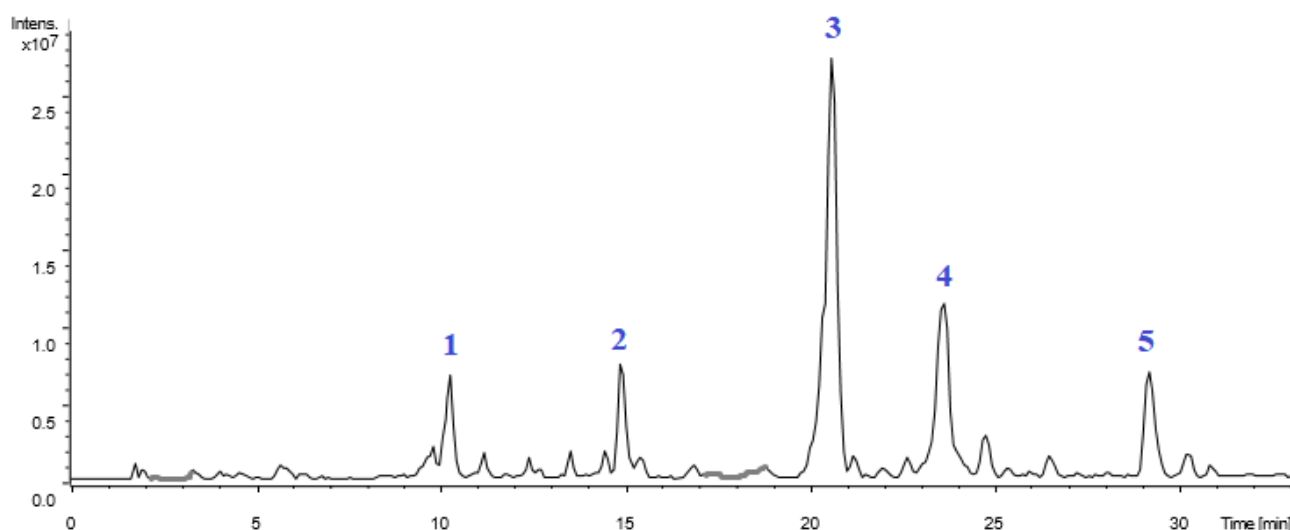


Figura 6. Cromatograma (comprimento de onda 270 nm) do extrato hidroetanólico das folhas e flores de *Tagetes erecta* L. **Pico 1** - 10,3 minutos, **Pico 2** - 14,9 minutos, **Pico 3** - 20,6 minutos, **Pico 4** - 23,7 minutos e **Pico 5** - 29,3 minutos. Fonte: (Leite, 2019).

Os espectros MS/MS^2 , MS^3 do pico 1 mostraram a presença do íon molecular ($[M - H]^-$; m/z 645) que se fragmentou em um íon de m/z 493 (Figura 7) caracterizando a perda de uma molécula de ácido gálico (m/z 152). O espectro obtido nas fragmentações MS^2 e MS^3 do íon precursor 645 mostrou a constância dos íon m/z 169, 313, 331 sendo característicos de Galoil-hexosídeo.

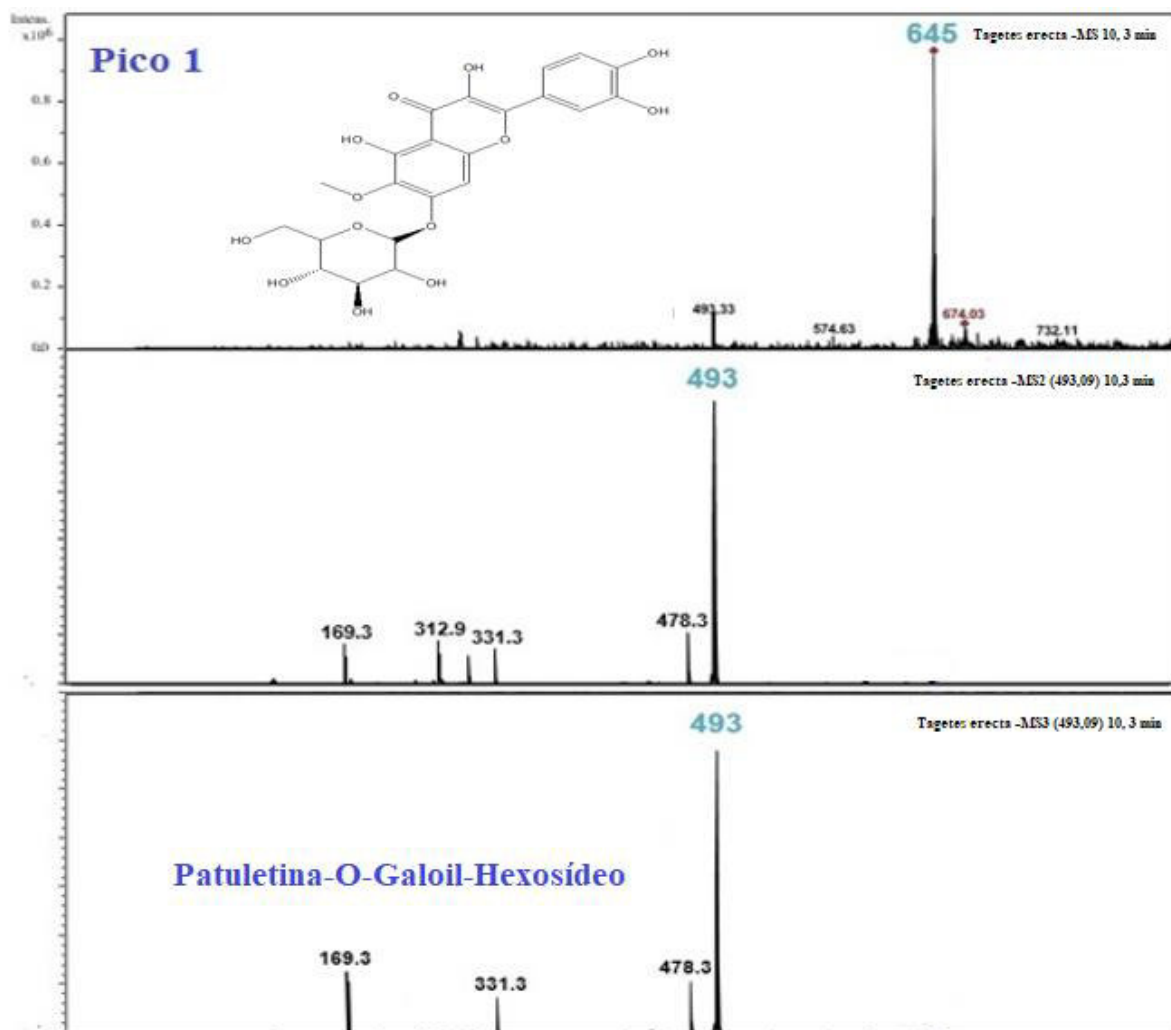


Figura 7. Espectros de massas dos compostos do extrato hidroetanólico das folhas e flores de *Tagetes erecta* L. (ESI- MS-). **Pico 1:** Patuletina-O-Galloyl-hexosídeo; íon molecular m/z 645; íons fragmentos; **MS²** (493, 478, 331, 313, 169); **MS³** (493, 478, 331, 169). Fonte: (Leite, 2019).

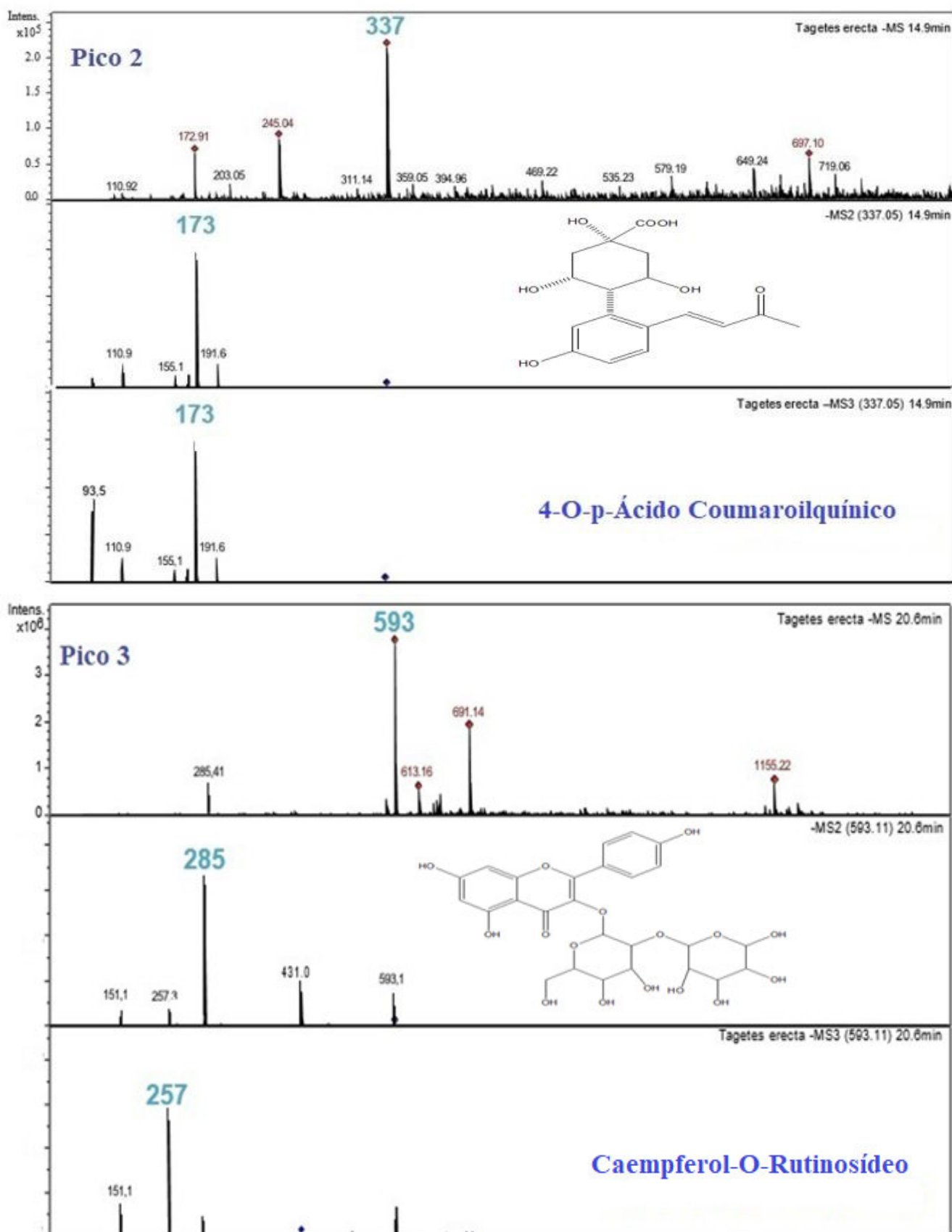


Figura 8. Espectros de massas dos compostos do extrato hidroetanólico das folhas e flores de *Tagetes erecta* L. (ESI- MS⁻). **Pico 2:** 4-O-p-Ácido Coumaroilquínico; íon molecular m/z 337; íons fragmentos; MS² (191, 173, 155, 111); MS³ (191, 173, 155, 111, 93), **Pico 3:** Caempferol-O-Rutinosídeo; íon molecular m/z 593; íons fragmentos; MS² (593, 431, 285, 257, 151); MS³ (593, 285, 257, 151). Fonte: (Leite, 2019).

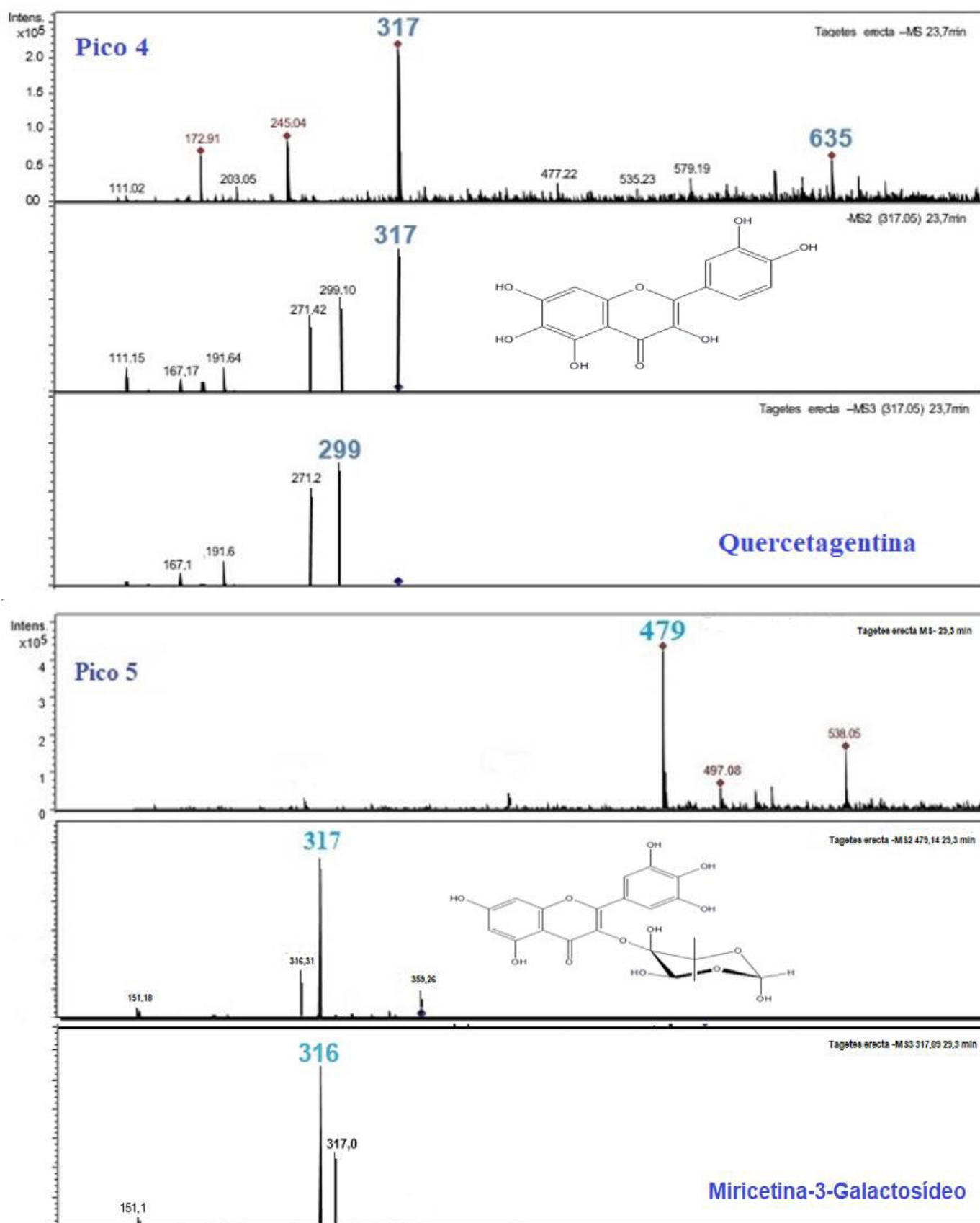


Figura 9. Espectros de massas dos compostos do extrato hidroetanólico das folhas e flores de *Tagetes erecta* L. (ESI-MS⁻). **Pico 4:** Quercetagetina; íon molecular m/z 317; íons fragmentos; MS² (317, 299, 271, 191, 167, 111); MS³ (299, 271, 191, 167), **Pico 5:** Miricetina-3-Galactosídeo; íon molecular m/z 479; íons fragmentos; MS² (359, 317, 316, 151); MS³ (317, 316, 151). Fonte: (Leite, 2019).

Na caracterização realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas dos OFO e OFL foi possível identificar 100% e 99,22% dos constituintes respectivamente com a identificação de 25 constituintes, sendo 13 (treze) pertencentes a classe dos monoterpenos, 08 (oito) sesquiterpenos e 04 (quatro) compostos pertencentes a outras classes de constituintes. A composição química, assim como a abundância relativa dos óleos essenciais em estudo estão listados na Tabela 4.

Tabela 4. Principais constituintes do óleo essencial das folhas de *Tagetes erecta* (OFO) e do óleo essencial das flores de *Tagetes erecta* (OFL) identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

Compostos ^b	IR ^{calc}		Fragmentações dos íons (m/z) ^a				Classe
	OFO	OFL	OFO	OFL	OFO A%	OFL A %	
α -pineno	948	-	77,91,92,93 ^c	-	1,01	-	MH
Sabineno	972	-	77,79,92,93 ^c	-	1,29	-	MH
Mirceno	985	980	41,69,91,93 ^c	41,69,91,93 ^c	1,90	2,40	MH
D – Limoneno	1015	1010	67,68 ^c ,93,94	67,68 ^c ,93,94	15,82	8,48	MH
<i>cis</i> - β -ocimeno	1038	1035	79,80,91,93 ^c	79,80,91,93 ^c	0,36	1,71	MH
<i>trans</i> - β -ocimeno	1046	1048	79,91,92,93 ^c	79,91,92,93 ^c	5,14	4,83	MH
4-careno	1091	1093	91,93 ^c 121,136	91,93 ^c ,121,136	14,24	3,24	MH
1,3,8-p-mentatrieno	1101	-	91,105,119,134 ^c	-	0,80	-	MH
Linalol	1103	1102	41,55,71 ^c ,93	41,55,71 ^c ,93	0,61	1,41	MO
Terpinen – 4 – ol	1135	-	70, 71 ^c , 93, 111	-	0,72	-	MO
α -terpineol	1147	1145	59 ^c ,93,121, 136	59 ^c ,93,121,136	1,31	0,40	MO
Piperitenona	1260	1263	58,89,90,117 ^c	-	7,53	1,86	MO
Piperitona	1275	1280	82 ^c ,95,110,137	82 ^c ,95,110,137	39,70	12,62	MO
Indol	1310	-	58,89,90,117 ^c	-	1,76	-	AC
Cariofileno	1434	1444	69,91,93 ^c ,133	69,91,93 ^c ,133	1,72	47,55	SH
Fitol	1466	-	43,57,69,71 ^c	-	3,90	-	DI
Humuleno	-	1512	-	41,80,93 ^c ,121	-	0,52	SH
Biciclogermacreno	1516	1515	91,93,107,121 ^c	-	0,56	-	SH
Germacreno D	-	1526	-	91,105,119,161 ^c	-	2,65	SH
Nerolidol	1564	1564	41,43,69 ^c ,93	41,43,69 ^c ,93	0,50	1,25	SO
Espatuleno	-	1580	-	43 ^c ,91,119,205	-	2,06	SO
Óxido de cariofileno	-	1590	-	41, 43, 79 ^c , 93	-	6,40	SO
Hexadecanal	1809	-	43,57 ^c ,82,96	-	1,13	-	AL
Cariofiladienol I	-	2310	-	41,69,91,136 ^c	-	1,10	SO
Total identificado (%)					100,00	98,85*	

Tabela 4. Principais constituintes do óleo essencial das folhas de *Tagetes erecta* (OFO) e do óleo essencial das flores de *Tagetes erecta* (OFL) identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (Continuação)

Monoterpeno hidrocarboneto	40,56%	20,66%
Monoterpeno oxigenado	49,87%	16,29%
Sesquiterpeno hidrocarboneto	2,28%	50,72%
Sesquiterpeno oxigenado	0,50%	10,81%
Outros	6,79%	-
Rendimento	1,6%	1,2%

^a íons fragmentos dos compostos dos óleos essenciais; IR^{calc} - índice de retenção linear coluna capilar BPX5 (série de n-alcenos C8-C28); ^b identificado a partir dos índice de retenção e íons fragmentos (m/z); ^c pico base; OFO: óleo essencial das folhas de *Tagetes erecta* L.; OFL: óleo essencial das flores de *Tagetes erecta* L; A % – calculado a partir das áreas relativas dos cromatogramas; MH – monoterpeno hidrocarboneto; MO – monoterpeno oxigenado; SH – sesquiterpeno hidrocarboneto; SO – sesquiterpeno oxigenado; AC – ácido carboxílico; AL – aldeído; DI – diterpeno; não elucidado – óleo essencial das flores de *Tagetes erecta* IR cal: 1704, m/z (91, 115, 117, 132^c) A % - 0,37*.

Os resultados da Tabela 4 permitem evidenciar que o OFO apresenta 90,43% de monoterpenos e 2,78 de sesquiterpenos. Há predominância de monoterpenos oxigenados (49,87%), sendo confirmada a identificação dos compostos através da espectrometria de massa (Figura 10). A piperitona (39,70%) foi o composto majoritário junto a outros 2 (dois) monoterpenos hidrocarbonetos como compostos auxiliares, D – Limoneno (15,82%) e 4-careno (14,24%), essas 3 (três) substâncias correspondem a mais da metade do teor volátil presente no óleo.

Já o OFL (Tabela 4) demonstrou menor percentual de monoterpenos (36,95%) e predominância de sesquiterpenos (60,84%), com destaque para os sesquiterpenos hidrocarbonetos (50,72%). Após confirmação dos espectros de massa das substâncias identificadas (Figura 11) constatamos que predomina o cariofileno (47,55%) como composto majoritário e destacando como compostos auxiliares os monoterpenos piperitona (12,62%) e D – Limoneno (8,48%).

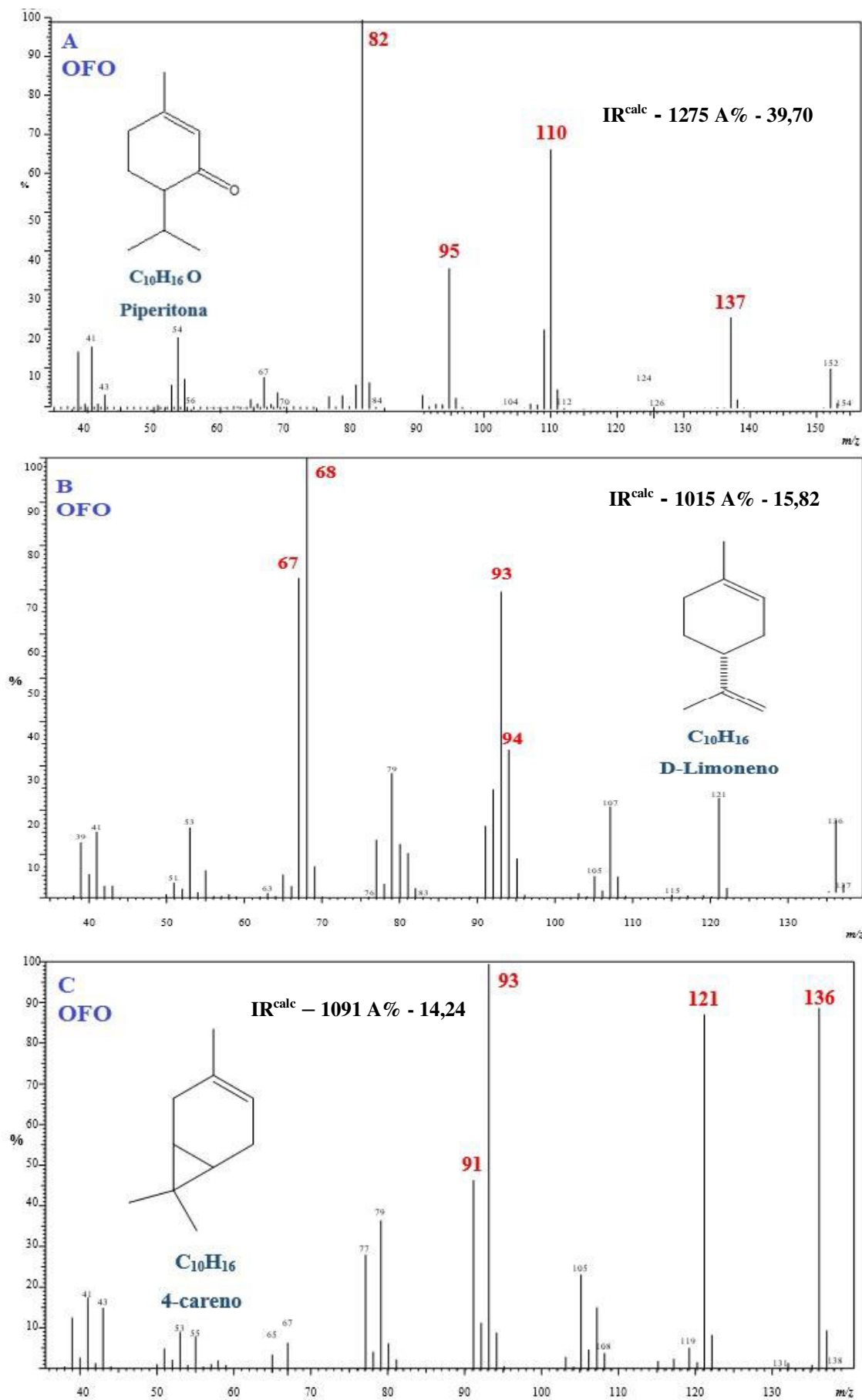


Figura 10. Espectros de massas dos compostos majoritários do óleo essencial das folhas de *Tagetes erecta* L. (ESI- MS⁻). **A:** Piperitona (82, 95, 110, 137); **B:** D – Limoneno (67, 68, 93, 94); **C:** 4-careno (91, 93, 121, 136). Fonte: (Leite, 2019).

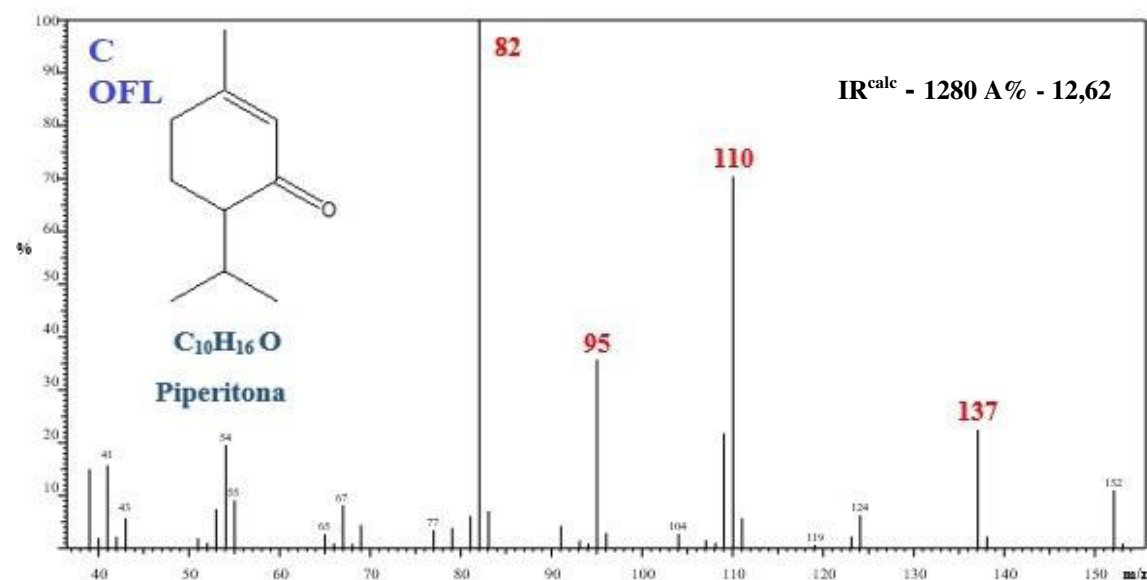
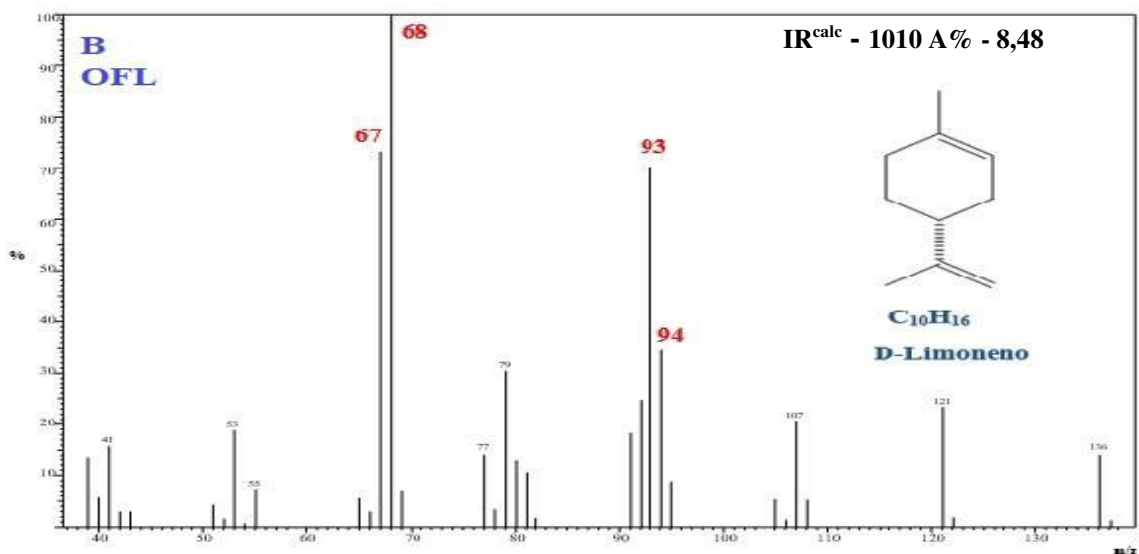
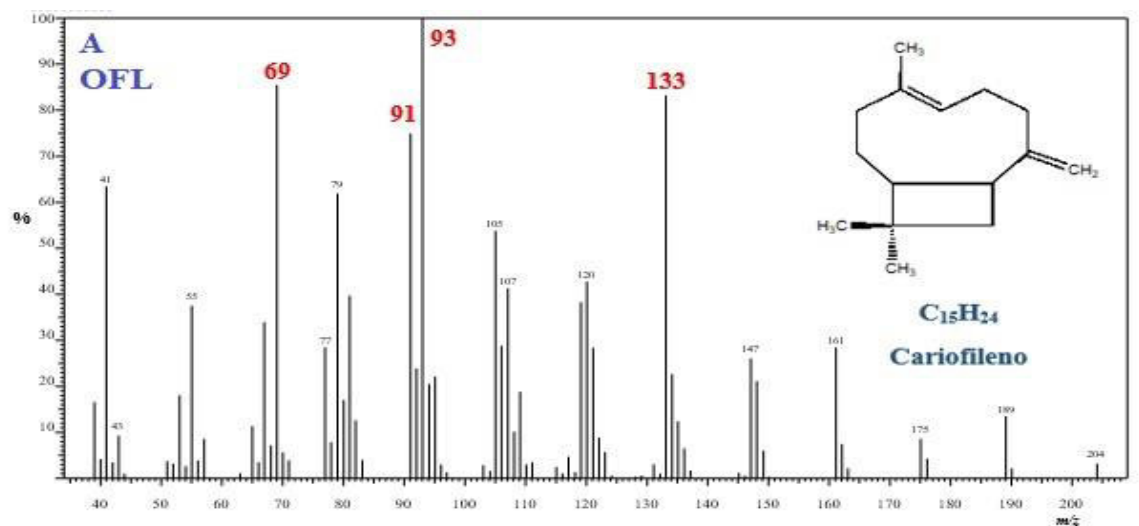


Figura 11. Espectros de massas dos compostos majoritários do óleo essencial das flores de *Tagetes erecta* L. (ESI- MS⁻). **A:** Cariofileno (69, 91, 93, 133); **B:** D – Limoneno (67, 68, 93, 94); **C:** Piperitona (82, 95, 110, 137). Fonte: (Leite, 2019).

5.3 Análises das atividades biológicas

5.3.1 Avaliação moluscicida frente *Biomphalaria glabrata* Say (1818)

O EHE apresentou baixa toxicidade frente caramujos *Biomphalaria glabrata*; sendo observado início da mortalidade a partir da concentração de 250 µg/mL. A mortalidade na concentração mais alta testada (1000 µg/mL) apresentou valores menores que 30% dos animais expostos.

O OFO é ativo contra caramujos *Biomphalaria glabrata*; ocasionando liberação de hemolinfa dos moluscos em 120 minutos após exposição a concentração de 125 µg/mL. Não ocorrendo o mesmo efeito na menor concentração ao qual foram expostos (25 µg/mL). Apresentando, assim, toxicidade dose-dependente. O óleo essencial frente *Biomphalaria glabrata* apresentou CL₅₀ e CL₉₀ com valores de 68,24 e 112,97 µg/mL, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5. Concentrações letais (CL₅₀ e CL₉₀) do óleo essencial das folhas (OFO) e do óleo essencial das flores (OFL) frente *Biomphalaria glabrata* (Say 1818)

Óleo essencial de <i>Tagetes erecta</i> L.	Concentração (µg/mL)	<i>Biomphalaria glabrata</i>	
		CL ₅₀ (µg/mL)	CL ₉₀ (µg/mL)
Folhas	125	68,24 ^a	112,97 ^a
	100		
	75		
	50		
	25		
		*(66,08 – 70,40)	*(105,51 – 120,47)
Flores	100	19,88 ^b	66,83 ^b
	75		
	50		
	25		
		*(18,80 – 20,96)	*(58,84 – 74,82)

CL 50 – concentração letal para 50% da população estudada; CL 90 – concentração letal para 90% da população estudada; *IC 95% – intervalo de confiança. A avaliação do ensaio foi analisado estatisticamente usando o teste ANOVA seguido de Tukey. As médias das CL₅₀ seguidas por letras distintas na mesma coluna (^a, ^b, ^c) apresentam diferença estatística (p > 0,05)

O OFL apresentou uma intensa e imediata atividade contra caramujos *Biomphalaria glabrata* nas concentrações de 75 e 100 µg/mL, sendo constatado que 90% dos animais expostos apresentavam liberação de hemolinfa e mortalidade significativa em 60 minutos.

Os óleos essenciais de *Tagetes erecta* demonstraram toxicidade em caramujos adultos de *Biomphalaria glabrata* após 24 horas de exposição. Nenhum molusco do controle negativo, que continha água isenta de cloro e DMSO 0,1%, morreu durante o desenvolvimento das análises moluscicida. O controle positivo utilizado, carbonato de cobre na concentração de 50 mg/L, causou a mortalidade de todos os caramujos expostos.

5.3.2 Avaliação cercaricida frente *Schistosoma mansoni* Sambon (1907)

O EHE e os OFO e OFL apresentaram atividade cercaricida (Tabela 6). O OFO e o EHE causaram 100% de mortalidade na concentração de 100 µg/mL em 15 minutos, enquanto o OFL mostrou a mesma atividade em 30 minutos.

Tabela 6. Concentrações letais (CL₅₀) do óleo essencial das folhas (OFO), óleo essencial das flores (OFL) e extrato hidroetanólico das folhas e flores (EHE) frente cercárias de *Schistosoma mansoni* Sambon (1907)

<i>Tagetes erecta</i> L.	Concentração (µg/mL)	Cercárias de <i>Schistosoma mansoni</i>	
		CL ₅₀ µg/mL	
Óleo essencial das folhas	100	22,56 ^{*a}	IC 95% (21,41 – 23,72)
	75		
	50		
	25		
	10		
Óleo essencial das flores	100	43,54 ^{**b}	IC 95% (36,02 – 51,10)
	75		
	50		
	25		
	10		
Extrato hidroetanólico das folhas e flores	100	31,09 ^{*c}	IC 95% (21,42 – 40,77)
	75		
	50		
	25		
	10		

*CL₅₀:Concentração Letal para 50% da população estudada, obtido 15 minutos do início do ensaio. **CL₅₀: Concentração Letal para 50% da população estudada, obtido 30 minutos do início do ensaio; IC 95% – intervalo de confiança. A avaliação do ensaio foi analisado estatisticamente usando o teste ANOVA e comparações múltiplas de Tukey. As médias das CL₅₀ seguidas por letras distintas ^(a, b, c) apresentam diferenças estatística entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Nas demais concentrações testadas do OFO e EHE, 100% de mortalidade foi atingida em 60 minutos. Já o OFL obteve igual resultado após 120 minutos do início dos testes.

5.3.3 Avaliação da toxicidade contra organismos não-alvos

5.3.3.1 Avaliação da toxicidade frente *Artemia salina* Leach

Os testes de toxicidade com *Artemia salina* realizados neste trabalho com OFO indicam toxicidade com valor de CL_{50} 87,23 $\mu\text{g/mL}$. Enquanto os testes de toxicidade com *Artemia salina* com o OFL apresenta valor de CL_{50} 12,49 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 7).

Os testes de toxicidade com *Artemia salina* realizados com EHE obteve valor elevado (CL_{50} 1.570,99 $\mu\text{g/mL}$) (Tabela 7).

Tabela 7. Concentrações letais (CL_{50}) do óleo essencial das folhas (OFO), óleo essencial das flores (OFL) e extrato hidroetanólico das folhas e flores (EHE) em ensaios de toxicidade frente *Artemia salina* Leach

CL_{50} ($\mu\text{g/mL}$)		
Óleo essencial das folhas	Óleo essencial das flores	Extrato hidroetanólico das folhas e flores
87,23 ^a	12,49 ^b	1.570,99 ^c
*(81,88 – 93,08)	*(11,17 – 13,80)	*(1.477,30 – 1.698,99)

CL_{50} – concentração letal para 50% da população estudada; * IC 95% – intervalo de confiança. A avaliação do ensaio foi analisado estatisticamente usando o teste ANOVA e comparações múltiplas de Tukey. As médias das CL_{50} seguidas por letras distintas ^(a, b, c) apresentam diferenças estatística entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

5.3.3.2 Avaliação da toxicidade aguda frente *Danio rerio*

O OFO apresentou CL_{50} e CL_{90} de 184,95 $\mu\text{g/mL}$ e 241,89 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Já o OFL apresentou CL_{50} de 39,27 e CL_{90} de 68,10 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 8).

O EHE apresentou CL_{50} de 489,58 $\mu\text{g/mL}$ e CL_{90} de 745,50 $\mu\text{g/mL}$, comprovando, assim, que a toxicidade é bastante superior no vertebrado testado, indicando segurança do produto (Tabela 8).

Tabela 8. Concentrações Letais (CL₁₀, CL₅₀ e CL₉₀) do óleo essencial das folhas (OFO), óleo essencial das flores (OFL) e extrato hidroetanólico das folhas e flores (EHE) frente *Danio rerio*

<i>Tagetes erecta</i> L.	Toxicidade aguda frente <i>Danio rerio</i> (µg/mL)		
	CL ₁₀	CL ₅₀	CL ₉₀
Óleo essencial das folhas IC 95%	141,42 ^a (128,81 – 154,04)	184,95 ^a (170,50 – 199,41)	241,89 ^a (224,36 – 259,41)
Óleo essencial das flores IC 95%	22,68 ^b (19,48 – 25,88)	39,27 ^b (37,53 – 41,01)	68,10 ^b (61,19 – 75,01)
Extrato hidroetanólico das folhas e flores IC 95%	321,50 ^c (319,19 – 323,75)	489,58 ^c (482,39 – 496,67)	745,50 ^c (728,89 – 762,01)

CL 10 – concentração letal para 10% da população estudada; CL 50 – concentração letal para 50% da população estudada; CL 90 – concentração letal para 90% da população estudada; IC 95% – intervalo de confiança. A avaliação do ensaio foi analisado estatisticamente usando o teste ANOVA e comparações múltiplas de Tukey. As médias das CL ₁₀, ₅₀, ₉₀ seguidas por letras distintas na mesma coluna (^a, ^b, ^c) apresentam diferenças estatística entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

6 DISCUSSÃO

Na avaliação de rendimento do extrato hidroetanólico dos estudos com *Tagetes erecta* trabalho de Ortega et al. (2017), com espécie cultivada no México extraída por maceração, apresentou resultado de 13,3% em extrato etanólico e 14,4% em extrato aquoso.

Estudos desenvolvidos com *Tagetes erecta* coletada na Índia apresentaram valores de rendimento inferiores ao que constatamos no nosso estudo (26,8%). Padalia; Chanda (2014), utilizando a percolação como método de extração (mesma técnica utilizada no nosso estudo) obtiveram rendimentos de 18,1% e 17,0%, para extratos aquoso e metanólico, respectivamente. Rodda et al. (2013), em extratos obtidos em aparelho de Soxhlet, tendo metanol como solvente, apresentaram rendimento de 6,8%.

Comparando esses valores acima citados ao rendimento do presente trabalho, evidenciamos maior rendimento no nosso estudo; o que pode ser justificado devido a quantidade de metabólitos secundários representar uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, portanto sua síntese e proporções no vegetal são frequentemente afetadas pelas condições geográficas e ambientais de México, Índia e Brasil locais onde foram desenvolvidos esses estudos com a espécie *Tagetes erecta* (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Mas vale destacar que outras variáveis entre esses estudos, como procedimento extrativo, natureza do solvente e proporção droga vegetal:solvente podem justificar as diferenças constatadas de rendimento (FONSECA, 2005).

Mas, estudo de Munhoz et al. (2012) com espécie cultivada no estado do Paraná - Brasil utilizando flores secas e água/etanol (1/1) como líquido extrator, com extração por maceração e posterior dispersão para complemento do processo extrativo, obteve rendimento para *Tagetes patula* L. (sinonímia de *Tagetes erecta*) de 46,6%, valor superior ao encontrado no presente estudo (26,8%). O que também pode estar relacionados aos fatores anteriormente referidos, mas que desperta atenção para necessidade de continuidade dos estudos com a espécie na perspectiva de desenvolver estudos para padronização do extrato, visando otimizar a obtenção dos mesmos, garantindo maior rendimento e aproveitamento da matéria-prima (LEITÃO, 2013).

Estudos indicam valores de rendimentos dos óleos essenciais de *Tagetes erecta*, menores aos obtidos no nosso estudo (1,6% e 1,2% para óleos essenciais das flores e dos óleos essenciais das folhas secas, respectivamente); sendo constatado valores que variam de 0,05% a 0,7% em óleos extraídos das folhas e flores frescas respectivamente (MARQUES et al., 2011; TRIPATHI et al., 2012; ARMAS et al., 2012; TONUCI et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2015).

Para Sefidkon et al. (2004), em estudo com óleo essencial das folhas secas e óleo essencial das flores secas, os rendimentos também foram mais baixos (0,37% e 0,35%).

Três parâmetros podem estar relacionados ao melhor rendimento dos óleos essenciais de *Tagetes erecta* do presente trabalho: a utilização de folhas e flores secas o que possibilita eliminação parcial da influência do peso da água no cálculo do rendimento; o horário de coleta das folhas e flores da espécie vegetal que é recomendado que seja pela manhã devido a preservação dos constituintes voláteis da planta (CORRÊA JUNIOR, 2013); o uso do sistema de resfriamento com temperatura menor igual a 12 °C (banho termostato) que minimiza as perdas do óleo essencial no processo de condensação na hidrodestilação, equipamento este que não foi relatado em nenhum outro trabalho consultado. Resultados esses que em conjunto, também devem estimular os estudos de padronização da extração dos óleos essenciais da espécie.

A literatura refere que valores de rendimento superiores a 0,7% para óleos essenciais, indica bom resultado (SERAFINI et al., 2002). Assim, podemos afirmar que os óleos essenciais de *Tagetes erecta* obtidos no nosso estudo apresentaram bom rendimento.

Prospecção fitoquímica do extrato hidroetanólico das folhas e flores de *Tagetes erecta*, desenvolvidos na Índia por Devika; Koilpillai (2012), Ramya et al. (2012) e Sandeep; Deepa (2017) apresentaram resultados divergentes ao nosso estudo, dada a comprovação da presença de alcaloides e a ausência de saponinas nos trabalhos acima citados. Já estudo nacional de Munhoz (2013) não evidenciou presença de saponinas e alcaloides nos extratos das flores *Tagetes erecta*. Diferenças de composição química entre extratos de mesma espécie vegetal pode ser justificada por fatores já referidos (FONSECA, 2005; GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

A caracterização química dos compostos presentes no extrato hidroetanólico de *Tagetes erecta* que podem ser os responsáveis pelas atividades biológicas do presente estudo são apresentadas nas Figura 6, Figura 7, Figura 8 e Figura 9. O espectro do pico 1 obtido nas fragmentações MS^2 e MS^3 do íon precursor m/z 645 demonstrou a constância dos íons m/z 169, 313, 331 sendo característicos de Galoil-hexosídeo conforme demonstrou Mena et al. (2012) que obtiveram fragmentações em espectrometria de massa em modo negativo m/z 331 e MS^2 (169, 193, 211, 271, 313) e MS^3 (125, 169) dos produtos vegetais da espécie *Punica granatum* L. Já Parejo et al. (2004), em extratos metanólicos de *Tagetes maxima*, obtiveram por espectrometria de massa MS/MS fragmentações m/z (645, 493, 331, 313, 169) resultados semelhantes aos espectros representados na Figura 7 identificando o composto como Patuletina-O-Galoil-Hexosídeo. O flavonoide Patuletina já foi referido em estudos anteriores com *Tagetes erecta* principalmente nas suas flores (BOHM; STUESSY, 2001).

O pico 2 de acordo com os seus espectros MS/MS², MS³ foi sugerido como derivados do ácido chiquímico (Figura 8). Exibiu um [M - H]- de m/z 337 com um padrão de fragmentação de acordo com derivados do ácido chiquímico principalmente formado pela presença dos íons m/z 173, m/z 93. Karar; Kuhnert (2015) obtiveram fragmentações semelhantes em MS² e MS³ ao presente estudo identificando o composto como 4-O-Ácido Coumaroilquínico.

No pico 3 foi possível identificar o íon precursor m/z 593 apresentado na Figura 8. Exibiu um MS² com pico base de m/z 285 que sugeriu a presença de Caempferol (m/z 285), aliando esses dados as fragmentações MS² e MS³ obtidos por Molina-Garcia et al. (2018) constatamos semelhanças na fragmentações de ambos estudos o que sugere o composto como Caempferol-O-Rutinosídeo.

Comparando com o padrão de fragmentação disponível na literatura, o composto identificado no pico 4 correspondeu à Quercetagentina um derivado da Quercetina, com íon precursor m/z 317 e nas fragmentações posteriores (MS² e MS³) apresentou fragmentos e abundância relativa característicos desse composto, tais como, m/z 317 na fragmentação MS² e fragmento m/z 299 em MS³ (Figura 9). Gong et al. (2012) em trabalho desenvolvido com extratos alcoólicos de *Tagetes erecta*, obtiveram valores de espectros de massas com fragmentações de íon precursor m/z 635 e íons fragmentos m/z 317, 299 e 271, resultados semelhantes ao do presente estudo.

Por fim, identificamos a Miricetina-3-Galactosídeo com o íon molecular m/z 479. No produto da fragmentação MS² e MS³ obteve como íons abundantes m/z 317, 316, 151 estando as fragmentações em acordo com a base de dados online MassBank (2018). Constatamos ainda a perda de m/z 162 através da diferença entre m/z 479 e m/z 317 correspondendo a molécula de glicose. Moliner et al. (2018), em extratos etanólicos das flores de *Tagetes erecta* demonstraram a presença de derivados da Miricetina com fragmentações semelhantes ao presente estudo com destaque para o fragmento MS² m/z 317. Navarro-González et al. (2014) em extratos etanólicos das flores dessa mesma espécie obtiveram de forma isolada o flavonoide Miricetina com os fragmentos m/z 317 e MS² m/z 299, 271, 167.

No conjunto, esses dados caracterizam o conteúdo do extrato hidroetanólico das folhas e flores de *Tagetes erecta* rico em derivados de flavonoides com abundância de Patuletina-O-Galoil-Hexosídeo, Caempferol-O-Rutinosídeo, Quercetagentina e Miricetina-3-Galactosídeo. Além de um derivado de Ácido quínico e Ácido 4-cumárico o 4-O-Ácido Coumaroilquínico.

Quanto à composição química do óleo essencial das folhas, estudo de Tonuci et al. (2011) também comprovaram predominância de monoterpenos (97,3%). Já em relação a

composição química do óleo essencial das flores, Sefidkon et al. (2004) obtiveram como composto majoritário um sesquiterpeno hidrocarbonado (cariofileno), também constatado no nosso estudo.

Mas estudos de composição química com óleos essenciais de *Tagetes erecta*, com material de origem e processamento diferentes indicam outros constituintes majoritários. Estudo de Sefidkon et al. (2004) comprovou presença dos monoterpenos Terpinoleno (18,4%) e E-ocimenona (12,6%) no óleo essencial das folhas; já no óleo essencial das flores foram identificados os sesquiterpenos cariofileno (35,2%) e o monoterpeno *cis*- β -ocimeno (13,7%) como compostos majoritários. Armas et al. (2012) constataram como compostos majoritários em óleo essencial das flores de *Tagetes patula* (sinonímia de *Tagetes erecta*), composição também semelhante ao nosso estudo, comprovando cariofileno (23,7%) e *cis*- β -ocimeno (13,7%) como compostos majoritários.

As plantas produtoras de essências que se desenvolvem em diversas partes do mundo geralmente produzem os mesmos componentes, mas com percentuais diferentes, podendo estes variarem para a mesma planta na dependência dos fatores ambientais, como época do ano e hora do dia (FONSECA, 2005). Variações na composição química do óleo essencial de uma mesma espécie, mas oriundas de regiões distintas, podem ser atribuídas às diferenças dos parâmetros climáticos e geográficos, como: temperatura, índice pluviométrico, tipo de solo, entre outros fatores ambientais que influenciam na produção dos metabólitos secundários (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Na análise da atividade frente *Biomphalaria glabrata*, o óleo essencial das folhas de *Tagetes erecta* avaliado no nosso estudo, ocasionou mortalidade de moluscos; entretanto apresentou valor acima das recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS) para produtos naturais moluscicidas, que adota como critério para efetividade da ação moluscicida em concentrações letais CL_{90} inferiores a 100 μ g/mL, sugerido como limite de segurança para utilização de concentrações baixas para a ação moluscicida desejada. Assim, quanto menor for a concentração da dose letal, melhores serão as condições de uso do produto e menores serão os impactos causados aos organismos não-alvos que coabitam regiões com os moluscos (MOREIRA et al., 2010).

Apesar de valores superiores as recomendações da OMS apresentado pelo óleo essencial das folhas de *Tagetes erecta* (Tabela 5), a literatura sinaliza para o potencial de exploração da atividade moluscicida de algumas espécies vegetais, a exemplo do estudo de Dias et al. (2013) com teste frente *Biomphalaria glabrata* de óleo essencial das folhas de *Syzygium cumini* (L.)

Skeels com valor de CL_{90} 191 $\mu\text{g/mL}$, concentração letal com valor bem superior ao encontrado no nosso estudo.

Quanto ao potencial moluscicida do óleo essencial das flores de *Tagetes erecta* frente *Biomphalaria glabrata*, o presente trabalho comprovou intensa e imediata atividade nas concentrações de 100 $\mu\text{g/mL}$ e 75 $\mu\text{g/mL}$; logo concentrações abaixo das estabelecidas pela OMS, no intervalo de até 48 horas após exposição dos caramujos.

Estudos de Chiang et al. (1972) e Saur et al. (2012) demonstraram a presença e distribuição de acetilcolina e da enzima acetilcolinesterase no sistema nervoso do caramujo. Ryan; Byrne (1988) e Souza et al. (2010) demonstram que terpenos de óleos essenciais, principalmente sesquiterpenos, ocasionam forte inibição da acetilcolinesterase, atuando como neurotoxinas causando sensibilidade no sistema neuromuscular dos moluscos expostos. Diante do exposto, podemos sugerir que as respostas rápidas e intensas contra os caramujos evidenciados no nosso estudo, podem estar relacionadas aos terpenos, como compostos majoritários das flores de *Tagetes erecta*, atuando na via de inibição da acetilcolinesterase.

É importante ressaltar que, a atividade moluscicida apresentada pelo óleo essencial das flores de *Tagetes erecta* (Tabela 5) pode estar associada a combinação de constituintes químicos presentes em sua composição em quantidades satisfatórias para desencadear efeito moluscicida, atuando assim, em sinergia e não necessariamente está relacionada a um único composto majoritário isolado. Uma vez que há na literatura trabalhos como o de Rouquayrol et al. (1972) no qual o composto cariofileno, composto majoritário do óleo essencial das flores de *Tagetes erecta* (Tabela 4), foi testado individualmente e não apresentou atividade moluscicida frente *Biomphalaria glabrata*.

Na análise da efetividade moluscicida do óleo essencial das folhas e do óleo essencial das flores de *Tagetes erecta*, constatamos que essa sofre influência da composição química, dada comprovação da predominância de monoterpenos oxigenados, tendo como composto majoritário a piperitona e 02 (dois) monoterpenos hidrocarbonetos como compostos auxiliares D – limoneno e 4-careno no óleo essencial das folhas. Já no do óleo essencial das flores predominam sesquiterpenos totais, tendo como composto majoritário cariofileno, sesquiterpeno hidrocarboneto (Tabela 4).

As atividades biológicas estão relacionadas a cadeia dos compostos, assim compostos com maior cadeia carbônica possuem maior lipofilicidade e maior capacidade de penetrar tecidos, como é o caso dos sesquiterpenos. Assim, a melhor atividade biológica moluscicida evidenciada no óleo essencial das flores de *Tagetes erecta* pode ser justificada pelas características dos sesquiterpenos hidrocarbonetos (LOMONACO et al., 2009).

A revisão que fundamenta essa discussão, não evidenciou, até o momento, estudo de avaliação da atividade moluscicida do composto piperitona e 4-careno. Mas estudo com piperitona constatou atividade inseticida contra *Callosobruchus maculatus* Fabricius, 1775, uma praga que ataca o feijão (KETOH et al., 2006) e atividade inibitória contra 04 (quatro) tipos de fungos fitopatógenos (EL-SAEID, 2011). Enquanto estudo de Figueredo et al. (2013) demonstrou que o óleo essencial de *Myracrodruon urundeuva* Allemão, tendo como composto majoritário 4-careno (80,41%), aumentou a potência de antimicrobianos utilizados no tratamento por infecções causadas por *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Estudo de Fernandes (2011) com óleo essencial das cascas de *Citrus limon* L. evidenciou atividade moluscicida contra *Biomphalaria glabrata* criados em laboratório, identificando limoneno como composto majoritário (49 %).

Comparando os valores de concentrações letais contra *Biomphalaria glabrata* obtidos no presente trabalho a outros estudos nacionais com diversas espécies vegetais, constatamos variações de valores de CL₅₀ e CL₉₀, indicando CL₅₀ de 46,76 a 253,43 µg/mL e CL₉₀ 67,7 a 97,0 µg/mL (SILVA-FILHO et al., 2009; LEITE et al., 2009; TELES et al., 2010; DIAS et al., 2013; RODRIGUES et al., 2013; COSTA et al., 2015); constatando, assim, valores superiores. Mas estudo desenvolvido por Moreira et al. (2010) e Pereira et al. (2017) apresentam valores de CL₁₀₀ 0,5 µg/mL e CL₉₀ 3,69 µg/mL, respectivamente, logo concentrações letais com valores inferiores aos nossos; entretanto no primeiro estudo não desenvolveram ensaios de toxicidade contra organismos não-alvos, já no segundo trabalho não elucidaram a composição química dos produtos testados.

O extrato hidroetanólico das folhas e flores de *Tagetes erecta* apresentou baixa atividade moluscicida frente caramujos *Biomphalaria glabrata*, sendo evidenciada mortalidade somente a partir da concentração de 250 µg/mL, mesmo na concentração mais alta testada (1000 µg/mL) ocorrendo mortalidade menor que 30% dos animais expostos.

Estudo com as frações hexânica e de acetato de etila do extrato das partes aéreas de *Tagetes minuta* L., logo espécie do mesmo gênero de *Tagetes erecta*, comprovou atividade moluscicida com CL₉₀ 100 µg/mL (LOPES et al., 1988). Esse resultado sinaliza para necessidade de continuidade do estudo com *Tagetes erecta*, investigando as frações do extrato hidroetanólico.

Ainda na perspectiva de investigação do potencial de *Tagetes erecta* (extrato hidroetanólicos das folhas e flores, óleo essencial das folhas e do óleo essencial das flores) no controle da transmissão da esquistossomose, foi avaliada a atividade frente cercárias do helminto *Schistosoma mansoni*. Os resultados comprovam valores mais significativos para óleo

essencial das folhas de *Tagetes erecta* (CL₅₀ 21,25 µg/mL), seguido do extrato hidroetanólico (CL₅₀ 32,77 µg/mL) e óleo essencial das flores (CL₅₀ 43,53 µg/mL), respectivamente (Tabela 6).

Até o momento poucos estudos de avaliação do potencial cercaricida frente *Schistosoma mansoni* de produtos naturais de origem vegetal têm sido desenvolvidos, sendo evidenciado limitações metodológicas, a exemplo da ausência de valores de CL₅₀ ou mesmo a segurança de seus produtos (DE-CARVALHO et al., 1998; VINAUD et al., 2005).

Vinaud et al. (2005), em estudo de atividade cercaricida frente *Schistosoma mansoni*, destacam que após sessenta minutos de exposição, o extrato da casca do caule de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville causou 75% da mortalidade na concentração de 20 µg/mL, atividade inferior à encontrada para o extrato hidroetanólico das folhas e flores e óleo essencial das folhas de *Tagetes erecta* no nosso estudo que causaram 100% de mortalidade na concentração de 10 µg/mL no mesmo tempo de exposição.

Em estudo de síntese de produto cercaricida derivados da 4-hidroxiquinolinonas, Abass; Mostafa (2005) encontraram, dentre 05 (cinco) produtos, o melhor cercaricida no composto que ocasionou 100% de mortalidade após 65 minutos na concentração de 7,9µg/mL, seguido do composto que atingiu a mesma mortalidade em 55 minutos em concentração de 6,11 µg/mL; esse valor não tão distante do observado no nosso estudo. Esses dados confirmam que os produtos obtidos de *Tagetes erecta* investigados nesse estudo podem representar potenciais fontes de produtos cercaricidas.

Embora moluscicidas e cercaricidas naturais sejam biodegradáveis, em determinadas concentrações, mesmo dentro dos valores exigidos pelos órgãos regulamentadores, os produtos vegetais podem representar riscos. Assim, a OMS recomenda que sejam realizados ensaios de toxicidade para a avaliação de possíveis efeitos nocivos a humanos, plantas, animais e meio ambiente (WHO, 1983).

Nesse contexto, é necessária realização de testes de toxicidade dos produtos vegetais que demonstrem atividade moluscicida e cercaricida contra organismos não-alvos (LUNA et al., 2006; SANTOS et al., 2007). Esses estudos, denominados estudos ecotoxicológicos, predizem sobre os possíveis impactos que um produto moluscicida e cercaricida de origem vegetal pode causar no meio ambiente; utilizando diferentes organismos de níveis tróficos distintos (FARRÉ; BARCELÓ, 2003).

Organismos como alga (*Chlorella vulgaris* Kessler & Huss), microcrustáceos (*Artemia salina* Leach, *Daphnia similis* Claus e *Ceriodaphnia dubia* Richard) e peixes (*Danio rerio* Hamilton - Buchanan e *Pimephales promelas* Rafinesque) são considerados organismos ideais

para ensaios de ecotoxicidade (MOUNT; NORBERG, 1984; BIRGE et al., 1985; CARVALHO et al., 2009; ABNT, 2016b). O peixe *Danio rerio* é o vertebrado mais recomendado para estes ensaios, pois apresenta sensibilidade, permitindo análise, durante o ensaio, de possíveis alterações fisiológicas e comportamentais (RAPADO et al., 2013).

Em relação a toxicidade frente *Artemia salina*, nesse estudo utilizamos o escore de Nguta et al. (2011), estabelecendo que produtos naturais com valores de CL_{50} inferiores a $100\mu\text{g/mL}$ frente *Artemia salina* são considerados de alta toxicidade, valores de CL_{50} entre $100\mu\text{g/mL}$ e $500\mu\text{g/mL}$ são classificados com toxicidade moderada, valores de CL_{50} entre $500\mu\text{g/mL}$ e $1000\mu\text{g/mL}$ são de baixa toxicidade e valores de CL_{50} acima de $1000\mu\text{g/mL}$ são classificados como não-tóxicos.

Os testes de toxicidade com *Artemia salina* realizados neste trabalho com óleo essencial das folhas e óleo essencial das flores de *Tagetes erecta* apresentaram elevada toxicidade frente este microcrustáceo (Tabela 7). Os dados de CL_{50} descritos por Olivero-Verbel et al. (2010), com óleo essencial das partes aéreas de outra espécie do mesmo gênero, *Tagetes lucida* Cav., obtiveram $22,14\mu\text{g/mL}$, logo o óleo essencial dessa espécie também apresentou elevada toxicidade ao microcrustaceo assim como no presente estudo.

Já os ensaios de toxicidade com extrato hidroetanólico das folhas e flores de *Tagetes erecta* frente *Artemia salina* desenvolvidos no presente trabalho apresentaram baixa toxicidade (valor de CL_{50} $1.570,99\mu\text{g/mL}$). Estudo de Téllez-Lopes et al. (2013) com extrato metanólico das partes aéreas de *Tagetes lucida* Cav., indica valor de CL_{50} : $454,03\mu\text{g/mL}$, classificando assim como moderadamente tóxico de acordo com os critérios adotados por Nguta et al. (2011).

Em relação a toxicidade frente *Danio rerio*, o extrato hidroetanólico das folhas e flores de *Tagetes erecta* pode ser indicado como seguro para uso, com valores de CL_{50} e CL_{90} para os peixes de $489,58\mu\text{g/mL}$ e $745,50\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

O óleo essencial das folhas de *Tagetes erecta* apresentou CL_{50} de $184,95\mu\text{g/mL}$ frente *Danio rerio*, indicando certa segurança ao uso se compararmos ao valor de CL_{50} do produto frente cercárias utilizados no presente estudo (Tabela 6).

Mas analisando a toxicidade do óleo essencial das flores de *Tagetes erecta* frente *Danio rerio*, constatamos valores de CL_{50} $39,27\mu\text{g/mL}$ e CL_{90} $68,10\mu\text{g/mL}$; indicando toxicidade ao uso. Vale destacar que comparando os valores de CL_{90} do óleo das flores contra *Danio rerio* e *Biomphalaria glabrata* (CL_{90} $66,83\mu\text{g/mL}$), constatamos valores muito próximo; evidenciando a não segurança frente organismos não-alvos do material vegetal se empregado como produto moluscicida.

É importante destacarmos que o moluscicida sintético niclosamida recomendado pela OMS, utilizado no controle do hospedeiro intermediário da esquistossomose, apresenta alta toxicidade contra o peixe *Danio rerio* com CL_{50} 0,12 µg/mL (RAPADO et al., 2013). Logo, a toxicidade do óleo essencial das flores de *Tagetes erecta* frente *Danio rerio*, evidenciado nesse estudo, é inferior ao produto de referência.

Não foram constatados, até o momento, estudos de toxicidade aguda dos óleos essenciais e extrato de *Tagetes erecta*. Baskar et al. (2018), em estudo de toxicidade de óleo essencial da espécie *Atalantia monophylla* (L.) DC. frente *Danio rerio* observaram valor de CL_{50} 69,59 valor próximo ao encontrado no presente trabalho.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo constata que produtos vegetais obtidos de *Tagetes erecta* apresentaram rendimentos satisfatórios.

A caracterização química de extrato hidroetanólico das folhas e flores de *Tagetes erecta* apresentou rica composição em compostos fenólicos principalmente compostos pertencentes a classe dos flavonoides.

A caracterização química dos óleos essenciais demonstrou predominante presença de terpenos diferindo os óleos essenciais em abundância de monoterpenos no óleo essencial das folhas e predomínio de sesquiterpenos no óleo essencial das flores de *Tagetes erecta*.

Os óleos essenciais apresentaram diferenças de atividades biológicas. O óleo essencial das folhas apresentou boa atividade cercaricida, porém demonstra-se um produto não seguro de utilização. O óleo essencial das flores apresentou atividade moluscicida, cercaricida e apresenta toxicidade contra os organismos não-alvos (*Artemia salina* Leach e *Danio rerio* Hamilton-Buchanan). O extrato hidroetanólico das folhas e flores de *Tagetes erecta* demonstrou ser um produto cercaricida seguro. Sinalizando para o potencial desse material vegetal no controle da esquistossomose, na perspectiva real de desenvolvimento de bioproduto eficaz e seguro.

8 REFERÊNCIAS

ABASS M, MOSTAFA BB. Synthesis and evaluation of molluscicidal and larvicidal activities of some novel enaminones derived from 4-hydroxyquinolinones: Part IX. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13: 6133–6144; 2005.

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Artemia* sp (Crustácea, Brachiopoda). Norma ABNT-NBR16530,16; 2016a.

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes. Norma ABNT-NBR 15088, 25; 2016b.

ADAMS RP. Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectrometry. 4. Ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 804; 2007.

AKINMOLADUN AC, IBUKUN EO, AFOR E, OBOUTOR EM, FAROMBI E O. Phytochemical constituent and antioxidant activity of extract from the leaves of *Ocimum gratissimum*. *Science Research Essay*, 2: 163-166; 2007.

ALENCAR MB, RAMOS RA, BARBOSA C, OLIVEIRA MET, MELO CS. Esquistossomose mansônica: uma análise de indicadores epidemiológicos no estado de Alagoas entre os anos de 2013 e 2015. *Revista Diversitas Journal*, 1(3): 266-274; 2016.

ALVES LPL. Atividade moluscicida em *Biomphalaria glabrata* Say: revisão e avaliação do látex de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (Euphorbiaceae). 116 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente), Universidade Federal do Maranhão, São Luís – MA, 2013.

ANDRADE CC. Macroinvertebrados bentônicos e fatores químicos como indicadores de qualidade de água da Bacia do Alto Jacaré-Guaçu (SP). Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos/UFSCar, 2009.

ARAÚJO KCGM, RESENDES APC, SOUZA-SANTOS R, JÚNIOR JCS, BARBOSA CS. Análise espacial dos focos de *Biomphalaria glabrata* e de casos humanos de esquistossomose mansônica em Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil, no ano 2000. *Cadernos de Saúde Pública*, 23: 409-17; 2007.

ARCHIBALD RG, C.M.G., DSO MD. The use of the fruit of the tree *Balanites aegyptiaca* in the control of schistosomiasis in the Sudan. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene*, 27(2); 1933.

ARMAS K, ROJAS J, ROJAS L, MORALES A. Comparative study of the chemical composition of essential oils of five *Tagetes* species collected in Venezuela. *Natural Product Communications*, 7 (9): 1225–1226; 2012.

AYUB MA, HUSSAIN AI, HANIF MA, CHATHA SAS, KAMAL GM, SHAHID M, JANNEH O. Variation in Phenolic Profile, beta-Carotene and Flavonoid Contents, Biological Activities of Two *Tagetes* Species from Pakistani Flora. *Chemistry e Biodiversity*, 1612-1880; 2017.

BARBOSA CS, GOMES ECS, NETO OBL. Manual prático para o diagnóstico e controle da esquistossomose. Recife: Editora Universitária, 2 ed, 1: 126p; 2012.

BARBOSA FS. Ação moluscicida sinérgica da saponina de *Sapindus saponaria* e pentaclorofenato de sódio. *Publ. Avulsas In st. Aggeu Magalhães*, 1: 127-39, 1952.

BARBOSA FS. Tópicos em Malacologia Médica. Rio de Janeiro Fiocruz, 1995.

BARRETO MS, GOMES ECS, BARBOSA CS. Turismo de risco em áreas vulneráveis para a transmissão da esquistossomose mansônica no Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, 32 (3); 2016.

BASHIR S, GILANI A. Studies on the antioxidant and analgesic activities of Aztec marigold (*Tagetes erecta*) flowers *Phytotherapy Research*, 22:1692-1694; 2008.

BASKAR K, NATTUDURAI VSG, IGNACIMUTHU S, DURAIPANDIYAN V, JAYAKUMAR M, AL-DHABI NA, BENELLI G. Larvicidal and repellent activity of the essential oil from *Atalantia monophylla* on three mosquito vectors of public health importance, with limited impact on non-target *zebrafish*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 101: 197-201; 2018.

BINA JC, PRATA A. Esquistossomose na área hiperendêmica de Taquarandi-Infecção pelo *Schistosoma mansoni* e formas graves. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36: 211-216; 2003.

BIRGE, W. J.; BLACK, J. A.; WESTERMAN, A. G. Short-term fish and amphibian tests for determining the effects of toxicant stress on early life stages and estimating chronic values for single compounds and complex effluents. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 49: 807-21; 1985.

BOHM BA, STUESSY T. *Flavonoids of the Sunflower Family (Asteraceae)* Springer, Wien, 2001.

BORA KS, SHARMA A. The Genus *Artemisia*: A Comprehensive Review, *Journal Pharmaceutical Biology*, 49 (1): 101-109; 2011.

BRAGA R. Plantas do nordeste, especialmente do Ceará. 3 ed. Fortaleza: Escola Superior de Agricultura de Mossoró, 214; 1976.

BRASIL - Agência Nacional de Águas. ANA. Atlas esgotos: despoluição de bacias hidrográficas /Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental. Brasília, 88p; 2017.

BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE. DEPARTAMENTO DE INFORMÁTICA DO SUS. Programa de Controle da Esquistossomose. Brasília: Ministério da Saúde; Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exesinan/pce/cnv/pcema.def>. 2018.

BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE. PORTAL DA SAÚDE. SISTEMA DE INFORMAÇÕES SOBRE MORTALIDADE. Mortalidade - Brasil. Óbitos por residência por Região / Unidade da Federação e Ano do Óbito. Causa - CID-BR-10: 028 Esquistossomose. Período: 1996 – 2017; 2019.

BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE. PORTAL DA SAÚDE: Número de casos de esquistossomose na área endêmica. Brasil, por Região e Unidade Federada. 2000 a 2015. Brasília; 2016a.

BRASIL. Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) – Coordenadoria do Controle de Doenças. Vigilância Epidemiológica e Controle da Esquistossomose: Normas e Instruções Controle da Esquistossomose do Estado de São Paulo/PCE-SP; 2007.

BRASIL. FARMACOPEIA BRASILEIRA 5ª ED. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2: 546-904; 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 1.399, de 15 de dezembro de 1999. Regulamenta a NOB SUS 01/96 no que se refere às competências da União, estados, municípios e Distrito Federal, na área de epidemiologia e controle de doenças, define a sistemática de financiamento e dá outras providências. Diário Oficial [da] União. Brasília, DF, 15 dez 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia e Serviços. Brasília: Ministério da Saúde, 1. ed., 583-584; 2016b.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Vigilância da Esquistossomose Mansonii - diretrizes técnicas / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – 4. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 144; 2014.

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) / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica – 2. ed. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde – (Série A. Normas e Manuais Técnicos), 178; 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Vigilância da Esquistossomose Mansonii: diretrizes técnicas / Ministério da

Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – 4. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRIJESH T, ROHIT B, SURESH W, BIRENDRA K. Chemical composition and evaluation of *Tagetes erecta* (var. Pusa narangi genda) essential oil for its antioxidant and antimicrobial activity. *Biopesticides International*, 8 (2); 2012.

CABELLO R. Microbiologia y parasitología. Bases etiológicas de las enfermedades. Infecciosas. México: Médica Panamericana, 1994.

CAMPOS FR, BRESSAN J, JASINSKI VC, ZUCCOLOTTO T, SILVA LE, CERQUEIRA LB. *Baccharis* (Asteraceae): chemical constituents and biological activities. *Chemistry Biodiversity*, 13:1–17; 2016.

CANTANHEDE SP, MARQUES A, SILVA-SOUZA MN, VALVERDE AL. Atividade moluscicida de plantas: uma alternativa profilática. *Brazilian Journal of Pharmacology*, 20(2): 282-288; 2010.

CANTANHEDE SPD. Gastrópodes límnicos e helmintofauna associada da Microrregião da Baixada Maranhense, MA, com ênfase nos transmissores da esquistossomose. Tese de doutorado, Fundação Oswaldo Cruz, 2015.

CARMO EH, BARRETO ML. Esquistossomose mansônica no Estado da Bahia, Brasil: tendências históricas e medidas de controle. *Cadernos de Saúde Pública*, 10(4): 425-439; 1994.

CARVALHO CA, MATTA SLP, MELO FCSA, ANDRADE DCF, CARVALHO LM, NASCIMENTO PC, SILVA MB, ROSA MB. Cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus* miers – bignoniaceae): estudo fitoquímico e toxicológico envolvendo *Artemia salina*. *Revista Eletrônica de Farmácia*, 6(1): 51 - 57; 2009.

CARVALHO OS, PASSOS LKJ, MENDONÇA CLF, CARDOSO PCM, CALDEIRA R L. Moluscos de importância médica no Brasil. Belo Horizonte, 2005.

CHAMORRO ER, BALLERINI G, SEQUEIRA AF, VELASCO GA, ZALAZAR MF. Chemical composition of essential oil from *Tagetes minuta* L. leaves and flowers. *J. Argentine Chemical Society*, 96(1-2): 80-86; 2008.

CHIANG P K, BOURGEOIS JG, AND BUEDING E. Histochemical distribution of acetylcholinesterase in the nervous system of the snail, *Biomphalaria glabrata*. *International Journal of Neuroscience*, 3: 47-60; 1972.

CHIFUNDERA, K.; BALUKU, B.; MASHIMANGO, B. Phytochemical screening and molluscicidal potency of same zairean medicinal plants. *Pharmacol Research*, 28: 333-340; 1993.

COLLEY DG, BUSTINDUY AL, SECOR WE, KING CH. Human schistosomiasis. *Lancet* 383 (9936): 2253–2264; 2014.

CORRÊA JUNIOR C. Boas Práticas Agrícolas (BPA) de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares. / Cirino Corrêa Júnior, Marianne Christina Scheffer. - Curitiba: Instituto Emater, 52 (88); 2013.

COSTA AV, ALMEIDA BR, GONÇALVES LV, CRICO KB, IGNACCHITI MDC, PEREIRA JUNIOR OS, PINHEIRO PF, QUEIROZ VT. Efeito moluscicida do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Poaceae) sobre *Lymnaea columella* (Say, 1817) e *Biomphalaria tenagophila* (D'Orbigny, 1835). Revista Brasileira de Plantas Medicinas, 17:707-712; 2015.

COURA JR, AMARAL RS. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. Memorial do Instituto Oswaldo Cruz, 99:13–19; 2004.

COUTINHO DF. Revisão de terpenóides de Lauraceae e estudo farmacobotânico de óleos essenciais de espécies do gênero *Ocotea* Aubl. Tese (Doutorado). 2006. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2006.

CRIBB TH, BRAY RA, OLSOPN PD, LITTLEWOOD DTJ. Life cycle evolution in the digenea: a new perspective from phylogeny. Advances in Parasitology, 54:203-240; 2003.

CUNHA LAD, GUEDES SAG. Prevalência de esquistossomose mansônica na cidade de Nossa Senhora do Socorro, Sergipe, 2001-2006. Ideias & Inovação, 01(01): 41-48; 2012.

CUTRIM RNM, CHIEFFI PP, MORAES JC. Schistosomiasis mansoni in the "baixada ocidental maranhense", state of Maranhão, Brazil: cross-sectional studies performed in 1987 and 1993. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 40(3): 165-172; 1998.

DA SILVA SP. Estudo da ação do praziquantel sobre as propriedades da adesão e contração do *Schistosoma mansoni* in vitro. Tese pelo Departamento de Farmacologia Básica e Clínica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1993.

D'ALMEIDA, J. Esquistossomose hematóbica: achados cintilográficos e manifestações clínicas em pacientes brasileiros. Radiologia Brasileira, 41(1): 34; 2008.

DAVID NF, CANTANHEDE SPD, MONROE, NB, PEREIRA, LPLA; SILVA-SOUZA N, ABREU-SILVA AL, OLIVEIRA VMD, TCHAICKA L. Spatial distribution and seasonality of *Biomphalaria* spp. in São Luís (Maranhão, Brazil). Parasitology Research, 1-8; 2018.

DE-CARVALHO RR, MALDONADO JÚNIOR A, OLIVEIRA-FILHO EC, RIBEIRO AC, PAUMGARTTEN FJR, REY L. Effects of *Euphorbia milii* Látex on *Schistosoma mansoni* Eggs, Miracidia and Cercariae. Memorial do Instituto Oswaldo Cruz, 93: 235-237; 1998.

DEVIKA R, KOILPILLAI J. Phytochemical screening studies of bioactive compounds of *Tagetes erecta*. International Journal of Pharma and Bio Sciences, 3(4): 596 – 602; 2012.

DIAS CN, RODRIGUES KAF, CARVALHO, FAA, CARNEIRO SM P, MAIA JGS, ANDRADE EHA, MORAES DFC. Molluscicidal and Leishmanicidal Activity of the Leaf

Essential Oil of *Syzygium cumini* (L.) Skeels from Brazil. Chemistry & Biodiversity, 10 (6):1133-1141; 2013.

DORSEY CH, COUSIN CE, LEWIS FA, STIREWALT MA. Ultrastructure of the *Schistosoma mansoni* cercaria. Micron, 33: 279-323; 2002.

DOS SANTOS AD, SANTOS M B, DOS SANTOS PGR, BARRETO AS, DE ARAÚJO K CGM. Análise espacial e características epidemiológicas dos casos de esquistossomose mansônica no município de Simão Dias, Nordeste do Brasil. Revista de Patologia Tropical / Journal of Tropical Pathology, 45(1): 99-114; 2016.

DOS SANTOS AF, AZEVEDO DP, DOS SANTOS MATA RDAC.; DE MENDONÇA DL, SANTANA AE. The lethality of *Euphorbia conspicua* to adults of *Biomphalaria glabrata*, cercaria of *Schistosoma mansoni* and larvae of *Artemia salina*. Bioresourch Technology, 98,135-139; 2007.

DU R, LIU J, SUN P, LI H, WANG J. Inhibitory effect and mechanism of *Tagetes erecta* L. fungicide on *Fusarium oxysporum* f. sp. niveum. Scientific Reports, 7: 14442; 2017.

ELAMIN E, SUBKI H, KOKO WS. Utilization of *Balanites aegyptiaca* fruit extract in the eradication of schistosomiasis transmitting snails in Sudan (Primary investigation). Albuath Sudan Journal of Scientific Research, 8 (2):112-119; 2005.

EL-SAEID MH. Antifungal activity of natural piperitone as fungicide on root rot fungi. American Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences; 11(2): 149–153; 2011.

FARRÉ M, BARCELÓ D. Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. Trends in Analytical Chemistry, 22(5): 299-310; 2003.

FAVRE TC. Avaliação das ações de controle da esquistossomose implementadas entre 1977 e 1996 na área endêmica de Pernambuco, Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 34 (6): 569-76; 2001.

FELIZARI J, OLIVEIRA RC, Toxicidade de extratos de *Ricinus communis* e *Euphorbia milli* para Caramujo aquático e Tilápia. Revista Thêma at Scientia, 1(2); 2011.

FERNANDES RP. Caracterização química, avaliação da toxicidade e atividade moluscicida dos óleos essenciais da folha de pimenta dióica Lindl, casca de *Citrus limon* Linneo e Rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe.- João Pessoa, 130f.: il. Tese (Doutorado) – UFPB/CCEN, 2011.

FERREIRA LA, LIMA FLC, ANJOS MRO, COSTA JML. Forma tumoral encefálica esquistossomótica: apresentação de um caso tratado cirurgicamente. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 31: 89-93; 1998.

FIGUEREDO FG, LUCENA BFF, TINTINO SR, MATIAS EFF, LEITE NF, ANDRADE JC. Chemical composition and evaluation of modulatory of the antibiotic activity from extract and

essential oil of *Myracrodruon urundeuva*, Journal Pharmaceutical Biology, 52: 5560-565; 2013.

FONSECA, S. G. C. Farmacotécnica de fitoterápicos, Fortaleza, Ceará, 64; 2005.

FREITAS J, CARVALHO J, CARLOS L, ALVES M, SILVA S, LARA FV, VILAÇA VC, AMARAL RM. Esquistossomose, uma doença no contexto da saúde pública brasileira, Revista Nova Científica, 2(3): 52-54; 2014.

GARCÍA-SÁNCHEZ F, LÓPEZ-VILLAFRANCO ME, AGUILAR-RODRÍGUEZ S, AGUILAR-CONTRERAS A. Etnobotánica y morfoanatomía comparada de tres especies de *Tagetes* que se utilizan en Nicolás Romero, Estado de México. Botanical Sciences, 90: 221-23; 2012.

GOBBO-NETO L, LOPES NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. Química Nova, 30(2): 374-381; 2007.

GOEL N, ANUKRATI K, & PAUL P. Biocontrole da partícula bacteriana de tomate por extrato aquoso de *Tagetes erecta*, Journal of Plant Protection Research, 2018.

GONG Y, LIU X, WH HE, HG XU, YUAN F, GAO YX. Investigation into the antioxidant activity and chemical composition of alcoholic extracts from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue. Fitoterapia, 83: 481-489. 2012.

GRYSEELS B, POLMAN K, CLERINX J, KESTENS L. Human Schistosomiasis. Lancet, 368 (9541):1106–1118; 2006.

GUO S, GE Y AND NA JOM K. A review of phytochemistry, metabolite changes, and medicinal uses of the common sunflower seed and sprouts (*Helianthus annuus* L.). Chemistry Central Journal, 11: 95; 2017.

GUPTA P, VASUDEVA N. Potencial antiplasmodial e antimicrobiano *in vitro* das raízes de *Tagetes erecta*. Pharmaceutical Biology, 48 (11): 1218 – 1223; 2010.

GUTIERREZ RMP, LUNA HH, GARRIDO SH. Atividade antioxidante do óleo essencial de *Tagetes erecta*. Journal Chilean Chemical Society, 51: 883-886; 2006.

HETHELYI E, DANOS B, TETENYI P, KOEZKA I. GC / MS analysis of the essential oils of four *Tagetes* sp. and the antimicrobial activity of *Tagetes minuta*. Flavour and Fragrance Journal, 1(4-5):169 – 173; 1986.

HOJNIK M, ŠKERGET M & KNEZ Ž. Extraction of lutein from marigold flower petals- experimental kinetics and modelling. LWT Food Science and Technology, 41(10): 2008-2016; 2008.

HOSTETTMANN K, MARISTON A, NDJOKO K, JEAN- LUC W. The Potential African Plants as a Source of Drugs. Current Organic Chemistry, Bentham Science Publisher Ltd, 4:973-1010; 2000.

HOWIDA A. H. Investigation on the molluscicidal activity of *Jatropha aceroide*s against *Bulinus truncatus*. Albuhuth Sudan Journal of Scientific Research, 9 (12): 33-40; 2005.

HUGGINS DW, MEDEIROS LB, SIQUEIRA-BATISTA R, RAMOS JUNIOR NA. Diagnóstico laboratorial. In: HUGGINS DW, SIQUEIRA-BATISTA R, MEDEIROS LB, RAMOS JUNIOR NA. Esquistossomose Manson. São Paulo: Grupo Editorial Moreira Jr, 75-80; 1998.

KARAR M, KUHNERT N. UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS characterization of phenolics from *Crataegus monogyna* and *Crataegus laevigata* (Hawthorn) leaves, fruits and their herbal derived drops (Crataegutt Tropfen). Journal of Chemical Biology and Therapeutics (1): 102; 2015.

KATZ N, ALMEIDA K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. Ciência & Cultura, 55: 38-43; 2003.

KATZ N. Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose manson e Geohelminthoses/Naftale Katz. – INPEG. Fiocruz, 22: 1-76; 2018.

KATZ, N. Terapêutica clínica na Esquistossomose manson. In: CARVALHO OS, COELHO PMZ, and LENZI HL. orgs. *Schistosoma manson* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 849-870; 2008.

KAZIBWE Z, KIM DH, CHUN S, GOPAL J. Ultrasonication assisted ultrafast extraction of *Tagetes erecta* in water: cannonading antimicrobial, antioxidant components. Journal of Molecular Liquids, 229: 453-458; 2017.

KETOH GK, KOUMAGLO HK, GLITHO IA, HUIGNARD J. Comparative effects of *Cymbopogon schoenanthus* essential oil and piperitone on *Callosobruchus maculatus* development. Fitoterapia, 77(7-8):506-510; 2006.

KHULBE A, PANDEY S, SAH S. Antidepressant-like action of the hydromethanolic flower extract of *Tagetes erecta* L. in mice and its possible mechanism of action. Indian Journal Pharmacology, 45: 386-390; 2013.

LAMBERTUCCI JR, SILVA LCS, VOIETA I. Esquistossomose mansônica. In: Coura JR, (editor). Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 931-44; 2005.

LEÃO RNQ. Doenças infecciosas e parasitárias. Enfoque amazônico. Belém: Cejup, 1997.

LEITÃO CBL. *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae): estudo de revisão e padronização dos extratos no desenvolvimento de fitoterápico giardicida. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Maranhão; 2013.

LEITE AM, LIMA EDO, SOUZA ELD, DINIZ MDFFM, LEITE SP, XAVIER AL, MEDEIROS IAD. Preliminary study of the molluscicidal and larvicidal properties of some essential oils and phytochemicals from medicinal plants. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19(4): 842-846; 2009.

LENZI, H. L.; JUBERG, A. D.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, J. A. Migração e desenvolvimento de *Schistosoma mansoni* no hospedeiro definitivo. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008.

LI W, GAO Y, ZHAO J, WANG Q. Phenolic, flavonoid, and lutein ester content and antioxidant activity of 11 cultivars of chinese marigold. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(21), 8478- 8484; 2007.

LIRA MGS, MIRANDA GS, RODRIGUES JGM, NOGUEIRA RA, GOMES GCC, SILVA-SOUZA N. Ocorrência de *Schistosoma mansoni* no município de São Bento, Baixada Ocidental Maranhense, estado do Maranhão, Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 8(4): 45-51; 2017.

LOMONACO D, SANTIAGO GMP, FERREIRA YS, ARRIAGA AMC, MAZZETTO SE, MELEC G, VASAPOLLO G. Study of technical CNSL and its main components as new green larvicides. *Green Chemistry*, 11(1): 31-33; 2009.

LOPES JLC, LOPES JNC, SOUZA CP, CUNHA WR. Avaliação da atividade moluscicida de extratos vegetais. II. *Acta Amazonica*, 18: 145-149; 1988.

LOPES RK, RITTER MR. Atividades biológicas e toxicidade de plantas ornamentais do Rio Grande do Sul: uma revisão. *Revista Brasileira de Biociencias*, 7: 305-315; 2009.

LOPEZ A, HUDSON JB, TOWER GHN. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. *Journal ethnopharmacology*, 77: 189-196; 2001.

LORENZI H, SOUZA H. M. Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 4 ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 1088; 2008.

LUNA JDS, SANTOS AFD, LIMA MRD, OMENA MCD, MENDONÇA FAD, BIEBER LW, SANT'ANA AE. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast BRAZIL. *Journal of Ethnopharmacology*, 20 (3):253-257; 2006.

MACEDO ME, CONSOLI R, GRANDI TSM, ANJOS AMG, OLIVEIRA AB, MENDES NM, QUEIROZ RO, ZANI CL. Screening of Asteraceae (Compositae) plant extracts for larvicidal activity against *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae). *Memorial do Instituto Oswaldo Cruz*, 92 (4): 565-570; 1997.

MAE SRI, HARTATI W, WAHYUONO S, KRASANAH N. Identification of antimicrobial compound in volatile oil of leaves of *Tagetes erecta* L. (Compositae). *Majalah Farmaci Indonesia*, 10(1): 40-47; 1999.

MAHMOUD AAF. Esquistossomose e outras infecções por trematódeos. In: FAUCI AS, BRAUNWDD E, KASPER DL, HAUSER DLL, LONGO DLK, JAMESON JL, LOSCALZO et al. (editors). *Harrison Medicina Interna*. 17ª ed. Vol. 1. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1330-6; 2008.

MARQUES MM, MORAIS SM, VIEIRA IG, VIEIRA MG, RAQUEL A, SILVA A, DE ALMEIDA RR, GUEDES MI. Larvicidal Activity of *Tagetes erecta* Against *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 27(2):156-158; 2011.

MARSTON A, GAFNER F, DOSSAJI SF, HOSTETTMANN K. Fungicidal and molluscicidal saponins from *Dolichos kilimandscharicus*. *Phytochemistry*, 27(5), 1325-1326; 1988.

MARSTON A, HOSTETTMANN K. Plant molluscicides. *Phytochemistry*, 24 (4): 639-652; 1985.

MARTINS-LEITE P, GAZZINELLI G, ALVES-OLIVEIRA LF, GAZZINELLI A, MALAQUIAS LC, CORREA-OLIVEIRA R, TEIXEIRA-CARVALHO A, SILVEIRA AM. Effect of chemotherapy with praziquantel on the production of cytokines and morbidity associated with schistosomiasis mansoni. *Antimicrob Agents Chemother*, 52(8):2780-6; 2008.

MASSBANK. EUROPEAN MASSBANK (NORMAN MASSBANK) <https://massbank.eu/MassBank/RecordDisplay.jspid=PR100972&dsn=RIKEN.Righ> Resolution Mass Spectral Database. 2018.

MATOS FJA. Introdução a fitoquímica experimental. 3ª.ed. Fortaleza: Edições UFC, 150. 2009.

MCCLLOUGH FS, GAYRAL P, DUNCAN J, CHRISTIE JD. Molluscicides in schistosomiasis control. *Bulletin of the World Health Organization Supplement*, 58: 681-689; 1980.

MCMICHAEL AJ. Disease patterns in human biohistory. In: *Human frontiers, environments and disease – past patterns uncertain futures*. Cambridge: Cambridge University Press, 1-30; 2001.

MENA P, CALANI L, DALL'ASTA C, GALAVERNA G, GARCÍA-VIGUERA C, BRUNI R, et al. Rapid and comprehensive evaluation of (poly)phenolic compounds in pomegranate (*Punica granatum* L.) juice by UHPLC-MSn. *Molecules*, (17):14821- 40; 2012.

MENDES NM, ARAÚJO N, DE SOUZA CP, PEREIRA JP, KATZ N. Atividade moluscicida e cercaricida de diferentes espécies de *Eucalyptus*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 23(4): 197-199; 1990.

MEYER BN, FERRIGNI NR, PUTNAN JE, JACOBSEN LB, NICHOLS DE, McI. AUGHLIN J. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal of Medical Plant Research*, 45(5): 31-34; 1982.

MIRANDA GS, MIRANDA BS, RODRIGUES JG, LIRA MG, NOGUEIRA RA, SILVA-SOUZA N. The wild water-rats and their relevance in the context of schistosomiasis mansoni in Brazil: what we know and recommendations for further research. *Helminthologia*, 54:1-5; 2017.

MOLINA-GARCÍA L, MARTÍNEZ-EXPÓSITO R, FERNÁNDEZ-DE CÓRDOVA ML, AND LLORENT-MARTÍNEZ EJ. Determination of the Phenolic Profile and Antioxidant Activity of Leaves and Fruits of Spanish *Quercus coccifera*. *Journal of Chemistry*, 9 p; 2018.

MOLINER C, BARROS L, DIAS MI, LÓPEZ V, LANGA E, FERREIRA ICFR and GÓMEZ-RINCÓN C. Edible Flowers of *Tagetes erecta* L. as Functional Ingredients: Phenolic Composition, Antioxidant and Protective Effects on *Caenorhabditis elegans*. *Nutrients*. 10, 2002. 2018.

MORAES J, SILVA MPN, OHLWEILER FP, KAWANO T. *Schistosoma mansoni* and other larval trematodes in *Biomphalaria tenagophila* (Planorbidae) from Guarulhos, São Paulo State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 51(2): 77-82; 2009.

MOREIRA CPS, ZANI CL, ALVES TMA. Atividade moluscicida do látex de *Synadenium carinatum* Boiss. (Euphorbiaceae) sobre *Biomphalaria glabrata* e isolamento do constituinte majoritário. *Revista Eletrônica de Farmácia*, 8(3): 16-27; 2010.

MOUNT, D. I. E.; NORBERG, T. J. A seven day life cycle cladoceran toxicity test. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 3: 425-34; 1984.

MOYO B, MASIKA PJ, DUBE S, MAPHOSA V. An *in-vivo* study of the efficacy and safety of ethno-veterinary remedies used to control cattle ticks by rural farmers in the Eastern Cape Province of South Africa. *Tropical Animal Health Product*, 41(7): 1569–1576; 2009.

MUNHOZ VM, LONGHINI R, SILVA TAP, LONNI AASG, SOUZA JRP, LOPES GC, MELLO JCP. Estudo farmacognóstico de flores de *Tagetes patula* L. (Asteraceae). *Revista Fitos*, 7: 225-230; 2012.

MUNHOZ VM. Avaliação Farmacognóstica e otimização da extração de flavonoides de flores de *Tagetes patula* através de planejamento de misturas, Dissertação, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil, 2013.

NAVARRO-GONZÁLEZ I, GONZÁLEZ-BARRIO R, GARCÍA-VALVERDE V, BAUTISTA-ORTÍN A, PERIAGO M. (2014). Nutritional Composition and Antioxidant Capacity in Edible Flowers: Characterisation of Phenolic Compounds by HPLC-DAD-ESI/MSn. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(1), 805–822. 2014.

- NEHER RT. The ethnobotany of *Tagetes*. Economic Botany, 22: 317–325; 1968.
- NEVES DP. Parasitologia humana. 13.ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2016.
- NGKASUPART P, MANOCHAI B, SONG WT and HONG, JH. Antioxidant activities and lutein content of 11 marigold cultivars (*Tagetes* spp.) grown in Thailand. Food Science and Technology, 35(2): 380-385; 2015.
- NGUTA JM, MBARIA JM, GAKUYA DW, GATHUMBI PK, KABASA JD, KIAMA SG. Biological screening of kenya medicinal plants using *Artemia salina* L. (Artemiidae). Pharmacology online, 2: 458-78; 2011.
- NIST. Mass Spectral Library (NIST/EPA/NIH). NIST Standard Reference Database. National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA. <https://www.nist.gov/srd/nist-standard-reference-database-1a-v17>. 2011.
- NOMURA YM, CAMARGOS MO, BICHARA CNC, RODRIGUES IRC. Esquistossomose mansônica em Carajás, Pará, Brasil: estudo retrospectivo realizado no hospital Yutaka Takeda. Cadernos de Saúde Coletiva, 15(4):531 – 542; 2007.
- NUTTALL Z. Los jardines del antiguo Mexico. Memórias de la Sociedad Científica “Antonio Alazate”, 37:193-213; 1920.
- OGUNWANDE IA, OLAWORE NO, The essential oil from the leaves and flowers of African Marigold, *Tagetes erecta* L. Journal of Essential Oil Research, 18:366–368; 2006.
- OLIVEIRA PFD, ALVES JM, DAMASCENO JL, OLIVEIRA RAM, DIAS HJ, CROTTI AEM, TAVARES DC. Cytotoxicity screening of essential oils in cancer cell lines. Revista Brasileira de Farmacognosia, 25 (2): 183-188; 2015.
- OLIVERO-VERBEL J, GONZÁLEZ-CERVERA T, GÜETTE-FERNANDEZ J, JARAMILLO-COLORADO B, STASHENKO E. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils isolated from Colombian plants. Revista Brasileira de Farmacognosia, (4): 568-574; 2010.
- ORTEGA GP, ANGELES-LÓPEZ GE, ARGUETA-VILLAMAR A, GONZÁLEZ-TRUJANO ME. Preclinical evidence of the anxiolytic and sedative-like activities of *Tagetes erecta* L. reinforces its ethnobotanical approach. Biomedicine & Pharmacotherapy, 93: 383-390; 2017.
- PADALIA H; CHANDA S. Evaluation of antioxidant efficacy of different fractions of *Tagetes erecta* L. Flowers Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSR-JPBS) (9): 28-37; 2014.
- PARAENSE WL. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. Arq. Museu Nac, Rio de Janeiro, 55: 105-128; 1975.

PARASTOO K, KAVOOSI G, AMIRGHOFRAAN Z. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of *Tagetes minuta* essential oil in activated macrophages. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(3): 219-227; 2014.

PAREJO I, JAUREGUI O, VILADOMAT F, BASTIDA J, CODINA C. Characterization of acylated flavonoid-O-glycosides and methoxylated flavonoids from *Tagetes maxima* by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, (18): 2801. 2004.

PATHAK N, MITTAL PK, SINGH OP, VIDYA SAGAR D, VASNDEVAN P. Larvicidal action of essential oils from plants against the vector mosquitoes *Anopheles stephensi* (Liston), *Culex quinquefasciatus* (Say) and *Aedes aegypti* (L). *International Pest Control*, 42 (2): 53- 55; 2000.

PAZ RJ. *Biologia e Ecologia de Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Mollusca: Pulmonata: Planorbidae), na Fazenda Árvore Alta, Alhandra (Paraíba: Brasil). CCEN/UFPB Dissertação de Mestrado – João Pessoa/ Paraíba, Brasil, 1997.

PEREIRA LPLA, DIAS CN, MIRANDA MV, FIRMO WCA, ROSA CS, SANTOS PF, BRITO MCA, ARARUNA FOS, ARARUNA FB, SILVA-SOUZA N, COUTINHO DF. Molluscicidal effect of *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns latex on *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* host snail. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 59; 2017.

PINTO C, ALMEIDA AF. Um novo método para a profilaxia da esquistossomose mansoni. *Memorando Instituto Oswaldo Cruz*, 40 (3): 291-318; 1944.

PORDEUS LC, AGUIAR LR, QUININO LR. M, et al. A ocorrência das formas aguda e crônica da esquistossomose mansônica no Brasil no período de 1997 a 2006: uma revisão de literatura. *Epidemiologia e Serviços Saúde*, 17(3):163-75; 2008.

PRATA A. Esquistossomose Mansonii. In: Foccacia R, (Editor). Veronesi: tratado de infectologia. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, 2: 1697-722, 2005.

PREETI V, ARCHANA V. Evaluation of antibacterial activity of different parts of *Tagetes erecta* *International Journal of Pharmacy and Life Sciences (IJPLS)*, 3 (6): 1766-1768; 2012.

QUINTAS LEM, SIQUEIRA-BATISTA R, CORRÊA D, & LEMOS-DA-SILVA. Tratamento da esquistossomose. *Revista Brasileira de Medicina*, 50:683; 1993.

RAMYA R, MAHNA S, BHANUMATHI, SAMANTA P AND BHAT SK. Analysis of phytochemical composition and bacteriostatic activity of *Tagetes* sp. *International Research Journal of Pharmacy*, 3 (11); 2012.

RAPADO LN, NAKANO E, OHLWEILER FP, KATO MJ, YAMAGUCHI LF, PEREIRA CA, KAWANO, T. Molluscicidal and ovicidal activities of plant extracts of the *Piperaceae* on *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *Journal Helminthology*, 85(1):66-72; 2011.

RAPADO LN, PINHEIRO ADS, LOPES PO, FOKOUE HH, SCOTTI MT, MARQUES JV, OHLWEILER FP, BORRELY SI, PEREIRA CA, KATO MJ, NAKANO E, YAMAGUCHI LF. Schistosomiasis Control Using Piplartine against *Biomphalaria glabrata* at Different Developmental Stages. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7 (6); 2013.

RAPADO LN. Efeito moluscicida de extratos de *Piperaceae* no vetor da esquistossomose *Biomphalaria glabrata*. Dissertação de mestrado Programa de Pós-graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2007.

RESENDES APDC, SOUZA-SANTOS R, BARBOSA CS. Hospitalization and mortality from mansoni schistosomiasis in the State of Pernambuco, Brazil, 1992/2000. *Cadernos de Saúde Pública*, 21(5): 1392-1401; 2005.

REY L. Bases da Parasitologia Médica. 3. Ed - 2011, (Reimpressão), Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

RIBEIRO PJ, AGUIAR LAK, TOLEDO CF, BARROS SMO, BORGES DR. Programa educativo em esquistossomose: modelo de abordagem metodológica. *Revista de Saúde Pública*, 38 (3):415-21; 2004.

ROCHA RS, SILVA JG, PEIXOTO SV, CALDEIRA RL, FIRMO JOA, CARVALHO OS, KATZ N. Avaliação da esquistossomose e de outras parasitoses intestinais, em escolares do município de Bambuí, Minas Gerais. Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 33(5): 431 – 436; 2000.

ROCHA TJM, NASCIMENTO-FILHO BP, NOÉ BDR, VEIGA-JÚNIOR CP, COSTA GN, ARAGÃO MB, DOS SANTOS AF. Estudo do efeito moluscicida de espécies vegetais em embriões e caramujos adultos de *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (GASTROPODA, PLANORBIDAE). *Revista de Patologia Tropical*, 42 (2): 230-239; 2013.

RODDA R, AVVARI SK, VIJAY R CHIDRAWAR, T RAMAMOHAN REDDY. Pharmacological screening of synergistic antidiabetic efficacy of *Tagetes erecta* and *Foeniculum vulgare*. Raghuveer Rodda. et al. / *International Journal of Phytopharmacology*. 4(4): 223-229; 2013.

RODRIGUES KA, DIAS CN, DO AMARAL FM, MORAES DF, MOUCHREK FVE, ANDRADE EH, MAIA JG. Molluscicidal and larvicidal activities and essential oil composition of *Cymbopogon winterianus*. *Journal Pharmaceutical Biology*, 51(10): 1293-7; 2013.

ROSS AG, BARTLEY PB, SLEIGH AC, OLDS GR, LI Y, WILLIAMS GM, MCMANUS DP. et al. Schistosomiasis. *The New England Journal Medicine*, 346(16):1212-20; 2002.

ROUQUAYROL MZ, SOUSA MP & SILVA MJM. Atividade moluscicida de plantas do Nordeste brasileiro (III). *Revista Brasileira Farmacognosia*, 53:215-20; 1972.

RUIZ ALTG, MAGALHÃES EG, MAGALHÃES AF, FARIA AD, AMARAL MCE, SERRANO DR, ZANOTTI-MAGALHÃES EM, MAGALHÃES LA. Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (Cyperaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15(2): 98-102; 2005.

RYAN MF and BYRNE O. Plant-insect coevolution and inhibition of acetylcholinesterase. *Journal of Chemical Ecology*, 14 (10): 1965-1975; 1988.

SANDEEP KR, DEEPA HD. Phytochemical screening studies of bioactive compounds of African marigold *Tagetes erecta* L. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(4): 524-527; 2017.

SANTOS AF, AZEVEDO DP, SANTOS MATA RDC, DE MENDONÇA DI, SANT'ANA AE. The lethality of *Euphorbia conspicua* to adults of *Biomphalaria glabrata*, cercaria of *Schistosoma mansoni* and larvae of *Artemia salina*. *Bioresource Technology*, 98 (1):135–139; 2007.

SANTOS AM, MELO ACFL. Prevalência da esquistossomose num povoado do Município de Tutóia, Estado do Maranhão. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44(1): 97-99; 2011.

SAUR M, MOELLER V, KAPETANOPOULOS K, BRAUKMANN S, GEBAUER W, TENZER S, and Markl J. Acetylcholine-binding protein in the hemolymph of the planorbid snail *Biomphalaria glabrata* is a pentagonal dodecahedron (60 subunits). *PLoS One*, 7; 2012.

SCHOLTE RGC, CARVALHO OS, MALONE JB, UTZINGER J, VOUNATSOU P. Spatial distribution of *Biomphalaria* spp., the intermediate host snails of *Schistosoma mansoni* in Brazil. *Geospat. Health*, 6: 95–101; 2012.

SEFIDKON F, SALEHYAR S, MIRZA M, DABIRI M. The essential oil of *Tagetes erecta* L. occurring in Iran. *Flavour Fragrance Journal*, 19: 579-581; 2004.

SERAFINI LA, SANTOS ACA, TOUGUINHA LA, AGOSTINHO G, DALFOVO V. Extrações e aplicações de óleos essenciais de plantas aromáticas e Medicinais. Caxias do Sul: EDUCS, 2002.

SHAHZADI I, SHAH MM. Acylated flavonol glycosides from *Tagetes minuta* with antibacterial activity. *Front Pharmacology*, 6: 195; 2015.

SILVA BS, BARBOSA CS, PIERI O, TRAVASSOS A, FLORENCIO L. Aspectos físico-químicos e biológicos relacionados à ocorrência de *Biomphalaria glabrata* em focos litorâneos da esquistossomose em Pernambuco. *Química Nova*, 29(5): 901-906; 2006.

SILVA-FILHO CRM, SOUZA AG, CONCEIÇÃO MM, SILVA TG, SILVA TMS, RIBEIRO APL. Avaliação da bioatividade dos extratos de cúrcuma (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae) extratos em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata*. Revista Brasileira de Farmacognosia, 19: 919-923; 2009.

SILVA-SOUZA N, VASCONCELOS SD. Histopathology of *Holochilus brasiliensis* (Rodentia: Cricetidae) infected with *Schistosoma mansoni* (Schistosomatida: Schistosomatidae). Revista de patologia Tropical, 34(2):145-150; 2005.

SILVEIRA AC. Controle da esquistossomose no Brasil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 84: 91-104; 1989.

SIMÕES CMO, SCHENKEL EP, GOSMANN G, MELLO JCP, MENTZ LA, PETROVICK PR. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. 1.ed.-Porto Alegre, Editora Artmed, 486; 2017.

SINGH P, KRISHNA A, KUMAR V, KRISHNA S, SINGH K, GUPTA M, SINGH S. Chemistry and biology of industrial crop *Tagetes* species: a review. Journal Essential Oil Research, 28:1–14; 2016.

SOULE JA, JANICK J. Novel annual perennial *Tagetes*. Progress in new crops: Proceedings of the Third National Symposium Indiana, (22- 25): 546-551; 1996.

SOUZA A, LOPES EM, CARDOSO SMC, CORDEIRO I, YOUNG MCM, SOBRAL MEG, MORENO PRH. Chemical composition and acetylcholinesterase inhibitory activity of essential oils of *Myrceugenia myrcioides* (Cambess.) O. Berg and *Eugenia riedeliana* O. Berg, Myrtaceae. Revista Brasileira Farmacognosia, 20 (2): 175-179; 2010.

SOUZA AA, BARBOSA VS, WANDERLEI TNG, BARBOSA CS. Criadouros de *Biomphalaria*, temporários e permanentes, em Jaboatão dos Guararapes, PE. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 41(3): 252-256; 2008.

SOUZA CAS, AVANCINI CAM, WIEST JA. Atividade antimicrobiana de *Tagetes minuta* L. Compositae (Chinchilho) frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, 37(6): 429-433; 2000.

SOUZA CP, LIMA LC. Moluscos de interesse parasitológico do Brasil. Belo Horizonte: Editora da FIOCRUZ/CPqRR, 1990.

SOUZA FPC, VITORINO RR, COSTA AP, FARIA-JÚNIOR FC, SANTANA LA, GOMES AP. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. Revista Brasileira de Clínica Médica de São Paulo, 9(4): 300-07; 2011.

SOWBHAGYA HB, SAMPATHU SR, KRISHNAMURTHY N. Natural colorant from marigold - chemistry and technology. Food Reviews International, 20: 33-50; 2004.

STASI LC, HIRUMA-LIMA CA. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica, 2nd ed. UNESP, São Paulo, 2002.

TAVARES W. Antibióticos e quimioterápicos para o clínico. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 2009.

TELES HMS, PEREIRA PAC, RICHINITTI LMZ. Distribuição de *Biomphalaria* (Gastropoda, Planorbidae) nos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, Brasil. Revista de Saúde Pública, 25(5): 350-352; 1991.

TELES HMS. Distribuição geográfica das espécies dos caramujos transmissores de *Schistosoma mansoni* no Estado de São Paulo. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 38(5): 426-432; 2005.

TELES TV, BONFIM RR, ALVES PB, BLANK AF, JESUS HCR, QUINTANS-JR LJ, SERAFINI MR, BONJARDIM LR, ARAÚJO AAS. Composition and evaluation of the lethality of *Lippia gracilis* essential oil to adults of *Biomphalaria glabrata* and larvae of *Artemia salina*. African Journal of Biotechnology, 9(51): 8800-8804; 2010.

TÉLLEZ-LÓPEZ MA, JAIME FCO, TREVIÑO-NEÁVEZ MA, VERDE-STAR J, RIVAS-MORALES C, ORANDAY-CÁRDENAS A, MORAN-MARTÍNEZ J, SERRANO-GALLARDO LBMA, MORALES-RUBIO E. Evaluación del efecto del extracto metanólico de *Tagetes lucida* sobre la función testicular y calidad espermática en ratas macho Wistar. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 44 (4); 2013.

TOMOVA BS, WATERHOUSE JS, DOBERSKI J. The effect of fractionated *Tagetes* oil volatiles on aphid reproduction Entomologia Experimentalis et Applicata, 115(1): 153-159; 2005.

TONUCI LRS, MELO NI, DIAS HJ, WAKABAYASHI KAL, AGUIAR GP, AGUIAR DP, MANTOVANI ALL, RAMOS RC, GROppo M, RODRIGUES V, VENEZIANI RCS, CUNHA WR, SILVA-FILHO AA, MAGALHÃES LG, CROTTI AEM. *In vitro* schistosomicidal effects of the essential oil of *Tagetes erecta*. Revista Brasileira de Farmacognosia, 22: 88-93; 2012.

TRIPATHI B, BHATIA R, WALIA S, KUMAR B. Chemical composition and evaluation of *Tagetes erecta* (var. Pusa narangi genda) essential oil for its antioxidant and antimicrobial activity. Biopesticides International, 8(2):138-146; 2012.

VASCONCELLOS MC, SCHALL VT. Latex of “Coroa-de-Cristo” (*Euphorbia splendens*): an affective molluscicide. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 81(1): 85-91; 1986.

VASCONCELLOS ML, SILVA TM, CAMARA CA, MARTINS RM, LACERDA KM, LOPES HM, PEREIRA VL, DE SOUZA RO, CRESPO LT. Baylis - Hillman adducts with molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata*. Pest Management Science, 3: 288-292; 2006.

VENTURA-MARTÍNEZ R, ÁNGELES-LÓPEZ GE, RODRÍGUEZ R, GONZÁLEZ-TRUJANO ME, DÉCIGA-CAMPOS M. Spasmolytic effect of aqueous extract of *Tagetes erecta* L. flowers is mediated through calcium channel blockade on the guinea-pig ileum. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 103: 1552-1556; 2018.

VERDI LG, BRIGHENTE IMC, PIZZOLATTI MG. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. *Química Nova*, 28(1): 85-94; 2005.

VINAUD MC, SUZANA CS, PEDRO HF, LINO JUNIOR RS, BEZERRA JCB. Avaliação da atividade larvívica de plantas fitoterápicas do cerrado do gênero *Stryphnodendron* spp. sobre miracídios e cercárias de *Schistosoma mansoni*. *Revista de Patologia Tropical*, 34 (2): 137-143; 2005.

VITORINO RR, SOUZA FPC, COSTA AP, JÚNIOR FCF, SANTANA LA, GOMES AP. Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle. *Revista Brasileira de Clínica Médica*, 10(1): 39- 45; 2012.

WALDMAN EA, SATO APS. Trajetória das doenças infecciosas no Brasil nos últimos 50 anos: um contínuo desafio. *Revista de Saúde Pública*, 50: 68. 2016.

WANG W, XU H, CHEN H, TAI K, LIU F, GAO Y. *In vitro* antioxidant, anti-diabetic and antilipidemic potentials of quercetagen extracted from marigold (*Tagetes erecta* L.) inflorescence residues. *Journal of Food Science and Technology*, 53: 2614-2624; 2016.

WORD HEALTH ORGANIZATION. WHO. Schistosomiasis: fact sheet Geneva, 2017.

WORD HEALTH ORGANIZATION. WHO. Snail control in the prevention of bilharziasis. Monograph series n 50 Geneva; 1965.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report of the scientific working group on plant molluscicides & guidelines for evaluation of plant molluscicides. Geneva: WHO; 1983.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. Accelerating work to overcome the global impact of neglected tropical diseases: a roadmap for implementation. Geneva: World Health Organization. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. Memoranda: molluscicide screening and evaluation. *Bul. of the World Health Organization*, 33: 567-576; 1965.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. Schistosomiasis: number of people treated worldwide in 2014; *Wkly Epidemiology Record*, 91:53–60; 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. Schistosomiasis: number of people treated in 2011. *Weekly Epidemiological Record*. Switzerland: [s.n.], p. 81-88; 2013.

XU L, CHEN J, QI H, SHI Y. Phytochemicals and their biological activities on plants in *Tagetes* L. *Chinese Herbal Medicines*, 4: 103-117; 2012.

YOUNIS A, RIAZ A, QASIM M, MANSOOR F, ZULFIQAR F, TARIQB U, AHSAN M, NASEEM MK, BHATTI ZM. Screening of marigold (*Tagetes erecta* L.) cultivars for drought stress based on vegetative and physiological characteristics. International Journal of Food and Allied Sciences. International Journal of Food and Allied Sciences, 3(2): 56-63; 2017.

ANEXO I – CERTIFICADO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS- CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS- CEUA CIAEP:01.0341.2014

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**Controle de doenças negligenciadas: estudo químico e atividade moluscicida e larvacida frente Aedes aegypti de espécies vegetais do Maranhão**” registrada com o nº **23115.009327/2017-10**, sob a responsabilidade de **Denise Fernandes Coutinho**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMA) da Universidade Federal do Maranhão.

FINALIDADE	() ENSINO (X) PESQUISA () EXTENSÃO
Vigência da autorização	20/03/2018 à 20/10/2019
Espécie/linhagem/raça	Peixe <i>Danio rerio</i> ou <i>Poecilia reticulata</i>
Nº de animais	180
Peso/Idade	0,70-0,3g/Peixe <i>Danio rerio</i> : 4 meses/ <i>Poecilia reticulata</i> : 30 dias
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	ACQUA RIO IMP E EXP DE PEIXES LTDA-ME; CNPJ: 10.863.168/001-84

Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho

Presidente da Comissão de Ética no uso de Animais CEUA UFMA