



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

**CONTROLE DA ESQUISTOSSOMOSE: Atividade moluscicida e cercaricida do
óleo essencial de *Citrus x limon* (L.) Osbeck**

Amália Cristina Melo Carvalho

SÃO LUÍS

2018

Amália Cristina Melo Carvalho

**CONTROLE DA ESQUISTOSSOMOSE: Atividade moluscicida e cercaricida do
óleo essencial de *Citrus x limon* (L.) Osbeck**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Denise Fernandes
Coutinho

SÃO LUÍS

2018

Amália Cristina Melo Carvalho

**CONTROLE DA ESQUISTOSSOMOSE: Atividade moluscicida e cercaricida do
óleo essencial de *Citrus x limon* (L.) Osbeck**

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

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Denise Fernandes
Coutinho

Aprovada em __/__/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr^ª. Denise Fernandes Coutinho
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Nêuton Silva Souza
Universidade Estadual do Maranhão

Prof. Dr^ª Flavia Maria Mendonça do Amaral
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr^ª. Ivone Garros Rosa
Universidade Federal do Maranhão

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela minha vida. Aos meus pais e irmãos pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

Ao meu esposo pelo amor, paciência, dedicação e companheirismo a mim dedicados.

À minha orientadora professora, Dra. Denise Fernandes Coutinho, pela oportunidade, atenção e empenho dedicado a elaboração desse trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente que contribuíram para a minha formação.

Ao professor, Dr. Victor Elias Mouchrek Filho, pela contribuição nas análises químicas dos óleos essenciais.

Aos meus colegas da turma 13 do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente, em especial Elayne Costa, Igor Marcelo, Walquiria Santos, agradeço pelo convívio diário, alegria, ensinamentos, conversas e conselhos.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Farmacognosia II, Daniela Patrícia, Antônio Leite, Edilene Ribeiro, Tássio Rômulo, Ludmilla e Luciana Patrícia, pela grande ajuda em todas as etapas da pesquisa, disponibilidade, descontração e divertimento.

A secretaria e coordenação do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente pelo suporte administrativo.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro a pesquisa desenvolvida.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para execução da pesquisa e conhecimentos adquiridos ao longo do mestrado.

RESUMO

“Controle da esquistossomose: atividade moluscicida e cercaricida do óleo essencial de *Citrus x limon* (L.) Osbeck”. A esquistossomose é uma enfermidade ainda considerada um grave problema de saúde pública no Brasil, sua ocorrência está estreitamente associada a falta de condições socioambientais e apresenta-se endêmica em vários estados brasileiros, inclusive no Maranhão. O *Schistosoma mansoni*, parasita transmissor da doença, necessita do caramujo do gênero *Biomphalaria* para completar seu ciclo de vida, sendo este o hospedeiro intermediário. Desse modo, uma das formas do controle da doença se dá com a interrupção do ciclo biológico do helminto por meio do combate do hospedeiro intermediário. Este estudo objetivou avaliar a atividade moluscicida e cercaricida do óleo essencial das partes aéreas e do epicarpo do fruto de *Citrus x limon* (L.) Osbeck, bem como analisar sua composição química e ação tóxica a organismos não alvo, visando encontrar uma alternativa viável e sustentável para o controle da esquistossomose. Os óleos essenciais em estudo foram extraídos por meio da técnica de hidrodestilação e, a composição química foi determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. A atividade moluscicida e cercaricida dos óleos foram avaliadas em quatro concentrações contra *Biomphalaria glabrata* e cercária do *Schistosoma mansoni*. A toxicidade contra organismos não alvo, foi avaliada frente *Artemia salina*. Os resultados foram expressos em concentrações letais das atividades biológicas, com nível de confiança de 95%, obtidos por regressão linear. Somente o óleo extraído do epicarpo do fruto demonstrou atividade frente *Biomphalaria glabrata* com CL₉₀ 90,08µg/mL. Os óleos extraídos das partes aéreas e do epicarpo exibiram atividade frente cercárias do *Schistosoma mansoni* com valores de CL₅₀ 1,33 e 1,05 µg/mL, respectivamente. Os óleos essenciais avaliados apresentaram toxicidade moderada para os microcrustáceos *Artemia salina*. Tal resultado nos faz concluir que a espécie estudada possui grande potencial para ser utilizada como alternativa bioativa viável e sustentável como moluscicida e cercaricida. O desafio é gerar novos dados que auxiliem no controle das doenças negligenciadas, área que ainda necessita de investimentos e pesquisas com retorno satisfatório.

Palavras-chave: Compostos majoritários. Limão. *Schistosoma mansoni*. *Biomphalaria glabrata*.

ABSTRACT

"Control of schistosomiasis: molluscicidal and cercaricidal activity of *Citrus x limon* (L.) Osbeck essential oil". Schistosomiasis is a disease still considered a serious public health problem in Brazil, its occurrence is closely associated with a lack of socioenvironmental conditions and is endemic in several Brazilian states, including Maranhão. *Schistosoma mansoni*, a parasite that transmits the disease, requires the snail of the genus *Biomphalaria* to complete its life cycle, which is the intermediate host. Thus, one of the forms of disease control is the interruption of the biological cycle of helminth by means of the combat of the intermediate host. The objective of this study was to evaluate the molluscicidal and cercaricidal activity of the essential oil of the aerial parts and the fruit epicarp of *Citrus x limon* (L.) Osbeck, as well as to analyze its chemical composition and toxic action to non - target organisms, aiming to find a viable and management of schistosomiasis. The essential oils under study were extracted by the hydrodistillation technique and the chemical composition was determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry. The molluscicidal and cercaricidal activity of the oils were evaluated in four concentrations against *Biomphalaria glabrata* and cercariae of *Schistosoma mansoni*. Toxicity against non-target organisms was assessed against *Artemia salina*. The results were expressed as lethal concentrations of biological activities, with 95% confidence level, obtained by linear regression. Only the oil extracted from the epicarp of the fruit showed activity against *Biomphalaria glabrata* with CL_{90} 90.08 μ g / mL. Oils extracted from the aerial parts and the epicarp exhibited cerivastatic activity of *Schistosoma mansoni* with CL_{50} values 1.33 and 1.05 μ g / mL, respectively. The evaluated essential oils presented moderate toxicity to the microcracks *Artemia salina*. This result leads us to conclude that the species studied has great potential to be used as a viable and sustainable bioactive alternative such as molluscicide and cercaricide. The challenge is to generate new data that help to control neglected diseases, an area that still requires investments and research with a satisfactory return.

Key words: Major compounds. Lemon. *Schistosoma mansoni*. *Biomphalaria glabrata*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividades biológicas comprovadas do gênero <i>Citrus</i>	27
Tabela 2 - Rendimento dos óleos essenciais de <i>Citrus x limon</i> (L.) Osbeck.....	35
Tabela 3 - Composição química dos óleos essenciais de <i>Citrus x limon</i> (L.) Osbeck.....	36
Tabela 4 - Concentração letal do óleo essencial extraído do epicarpo do fruto de <i>Citrus</i> <i>x limon</i> (L.) Osbeck sobre caramujos <i>Biomphalaria glabrata</i>	39
Tabela 5 - Concentração letal dos óleos essenciais das partes aéreas e do epicarpo do fruto de <i>Citrus x limon</i> (L.) Osbeck sobre cercárias de <i>Schistosoma mansoni</i>	41
Tabela 6 - Concentrações letais dos óleos essenciais das partes aéreas e do epicarpo da espécie <i>Citrus x limon</i> (L.) Osbeck sobre <i>Artemia salina</i>	43

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Características conquiliológicas do <i>Biomphalaria</i> , vista do lado direito, vista frontal e vista do lado esquerdo, respectivamente.....	17
Figura 2 - Partes aéreas e fruto de <i>Citrus x limon</i> (L.) Osbeck.....	28
Figura 3 - Compostos majoritários dos óleos essenciais de <i>Citrus x limon</i> (L.) Osbeck.....	37

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 Esquistossomose mansônica	12
2.1.1 Agente etiológico e ciclo biológico	14
2.1.2 Caramujos transmissores	15
2.1.3 Patogenia	18
2.1.4 Tratamento	19
2.1.5 Controle	20
2.2 Óleos essenciais x controle biológico	23
2.2.1 Toxicidade	25
2.3 <i>Citrus x limon</i> (L.) Osbeck	26
3 OBJETIVOS	29
3.1 Geral	29
3.2 Específicos	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 Coleta das amostras	30
4.2 Extração dos óleos essenciais	30
4.3 Análise química dos óleos essenciais de <i>Citrus x limon</i> (L.) Osbeck	30
4.4 Ensaios biológicos	31
4.4.1 Coleta e identificação de caramujos <i>Biomphalaria glabrata</i>	31
4.4.2 Observação da positividade dos caramujos quanto ao <i>Schistosoma mansoni</i>	31
4.4.3 Ensaios de atividade moluscicida	32
4.4.4 Bioensaio frente as cercarias de <i>Schistosoma mansoni</i>	32
4.4.5 Bioensaio frente <i>Artemia salina</i>	33
4.5 ANÁLISE DOS DADOS	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 Composição química dos óleos essenciais de <i>Citrus x limon</i> (L.) Osbeck	35
5.2 Análise moluscicida dos óleos essenciais de <i>Citrus x limon</i> (L.) Osbeck em caramujos <i>Biomphalaria glabrata</i>	39
5.3 Análise dos óleos essenciais de <i>Citrus x limon</i> (L.) Osbeck frente a cercarias de <i>Schistosoma mansoni</i>	41
5.4 Avaliação dos óleos essenciais de <i>Citrus x limon</i> (L.) Osbeck frente <i>Artemia Salina</i>	42
6 CONCLUSÃO	44
7 PERSPECTIVAS FUTURAS	45
REFERÊNCIAS	46
ANEXOS	66

1 INTRODUÇÃO

As doenças negligenciadas são caracterizadas por um grupo de enfermidades infecciosas que acometem sobretudo a população de baixa renda nos países em desenvolvimento, com poucos investimentos em pesquisa e tecnologia para o avanço e controle, na prevenção e tratamento medicamentoso. Possui grande impacto na população em termos de ônus da doença, qualidade de vida, perda de produtividade e agravamento da pobreza, uma vez que afetam principalmente as populações sem saneamento ou com saneamento básico inadequado e em estreito contato com vetores infecciosos e animais domésticos. Apesar disso, não atraem o interesse de investimentos para pesquisa e desenvolvimento de medicamentos e/ou técnicas para o tratamento adequado por motivo do reduzido potencial de retorno lucrativo (WHO, 2010; WHO, 2016).

As distribuições destas enfermidades ocorrem em todo o mundo, mas são prevalentes principalmente nas regiões tropicais. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que mais de um bilhão de pessoas estão infectadas com uma ou mais doenças negligenciadas, representando um sexto da população mundial. Durante os últimos anos, o Brasil buscou definir um plano de ação no controle às doenças negligenciadas através de investimento em pesquisa e financiamento em novas tecnologias, dando início em 2006 ao Programa de Pesquisa e Desenvolvimento em Doenças Negligenciadas. O programa definiu, com o auxílio de dados epidemiológicos e demográficos, as doenças negligenciadas que necessitavam de prioridades de atuação, são elas: dengue, doença de Chagas, leishmaniose, hanseníase, malária, esquistossomose e tuberculose (BRASIL, 2015).

Além do Programa de Pesquisa e Desenvolvimento em Doenças Negligenciadas, incontáveis estratégias foram utilizadas objetivando o controle das doenças infecto-parasitárias, mas apesar de todas as ações realizadas grande parte destas ainda persistem no Brasil, dentre as quais destaca-se a esquistossomose (TIBIRIÇA, et al., 2011).

A esquistossomose é uma enfermidade parasitária ocasionada por helmintos do gênero *Schistosoma*, considerada uma doença crônica de relevância epidemiológica tanto pela sua prevalência como pela gravidade de suas complicações clínicas, provocando um número significativo de morbidade e mortalidade. Sua ocorrência é mais propícia em áreas rurais e áreas urbanas sem saneamento, outros

fatores como: nível socioeconômico, ocupação, lazer, grau de educação e informação, atuam como condicionantes e cooperam para a ocorrência da esquistossomose numa localidade (BRASIL, 2014).

As estratégias preconizadas para a diminuição de casos da esquistossomose, alternam-se dependendo da área e dos níveis de transmissão da doença. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), devem haver ações guiadas para: delimitar áreas endêmicas e focais, identificar e monitorar áreas vulneráveis, diagnosticar e tratar precocemente populações humanas parasitadas, investigar e classificar casos da doença, implantar sistemas de eliminação de dejetos e abastecimento de água, fomentar a participação da comunidade na luta contra a doença com campanhas informativas e educativas, desenvolvimento de vacina e uso de produtos moluscidas para reduzir a densidade populacional de caramujos e de fases larvárias do *Schistosoma* (WHO, 1983).

A disseminação dos caramujos vetores é fator crucial na transmissão da esquistossomose, considerando que são hospedeiros intermediários do ciclo do parasito. Seu domínio se torna estratégia de urgência para a redução da transmissão da doença. (PARAENSE, 1983; CHITSULO et al., 2000; CARVALHO et al., 2008). Seu controle tem por objetivo eliminar os focos de transmissão, bloqueando a proliferação e o desenvolvimento dos caramujos, abrangendo o tratamento químico e respeitando a legislação ambiental vigente (BARBOSA et al., 2008).

Atualmente o controle da população malacológica se restringe a substâncias sintéticas, sendo a niclosamida (Bayluscid®) o moluscida recomendado pela OMS. Este composto afeta uma ampla variedade de moluscos, cercárias, e também é usado como um antiparasitário em medicina humana e veterinária. A niclosamida tem baixa toxicidade para mamíferos, mas são tóxicos para vertebrados aquáticos (peixes e anfíbios) e crustáceos, além de ter um alto custo e ser de difícil operacionalização (WHO, 1988; MARSTON, 1985).

O alto custo dos moluscidas sintéticos e seus impactos negativos sobre o meio ambiente, bem como o receio do surgimento da resistência do caramujo a estes compostos deu um impulso nos estudos envolvendo produtos naturais com a finalidade de se obter substâncias bioativas mais seletivas e de fácil biodegradação para o controle da população dos caramujos. Alguns estudos já demonstram que a atividade moluscida das plantas está relacionada aos princípios ativos derivados do seu metabolismo secundário (SOLÓRZANO-SANTOS; MIRANDA-NOVALES, 2012).

O interesse pelo uso de moluscidas de origem vegetal no controle da esquistossomose data da década de 1930, quando foi sugerido o plantio de *Balanites aegyptiaca* L. (Balanitaceae), uma árvore típica do deserto, nas margens dos focos de transmissão, no Sudão. Seus frutos, ao caírem das árvores, inibiam a densidade populacional de caramujos (ARCHIBALD, 1933). No Brasil, os primeiros estudos sobre moluscidas de origem vegetal demonstraram a atividade de extratos aquosos de caules de *Serjania* spp. (cipó-timbó) e de frutos de *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae) (saboneteira, sabão) em *Biomphalaria glabrata*. Essa ação foi atribuída às saponinas presentes nestes vegetais (PINTO; ALMEIDA, 1944).

Grandes são as expectativas em torno das atividades biológicas de produtos do metabolismo vegetal, em especial dos metabólitos secundários, consequência de sua complexa composição química. Alguns estudos experimentais envolvendo os óleos essenciais, por exemplo, já relataram importantes atividades, como: antioxidante (MIRANDA et al., 2016), larvicida (DIAS et al., 2015), antibacteriana (MILLEZI et al. 2014), anti-inflamatória (SILVA DE ARAÚJO et al., 2015), moluscida (FERNANDES, 2011), ratificando sua potencialidade diversa.

Perante a grande variabilidade e diversidade presente nos óleos essenciais, e também da inexistência de um moluscida sintético seguro e eficiente relacionada ao panorama epidemiológico da esquistossomose na região Nordeste do país, é de suma importância a investigação e descoberta de novas substâncias naturais seletivamente tóxicas para o *Biomphalaria glabrata* e cercárias de *Schistosoma mansoni*; apresentando alternativas viáveis para o controle integral da esquistossomose, contribuindo com o progresso científico e tecnológico do Brasil.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Esquistossomose mansônica

A esquistossomose consiste em uma enfermidade parasitária causada por trematódeos pertencentes ao gênero *Schistosoma*, onde uma (ou mais) espécies existentes se adaptaram ao ser humano, ocasionando a doença. Dentre as espécies, destacam-se: *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma mekongi* e *Schistosoma intercalatum*. Trata-se de uma doença típica das Américas, Ásia e África, sendo que seus primeiros registros se deram nas redondezas das bacias do Rio Nilo. E, por muito tempo, vem persistindo como uma doença de alto impacto na saúde de grande parte da população, tornando-se um desafio que já vem ultrapassando décadas de estudos acumulados e de intervenções sociais (LAMBERTUCCI; SERUFO, 2001).

O ciclo do *Schistosoma mansoni* necessita de hospedeiros intermediários e definitivos, pois trata-se de um ciclo heteroxênico. Em relação aos hospedeiros intermediários, três importantes espécies de moluscos vetores do gênero *Biomphalaria* são encontradas no Brasil, dentre elas: *Biomphalaria tenagophila*, *Biomphalaria straminea*, *Biomphalaria glabrata*, sendo essa última o vetor mais eficiente na nossa região (REY, 2001; RESENDES et al., 2005; CARVALHO et al., 2008).

A transmissão da doença ocorre pelo contato com água contaminada por ovos de *Schistosoma mansoni*, onde também se possa encontrar os hospedeiros intermediários (caramujos do gênero *Biomphalaria*). O homem, hospedeiro definitivo, acometido pela doença expela os ovos do parasito nas fezes que em contato com a água, eclodem e larvas ciliadas (miracídeos) são liberadas. Essas larvas penetram nos tecidos moles do caramujo, instalam-se no corpo desse animal e sofrem sucessivas modificações dando origem a outro estágio larval do verme denominado de cercarias. As cercarias, ao serem liberadas, podem infectar o homem, completando a sua evolução para verme adulto e restabelecendo o ciclo biológico do parasito (ROZEMBERG, 1998; SILVA, 2006).

Por se tratar de uma doença de veiculação hídrica, os recursos hídricos, indispensáveis ao desenvolvimento de inúmeras atividades laborais como a atividade agrícola, contribuem para a propagação da esquistossomose no País. No entanto, os

fluxos migratórios e, principalmente os hábitos de vida do homem, tiveram destaque em propiciar novos e vastos habitats para os moluscos hospedeiros, beneficiando a disseminação da doença permitindo o frequente contato da população humana com a água contaminada (BRASIL, 2014).

No Brasil, a esquistossomose foi introduzida no período colonial por ocasião do tráfico de escravos africanos parasitados que laboravam em lavouras canavieiras no nordeste brasileiro. O contato em áreas alagadas dos escravos contaminados, associado às péssimas condições de higiene desses indivíduos e da existência de caramujos das espécies transmissoras do *Schistosoma mansoni*, foram fatores básicos para a introdução da esquistossomose no Nordeste brasileiro, formando extensa área de transmissão entre os estados do Rio Grande do Norte e a Bahia. No século XVIII, com o início do ciclo do ouro e diamante e o declínio da produção açucareira no Nordeste, um fluxo migratório intenso introduziu a endemia em Minas Gerais. Apesar da chegada de três espécies dos trematódeos no país, admite-se que as favoráveis condições ambientais agrupadas a existência de hospedeiros intermediários aptos favoreceram a adaptação de somente de *Schistosoma mansoni*. Essa espécie gera a esquistossomose mansônica ou intestinal (NEVES, 2005; BRASIL, 2008).

No território brasileiro, localiza-se 96% dos casos de esquistossomose de toda América Latina (MARTINS-MELO et al., 2015). Em dias atuais encontram-se casos de transmissão em todas as regiões, com áreas endêmicas e focais abrangendo 19 estados, sobretudo nas regiões Norte e Nordeste (BRASIL, 2016). Outros focos de transmissão no continente americano são encontrados na Colômbia, Venezuela, Porto Rico, República Dominicana, Santa Lúcia, Guadalupe, Martinica, St. Kitts, Suriname, Montserrat, Haiti e San Martin (CARDIM, 2010; NOYA et al., 2015).

No Maranhão, a esquistossomose, estende-se em 49 dos 217 municípios, onde apresenta endemicidade em 20 e casos focais avulsos em 29 municípios. No Litoral Norte, na Baixada Maranhense e em alguns bairros da periferia da cidade de São Luís localizam-se as mais elevadas prevalências do Estado (BRASIL, 2011; CANTANHEDE et al., 2014). As estimativas da frequência desta doença no Maranhão indicam que existe uma tendência à elevação de números de casos dessa enfermidade (SANTOS; MELO, 2011). Segundo dados do Programa de Controle da Esquistossomose (PCE), em 2016, houve o registro de 920 novos casos (DATASUS, 2017).

2.1.1 Agente etiológico e ciclo biológico

Os agentes causadores da esquistossomose são platelmintos, da classe dos trematódeos, família *Schistosomatidae*, gênero *Schistosoma* que apresenta como característica a existência de sexos separados, com nítido dimorfismo sexual. *Schistosoma mansoni* é um verme de cor esbranquiçada ou leitosa, que é habitualmente hospede das vênulas tributárias do sistema porta, particularmente das veias mesentéricas superiores e inferiores, do plexo hemorroidário e mesmo da porção intra-hepática da veia porta. No interior desses vasos, encontram-se geralmente o macho e a fêmea, acasalados. A fêmea aloja-se no canal ginecóforo do macho e, por ser mais longa, ultrapassa-o para diante ou para trás e se recurva em uma ou duas flexões. Geralmente esses vermes realizam migrações dentro do mesmo vaso ou de um para outro, através de anastomoses (REY, 2001; NEVES, 2005).

O ciclo evolutivo de *Schistosoma mansoni* é formado por duas fases parasitárias: uma no hospedeiro definitivo (vertebrado/homem) e outra no hospedeiro intermediário (invertebrado/caramujo). Há ainda duas formas larvárias de vida livre no meio aquático (miracídio e cercaria), que se alternam com as fases parasitárias. As etapas evolutivas consistem no verme adulto (macho e fêmea), ovo, miracídio, esporocisto, cercaria e esquistossômulo. O ciclo evolutivo do parasito se completa, em condições favoráveis, em torno de 80 dias. No homem, o ciclo é sexuado e o período decorrido entre a penetração das cercarias e o encontro de ovos nas fezes é de cerca de 40 dias. No molusco, o ciclo é assexuado e dura, aproximadamente, 40 dias (REY, 2001; BRASIL, 2014).

O miracídio representa a primeira forma larval de *Schistosoma mansoni* e sobrevive até 24 horas na água, caso as condições de temperatura sejam adequadas. Possui mobilidade, graças aos numerosos cílios que revestem sua delgada cutícula e ao seu sistema muscular. O miracídio penetra no interior do molusco hospedeiro intermediário em decorrência da atividade de substâncias histolíticas que são secretadas por suas glândulas cefálicas. O miracídio perde a mobilidade após 48 horas e se transforma em esporocisto primário, cujas células germinativas se multiplicam e dão origem a esporocistos secundários. Um único miracídio é capaz de expelir até 300.000 cercarias (MARQUES, 2012).

A luz solar e temperatura da água influenciam a liberação das cercarias. Essa eclosão ocorre geralmente entre 11 e 15 horas, período em que a luminosidade e a

temperatura são as mais adequadas para a ocorrência do fenômeno. É sob a forma de cercarias que *Schistosoma mansoni* infecta o hospedeiro definitivo, seja ele o homem ou qualquer vertebrado suscetível. A longevidade dessas larvas é inferior a dois dias e sua capacidade de infecção diminui progressivamente durante o tempo em que permanecem livres. Ao penetrar ativamente na pele do homem, produz uma irritação de intensidade variável de indivíduo para indivíduo. O processo de penetração da cercaria dura normalmente de dois a quinze minutos. Uma vez nos tecidos do hospedeiro definitivo, as cercarias perdem a cauda e se transformam em esquistossômulos. Estes caem na circulação sanguínea e/ou linfática, atingem a circulação venosa, vão ao coração e aos pulmões, onde permanecem algum tempo e podem causar certas alterações mórbidas. Em seguida retornam ao coração, de onde são lançados através das artérias aos pontos mais diversos do organismo, sendo o fígado o órgão preferencial de localização do parasita. Neste órgão, as formas jovens se diferenciam sexualmente e crescem, alimentando-se de sangue. Ainda imaturos, os parasitas migram para a veia porta, passando daí às suas tributárias mesentéricas, onde completam sua evolução. A partir de 27 dias da penetração das cercarias, após a migração dos esquistossomos para as veias mesentéricas, inicia-se, geralmente, o acasalamento (LENZI, 2008; REY, 2008).

Os vermes adultos se localizam no fígado e nos ramos terminais das veias mesentéricas, daí migram para as vênulas da submucosa intestinal, onde se dão as posturas dos ovos, por meio de uma série de contrações musculares. A migração dos ovos do vaso para a luz intestinal provoca micro hemorragias e áreas de inflamação responsáveis pelo aparecimento de diarreia mucossanguinolenta e de outros distúrbios gastrointestinais. Uma fêmea de *Schistosoma mansoni* produz cerca de 300 ovos diariamente, dos quais cerca da metade é eliminada nas fezes. Os ovos que não conseguem alcançar a luz intestinal por ficarem retidos nos tecidos, preferencialmente fígado e intestinos, são os responsáveis pela formação de granulomas que, no fígado, podem ocluir total ou parcialmente a passagem do sangue, e juntamente com a fibrose periportal vão ocasionar as manifestações das formas mais graves da doença (LENZI, 2008; NEVES, 2010).

2.1.2 Caramujos transmissores

Schistosoma mansoni, no Brasil, tem como hospedeiro intermediário os moluscos do gênero *Biomphalaria*. Este gênero possui 37 espécies já identificadas na África e na Região Neotropical. No Brasil foram reconhecidas 11 espécies, dentre

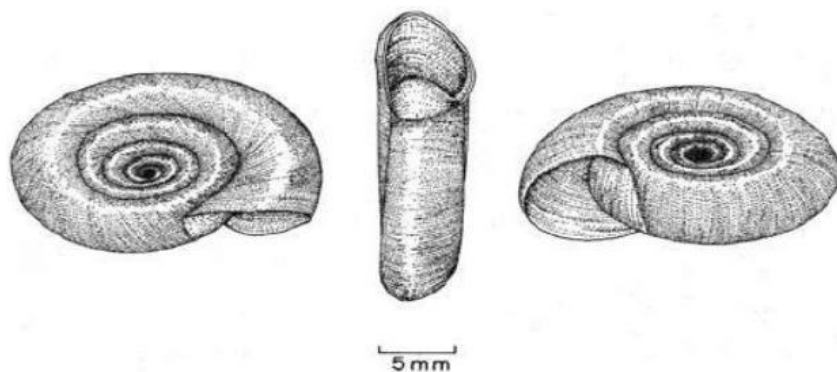
estas apenas três: *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea* são encontradas naturalmente infectadas (PEPE et al., 2006).

Algumas particularidades facilitam o reconhecimento do gênero *Biomphalaria*, como exemplo: concha planispiral, com variação de diâmetro entre 7 a 40 milímetros, tentáculos longos e filiformes, olho situado na base interna dos tentáculos, pé oblongo, boca contornada por mandíbula em forma de T, hemolinfa vermelha e pênis simples (PARAENSE, 1975).

Identificados há aproximadamente 140 milhões de anos, esses moluscos sobreviveram a diversas pressões ambientais e ocupam atualmente grandes extensões territoriais. São encontrados em pequenas coleções de água, mas podem também ocorrer em córregos, lagoas, pântanos, remansos de rios, margens de reservatórios ou coleções artificiais (BARBOSA et al., 2012). A presença de vegetação vertical ou flutuante é indispensável tanto para alimentação e abrigo dos animais quanto para o suporte para as desovas, que são depositadas sempre na parte submersa, em criadouros, podem consumir folhas de alface, agrião, couve e fatias de cenoura (CIMERMAM; CIMERMAM, 2005). Entre os mecanismos de dispersão dos moluscos, considerados mais importantes, estão o transporte das desovas ou mesmo de moluscos através de aves, peixes e plantas aquáticas. A retirada e o transporte de areia das margens de coleções hídricas com moluscos e as cheias provocadas pelas chuvas são também mecanismos de dispersão (BRASIL, 2014).

Quando infectados pelas formas jovens do *Schistosoma mansoni*, os caramujos têm a sua sobrevivência encurtada, devido à espoliação parasitária e às lesões causadas nos tecidos pelo desenvolvimento das larvas até a liberação das cercarias. *Biomphalaria glabrata* é a mais importante espécie hospedeira intermediária do *Schistosoma mansoni* nas Américas, por apresentar altos níveis de infecção e ter sua distribuição, no Brasil, quase sempre associada à ocorrência da esquistossomose (BRAGA, 2012). Sua presença foi notificada em 16 estados brasileiros (Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, São Paulo e Sergipe), além do Distrito Federal (BRASIL, 2016).

Figura 1 - Características conquiliológicas do *Biomphalaria*, vista do lado direito, vista frontal e vista do lado esquerdo, respectivamente.



Fonte: Amaral et al., 2008

A espécie *Biomphalaria tenagophila* tem importância epidemiológica na transmissão do *Schistosoma mansoni* nos estados das regiões Sul e Sudeste. É responsável pela maioria dos casos autóctones de esquistossomose no estado de São Paulo e pelos focos da doença no estado de Santa Catarina. Foi notificada em 562 municípios de 10 estados brasileiros (Bahia, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo) além do Distrito Federal. A espécie é encontrada numa faixa litorânea, de forma quase contínua a partir do sul do estado da Bahia até o estado do Rio Grande do Sul (BRASIL, 2014).

Biomphalaria straminea constitui a espécie mais bem-sucedida e adaptada às variações climáticas, sendo encontrada em quase todas as bacias hidrográficas do País. É muito menos suscetível que *Biomphalaria glabrata*, entretanto, possui a distribuição mais abrangente entre as demais, sendo responsável pela manutenção de taxas de infecção humana superiores a 50% em algumas localidades do Nordeste brasileiro. A presença de *Biomphalaria straminea* foi registrada em 1.280 municípios distribuídos por 24 estados brasileiros: Acre, Alagoas, Amazonas, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo, Sergipe, Tocantins e Roraima (BRASIL, 2014).

2.1.3 Patogenia

A evolução clínica da esquistossomose mansoni depende da resposta do hospedeiro à invasão, ao desenvolvimento e à oviposição do verme. A fase inicial começa após o contato com as cercarias. Nessa fase, as manifestações alérgicas predominam; são mais intensas nos indivíduos hipersensíveis e nas reinfecções. Além das alterações dermatológicas, ocorrem também manifestações gerais, devido às alterações em outros tecidos e órgãos (POVISNKE; PRESTES, 2012).

Semanas após a penetração das cercarias, tem-se a fase aguda onde ocorre à migração e maturação das larvas do *S. mansoni*. Em geral os sintomas são febre, tosse seca, fraqueza, dor de cabeça, sintomas abdominais, urticária e/ou angioedema. A carga parasitária é diretamente proporcional a gravidade do quadro clínico e a resposta imune aos antígenos do parasito (MOUNTFORD, 2005). Muitos pacientes não têm uma forma definida de esquistossomose aguda, apresentando-se assintomáticos ou com poucos e leves sintomas, ou ainda queixas inespecíficas. Esta fase sintomática aguda é descrita principalmente em indivíduos não imunes expostos à água contaminada em áreas endêmicas (CORACHAN, 2002).

Os indivíduos que evoluem das formas agudas para as formas crônicas podem apresentar sintomas meses ou até anos após a exposição principal, sendo resultado da resposta imunológica induzida pelo ovo, com formação de granulomas associado a alterações fibróticas. Este quadro é mais comum do que a forma aguda da doença, visto que as formas cercarianas e adultas do verme são minimamente imunogênicas, enquanto que os ovos são altamente imunogênicos. Durante a evolução da esquistossomose crônica, dependendo da maior ou menor susceptibilidade do indivíduo e da intensidade da infecção, podem ocorrer diversas formas clínicas como intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica (GRYSEELS et al., 2006).

A retenção dos ovos e a formação de granulomas na parede intestinal podem causar diarreia sanguinolenta, cólicas e, eventualmente, polipose colônica inflamatória. Pacientes com grande envolvimento da parede intestinal tem um risco maior de infecção recorrente por *Salmonella* (PRATA, 2002).

Os ovos não eliminados, que são levados de volta para a circulação portal, induzem reações granulomatosas no trato portal, levando a severa fibrose periportal e infecções com alta carga parasitária são mais propensas a produzir comprometimento hepático. Embora a função hepatocelular seja poupada, a fibrose periportal pode levar a hipertensão portal com sequelas em potencial, incluindo

esplenomegalia, ascite e hemorragia por varizes de esôfago. Devido a essas complicações os ovos podem atingir a circulação pulmonar e a granulomatose e a fibrose resultante pode levar à hipertensão pulmonar, que possui uma alta taxa de mortalidade. Deposição ectópica de ovos pode levar a síndromes clínicas adicionais, podendo atingir a pele, pulmão, cérebro, medula espinhal, músculo, glândulas suprarrenais, órgãos genitais e olhos. As taxas e a intensidade da infecção sofrem influências dentro de uma população de acordo com seus padrões de contato com a água, da imunidade adquirida e dos fatores comportamentais, profissionais, culturais e religiosos. E em relação à idade, os índices aumentam desde a tenra idade para um pico na faixa etária de 8-15 anos e volta a diminuir nos adultos (GRYSEELS et al., 2006).

2.1.4 Tratamento

A terapêutica consiste em curar a doença, reduzir a carga parasitária do hospedeiro, evitar a evolução para as formas graves e diminuir a produção e eliminação dos ovos do helminto como uma forma de prevenção primária da transmissão da doença. O tratamento específico é feito com os fármacos praziquantel e oxaminiquine, que devem ser consumidos avaliando os aspectos de contraindicação. Os dois medicamentos são recomendados em dose única, segundo o peso e a idade do indivíduo que fará uso. Porém, o custo elevado do oxamniquine limitou seu uso em grande escala, sendo substituído no Brasil desde 1999 pelo praziquantel. Esse fármaco contempla o tratamento de todas as formas clínicas da esquistossomose, confere cerca de 60 a 90% de cura e redução na contagem de ovos de 90 a 95% em indivíduos que não são curados (BARBOSA et al., 2008; SIQUEIRA; GOMES, 2010)

Determinadas características devem ser consideradas na terapêutica dos diferentes estágios evolutivos da doença. Na fase inicial, onde ocorre a penetração da cercaria do *Schistosoma* no homem causando a dermatite cercariana, deve-se tratar com anti-histamínicos locais e corticosteroides tópicos, associados à terapêutica com os fármacos específicos podem propiciar o alívio do prurido (MAHMOUD, 2008). Os quadros de febre toxêmica podem necessitar internação nosocomial, juntamente com repouso, hidratação adequada, uso de antitérmicos, analgésicos e antiespasmódicos (LAMBERTUCCI, 1988). Em pacientes criticamente enfermos, a administração de corticosteroides pode aliviar a resposta inflamatória decorrente da morte do

Schistosoma mansoni. Nas fases crônica, hepatointestinal e hepatoesplênica devem ser contempladas medidas para atenuar o quadro diarreico e os episódios 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 (HUGGINS et al., 1998).

É importante ressaltar que os medicamentos utilizados para eliminar os helmintos em todos os estágios da doença não impedem a reinfecção (RAMOS et al., 1998).

2.1.5 Controle

No ano de 1975, em território nacional, foi criado o Programa Especial para Controle a Esquistossomose (PECE), que tinha por finalidade tratar a população infectada através da quimioterapia (CANTANHEDE, 2010). Em 1993 houve a descentralização do Programa para os estados e logo após para os municípios, passando a integrar a rede de atenção à saúde no período de 2007 a 2010 (BARRETO et al., 2011).

Com o passar dos anos a doença continuou em expansão e o número expressivo de casos era preocupante. Diante disso, o programa brasileiro de controle a esquistossomose passa a ter como objetivo principal a eliminação da doença, com redução do número de casos à níveis aceitáveis (menores que 5%) em áreas com intensa endemicidade e a interrupção da transmissão em áreas de baixa endemicidade (BRASIL, 2014).

Várias estratégias já foram estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) visando o controle da esquistossomose, dentre elas: a quimioterapia para o tratamento dos pacientes e também o controle do caramujo transmissor, propondo a erradicação do parasita com o propósito de interromper o ciclo de vida do parasito e, conseqüentemente, impedir o ser humano de ser atingido com a doença (BARBOSA et al., 2012).

O controle da população malacológica pode ser executado a partir de três métodos: o físico, biológico e químico. Onde o método físico elimina criadouros através de modificação no ambiente (canalização, aterros, drenagens e limpezas das margens de coleções de água). Método biológico introduz organismos com ação predatória, competidora, parasitária ou patogênica sobre os caramujos hospedeiros. Vale ressaltar que os dois métodos já descritos demonstram efeitos de médio a longo

prazo, no índice populacional dos moluscos e de infecção humana. Além disso, já se foi comprovado a ineficácia dos controles biológicos sobre os moluscos. Já o método químico realiza a diminuição desse molusco a curto prazo, principalmente através de produtos moluscidas que apresentam substâncias capazes de eliminar os moluscos que eliminam a forma infectante do parasita, eliminando, dessa forma, os criadouros naturais (WHO, 1993).

Diversas substâncias sintéticas já foram testadas na tentativa de eliminar os caramujos vetores da esquistossomose, como por exemplo a cal extinta, o sulfato de cobre, o pentaclorofenato de sódio, a tritilmorfolina e a niclosamida, todos estes comprovadamente tóxicos ao meio ambiente. No entanto, o único agente moluscida utilizado em campanhas de controle nacional, tendo sua recomendação defendida pela Organização Mundial da Saúde, é a niclosamida, produzida comercialmente pela Bayer (WHO, 1965; BARBOSA et al., 2008). Consiste em um produto de elevada eficiência contra todos os estágios de desenvolvimento dos caramujos *Biomphalaria*, inclusive as formas larvárias de *Schistosoma*, mesmo em concentrações baixas (MALTA et al., 2011). Embora possua excelente capacidade moluscida e cercaricida, a niclosamida se decompõe sob luz solar, possui toxicidade elevada para animais e plantas e também alto valor operacional (MOREIRA et al., 2010).

Os impactos ambientais causados por essa substância sintética e o possível desenvolvimento de resistência dos caramujos vem causando declínio de sua utilização no controle da esquistossomose. Em tempos atuais está em desuso no Brasil, sendo unicamente aconselhado somente em situações emergenciais (BARBOSA et al., 2012). Plantas da flora de áreas endêmicas da esquistossomose de fácil propagação, ciclo evolutivo curto e com baixa ou nenhuma toxicidade, vem sendo estudadas como medida de controle alternativa à proliferação de caramujos. Os moluscidas naturais são mais viáveis, em geral, por terem baixo custo, não prejudicarem o meio ambiente e por serem obtidos de matérias-primas renováveis (SILVA-FILHO et al., 2009).

Importante destacar que qualquer método utilizado com intervenção no ambiente deve ser realizado de acordo com a legislação ambiental pertinente (BARBOSA et al., 2012).

Para uma substância ser considerada moluscida, esta deve eliminar o caramujo em todas as fases do seu ciclo de vida e do seu habitat natural, em baixas concentrações, baixo custo, ser estável em condições tropicais, facilidade de

aplicação e transporte, ter letalidade seletiva ao caramujo, não apresentar riscos ao homem e nem a fauna e flora circundante, não sofrer decomposição na água e no solo e ser estável em condições de temperatura e irradiação solar (WHO, 1965; 1983; 2002). A morte do caramujo pelo moluscicida é evidenciada pela retração da massa cefalopodal para o interior da concha, liberação de hemolinfa ou um inchaço com consequente prolongamento de sua massa cefalopodal para fora da concha devido à quebra de equilíbrio osmótico que está sob controle neuro-hormonal (MCCULLOUGH et al., 1980).

Inúmeras substâncias moluscicidas já foram isolados de diversas espécies vegetais e estudos sugerem que tal atividade biológica está relacionada à presença de metabólitos secundários como: flavonoides, alcaloides, terpenoides, saponinas, taninos, esteroides, dentre vários outros. Faz-se necessário compreender o mecanismo de ação desses compostos sobre os moluscos. O perfil fitoquímico do moluscicida auxilia no esclarecimento deste processo, bem como da resposta fisiológica dos caramujos frente a esses constituintes químicos. Porém, apesar de diversas plantas terem sido testadas como possíveis agentes moluscicidas, pouco se sabe sobre seus metabólitos ativos (WHO, 1983; LOPES et al., 2011; CANTANHEDE et al., 2010).

Nas regiões do Brasil de maiores prevalências de esquistossomose, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste, encontram-se plantas que já foram testadas e possuem potencial atividade moluscicida, com destaque para as famílias: Lauraceae (COUTINHO et al., 2007), Fabaceae (DOS SANTOS et al., 2010), Verbenaceae (TELES et al., 2010), Euphorbiaceae (PATEL et al., 2011; PEREIRA et al., 2017), Lamiaceae (SANTOS et al., 2012), Myrtaceae (GUSMAN et al., 2014), Rhizophoraceae (MENDES et al. 2018), e Combretaceae (MENDES et al. 2018).

Além disso, outros estudos buscam o controle integral da doença em compostos bioativos contra as larvas infectantes do *Schistosoma mansoni*, as cercarias, como exemplos: *Euphorbia millii* (CARVALHO, 1998), *Jathropa curcas* (RUG, 2000), *Stryphnodendron polyphyllum* e *Stryphnodendron adstringens* (VINAUD, 2005), *Balanites aegyptiaca* (MOLLA, 2013) *Cinnamomum camphora* L. (YANG et al., 2014).

2.2 Óleos essenciais x controle biológico

O emprego de produtos naturais tem sido amplamente estudado nos últimos tempos com a finalidade de se obter substâncias bioativas, que sejam seguras e eficazes. Há interesse econômico por tais produtos, o que gera estímulo em pesquisadores, instituições de pesquisa e desenvolvimento tecnológico para caracterização e estudo de suas propriedades. Nesse contexto, destacam-se os óleos essenciais (SIMÕES, 2000).

Os óleos essenciais, também chamados óleos éteres ou essências, são produto do metabolismo secundário das plantas, não presentes em todas as espécies, encontrando-se em plantas aromáticas na maioria das vezes em folhas, flores, cascas de caule, rizomas, sementes e frutos. Estes produtos garantem algumas vantagens em relação a sobrevivência e permanência da espécie no ecossistema, importantes na defesa contra microorganismos e predadores, e ainda na atração a polinizadores e proteção contra perda de água (BRUNETON 1991; SIMÕES, 2000).

De acordo com a International Standard Organization, os óleos essenciais são produtos obtidos de parte de plantas por destilação por arraste a vapor com vapor de água, bem como os produtos obtidos por esmagamento dos pericarpos de frutos cítricos. Generalizando são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, em regra odoríferas e líquidas (ISO, 1997).

As técnicas de extração desses óleos podem variar de acordo com sua localização na planta e com a proposta de uso. O rendimento do óleo essencial obtido, independentemente do método de extração utilizado, geralmente é inferior a 1% (SILVEIRA et al., 2012).

Os métodos mais utilizados na obtenção dos óleos essenciais são: enfloração, hidrodestilação, arraste por vapor d'água, prensagem a frio, espremedura, extração por solventes e extração por CO₂ supercrítico.

O método de arraste por vapor d'água é o mais utilizado em todo o mundo, permite obter óleo oriundos de diversas partes do vegetal. Nesse método, o material vegetal, de onde será extraído o óleo, é geralmente moído ou triturado (FÜLLER, 2008). Este processo utiliza uma caldeira para geração de vapor, um extrator (destilador), onde é colocada a matéria-prima a ser extraída, um condensador e um frasco de coleta. O vapor é percolado através do leito de sólidos, no interior do vaso extrator, arrastando o óleo essencial. A mistura vapor-óleo segue então para o

condensador, onde ocorre a mudança de fase. O condensado é alimentado no frasco de coleta, onde ocorre a separação das fases, por diferenças de polaridade, já que os óleos essenciais são apolares ou pouco polares (STEFFANI, 2003). Posteriormente o óleo essencial é envasado em vidro âmbar e mantido em local abrigado de temperaturas elevadas e luminosidade (MACHADO; FERNANDES Jr., 2011).

O método mais utilizado em âmbito laboratorial, é a hidrodestilação, onde o óleo é extraído a partir do contato do material vegetal com a água em ebulição, o vapor força a abertura das paredes celulares e ocorre a evaporação do óleo que está entre as células da planta. O vapor, que consiste na mistura de óleo e água, passa por um condensador, onde ocorre seu resfriamento e, como os componentes voláteis e a água são imiscíveis, ocorre a formação de duas fases líquidas que podem ser separadas (SATOR, 2009; SILVA, 2011).

A enfloração é largamente utilizada por indústrias de perfumes que desejam extrair óleo essencial de pétalas de flores. Essas pétalas são colocadas, em temperatura ambiente, sobre uma camada de óleo fixo, por um certo tempo. O óleo fixo funciona como líquido extrator. As pétalas são substituídas por novas, após esgotadas, até total saturação. Em seguida a gordura é tratada com álcool, e para obter o óleo, o álcool é submetido a destilação em baixa temperatura. A obtenção através dessa técnica é lenta, complexa e possui alto custo, porém o produto obtido possui alto valor comercial (BIASI; DESCHAMPS, 2009).

Na extração por CO₂ supercrítico os aromas naturais de vários tipos e não somente do óleo essencial podem ser recuperados. O produto final fica isento de quaisquer resquícios do solvente, tornando-o mais puro que os obtidos em outros métodos. Para tal extração o CO₂ é inicialmente liquefeito por compressão e, em seguida, aquecido a uma temperatura superior a 31°C. Nessa temperatura, o CO₂ atinge um quarto estado, no qual sua viscosidade é análoga à de um gás, mas sua capacidade de dissolução é elevada como a de um líquido, extraíndo o óleo com perfeição. Uma vez efetuada a extração, o CO₂ retorna ao estado gasoso, resultando na sua total eliminação (MSAADA et al., 2012).

A composição química dos óleos essenciais é de alta complexidade, possuindo grande heterogeneidade de constituintes capazes de desempenhar diversas funções (SIMÕES et al., 2010). Os terpenos, especialmente os monoterpenos e seus análogos, podem ser considerados como os principais compostos (SIMÕES;

SPITZER, 2000) e podem apresentar diversas funções orgânicas, tais como cetonas, aldeídos, álcoois, ésteres, fenóis e hidrocarbonetos (MAIA; ZOGHBI, 1998).

Essa composição química pode diferir significativamente de espécie para espécie, por motivo de fatores fenomenológicos como estágio de desenvolvimento, nutrição e genética do vegetal, e fatores como variação climática, sazonalidade e variações de solo (LIMA; KAPLAN; CRUZ, 2003; CUNHA et al., 2012). Mesmo com a extensa diversidade de compostos químicos, nos óleos essenciais, sempre existem componentes que prevalecem sob os demais, denominados componentes majoritários. A identificação do(s) composto(s) majoritário(s) é de grande valia para o entendimento dos possíveis efeitos biológicos que o óleo essencial em questão possa apresentar, é comumente realizada por técnicas de cromatografia e espectrometria (ADAMS, 2007). Cromatografia gasosa é a técnica mais utilizada rotineiramente em virtude do seu alto poder de diferenciação e por ser um método simples usado para separação e quantificação dos componentes de óleos essenciais, geralmente é utilizada acoplada a algum detector, como um espectro de massa, que quebra e verifica os elementos oriundos do analito (ROBLES, 1998; WEYERSTAHL, 1998; KIRK, 1981; SILVERSTEIN, 2007).

A variabilidade das possibilidades de emprego dos óleos essenciais como matérias-primas funcionais em formulações alimentícias, cosméticas, entre outras, tem despertado interesse do setor industrial. Várias atividades biológicas atribuídas aos óleos essenciais já foram descritas por pesquisas atuais, podendo destacar: atividade antioxidante (MIRANDA et al., 2016), anti-inflamatória (SILVA DE ARAÚJO et al., 2015), larvicida (SANTANA et al., 2015; DIAS et al., 2015), moluscicida (COSTA et al., 2015), cercaricida (MENDES et al., 1990) ratificando a potencialidade das atividades biológicas.

2.2.1 Toxicidade

Ainda que os moluscicidas naturais sejam biodegradáveis, em determinadas concentrações, dentro dos valores exigidos pela OMS, seus derivados podem manifestar riscos. Por esse motivo, faz-se necessário realizar testes que avaliem a toxicidades das plantas potencialmente moluscicidas (LUNA et al., 2005; SANTOS et al., 2007).

A fim de estabelecer a toxicidade de novos moluscicidas naturais, muitos ensaios podem ser utilizados, como o ensaio de letalidade com o microcrustáceo

Artemia salina, que foi desenvolvido para detectar compostos bioativos em extratos vegetais e óleos essenciais. O teste de letalidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* tem-se destacado, pois além de avaliar a toxicidade geral, pode detectar compostos bioativos em extratos vegetais (MEYER et al., 1982). O efeito tóxico analisado neste bioensaio se baseia na mortalidade ou perda de mobilidade dos organismos teste após 48 horas de exposição nas amostras a serem analisadas (MEYER et al., 1982; MACRAE et al., 1988; SAHPAZ et al., 1994).

Também conhecidos como camarões de água salgada, a *Artemia salina*, são microcrustáceos que habitam em lagos ou lagoas salgadas, mares e tanques de salinas de vida marinha, que podem ser observados a olho nu, ou com auxílio de microscópio. Possui quatro estágios de desenvolvimento (ovo, náuplio, metanáuplio e adulto). A implementação e manutenção da cultura de *Artemia salina* possui baixo custo e fácil execução, promovendo um excelente modelo experimental. A *Artemia salina* é largamente conhecida como indicador de toxicidade em um bioensaio (Shrimp test), utilizando-se a concentração média letal (CL₅₀) como parâmetro de avaliação da atividade biológica (toxicidade) de uma substância natural (LOPES et al., 2002).

2.3 *Citrus x limon* (L.) Osbeck

Cerca de 150 gêneros e 1.600 espécies abrangem a família Rutaceae, difundidas amplamente em regiões tropicais, subtropicais e temperadas do mundo, sendo mais abundante na América tropical, Sul da África e Austrália. No Brasil, a família está representada por aproximadamente 29 gêneros e 182 espécies, com algumas de importância medicinal, ecológica e econômica (MELO, 2004). O gênero *Citrus* engloba 70 espécies de subarbustos e arbustos que podem ser cultivadas ou encontradas espontaneamente na Alemanha, Espanha, México, Venezuela, Cuba, Jamaica, Equador, e no Norte e Nordeste do Brasil (KUSTER et al., 2003).

As espécies do gênero *Citrus* são ricas em flavonoides, óleos voláteis, cumarinas e pectinas (KUSTER et al., 2003). A composição química dos óleos voláteis compreende hidrocarbonetos monoterpênicos e sesquiterpênicos, com predominância de limoneno, α – pineno, γ – terpineno, terpinoleno, neral e geranial (GHERLADINI et al., 1999; BISSET; VEKIARI et al., 2012). Inúmeras atividades biológicas, do gênero *Citrus*, já foram comprovadas como podemos evidenciar na tabela 1.

Tabela 1 – Atividades biológicas comprovadas do gênero *Citrus*.

ESPÉCIE EM ESTUDO	AUTORES	ATIVIDADE BIOLÓGICA
<i>Citrus reticulata</i>	CHUTIA et al., 2009	Antifúngico
<i>Citrus limon</i> (L.) Burm. f., <i>Citrus latifolia</i> Tanaka ex Q. Jiménez, <i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle e <i>Citrus</i> <i>limonia</i>	SIMAS et al., 2017	Antifúngico
<i>Citrus limon</i>	EZZAT et al., 2001	Antifúngico
<i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck, <i>Citrus aurantium</i> L., <i>Citrus</i> <i>deliciosa</i> Tenore, <i>Citrus</i> <i>paradisi</i> Macfad, <i>Citrus limon</i> (L.) Burm.f.	CACCIONI et al., 1998	Antifúngico
<i>Citrus spp.</i>	JOHANN et al., 2007	Antimicrobiano
<i>Citrus sinensis</i> , <i>Citrus lemon</i> e <i>Citrus reticulata</i>	ESPINA et al., 2010	Antimicrobiano
<i>Citrus spp.</i>	BENAVENTE; CASTILLO, 2008	Antioxidante
<i>Citrus spp.</i>	SHEN et al., 2012	Antiedêmico
<i>Citrus spp.</i>	WESOLOWSKA et al., 2012	Anti-hiperglicêmico e antitumoral
<i>Citrus aurantium</i>	MENCHERINI et al., 2013	Cardiovascular
<i>Citrus x limon</i> L. Burm. f.	HAMDAN et al., 2013	Anti-inflamatório

A espécie *Citrus x limon* (L.) Osbeck, consiste em um arbusto variando de 2 a 6 metros, apresenta bastante ramos, poucos espinhos e produz frutos durante do ano.

Popularmente conhecido como limão-cravo, é largamente utilizada na medicina popular para bronquite, redução de colesterol, dor de cabeça, emagrecimento, expelir secreção em vias respiratórias, enxaqueca, dores de estômago, garganta, gripe, gripe mal curada, pigarro e tosse. Dados indicam que se constitui como importante antioxidante devido à vitamina C e aos flavonoides encontradas nessa espécie (DER MARDEROSIAN, 2001).

Figura 2 - Partes aéreas e fruto de *Citrus x limon* (L.) Osbeck



Fonte: Dados da pesquisa

Apesar de já existirem dados na literatura em relação a atividade biológica dos óleos essenciais do gênero *Citrus*, ainda não foram realizados experimentos utilizando óleos essenciais de *Citrus x limon* (L.) Osbeck para testar atividade moluscicida e cercaricida. Portanto o presente estudo objetivou caracterizar e quantificar quimicamente os óleos essenciais extraídos das partes aéreas e do epicarpo do fruto de *Citrus x limon* (L.) Osbeck e também avaliar a ecotoxicidade e as atividades moluscicida e cercaricida dos mesmos.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar a atividade moluscicida e cercaricida do óleo essencial extraído das partes aéreas e do epicarpo do fruto da espécie *Citrus x limon* (L.) Osbeck.

3.2 Específicos

Caracterizar a composição química através de Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, do óleo essencial extraído por hidrodestilação das partes aéreas e do epicarpo do fruto da espécie *Citrus x limon* (L.) Osbeck;

Avaliar a atividade moluscicida do óleo essencial das partes aéreas e do epicarpo do fruto da espécie *Citrus x limon* (L.) Osbeck utilizando moluscos adultos de *Biomphalaria glabrata*;

Avaliar a atividade cercaricida do óleo essencial das partes aéreas e do epicarpo do fruto da espécie *Citrus x limon* (L.) Osbeck sobre *Schistosoma mansoni*;

Verificar a toxicidade ambiental do óleo essencial das partes aéreas e do epicarpo do fruto da espécie *Citrus x limon* (L.) Osbeck sobre *Artemia salina*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta das amostras

As partes aéreas e o fruto da espécie *Citrus x limon* (L.) Osbeck foram coletados às oito horas no mês de abril de 2017, em área de cultivo controlado, no bairro do Olho D'água no município de São Luís – MA (21°46'34.0"S 43°21'57.0"W). O material coletado foi armazenado em sacos plásticos e direcionados ao Laboratório de Farmacognosia II da Universidade Federal do Maranhão. Para a extração do óleo essencial a partir das partes aéreas, as folhas e galhos finos foram secos em estufa à 40°C e pulverizadas em moinho de facas, na granulometria de pó grosso (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). O material proveniente do fruto foi obtido com a retirada do seu epicarpo para a posterior extração do óleo essencial. A exsicata contendo os órgãos aéreos e o fruto da espécie vegetal foi confeccionada e enviada ao Herbário do Maranhão (Herbário MAR) pertencente a Universidade Federal do Maranhão – UFMA, para confirmação da identificação botânica e onde encontra-se depositada sob o número 9.727.

4.2 Extração dos óleos essenciais

O material seco e pulverizado das partes aéreas da espécie em estudo foi submetido ao método de hidrodestilação em aparelho de Clevenger para a extração do óleo essencial (BRASIL, 2010).

O epicarpo *in natura* foi triturado e também submetido ao mesmo método para a obtenção do óleo dos frutos.

Os óleos essenciais extraídos foram centrifugados e secos com sulfato de sódio anidro, com auxílio de pipeta Pasteur foram separados e armazenados em ampola de vidro do tipo âmbar, hermeticamente fechada e posteriormente conservados em ambiente refrigerado, entre 5-10°C (COUTINHO, 2006).

Para o cálculo de rendimento dos óleos essenciais obtidos, foi determinado a umidade da amostra em balança de infravermelho, empregando-se o peso em gramas dos materiais vegetal utilizados para extração livre de umidade (BRITO, 2013).

4.3 Análise química dos óleos essenciais de *Citrus x limon* (L.) Osbeck

A identificação química dos compostos dos óleos essenciais foi realizada no Centro Analítico de Instrumentação da Universidade de São Paulo, por Cromatografia

em fase gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) com a injeção de 1 mL (Auto injetor AOC-20i) em sistema Shimadzu QP 2010 ultra equipado com coluna capilar de sílica Rtx-5MS (Restek, EUA) de 30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno revestido com difenil-dimetil-polisiloxano (0,25 µm de espessura do filme). A temperatura do forno do CG foi programa de 60°C a 240°C (10 min) a 3°C/min, as temperaturas do injetor e linha de transferência foram 200°C e a da câmara de ionização 200°C. Hélio foi usado como gás transportador a uma velocidade de 1 mL/min.

Os espectros de massas foram obtidos por impacto eletrônico a 70 eV. A identificação dos componentes foi baseada no tempo, índice de retenção linear e perfil de fragmentação. A interpretação e comparação dos espectros de massas foram obtidos com as bibliotecas Adams 2006, Nist 2011 e FFNSC 2 (ADAMS, 2007).

4.4 Ensaios biológicos

4.4.1 Coleta e identificação de caramujos *Biomphalaria glabrata*

Moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata* foram coletados nos bairros do Sá Viana e Bom Jesus, na cidade de São Luís - MA, por se tratarem de áreas com pouco saneamento básico, possuírem coleções de água parada, luz solar intensa, proliferação de vegetação aquática e também já existirem registros do aparecimento desse molusco e de casos da doença, de acordo com informações da Vigilância Epidemiológica e Sanitária da Secretaria Municipal de Saúde de São Luís-MA (2° 33' 35.1"S 44° 18' 05.3" W).

Após coleta, os moluscos foram mantidos em laboratório, acondicionados em aquários com água desclorada, sob aeração constante, a temperatura de 25°C e sendo alimentados com alface *in natura*. A confirmação da espécie desses animais foi realizada através das análises da morfológica interna e características conquiliológicas (PARAENSE, 1975), no Laboratório de Farmacognosia II da Universidade Federal do Maranhão.

4.4.2 Observação da positividade dos caramujos quanto ao *Schistosoma mansoni*

Os moluscos *Biomphalaria glabrata* foram examinados por aproximadamente trinta dias para verificação de possível positividade ao *Schistosoma mansoni*. Em intervalos de 3 dias eram isolados em grupos de cinco, em recipiente de vidro

contendo 10 mL de água desclorada e expostos à luz e ao calor de lâmpada de 60W, por aproximadamente duas horas, com uma distância de 30 cm, para estimular a liberação das cercárias. (SMITHERS & TERRY, 1974). Para constatar se os caramujos coletados liberaram cercárias de *Schistosoma mansoni* nos recipientes, foi utilizado estereomicroscópio. Os que estavam positivos foram separados e condicionados em potes de vidro devidamente identificados, e os não infectados foram selecionados para os testes de atividade moluscicida.

4.4.3 Ensaio de atividade moluscicida

Os testes foram realizados em triplicata, sob as mesmas condições. Nos experimentos, dez caramujos isentos de infecção por *Schistosoma mansoni* foram expostos, por 24 horas, a diluições dos óleos essenciais em concentrações que variaram de 25 a 100 µg/mL (25 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL e 100 µg/mL), respeitando a relação de 50mL de solução/caramujo. As soluções foram preparadas por dissolução dos óleos essenciais das partes aéreas e do epicarpo do fruto de *Citrus x limon* (L.) Osbeck em água destilada contendo 0,1% de dimetilsulfóxido (DMSO) (WHO, 1983).

Para evitar a fuga dos moluscos em análise, os recipientes utilizados no ensaio foram envolvidos com filme de plástico com pequenas perfurações. Após exposição de 24 horas, os caramujos foram lavados com água desclorada e transferidos para novos frascos contendo apenas água desclorada. A mortalidade foi analisada por até 48 horas, sendo considerados mortos os moluscos que exibiram ausência de contração muscular, extravasamento de hemolinfa e/ou retração massa cafalopodal para dentro da concha (MCCULLOUGH, 1980).

Os resultados foram expressos em função das CL₅₀ e CL₉₀, calculadas por regressão linear, com índice de confiança de 95%. Nos testes foram inclusos grupos de controle positivo, feito com sulfato de cobre (3µL/mL). Grupos de controle negativo utilizando água desclorada com DMSO 0,1% (tensoativo utilizado para diluição dos óleos essenciais).

4.4.4 Bioensaio frente as cercarias de *Schistosoma mansoni*

As cercarias de *Schistosoma mansoni* obtidas no exame de positividade dos caramujos foram capturadas com micropipeta para avaliação da atividade cercaricida dos óleos estudados. Os ensaios consistiram na imersão de 10 cercarias em soluções

aquosas dos óleos a 0,1% de DMSO, nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 µg/mL. O controle negativo foi realizado com a exposição das cercarias a água desclorada juntamente com DMSO. O controle positivo consistiu na mistura de 500 µL de álcool etílico e água com volume final de 2mL de solução. O ensaio foi realizado em triplicata. A observação quanto à morte das cercarias foi executada em 15, 30, 60 e 120 minutos, com auxílio de estereomicroscópio após a exposição aos óleos essenciais das partes aéreas e do epicarpo do fruto de *Citrus x limon* (L.) Osbeck. Os resultados foram expressos em função da CL₅₀, calculadas por regressão linear, com índice de confiança de 95%.

4.4.5 Bioensaio frente *Artemia salina*

Em um aquário contendo 1L de solução salina sintética (60g de sal marinho/litro água mineral) foi adicionado aproximadamente 100 mg de cistos de *Artemia salina* obtidos comercialmente, mantendo-se 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 48h 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 24h, 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, 2016).

O bioensaio de *Artemia salina* seguiu metodologia estabelecida por Meyer (1982), adaptada por Ruiz et al. (2005). Cerca de 10 larvas desse microcrustáceo foram transferidas para um recipiente de 50 mL contendo água artificial do mar, DMSO 0,1% e a substância a ser testada, em sete diferentes concentrações (10, 50, 75, 100, 250, 500 e 1000 µg/mL). Dez larvas na fase metanáuplio foram transferidas para cada um dos frascos com suas respectivas concentrações. O controle negativo consistiu em solução salina sintética mais DMSO 0,1%, já o controle positivo foi realizado com dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇). 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. Os testes foram feitos em triplicata.

4.5 ANÁLISE DOS DADOS

A análise dos dados se baseou no método de Reed-Muench (1938), que compreende que um animal que se mantém vivo em certa dose, também permanecerá vivo em doses inferiores aquela. Consequentemente se o animal que não sobreviver em certa dose, também não sobreviverá em doses superiores aquela. As concentrações letais da espécie em estudo foram expressas em função das CL_{50} e CL_{90} , calculadas por regressão linear, com índice de confiança de 95%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Composição química dos óleos essenciais de *Citrus x limon* (L.) Osbeck

Informações sobre a planta selecionada para o experimento estão sumarizadas na Tabela 2 e compreendem o nome científico e vulgar, a parte utilizada para extração do óleo essencial e o rendimento deste produto.

Tabela 2. Rendimento dos óleos essenciais de *Citrus x limon* (L.) Osbeck.

Espécie	Nome vulgar	Parte da planta utilizada	Rend. óleo (%)*
<i>Citrus x limon</i> (L.) Osbeck	Limão-cravo	Partes aéreas (folhas e galhos finos)	1,67
		Epicarpo (casca do fruto)	1,36

*Volume do óleo em mL/massa da amostra;

Ao extrair óleo essencial da casca fresca da fruta e folhas de *Citrus x limon* L. Burm. f., Hamdan et al. (2013), obteve rendimentos de 2% e 0,2%, respectivamente. Já os rendimentos dos óleos essenciais da casca de *Citrus aurantium* e de *Citrus paradisi* encontrados por Sanei-Dehkordi et al. (2016) foram 0,7 e 0,85%. Os valores de rendimentos dos óleos essenciais de *Citrus x limon* (L.) Osbeck demonstrados nesse estudo encontram-se próximos aos revelados na literatura.

O local e a sazonalidade são fatores importantes para diferentes variedades de plantas com relação aos rendimentos encontrados na literatura (OZCAN; CALCHAT, 2002).

Foi possível identificar 25 constituintes dos óleos essenciais da espécie em estudo, através da caracterização cromatográfica totalizando 99,99% da composição do óleo, demonstrando uma composição complexa. A tabela 3 traz informações sobre os compostos químicos.

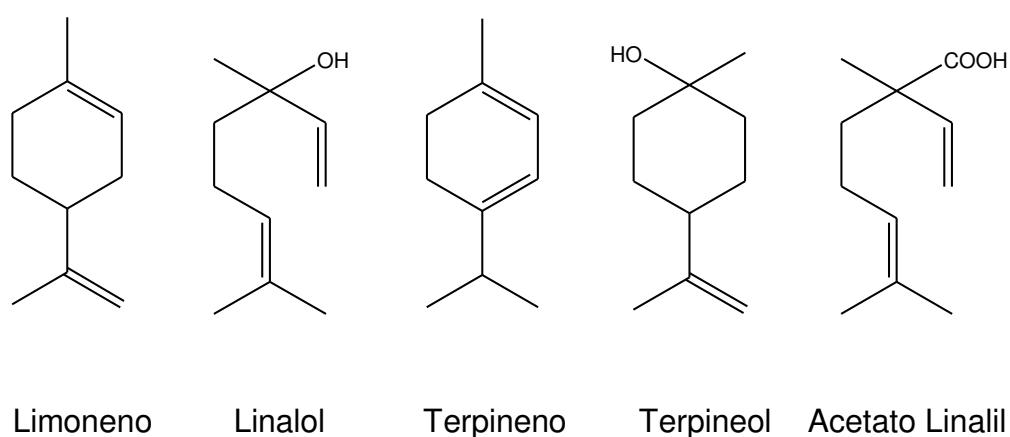
Tabela 3. Composição química dos óleos essenciais de *Citrus x limon* (L.) Osbeck.

Compostos ^a	TR ^b		Abundância relativa (%) ^c	
	*X	*Y	*X	**Y
β – Mirceno	4,372	4,373	3,05	2,26
D – Limoneno	4,938	4,959	3,63	67,51
β – Ocimene	5,026	-	0,88	-
Z – Ocimene	5,181	5,187	2,00	0,15
4 – Carene	5,804	4,770	0,52	0,66
Linalol	5,956	5,931	43,30	9,99
Allo – Ocimene	6,359	-	0,21	-
(R) – Citronelal	6,709	-	0,15	-
L – Terpinol	7,117	7,117	0,11	0,48
α – Terpineol	7,305	7,299	10,12	1,34
Nerol	7,792	7,792	2,13	2,28
Neral	7,987	7,987	0,36	0,56
Acetato Linalil	8,161	-	20,94	-
Geranial	8,391	8,391	0,60	0,76
Mirtanol	9,474	-	0,18	-
Neril acetate	9,625	9,625	4,34	0,35
Geranil acetato	9,875	-	6,71	-
β – Cariofileno	10,488	-	0,48	-
α – Bergamoteno	10,621	10,623	0,09	0,46
β – Bisabolene	11,518	11,519	0,16	0,72
α – Tujene	-	3,552	-	0,22
(R) - α – Pinene	-	3,657	-	0,82
L - β – Pinene	-	4,237	-	0,56
o – Cimene	-	4,883	-	3,26
γ – Terpineno	-	5,369	-	7,61
Total de compostos identificados (%)			99,85%	99,99%

^a Compostos dos óleos essenciais; ^b Tempo de retenção; ^c Calculado a partir das áreas relativas dos picos nos cromatogramas; *X: óleo das partes aéreas de *Citrus x limon* (L.) Osbeck; **Y: óleo do epicarpo do fruto de *Citrus x limon* (L.) Osbeck

A análise revelou que os óleos em estudo possuem composição química similar, embora diferem na proporção entre os seus constituintes individuais. O linalol (43,30%), acetato linanil (20,94%) e o terpineol (10,12%) são os principais constituintes do óleo das partes aéreas, enquanto o limoneno (67,51%), o linalol (9,99%), terpineno (7,61%) predominam no óleo extraído do epicarpo do fruto. Em suma, constitui-se uma mistura de monoterpenos e hidrocarbonetos sesquiterpênicos e seus derivados oxigenados incluindo aldeídos, cetonas, ácidos, álcoois e ésteres (PALAZZOLO et al., 2013).

Figura 3 – Compostos majoritários dos óleos essenciais de *Citrus x limon* (L.) Osbeck.



A análise de óleos essenciais da espécie *Citrus deliciosa* Ten., realizada por Dugo et al. (2010), destacaram como mais elevados os componentes limoneno, 72,71%, terpineno, 18,39%, pineno, pineno e mirceno com cerca de 1,5% cada. Vasudeva & Sharma (2012) identificaram no óleo das cascas de *Citrus limettioides* coletadas em Hisa (Índia) 14 compostos químicos, sendo os majoritários o limoneno (89,08%), o β -mirceno (2,93%) e o linalol (2,92%). Lopes (2013) analisou o óleo essencial das partes aéreas e do epicarpo do fruto de *Citrus limettioides* em três localidades distintas (Campestre, Nova América e Itapuranga no estado de Goiás), o linalol foi o componente majoritário do óleo essencial das partes aéreas (36,88%, 45,15% e 43,41%) e o limoneno o principal componente do óleo da casca dos frutos (75,06%, 75,18% e 70,6%). Handam et al., (2013) também mostrou a predominância do limoneno no óleo da casca do fruto com 52,73% e no óleo das folhas 29,13%.

Embora o limoneno tenha sido anteriormente relatado por Tu et. al. (2012) como sendo o principal constituinte do óleo extraído das folhas de outras espécies de

Citrus, houve níveis significativamente mais baixos desse constituinte no óleo das partes aéreas investigados aqui. Resultados do presente estudo também contrariam o demonstrado por Palazzolo em 2013, que afirma ser o limoneno o principal componente químico do óleo de citros, com variações de teor de 32 a 98%. Com alterações peculiares de 68 a 98% em laranjas, de 45 a 76% em limão e de 32 a 45% em bergamota. Já o linalol, expressa suas frações em concentrações de 0,018, 0,015 e 10,23 em laranjas, limões e bergamota, respectivamente.

A qualidade e quantidade dos óleos essenciais de *Citrus x limon* (L.) Osbeck dependem de muitos fatores, tais como a natureza do fruto em si, origem, genótipo, tipo de solo e clima, como também das condições e técnicas de extração. A composição do óleo pode sofrer variações em relação a peso e volume entre 0,5 e 5,0% (PALAZZOLO et al., 2013). Os metabólitos secundários representam uma interação química entre as plantas e o ambiente, que podem interferir diretamente nas atividades enzimáticas em determinadas espécies e, conseqüentemente, influenciar na biossíntese de metabólitos secundários, incluindo compostos terpênicos (TEIXEIRA et al., 2014).

O composto predominante no óleo do epicarpo do fruto de *Citrus x limon* (L.) Osbeck, o limoneno, é utilizado como matéria-prima na síntese de diversos produtos químicos (SILVA SANTOS et al., 2006) e na agricultura como repelente ao ácaro rajado *Tetranychus urticae* Koch (BOTELHO et al., 2009).

O linalol, composto majoritário do óleo essencial das partes aéreas de *Citrus x limon* (L.) Osbeck já demonstrou, em pesquisas anteriores, atividade anti-inflamatória e antinociceptiva em camundongos, efeito sedativo dose-dependente, ação citotóxica contra linhagem de células leucêmicas e de melanoma murino B16 (HENRIQUES et al., 2009). O linalol quando associado a outras substâncias, como o limoneno, o α -terpineol e o terpinol, proporcionam atividade larvicida contra três espécies de mosquitos (*Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* e *Culex quinquefasciatus*) o que pode representar uma forma de controle desses insetos (TIWARY et al., 2007).

Deve-se considerar todas essas diferenças nos aspectos dos óleos quando se almeja qualquer tipo de correlação entre a composição química e atividade biológica ou efeitos farmacológicos dos óleos. Portanto, quando se tem por finalidade o uso de óleos essenciais voltados para atividade biológica, faz-se necessário um estudo e análise de sua composição química, fundamentais para estimar os compostos

químicos responsáveis pela atividade biológica e compreensão dos compostos ativos, permitindo que os pesquisadores direcionem a sua utilização para diversos fins, tais como o desenvolvimento de produtos para aplicações específicas, como a do presente estudo, em busca de substâncias de plantas com efeito moluscicida.

5.2 Análise moluscicida dos óleos essenciais de *Citrus x limon* (L.) Osbeck em caramujos *Biomphalaria glabrata*

O óleo extraído das partes aéreas da espécie em estudo não apresentou toxicidade sobre os caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* na concentração máxima determinada para ensaios preliminares de avaliação moluscicida (100 µg/mL). Em contrapartida, o óleo do epicarpo do fruto demonstrou atividade moluscicida, com concentrações letais significativas (Tabela 4).

Tabela 4. Concentração letal do óleo essencial extraído do epicarpo do fruto de *Citrus x limon* (L.) Osbeck sobre caramujos *Biomphalaria glabrata*.

Amostra testada	Concentrações letais	
	CL ₅₀ µg/mL	CL ₉₀ µg/mL
<i>Biomphalaria glabrata</i> *	50,04	90,08

*Análise realizada 24h após exposição. No controle negativo, solução de DMSO a 0,1%, não foi evidenciada mortalidade de caramujos expostos. A totalidade dos caramujos expostos a solução com 15µg/mL de sulfato de cobre, controle positivo, apresentou mortalidade.

As concentrações de 50, 75 e 100µg/mL do óleo do epicarpo do fruto de *Citrus x limon* (L.) Osbeck causaram total mortalidade após 24 horas dos caramujos em exposição evidenciado pelo extravasamento de hemolinfa e também pela retração massa cafalopodal para dentro da concha. Na concentração de 25µg/mL houve ausência de mortalidade até as 48h de observação do teste, somente foi identificado uma alteração no comportamento desses organismos, como a diminuição de sua capacidade motora e de alimentação. Essas mudanças comportamentais supõem numa reação própria destes moluscos frente a agente potencialmente nocivo. O potencial de letalidade do óleo sob os caramujos foi se tornando mais efetivo com o

aumento de suas concentrações, presume-se que seja devido ao maior contato dos animais expostos com os componentes presentes no óleo essencial.

Segundo diretrizes da WHO (1983), uma planta com propriedade moluscicida é considerada ativa se ocasionar 90% de mortalidade, em concentrações de até 100µg/mL. No presente estudo o óleo extraído do epicarpo do fruto de *Citrus x limon* (L.) Osbeck apresentou CL₉₀ de 90,08µg/mL. Dessa forma, a espécie foi considerada moluscicida com atividade significativa, conforme as normas da Organização Mundial de Saúde.

Fernandes em 2011, em experimento com *Citrus limon* L^{íneo}, exibiu resultados que corroboram os aqui demonstrados, com total letalidade dos moluscos nas concentrações de 50 e 75µg/mL.

A interação da composição e atividade, via de regra, indica que a atividade biológica de um óleo pode ser conferida tanto a seus compostos majoritários presentes ou está associada a outros compostos que, mesmo concentrações inferiores, podem apresentar-se ativos ou devido ao sinergismo dos constituintes presentes no óleo (LAHLOU, 2004).

Conseguir determinar a real interação do composto químico presente nos óleos essenciais e a atividade biológica apresentada tornam mais promissoras o alcance de novos agentes moluscicidas mais ativos, seletivos e biodegradáveis (MATOS ROCHA, 2013), faz-se necessário também a busca de possíveis atividades biológicas dos seus compostos isolados para assim esclarecer os constituintes bioativos presentes nestes óleos. Comumente as propriedades biológicas dos óleos essenciais são intimamente relacionadas com seus componentes majoritários, no entanto a hipótese de ação sinérgica dos mesmos também precisa ser considerada (BAKALLI et. al. 2008).

O mecanismo de ação dos produtos naturais com potencial moluscicida ainda é desconhecido. A OMS (1993) sugere que tais produtos, podem afetar mais de um sistema desses animais. Dados de pesquisas anteriores referem que agentes moluscicidas podem inibir os batimentos cardíacos do caramujo e assim causar inchaços nos tecidos, modificar o equilíbrio osmótico e alterar o nível de cloreto nos neurônios dos moluscos, atingindo o transporte de bicarbonato e provocando uma elevação na excitabilidade neuronal (MCCULLOUGH et al. 1980; ADEWUNMI; ADESOGAN, 1986).

5.3 Análise dos óleos essenciais de *Citrus x limon* (L.) Osbeck frente a cercarias de *Schistosoma mansoni*

Os óleos essenciais extraídos das partes aéreas e do epicarpo do fruto de *Citrus x limon* (L.) Osbeck demonstraram atividade sobre as cercarias de *Schistosoma mansoni*, com concentrações letais significativas (Tabela 5).

Tabela 5. Concentração letal dos óleos essenciais das partes aéreas e do epicarpo do fruto de *Citrus x limon* (L.) Osbeck sobre cercarias de *Schistosoma mansoni*.

Óleos essenciais	Epicarpo	Partes aéreas
	CL ₅₀ µg/mL	CL ₅₀ µg/mL
Cercárias de <i>Schistosoma</i> <i>mansoni</i>	1,05	1,33

Em quinze minutos de exposição às diferentes concentrações dos óleos de *Citrus x limon* (L.) Osbeck, as cercarias apresentaram uma taxa de mortalidade de 100% sob 100µg/mL e 75µg/mL de ambos os óleos. Após trinta minutos, a concentração de 50µg/mL do óleo do epicarpo do fruto atingiu 100% mortalidade, enquanto a mesma concentração do óleo das partes aéreas apresentou redução para 75%. Os óleos essenciais, na concentração de 25ppm, tiveram sua capacidade de mortalidade sobre as cercarias diminuídas. As cercarias do controle positivo mantiveram-se vivas por aproximadamente 36 horas. A CL₅₀ do óleo essencial do epicarpo do fruto (1,05) foi menor que a do óleo das partes aéreas (1,33), demonstrando superioridade na capacidade cercaricida. Ambos os óleos apresentaram atividade larvicida sobre cercarias em concentrações baixas (100, 75, e 50µg/mL), próximas daquelas indicadas pela OMS (WHO, 1997).

Tem crescido o interesse acerca de um produto natural bioativo sobre as formas larvais de *Schistosoma mansoni*. Alguns experimentos já foram realizados (SCALBERT 1991, CARVALHO et al. 1998, SILVA et al. 2005, MAIA, 2002), porém, poucos ressaltam a atividade de plantas cítricas no combate as formas infectantes do parasito. Tal atividade, pode originar indicadores da possibilidade do controle

integrado da esquistossomose, já que as formas larvais deste parasito compartilham o mesmo ambiente que seu hospedeiro intermediário.

Carvalho et al. (1998) comprovou a atividade larvicida de *Euphorbia milii* sobre miracídios e cercárias. Porém, plantas da família Euphorbiaceae, como *Euphorbia milii* e *Jathropa curcas*, contêm em sua composição, substâncias irritantes e indutoras da formação de tumores. Em pesquisa realizada por Ahmed & Rifaat (2004), *Acanthus mollis* apresentaram atividade larvicida sobre cercárias em baixas concentrações. Ahmed & Ramzy (1997) em estudo da planta *Solanum nigrum*, conhecido popularmente por “erva-moura”, apresentou atividade cercaricida num período de 30 minutos numa concentração de 30µg/mL. Semelhante aos resultados encontrados em nosso trabalho, em que se observou atividade cercaricida em menos de uma hora.

Algumas substâncias sintéticas vêm sendo testadas com a finalidade de combater as cercárias. Repelentes de insetos como o N,N-dietil-mtoluamida (DEET), também foram testados quanto a sua atividade no controle de cercárias *in vitro* e no combate à infecção em camundongos. Eficiência larvicida foi detectada em ambas as situações (NEGM et al. 2004). A niclosamida foi testada contra cercarias de *Schistosoma japonicum* na China mostrando eficácia na concentração de 0,25ppm. Como empecilho, essas substâncias oferecem grande impacto ambiental, por serem tóxicas para peixes nas concentrações usadas (LOWE et al. 2005).

5.4 Avaliação dos óleos essenciais de *Citrus x limon* (L.) Osbeck frente *Artemia Salina*

A OMS, possuem valores normatizados que teoricamente recomendam um limite para que os efeitos tóxicos que possam ser causados por compostos presentes no vegetal sejam mínimos em organismos não-alvo. Logo, quão menor for a concentração da dose letal (90-100% de letalidade dos caramujos), melhores serão as condições de uso desses compostos no meio ambiente, e uma menor quantidade do material será utilizada (MOREIRA et al., 2010).

A avaliação frente *Artemia salina* é utilizado para determinar o potencial tóxico ou eficiência biológica de produtos naturais. Segundo Nguta (2012), os produtos são classificados com base nos níveis de CL₅₀ frente *Artemia salina*. Para esse autor, extratos vegetais ou óleos essenciais com CL₅₀ < 80 µg/mL são altamente tóxicos, os

que apresentam CL_{50} entre 80 $\mu\text{g/mL}$ e 250 $\mu\text{g/mL}$ são moderadamente tóxicos e os óleos com $CL_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$ possuem baixa toxicidade ou são considerados atóxicos.

De acordo com essa avaliação os óleos essenciais de *Citrus x limon* (L.) Osbeck, foram classificado como moderadamente tóxico, devido aos valores de CL_{50} obtidos, menores que 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 6).

Tabela 6. Concentrações letais dos óleos essenciais das partes aéreas e do epicarpo da espécie *Citrus x limon* (L.) Osbeck sobre *Artemia salina*.

Óleos essenciais	CL_{50} <i>Artemia salina</i>
Partes aéreas	93,36
Epicarpo	96,81

A toxicidade com *Artemia salina* manifesta boa correlação com atividades antitumoral, inseticida (MEYER et al., 1982; MCLAUGHLIN et al., 1995) e anti-*Trypanosoma cruzi* (ALVES et al., 2000) para substâncias com $CL_{50} < 10^3 \mu\text{g/mL}$. Os ensaios sobre *Artemia salina* também podem ser utilizados para expressar a segurança de óleos essenciais ou produtos de origem vegetal com atividade moluscicida, pois indica a possibilidade de toxicidade frente a organismos não-alvos, como peixes e pequenos crustáceos, que ocorrem no mesmo local dos caramujos. A moderada toxicidade, como demonstrada pelas concentrações letais dos óleos essenciais de *Citrus x limon* (L.) Osbeck, pode ser considerada uma característica relevante para utilização de produtos de origem vegetais como óleos essenciais em ambientes naturais para controle da população de caramujos e de larvas infectantes do *Schistosoma mansoni*.

6 CONCLUSÃO

No presente estudo foi possível obter a composição química dos óleos essenciais da espécie em estudo e avaliar sua relação com as atividades biológicas realizadas. O óleo essencial do epicarpo do fruto de *Citrus x limon* (L.) Osbeck demonstrou-se ativo contra *Biomphalaria glabrata* e cercarias de *Schistosoma mansoni*. Já o óleo essencial das partes aéreas de *Citrus x limon* (L.) Osbeck mostrou-se ativo somente sobre cercarias de *Schistosoma mansoni*.

Quanto aos ensaios de toxicidade realizados com *Artemia salina*, observou-se que os óleos essenciais revelaram efeito moderadamente tóxico, menos tóxico que o moluscicida comercial sintético Bayluscide.

Dessa forma, os óleos essenciais em experimento exibem potencial para utilização em criadouros artificiais, como valas e esgotos a céu aberto.

As informações aqui descritas vêm reforçar a importância dos produtos naturais como fonte renováveis de novos compostos bioativos. Faz-se necessário estudos adicionais de toxicidade, pesquisas complementares a fim de isolar e identificar os compostos ativos presentes nos óleos em estudo e também pesquisas para a formulação de produtos com finalidade de uso em campo.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Extrair óleos essenciais das partes aéreas e do epicarpo do fruto de *Citrus x limon* (L.) Osbeck, utilizando diferentes técnicas de extração e verificar possíveis alterações na sua composição química;

Realizar ensaios de estabilidade com os óleos essenciais em estudo;

Isolar e avaliar a atividade moluscicida, cercaricida e toxicidade dos compostos majoritários e minoritários dos óleos essenciais;

Realizar ensaios de atividade moluscicida, cercaricida e toxicidade com os óleos essenciais em diferentes condições;

Formulação de um produto para uso em áreas periurbanas.

REFERÊNCIAS

- AHMED, A. H; RAMZY, R. M.. Laboratory assessment of the molluscicidal and cercaricidal activities of the Egyptian weed, *Solanum nigrum* L. Ann. **Tropical Medicine Parasitology**. 1997; v. 91, p. 931-7.
- AHMED, A. H.; RIFAAT, M. M. Molluscicidal and cercaricidal efficacy of *Acanthus mollis* and its binary and tertiary combinations with *Solanum nigrum* and *Iris pseudacorus* against *Biomphalaria alexandrina*. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**. 2004; v. 34, p. 1041-1050.
- ABNT NBR 16530. Ecotoxicologia Aquatica – Toxicidade Aguda – Método De Ensaio Com *Artemia SP* (Crustácea Brachiopoda). 2016.
- ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**, Allured, Carol Stream, I11, USA, 4TH EDITION, 2007.
- ADEWUNMI, C. O.; ADESOGAN, E. K. Toxicology of some Nigerian plants used in schistosomiasis control. The effect of molluscicides on molluscan hearts. **Fitoterapia**, v. 57, p. 353-358, 1986.
- ALVES et al. **Biological Screening of Brazilian medicinal plants**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 95, p. 367-373, 2000.
- AMARAL, R. S. do. et al. Vigilância e controle dos moluscos de importância médica. In: BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: diretrizes técnicas: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE)**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.
- ARCHIBALD, R. G. The use of the three *Balanites aegyptiaca* in the controlo f schistosomiasis in the Sudan. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 1933; v. 27, p. 207-210.

BAKKALI, F. et. al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, 2008; v. 46, n. 2, p. 446-475.

BARBOSA, C. S. et al. Os moluscos transmissores. **Guia para vigilância e controle da esquistossomose: práticas de laboratório e campo**. Recife: Editora Universitária da Universidade Federal de Pernambuco, 2008. p. 27 – 37.

BARBOSA, C. S.; GOMES, E. C. S.; NETO, O. B. L. **Manual prático para o diagnóstico e controle da esquistossomose**. 2 ed, v. 1, Recife: Editora Universitária, 2012. 126p.

BARRETO, M. L. et al. **Sucessos e fracassos no controle de doenças infecciosas no Brasil**: o contexto social e ambiental, políticas, intervenções e necessidades de pesquisa. **The Lancet**, p. 47-60 2011. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/artigos/artigo_saude_brasil_3.pdf

BENAVENTE-GARCIA, O. CASTILLO. J. Update on uses and properties of Citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. **Journal Agricultural Food Chemistry**. 2008; 56, p. 6185 – 6205.

BIASI, Luiz A; DESCHAMPS, Cícero. Plantas aromáticas: do cultivo à produção de óleo essencial. Curitiba: Layer Studio Gráfico e Editora Ltda., 2009. 106p.

BOTELHO, P. S. et. al. Composição química e ação repelente do óleo essencial da laranja lima (*Citrus aurantium* L.) sobre o ácaro rajado *Tetranychus urticae* Koch. Recife: UFRPE; 2009.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. 7. ed. rev., Brasília: Ministério da Saúde, 2008. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doencas_infecciosas_guia_bolso_7ed_2008.pdf Acesso em março de 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Sistema nacional de vigilância em saúde – Relatório de situação – Maranhão**/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 5. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 35p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Plano integrado de ações estratégicas de eliminação da hanseníase, filariose, esquistossomose e oncocercose como problema de saúde pública, tracoma como causa de cegueira e controle das geohelmintíases: plano de ação 2011-2015**. 1. ed., 1. reimpr. Brasília: Ministério da Saúde, 2013. 100p.: l1. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano_integrado_acoes_estrategicas_hanseníase

BRASIL. Farmacopeia Brasileira 5ª ed., volume 1, 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: **ANVISA** , 2010; 2: 546.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Vigilância da Esquistossomose Mansoní: diretrizes técnicas**. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 144 p.: l1.

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

BRITO, M.C.A. Estudo botânico, químico, avaliação da citotoxicidade e atividade

antimicrobiana de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, frente ao óleo essencial da espécie *Eugenia patrisii* vahl. Trabalho de conclusão de curso, Farmácia, Universidade Federal do Maranhão, 2013, 46 f.

BRUNETON, J. Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. Zaragoza: Editorial Acribia, 1991.

CACCIONI, D. R. et. al. Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. **Intinternational Journal Food Microbiology**, v. 43, p. 73-9, 1998.

CANTANHEDE, S. P. D. et al. Atividade moluscicida de plantas: uma alternativa profilática. **Revista Brasileira Farmacognosia**. Curitiba, v.20, n. 2, p. 282 – 288, maio 2010. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v20n2/a24v20n2.pdf>> Acesso em março 2017.

CANTANHEDE, S. P. D. et al. Freshwater gastropods of the Baixada Maranhense Microregion, an endemic area for schistosomiasis in the State of Maranhão, Brazil: I – qualitative study. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** Uberaba, 2014; v. 47, n. 1, p. 79-85. Disponível em< http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822014000100079> Acesso em março 2017.

CARDIN, L. L. **Caracterização das áreas de risco para a esquistossomose mansônica no município Lauro de Freitas, Bahia**. Dissertação. Salvador: Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária, 2010.

CARVALHO, R. R. et. al. 1998. Effects of *Euphorbia milii* latex on *Schistosoma mansoni* eggs, miracidia and cercariae. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz** (Suppl I), p. 235-237, 1998.

CARVALHO, O.S; COELHO; P.M.Z; LENZI, H.L. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: **FIOCRUZ**, 2008. 20^a ed., cap. 11.

CARVALHO, C. A. de. et al. Cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus* miers-Bignoniaceae): Estudo fitoquímico e toxicológico envolvendo *Artemis salina*. **Revista Eletrônica de Farmácia**. 2009; Vol 6(1), p. 51-58.

CHIFUNDERA, K.; BALUKU, B.; MASHIMANGO, B. Phytochemical screening and molluscicidal potency of some zairean medicinal plants. **Pharmacological Research**, v. 28, n. 4, p. 8-12, 1993.

CHITSULO L., ENGELS D., MONTRESOR A., SAVIOLLI L. The global status of schistosomiasis and its control. **Acta Tropica**. 2000; 77: 41-51.

CHUTIA, M. et. al.. Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. **LWT – Food Sci Technol**, v. 42, p. 777-80, 2009.

CIMERMAN, B. & CIMERMAN, S. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. 2^a ed. Atheneu Editora, 2005; 390 p.

CORACHAN, M. Schistosomiasis and international travel. **Clinical Infectious Diseases**. 2002; v. 35, p. 446-450.

COSTA, A.V.; et al. 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 medicinais**. 2015 v.17 n.4 supl.1.

COSTA, J. F. O, et al. Immunomodulatory and antibacterial activities of extracts from Rutaceae species. **Revista Brasileira Farmacognosia**. 2010; v. 20, n. 4, p. 502-5.

COUTINHO, D. F. et al. A composition of molluscicidal activity of the essential oil from the stem bark of *Ocotea bracteosa* (Meisn.) Mez. **The Journal of Essential Oil Research**, v. 19, p. 482-484, 2007.

COUTINHO, D.F.; Revisão de Terpenóides de Lauraceae e Estudo Farmacobotânico e de Óleos Essenciais de Espécies do Gênero *Ocotea* Aubl., **Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Universidade Federal da Paraíba, UFPB, Brasil.)**, 266p. João Pessoa. 2006.

CUNHA, L.A.D.; GUEDES, S.A.G. Prevalência de esquistossomose mansônica na cidade de Nossa Senhora do Socorro, Sergipe, 2001-2006. **Ideias & Inovação**. 01(01): 41-48, 2012.

DER MARDEROSIAN, 2001. The review of natural products: The most complete source of natural products information. Saint Louis: Facts and Comparisons.

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

DOS SANTOS, A. F. et al. Toxicity of some glucose/mannose-binding lectins to *Biomphalaria glabrata* and *Artemia salina*. **Bioresource technology**, v. 101, n. 2, p. 794-798, 2010.

DUGO, P. et al. Analytical characterization of mandarin (*Citrus deliciosa* Ten.) essential oil. **Flavour and Fragrance Journal**. 2010 v. 26, p. 34- 46.

ESPINA, L. SOMOLINOS, M.LÓRAN, S. CONCHELLO, P. GARCIA, D. PAGÁN, R. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. **Food Control**. June 2011, 22: p. 896-902.

EZZAT, S. M. *In vitro* inhibition of *Candida albicans* growth by plant extracts and essential oils. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 2001; 17: p. 757-759.

FERNANDES, R P. 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. Universidade Federal da Paraíba, 2011.

FÜLLER, T. N.; 2008. Caracterização fenotípica, fitoquímica e molecular de populações de *Elionurus* sp. Humb. & Bonpl. ex Willd (capim-limão). Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Faculdade de Agronomia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2008.

GRYSEELS, B.; POLMAN, K.; CLERINX, J.; KESTENS, L. **Human Schistosomiasis**. Lancet, 2006; v. 368, p. 1106-1118.

GUSMAN, G. S.; VIEIRA, L. R.; VESTENA, S. Atividade alelopática e moluscicida de *Syzygium aromaticum* (L.) MERR. & PERRY (MYRTACEAE). **Evidência-Ciência e Biotecnologia**, v. 14, n. 2, p. 113-128, 2014.

HAMDAN, D. ASHOURB M., L., MULYANINGSIH, S, EL-SHAZLYA, A. WINKC, M. Chemical Composition of the Essential Oils of Variegated Pink-Fleshed Lemon (*Citrus x limon* L. Burm. f.) and their Anti-Inflammatory and Antimicrobial Activities. **Zeitschrift Naturforsch.** 2013; 68 c, p. 275 – 284.

HENRIQUES, A. T. Et al. Óleos essenciais: importância e perspectivas terapêuticas. Ijataí: Editora Univali; 2009.

HUGGINS DW, MEDEIROS LB, QUINTAS LEM, et al. Tratamento. In: Huggins DW, Siqueira-Batista R, Medeiros LB, et al. (editores). **Esquistossomose mansoni**. São Paulo: Grupo Editorial Moreira Jr; 1998. p. 93-9. 27.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Aromatic natural raw materials – Vocabulary: **ISO – 9235**. Geneva, 1997. 8p.

JOHANN S., OLIVEIRA V., PIZZOLATTI M. G., SCHRIPEMA J., BRAZ-FILHO R., BRANCO A., AND SMANIA JR. A. Antimicrobial activity of wax and hexane extracts from *Citrus spp.* peels. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**. 2007; 102, p. 681 – 685.

KIRK, A.; OTHMER, B. **Encyclopedia of Chemical Technology**. 3 ed. v. 16, p. 307-332, 1981.

LAMBERTUCCI, J. R.; Treatment of the acute (toxaemic) phase of schistosomiasis with oxaminiquine. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene. 1988; 82(2):350-1.

LAMBERTUCCI, J. R.; SERUFO, J. C. Esquistossomose mansônica. In LCC Gayotto, VAF Alves (eds), **Doenças do Fígado e Vias Biliares**. Atheneu, São Paulo, 2011; p. 815-835.

LAHLOU, M. Study of the molluscicidal activity of some phenolic compounds: structure-activity relationship. **Pharmaceutical Biology**. 2004; v. 42, p. 258.

LENZI, H. L. et al. 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.

LIMA, H. R. P., M. A. C. KAPLAN & A. V. M. CRUZ. Influence of abiotic factors on terpenoids production and variability in the plant. **Floresta e Ambiente**. 2003; 10: 71-77.

LOPES, W. B.; MORONI, F. T.; BRANDEBURGO, M. I. H.; HAMAGUCHI, A. Desenvolvimento de um método alternativo ao uso de animais de laboratório para

avaliação da toxicidade de extratos vegetais. **Revista online da PROPP**.
Uberlândia, 2002; v. 1.

LOPES, E. L. et al. Flavanóides e sesquiterpenos de *Croton pedicellatus* Kunth.
Química Nova, v. 35, n. 11, p. 2168, 2012.

LOPES, T. C. et al. Avaliação moluscicida e perfil fitoquímico das folhas de *Caryocar brasiliense* Camb. **Revista Cadernos de Pesquisa**, v. 18, n. 13, p. 23-30, 2011.

LOPES, L. T. A.; et al. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial e anatomia foliar e caulinar de *Citrus limettoides* Tanaka (Rutaceae).
Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. 2013; v. 34, n. 4, p. 503-511.

LOWE, D. Transport of *Schistosoma japonicum* cercariae and the feasibility of niclosamide for cercariae control. **Parasitol Internat**, v. 54, p. 83-89, 2005.

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

MACHADO, B. F. M. T.; FERNADES Jr., A. Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. **Cadernos Acadêmicos**. 2011; v. 3, n. 2, p. 105-127.

MACRAE, W. D. et al. **Journal of Ethnopharmacology**, 1988; v. 22, p. 143.

MAHMOUD, A. A. F. **Esquistossomose e outras infecções por trematódeos**. In: Fauci AS, Braunwdd E, Kasper DL, et al. (editors). Harrison Medicina Interna. 17^a ed. Vol. 1. Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 2008. p. 1330-6.

MAIA, J. G. S.; ZOGHBI, M. das G. B.; **Óleos essenciais da Amazônia: inventário da flora aromática**, In: Tópicos especiais em Tecnologias de Produtos Naturais,

Coordenadores FARIA, L. J. D. de; COSTA, C. M. L.; NUMA/POEMA/UFPA, Série POEMA n. 7, p. 129 e 133, Belém, 1998.

MAIA, J. G. S. et al. **Plantas Aromáticas na Amazônia e Seus Óleos Essenciais**. 1. ed., v. 1, Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 2002.

MARQUES, D. P. A. **Monitoramento da inserção do patrimônio genético de *Biomphalaria tenagophila* do Taim (RS), linhagem resistente ao *Schistosoma mansoni* após a sua introdução em uma área endêmica para esquistossomose no município de Bananal/SP, com transmissão mantida por *B. tenagophila***. 2012. 119f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Centro de Pesquisa René Rachou, Belo Horizonte, 2012.

MARTINS-MELO, F R. PINHEIRO, M C C. RAMOS JR, A N. ALENCAR, C H. BEZERRA, F S M. HEUKELBACH, J. Spatiotemporal Patterns of Schistosomiasis-Related Deaths, Brazil, 2000-2011. **Emerging Infectious Diseases**, 2015; v. 21, p. 1820 – 1823.

MARSTON A, HOSTETTMANN K. **Plant molluscicides. Phytochemistry**. 1985; 24: 639-52.

MALTA, R. C. S. et al. Molluscicidal activitys of compounds isolated from *Euphorbia conspicua* N. E. Br. **Journal of Brazil Chemical Society**, v.22, n. 10, p.188, 2011.

MATOS ROCHA, T. J. Estudo do efeito moluscicida de espécies vegetais em embriões e caramujos adultos de *Biomphalaria glabrata* SAY, 1818 (GASTROPODA, PLARNOBIDAE). **Revista de Patologia Tropical**. 2013; v. 42, n. 2. Disponível em <<https://www.revistas.ufg.br/iptsp/article/view/25524/14674>>

MCLAUGHLIN, J. L. et al. **In Studies in Natural Products Chemistry, Vol. 9, Ed. Atta-ur-Rahman, Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam, p. 383-409, 1995.**

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

MENCHERINI T., CAMPONE L., PICCINELLI A. L., MESA M. G., SÁNCHEZ D. M., AQUINO R. P., RASTRELLI L. HPLC-PDA-MS and NMR characterization of a hydroalcoholic extract of *Citrus aurantium* L. var. *amara* peel with antiedematogenic activity. *J. Agric. Food Chem.* 2013; 61, p. 1686 – 1693.

MENDES, N. M.; ARAÚJO, N.; SOUZA, S. P.; PEREIRA, J. P.; KATZ, N. Atividade moluscicida e cercaricida de diferentes espécies de *Eucalyptus*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 1990; 23(4): p. 197-199.

MENDES, R. J. A. Evaluation of molluscicidal activity of three mangrove species (*Avicennia schaueriana*, *Laguncularia racemosa* and *Rhizophora mangle*) and their effects on the bioactivity of *Biomphalaria glabrata* Say, 1818. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**. São Paulo, 2018; 60:e7.

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

MELO, M.F.F.; ZICKEL, C.S. Os gêneros *Zanthoxylum* L. e *Esenbeckia* Kunth (Rutaceae) no Estado de Pernambuco, Brasil. *Acta Botânica Brasileira*, v.18, n.1, p.73-90, 2004.

MILLEZI, A. F. et al. Caracterização química e atividade bacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Plantas medicinais**. 2014; v. 16, n. 1, p. 18-24. Disponível em < <http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v16n1/a03v16n1.pdf>>

MIRANDA, C. A. S. F. et al. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. **Revista Ciências Agronômica**. Fortaleza, 2016. v. 47, n. 1, p. 2013-220. Disponível em < <http://www.scielo.br/pdf/rca/v47n1/0045-6888-rca-47-01-0213.pdf>>

MOLLA, E. et al. Laboratory assessment of the molluscicidal and cercariacidal activities of *Balanites aegyptiaca*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2013; 3(8): 657-662

MORAIS, L. M. F.; CONCEIÇÃO, G. M.; NASCIMENTO, J. M. Família Myrtaceae: análise morfológica e distribuição geográfica de uma coleção botânica. **Agrarian Academy**, Centro Científico Conhecer – Goiânia, v. 1, n. 01, p. 317, 2014.

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

MOUNTFORD, A. P. Immunological aspects of schistosomiasis. **Parsite Immunol.** 2005; v. 27, n. 7/8, p. 243-246.

MSAADA, K. et al. Compariosn of Different Extraction Methods for the Determination of Essential oils and related compounds from Coriander (*Coriandrum sativum* L.). **Acta Chimica**. 2012; v. 59, p. 803-813.

NEVES, D.P. et al. *Parasitologia Humana* - 11ªed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

NEVES, D.P. et al. *Parasitologia Humana* - 11ªed. São Paulo: Editora Atheneu, 2010.

NEGM, A. Y. Effect of topical agents on cercariae of *Schistosoma mansoni*. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**. 2004; v. 34, p. 900-913.

NGUTA, et al. Evaluation of Acute Toxicity of Crude Plant Extracts from Kenyan Biodiversity using Brine Shrimp, *Artemia salina* L. (Artemiidae). **The Open Conference Proceedings Journal**, v. 3, p. 30-34, 2012.

NIST, **Mass Spectral Library** (NIST/EPA/NIH), National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, Md, USA, 2005.

NOYA, O.; KATZ, N.; POINTIER, J. P.; THERON, A.; NOYA, B. A. Schistosomiasis in America. In: FRANCO-PAREDES, C.; SANTOS-PRECIADO, J. I. **Neglected Tropical Diseases – Latin America and the Caribbean**. Springer-Verlag Wien, 2015. p. 11 – 43.

OZCAN, M.; CALCHAT, J. C. Essential oil composition of *Ocimum basilicum* L. And *Ocimum minimum* L. In Turkey. **Czech Journal of food Sciences**. 2002; v. 20, n. 6, p. 223-228.

OLIVEIRA, D.S. da; *Inquérito Malacológico para Identificar a Célula de Expansão da Esquistossomose Mansônica na Vila Embratel, um Bairro de Periferia de São Luís do Maranhão*. Cad. Pesq., São Luís, v. 20, n. especial, julho 2013.

PALAZZOLO, E.; LAUDICINA, V. A; GERMANÀ, M. A. Current and Potential Use of Citrus Essential Oils. **Current Organic Chemistry**, v. 17, p. 3042-3049, 2013.

PARAENSE, W. L. Autofecundação e fecundação cruzada em *Australorbis glabratus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 53, p. 277-284, 1955.

PARAENSE, W. L. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. **Arquivo Museu Nacional**, Rio de Janeiro, v. 55, p. 105-128, 1975.

PARAENSE, W. L. A survey of Planorbid Molluscs in the Amazonian region of Brazil'. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 1983; 78(3):343-61.

PATEL, A. et. al. Stable Molluscicide Formulation of na Aqueous Extract of *Euphorbia myrsinites*. **Phytotherapy Research**. 2011; v. 25, p. 1412-1414.

PEPE, M. S. **Identificação de populações de Biomphalaria (Gastropoda:Planorbidae) na região sul do Rio Grande do Sul, Brasil.**

Dissertação (Mestrado em Parasitologia)-Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006; 79 f.

PEREIRA, L. P. L. A. et. al. Molluscicidal effect of *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns latex on *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* host snail. **Revista Instituto Medicina Tropical** São Paulo; 59: e85; 2017.

PINTO, C.; ALMEIDA, A. F. Um novo método para a profilaxia da esquistossomose mansoni. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 1944; v. 40, n. 3, p. 291-311.

POVISNKE, L. F.; PRESTES, A. F. R. O. Esquistossomose no Vale do Ribeira/SP: incidência e prevenção – levantamento literário. **Saúde em Foco**, 2012, p. 21-9.

PRATA, A. Comemoração do centenário da descoberta do *Schistosoma mansoni* no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 2008; v. 41; n. 6, p. 689-691.

RAMOS JÚNIOR AN, SIQUEIRA-BATISTA R, HUGGINS DW, et al. Perspectivas. In: Huggins DW, Siqueira-Batista R, Medeiros LB, et al. (editores). Esquistossomose mansoni. São Paulo: Grupo Editorial Moreira Jr; 1998.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method estimating fifty per cent end-points. **Amer. J. Hyg.** 1938; 27: 493-7. Y, L. **Parasitologia: Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan AS, 2001.

REY, L. **Parasitologia: Parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

RESENDES, A P da C et al. Hospitalization and mortality from mansoni schistosomiasis in the State of Pernambuco, Brazil, 1992/200. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 2005; v. 21, p. 1392-1401.

ROBLES, C. **Essential Oil Composition of *Cistus Albidus* Leaves.**

Phytochemistry, v. 48, n. 8, p. 1343-1345, 1998.

ROZEMBERG, B. Saneamento rural em áreas endêmicas de esquistossomose: experiência e aprendizagem. **Ciência e Saúde Coletiva.** 1998; v, 3, p. 125-141.

RUG, M.; RUPPEL, A. Toxic activities of the plant *Jatropha curcas* against intermediate snail hosts and larvae of schistosomes. **Tropical medicine International Health.** 2000 Jun;5(6):423-30.

RUIZ, A. L. T. G. et al. Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (Cyperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 98-102, 2005.

SAHPAZ et al. **Planta médica**, p. 538, 1994.

SANEI-DEHKORDI, A.; SEDAGHAT, M. M.; VATANDOOST, H.; ABAI, M. R. Chemical Compositions of the Peel Essential Oil of *Citrus aurantium* and Its Natural Larvicidal Activity against the Malaria Vector *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) in Comparison with *Citrus paradisi*. **Journal Arthropod-Borne Dis.** December 2016, 10(4): 577–585.

SANTANA, H. T. et al. Essential oils of leaves of *Piper* species display larvicida activity against the dengue vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.** Botucatu, 2015; v. 17, n. 1, p. 105-11. Disponível em < <http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v17n1/1983-084X-rbpm-17-01-00105.pdf>>

SANTOS, A. F. et al. The lethality of *Euphorbia conspicua* to adults of *Biomphalaria glabrata*, cercaria of *Schistosoma mansoni* and larvae of *Artemia salina*. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 135-139, 2007.

SANTOS, A. de M.; MELO, A. C. F. L. Prevalência da esquistossomose num povoado do Município de Tutóia, Estado do Maranhão. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Uberaba, 2011; v. 44, n. 1, p. 97-99.

SANTOS, E. A. et al. Bioactivity evaluation of plants extracts used in indigenous medicine against the snail, *Biomphalaria glabrata*, and the larvae of *Aedes aegypti*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-9, 2012.

SANTOS, N. C. et al. Toxicidade e avaliação de atividade moluscicida de folhas de *Turnera ulmifolia* L. **Revista Brasileira de Biociência**. 2010; p. 324-329.

SARTOR, R. B. **Modelagem, Simulação e Otimização de uma Unidade Industrial de Extração de Óleos Essenciais por Arraste a Vapor**. 2009. Dissertação (Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos). Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, v. 30, p. 3875-3883, 1991.

SHEN W., XU Y., AND LU Y. Inhibitory effects of *Citrus* flavonoids on starch digestion and antihyperglycemic effects in HepG2 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 2012; 60, p. 9609 – 9619.

SILVA SANTOS, A. et. al. A participação da indústria óleo-citrícola na balança comercial brasileira. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 8, p. 8-13, 2006.

SILVA, J. M. C.; RYLANDS, A. B.; FONSECA, G. A. B. O.; Destino das áreas de endemismo da Amazônia. **Megadiversidade**, Belo Horizonte, 2005; v. 1, n. 1, p. 124-131.

SILVA, M. G. F.; Atividade antioxidante e antimicrobiana in vitro de óleos essenciais e extratos hidroalcoólicos de manjerona (*Origanum majorana* L.) e manjeriço (*Ocimum basilicum* L.). 2011. 70 f. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2011.

SILVA FILHO, C. R. M. da et al. Avaliação da bioatividade dos extratos de cúrcuma (*Cúrcuma longa* L., Zingiberaceae) em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata*.

Revista Brasileira de Farmacognosia. 2009; v. 19. n. 4, p. 929-923. Disponível em < <http://www.scielo.br/pdf/bjps/v50n4/1984-8250-bjps-50-04-00885.pdf>>

SILVA DE ARAÚJO, S. et al. Prospecção de patentes biotecnológicas com óleo essencial em microemulsão como agente anti-inflamatório **GEINTEC – Gestão, Informação e Tecnologias**, v. 5, n. 2, p. 2058-2065, 2015. Disponível em < <http://www.revistageintec.net/index.php/revista/article/view/885>>

SILVERSTEIN, R. M. et al. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora, 2007.

SIMAS, D. L. R. AMORIM, S. H. B. M. GOULART, F. R. V. ALVINO, C. S. ALVINO, D. S. SILVS, J. R. Citrus species essential oils and their components can inhibit or stimulate fungal growth in fruit. **Industrial Crops and Products**. 2017; 98: p. 108-115.

SMITHERS, S. R.; TERRY, R. Boletim da Organização Mundial de Saúde. **Journal. Immunology of schistosomiasis**. 1974; v. 51, p. 553-595.

SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NO, VALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agentes. **Current Opinion Biotechnology**. 2012; v. 23, n. 2, p. 136-141.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia**. Porto Alegre: UFRGS, 2000.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.

TEIXEIRA, J. P. F. et al. Caracterização de óleos essenciais em fruto de nove genótipos de tangerine. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 25, n. 1, p. 1-10, 2014.

SILVEIRA, J. C et al. Levantamento e análise de métodos de extração de óleos essenciais. **Enciclopédia Biosfera**. Centro Científico Conhecer. Goiânia, 2012, v. 8, n. 15.

SIQUEIRA-BATISTA R, GOMES AP. Antimicrobianos: guia prático. 2ª ed. Rio de Janeiro: Rubio; 2010.

STEFFANI, E. Modelagem matemática do processo de extração supercrítica de óleo essencial de Ho-Sho (*Cinnamomum camphora* Nees & Eberm var. *linaloolífera* Fujita) Utilizando CO₂. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

TELES, T. V. et al. 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**. v. 9, n. 51, p. 8800, 2010. Disponível em < http://www.academicjournals.org/article/article1380726500_Teles%20et%20al.pdf>

TIBIRIÇA, S. H. C. et al. A esquistossomose mansonii no contexto da política de saúde brasileira. **Ciência Saúde coletiva**, Rio de Janeiro, v. 16, supl. 1, p. 1375-1381, 2011. Disponível em < <http://www.scielo.br/pdf/csc/v16s1/a72v16s1.pdf>>

TIWARY, M. et. al. Chemical composition and larvicidal activities of the essential oil of *Zanthoxylum armatum* DC (Rutaceae) against three mosquito vectors. **Journal of Vector Borne Diseases**. 2007; v. 44, p. 198-204.

TU, N.T. et al. Volatile constituents of Vietnamese pummelo, orange, tangerine and peels oils. *Flavour and Fragrance Journal*, v.17, n.3, p.169-74, 2002.

VASUDEVA N, SHARMA T. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Citrus limettioides* Tanaka. *J Pharm Technol Drug Res*. 2012 ;1:1-7.

VINAUD, M. C. Avaliação da atividade larvícida de plantas fitoterápicas do cerrado do gênero *Stryphnodendron spp.* sobre miracídios e cercárias de *Schistosoma mansoni*. **Revista**

de Patologia Tropical. 2005; vol. 34 (2): 137-143.

WESOŁOWSKA O., WIŚNIEWSKI J., ŚRODA-POMIANEK K., BIELAWSKA-POHL A., PAPROCKA M., DUŚ D., DUARTE N., FERREIRA M. U., AND MICHALAK K. Multidrug resistance reversal and apoptosis induction in human colon cancer cells by some flavonoids present in Citrus plants. **Journal of Natural Products**. 2012; 75, p. 1896 – 1902.

WEYERSTAHL, P. et al. **Volatiles Constituents of Eugenia Uniflora Leaf. Oil**. Planta médica. p. 546-549, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Memoranda: molluscicide screening and evaluation**. Bulletin of the World Health Organization, v. 33, p. 567-576, 1965.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Report of the Scientific working Group on Plant Molluscicide & Guidelines for evaluation of plants molluscicides**. Geneva, 1983.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Division of Vector Biology and Control. Data sheet on pesticides nº 63: niclosamide**. Geneva: 1988.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The control of schistosomiasis: second report of the WHO Expert Committee**. Geneva: World Health Organization, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Vector Control - Methods for Use by Individuals and Communities**, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **WHO Policy perspectives on medicines: medicina tradicional – necesidades crecientes y potencial.** Geneva, 2002.

YANG et al. Linalool, derived from *Cinnamomum camphora* (L.) Presl leaf extracts, possesses molluscicidal activity against *Oncomelania hupensis* and inhibits infection of *Schistosoma japonicum*. **Parasites & Vectors.** 2014, 7:407.

YI, Z. et al. In vitro antioxidant and antimicrobial activities of the extract of *Pericarpium Citri Reticulatae* of a new Citrus cultivar and its main flavonoids. **LWT – Food Sci Technol**, v. 4, p. 597-603, 2008.

ANEXOS

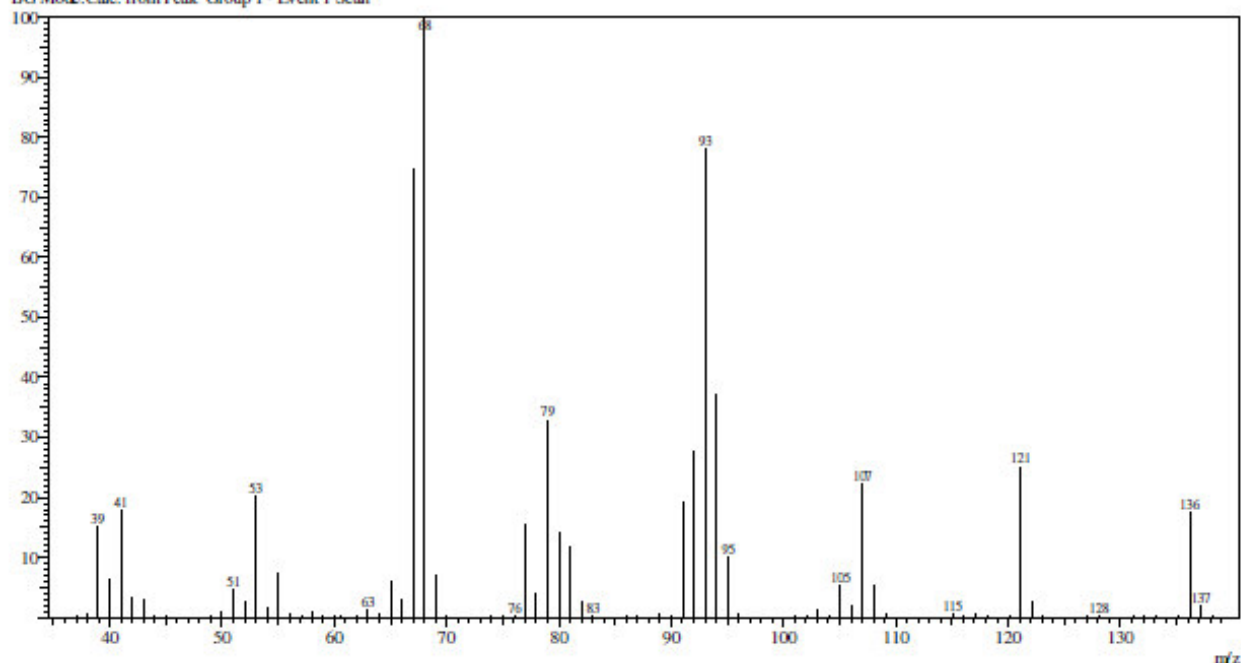
ANEXO 1 – Espectro do primeiro composto majoritário do óleo essencial do epicarpo do fruto de *Citrus x limon* (L.) Osbeck – LIMONENO.

Peak#:7 R.Time:4.959(Scan#:296)

MassPeaks:79

RawMode:Averaged 4.950-4.967(295-297)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Mass Table

Peak#:7 R.Time:4.958(Scan#:296)

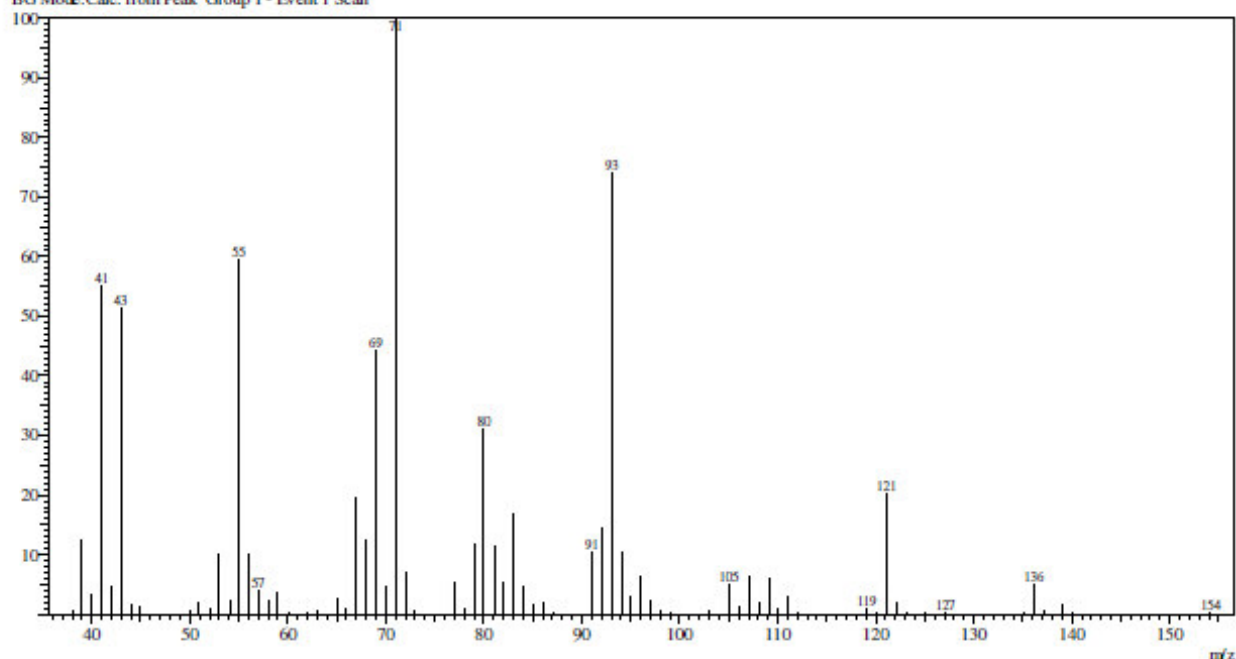
MassPeaks:79

Group 1 - Event 1 Scan

#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.
1	37.00	0.11	21	58.95	0.37	41	82.05	2.47	61	109.10	0.46
2	38.00	0.62	22	59.95	0.10	42	83.05	0.14	62	115.05	0.68
3	38.95	15.16	23	60.65	0.10	43	86.00	0.05	63	116.05	0.16
4	40.00	6.17	24	62.00	0.35	44	87.00	0.07	64	117.05	0.39
5	41.00	17.88	25	63.00	1.32	45	89.00	0.39	65	118.10	0.06
6	42.00	3.15	26	64.00	0.43	46	90.05	0.23	66	120.15	0.26
7	43.00	2.98	27	65.00	5.96	47	91.05	19.17	67	121.10	25.12
8	44.00	0.12	28	66.05	3.03	48	92.05	27.75	68	122.10	2.50
9	45.00	0.09	29	67.00	74.79	49	93.05	78.17	69	123.10	0.12
10	45.85	0.02	30	68.05	100.00	50	94.05	37.10	70	127.05	0.04
11	49.05	0.03	31	69.05	7.00	51	95.05	10.04	71	128.05	0.07
12	50.00	1.04	32	70.05	0.24	52	96.05	0.68	72	129.05	0.02
13	51.00	4.44	33	74.00	0.17	53	101.05	0.03	73	131.10	0.04
14	52.00	2.58	34	75.00	0.17	54	102.05	0.17	74	132.10	0.09
15	53.00	20.17	35	76.05	0.26	55	103.05	1.13	75	133.10	0.05
16	54.00	1.61	36	77.00	15.51	56	104.05	0.37	76	135.15	0.29
17	55.00	7.29	37	78.00	3.77	57	105.05	5.35	77	136.15	17.43
18	56.00	0.39	38	79.00	32.90	58	106.10	1.80	78	137.15	1.95
19	57.05	0.36	39	80.05	13.94	59	107.05	22.23	79	138.15	0.10
20	58.00	0.77	40	81.05	11.74	60	108.10	5.41			

ANEXO 2 – Espectro do segundo composto majoritário do óleo essencial do epicarpo do fruto de *Citrus x limon* (L.) Osbeck – LINALOL.

Peak#:11 R.Time:5.931(Scan#:413)
MassPeaks:72
RawMode:Averaged 5.925-5.942(412-414)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Mass Table

Peak#:11 R.Time:5.933(Scan#:413)

MassPeaks:72

Group 1 - Event 1 Scan

#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.
1	38.05	0.45	19	60.05	0.16	37	83.05	16.74	55	108.05	1.72
2	38.95	12.50	20	62.00	0.16	38	84.05	4.69	56	109.10	6.09
3	40.00	3.14	21	63.00	0.43	39	85.05	1.55	57	110.10	0.76
4	41.00	55.05	22	65.00	2.59	40	86.05	1.74	58	111.05	2.83
5	42.00	4.49	23	66.00	0.98	41	87.05	0.06	59	112.10	0.21
6	42.95	51.32	24	67.00	19.57	42	91.00	10.38	60	119.05	0.98
7	44.00	1.60	25	68.00	12.31	43	92.05	14.37	61	120.15	0.19
8	45.00	1.10	26	69.00	44.31	44	93.05	73.96	62	121.10	20.19
9	50.00	0.47	27	70.05	4.72	45	94.05	10.26	63	122.10	2.01
10	50.95	1.75	28	71.00	100.00	46	95.05	2.87	64	123.10	0.31
11	52.00	0.87	29	72.00	7.10	47	96.05	6.37	65	125.10	0.37
12	53.00	9.95	30	73.00	0.71	48	97.05	2.23	66	127.10	0.31
13	54.05	2.10	31	77.00	5.44	49	98.05	0.73	67	135.15	0.13
14	55.00	59.37	32	78.00	0.82	50	99.10	0.30	68	136.10	4.94
15	56.00	9.91	33	79.00	11.90	51	103.05	0.41	69	137.15	0.62
16	57.00	4.00	34	80.00	31.11	52	105.05	5.09	70	139.10	1.53
17	58.00	2.16	35	81.05	11.28	53	106.05	1.19	71	140.15	0.14
18	59.00	3.70	36	82.05	5.34	54	107.05	6.44	72	154.15	0.13

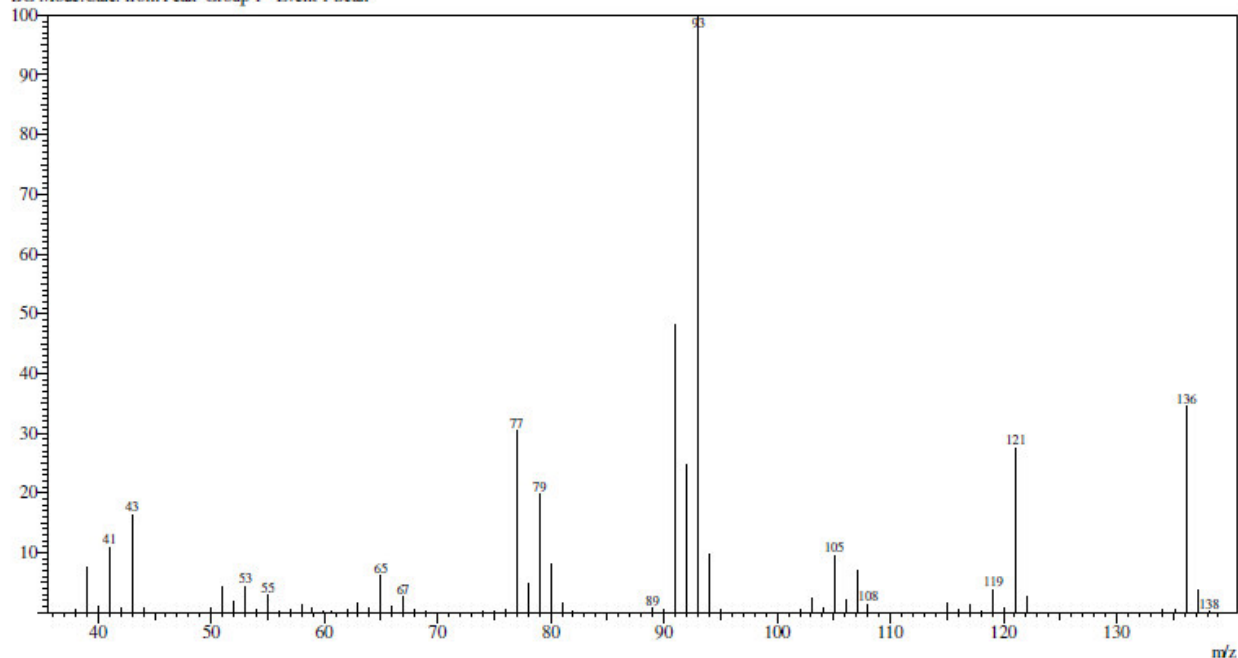
ANEXO 3 – Espectro do terceiro composto majoritário do óleo essencial do epicarpo do fruto de *Citrus x limon* (L.) Osbeck – TERPINENO.

Peak# 9 R.Time:5.369(Scan#:345)

MassPeaks:64

RawMode:Averaged 5.358-5.375(344-346)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Mass Table

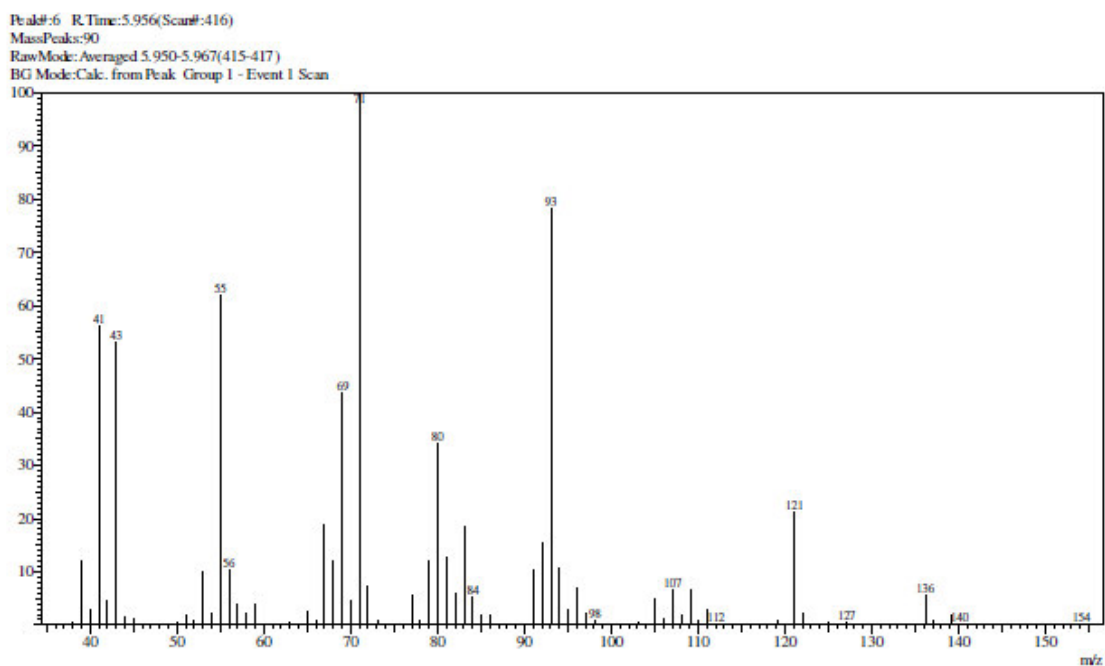
Peak# 9 R.Time:5.367(Scan#:345)

MassPeaks:64

Group 1 - Event 1 Scan

#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.
1	38.00	0.37	17	58.85	0.72	33	79.00	19.71	49	107.05	7.05
2	38.95	7.42	18	59.85	0.13	34	80.00	8.15	50	108.05	1.40
3	40.00	1.12	19	60.60	0.14	35	81.05	1.49	51	109.10	0.05
4	41.00	10.98	20	62.00	0.37	36	82.00	0.11	52	115.05	1.47
5	42.00	0.62	21	63.00	1.57	37	89.00	0.72	53	116.05	0.34
6	43.00	16.37	22	64.00	0.60	38	90.05	0.36	54	117.05	1.32
7	44.00	0.62	23	65.00	6.16	39	91.00	48.18	55	118.10	0.20
8	49.95	0.83	24	66.00	0.96	40	92.05	24.70	56	119.10	3.81
9	50.95	4.19	25	67.00	2.58	41	93.05	100.00	57	120.15	0.67
10	52.00	1.76	26	68.00	0.55	42	94.05	9.65	58	121.10	27.53
11	53.00	4.38	27	69.00	0.30	43	95.05	0.58	59	122.10	2.76
12	54.00	0.42	28	74.00	0.15	44	102.05	0.41	60	134.10	0.54
13	55.00	2.94	29	75.00	0.23	45	103.05	2.43	61	135.15	0.43
14	55.95	0.13	30	76.05	0.38	46	104.05	0.82	62	136.15	34.51
15	56.95	0.59	31	77.00	30.46	47	105.05	9.59	63	137.15	3.78
16	57.95	1.40	32	78.00	4.79	48	106.05	2.15	64	138.15	0.19

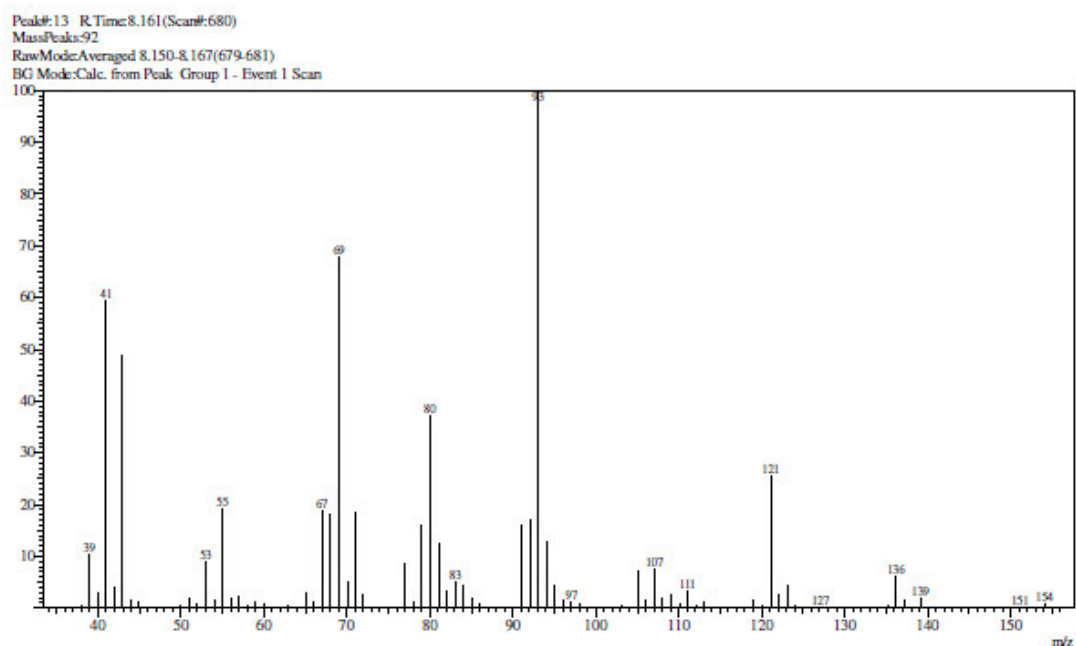
ANEXO 4 – Espectros do primeiro composto majoritário do óleo essencial das partes aéreas de *Citrus x limon* (L.) Osbeck – LINALOL.



Mass Table
Peak#-6 R.Time:5.958(Scan#:416)
MassPeaks:90
Group 1 - Event 1 Scan

#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.
1	37.00	0.08	24	60.00	0.19	47	84.05	5.13	70	111.05	2.99
2	38.05	0.41	25	61.00	0.08	48	85.05	1.68	71	112.05	0.28
3	38.95	12.12	26	62.00	0.21	49	86.05	1.94	72	115.05	0.08
4	40.00	3.00	27	63.00	0.40	50	87.05	0.16	73	117.05	0.11
5	41.00	56.28	28	64.05	0.11	51	89.00	0.04	74	119.10	0.99
6	42.00	4.56	29	65.00	2.48	52	90.05	0.07	75	120.15	0.28
7	42.95	53.10	30	66.00	0.99	53	91.05	10.44	76	121.10	21.22
8	44.00	1.61	31	67.00	18.88	54	92.05	15.33	77	122.10	2.07
9	45.00	1.16	32	68.00	11.93	55	93.05	78.14	78	123.10	0.33
10	46.00	0.04	33	69.05	43.74	56	94.05	10.81	79	124.10	0.04
11	47.00	0.06	34	70.05	4.70	57	95.05	2.97	80	125.10	0.41
12	48.00	0.11	35	71.00	100.00	58	96.05	6.92	81	126.10	0.12
13	49.00	0.02	36	72.00	7.29	59	97.05	2.33	82	127.10	0.33
14	50.00	0.48	37	73.05	0.69	60	98.05	0.78	83	134.10	0.09
15	51.00	1.76	38	74.00	0.07	61	99.05	0.31	84	135.15	0.19
16	52.00	0.87	39	76.05	0.06	62	103.05	0.41	85	136.15	5.53
17	53.00	10.07	40	77.00	5.48	63	104.15	0.10	86	137.10	0.79
18	54.05	2.18	41	78.00	0.82	64	105.05	4.90	87	138.15	0.07
19	55.00	61.81	42	79.00	12.16	65	106.05	1.14	88	139.10	1.78
20	56.00	10.39	43	80.00	34.16	66	107.05	6.53	89	140.10	0.16
21	57.00	4.05	44	81.05	12.68	67	108.10	1.79	90	154.10	0.17
22	58.00	2.24	45	82.05	5.94	68	109.10	6.45			
23	59.00	3.81	46	83.05	18.51	69	110.10	0.74			

ANEXO 5 – Espectros do segundo composto majoritário do óleo essencial das partes aéreas de *Citrus x limon* (L.) Osbeck – ACETATO LINALIL.



Mass Table

Peak#:13 R.Time:8.158(Scan#:680)

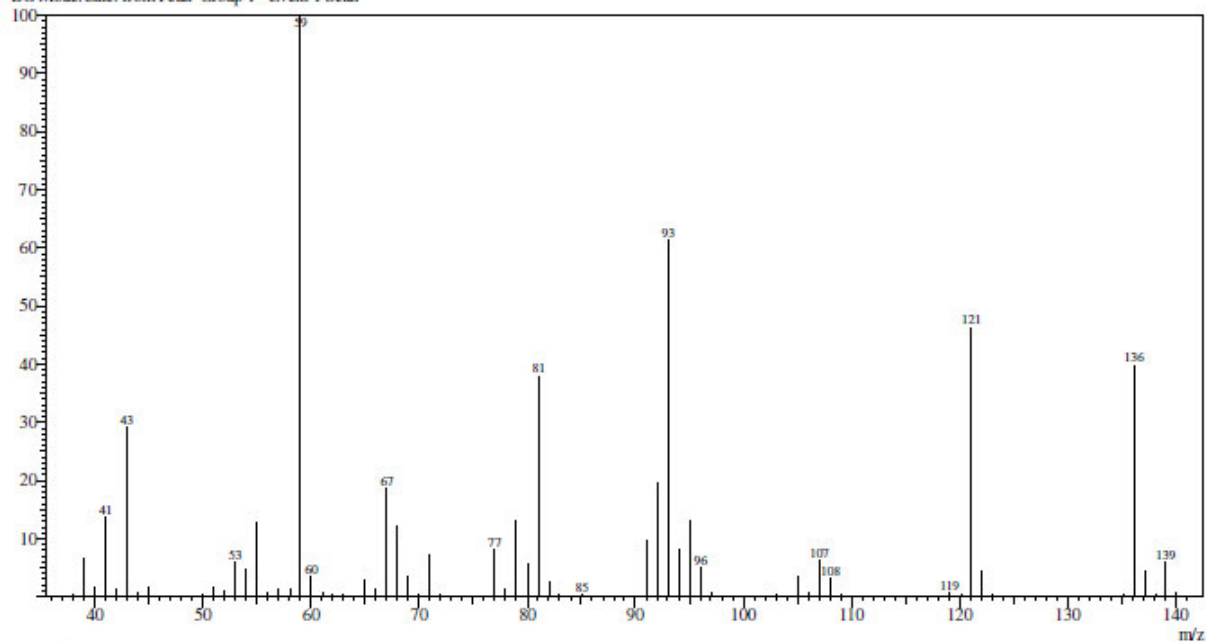
MassPeaks:92

Group 1 - Event 1 Scan

#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.
1	35.95	0.10	24	63.00	0.42	47	89.00	0.08	70	114.05	0.23
2	37.00	0.05	25	64.05	0.13	48	90.05	0.10	71	115.05	0.18
3	38.05	0.33	26	65.00	2.79	49	91.00	15.98	72	117.10	0.19
4	38.95	10.28	27	66.00	1.11	50	92.05	16.99	73	119.05	1.42
5	40.00	2.78	28	67.00	18.90	51	93.05	100.00	74	120.15	0.44
6	41.00	59.48	29	68.00	18.19	52	94.05	12.77	75	121.10	25.60
7	42.00	3.97	30	69.05	67.95	53	95.05	4.29	76	122.10	2.65
8	42.95	48.72	31	70.05	5.04	54	96.05	1.38	77	123.10	4.38
9	43.95	1.41	32	71.00	18.58	55	97.05	1.11	78	124.10	0.50
10	44.95	1.02	33	72.00	2.60	56	98.05	0.84	79	125.10	0.24
11	49.95	0.43	34	73.00	0.20	57	99.05	0.17	80	126.10	0.13
12	50.95	1.73	35	76.05	0.09	58	101.05	0.02	81	127.10	0.27
13	52.00	0.96	36	77.00	8.52	59	103.05	0.60	82	134.10	0.10
14	53.00	8.93	37	78.00	1.29	60	104.15	0.16	83	135.15	0.36
15	54.05	1.37	38	79.00	15.83	61	105.05	7.20	84	136.15	6.02
16	55.00	19.20	39	80.00	36.97	62	106.05	1.54	85	137.15	1.36
17	56.00	1.92	40	81.05	12.49	63	107.05	7.53	86	138.15	0.18
18	57.00	2.19	41	82.05	3.28	64	108.05	1.80	87	139.15	1.83
19	58.00	0.57	42	83.05	5.14	65	109.10	2.54	88	140.15	0.19
20	59.00	1.25	43	84.05	4.34	66	110.10	0.83	89	151.10	0.10
21	60.00	0.68	44	85.05	2.01	67	111.05	3.20	90	153.10	0.11
22	61.00	0.22	45	86.05	0.68	68	112.10	0.57	91	154.10	0.78
23	62.00	0.12	46	87.05	0.08	69	113.05	1.00	92	155.10	0.09

ANEXO 6 – Espectros do terceiro composto majoritário do óleo essencial das partes aéreas de *Citrus x limon* (L.) Osbeck – TERPINEOL.

Peak#:10 R.Time:7.305(Scan#:578)
 MassPeaks:69
 RawMode:Averaged 7.300-7.317(577-579)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Mass Table
 Peak#:10 R.Time:7.308(Scan#:578)
 MassPeaks:69

Group 1 - Event 1 Scan											
#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.
1	38.00	0.25	19	60.00	3.40	37	82.05	2.60	55	109.05	0.47
2	38.95	6.60	20	61.05	0.71	38	83.00	0.41	56	111.10	0.11
3	40.00	1.54	21	62.00	0.36	39	84.05	0.20	57	115.00	0.16
4	41.00	13.59	22	62.95	0.50	40	85.05	0.32	58	117.05	0.17
5	42.00	1.29	23	64.05	0.11	41	89.00	0.10	59	119.10	0.79
6	42.95	29.24	24	65.00	2.81	42	91.00	9.68	60	120.15	0.34
7	43.95	0.81	25	66.00	1.16	43	92.05	19.66	61	121.10	46.30
8	44.95	1.60	26	67.00	18.50	44	93.05	61.29	62	122.10	4.55
9	49.95	0.36	27	68.00	12.07	45	94.05	8.01	63	123.10	0.53
10	50.95	1.65	28	69.00	3.48	46	95.05	12.97	64	135.15	0.28
11	52.00	0.87	29	69.95	0.49	47	96.05	5.13	65	136.15	39.78
12	53.00	6.00	30	71.00	7.13	48	97.05	0.67	66	137.15	4.58
13	54.00	4.68	31	72.00	0.46	49	103.05	0.36	67	138.15	0.30
14	55.00	12.73	32	77.00	8.16	50	104.05	0.04	68	139.10	5.84
15	56.00	0.78	33	78.00	1.37	51	105.05	3.57	69	140.10	0.56
16	57.00	1.34	34	79.00	13.22	52	106.05	0.77			
17	58.05	1.22	35	80.00	5.79	53	107.05	6.26			
18	59.00	100.00	36	81.05	37.95	54	108.05	3.25			