

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

**EDILENE CARVALHO GOMES RIBEIRO**

**ATIVIDADE MOLUSCICIDA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS  
AROMÁTICAS DA REGIÃO AMAZÔNICA MARANHENSE**

SÃO LUÍS

2016

**EDILENE CARVALHO GOMES RIBEIRO**

**ATIVIDADE MOLUSCICIDA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS  
AROMÁTICAS DA REGIÃO AMAZÔNICA MARANHENSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente / UFMA, para obtenção do título de Mestre em Saúde e Ambiente.

Orientadora: **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Denise Fernandes Coutinho Moraes**

SÃO LUÍS  
2016

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Ribeiro, Edilene Carvalho Gomes.

Atividade moluscicida de óleos essenciais de plantas aromáticas da região Amazônica maranhense / Edilene Carvalho Gomes Ribeiro. - 2016.

89 p.

Orientador(a): Denise Fernandes Coutinho Moraes.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Saúde e Ambiente/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2016.

1. Caramujos. 2. Controle. 3. Esquistossomose. 4. Óleo essencial. I. Moraes, Denise Fernandes Coutinho. II. Título.

**EDILENE CARVALHO GOMES RIBEIRO**

**ATIVIDADE MOLUSCICIDA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS  
AROMÁTICAS DA REGIÃO AMAZÔNICA MARANHENSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente / UFMA, para obtenção do título de Mestre em Saúde e Ambiente.

São Luís – MA, 26/ 07/ 2016.

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Profa. Dra. Denise Fernandes Coutinho Moraes (UFMA)**  
Orientadora

---

**Prof. Dra. Flávia Maria Mendonça do Amaral (UFMA)**  
Examinadora

---

**Profa. Dra. Ivone Garros Rosa (UFMA)**  
Examinadora

---

**Profa. Dra. Selma Patrícia Diniz Cantanhede (UEMA)**  
Examinadora

## *Dedico*

A minha família, em especial a meus pais, Maria Renilde, Edilson Gomes e Valdirene Gomes, pelo amor, carinho e confiança. E a minha irmã, Gleycka Cristine, pelo companheirismo, e sorrisos que me apoiaram nesta fase cumprida...

Ao meu esposo Paulo Roberto Flexa Ribeiro, pelo grande apoio, compreensão, respeito, pela serenidade e amor a mim destinado.

A vocês, meu sincero amor e eterno agradecimento...

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por se fazer presente em tudo que faço e por permitir eu realizar este trabalho.

À minha orientadora, professora Dra. Denise Fernandes Coutinho Moraes, pela oportunidade, receptividade, atenção e ensinamentos científicos.

A todos os professores do Mestrado Saúde e Ambiente que contribuíram em minha formação e por tudo que acrescentaram ao meu saber.

Ao professor Dr. Odair Monteiro (Laboratório de óleos essenciais - UFMA) pela contribuição na coleta das espécies estudadas e obtenção dos óleos essenciais.

Ao professor Dr. José Guilherme Soares Maia (Laboratório de óleos essenciais - UFPA) pela contribuição com as análises químicas dos óleos essenciais.

Ao professor Dr. Ricardo Luvizotto (Laboratório de Ecotoxicologia - UFMA) pelo fornecimento da infraestrutura para a realização dos testes toxicológicos com peixes.

À minha amiga e irmã Gleycka Cristine pela paciência e ajuda na identificação morfológica dos caramujos.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Farmacognosia, Antonio Leite, Tássio Rômulo, Samara Araújo, Daniela Patrícia, Tasso Ramom, Maria Cristiane e Talita Amorin, pela companhia, bons momentos de divertimento e muita ajuda, tanto nas coletas em campo quanto atividades laboratoriais.

Ao casal Ludmila e Will pela ajuda e disponibilidade no decorrer deste trabalho.

Aos amigos da turma 11 do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente, em especial a Clícia Nino, Caio Pavão e Marcelo Gonçalves, obrigada pelo carinho, conversas, aprendizado, momentos divertidos, companheirismo e grande oportunidade de convívio.

A secretaria e coordenação do Mestrado em Saúde e Ambiente pelo suporte administrativo prestado e dedicação com que trabalham para a melhoria do programa.

Aos membros da banca examinadora de qualificação e defesa, pelas correções e sugestões para a melhoria do trabalho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão (FAPEMA) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro da pesquisa desenvolvida.

Aos que contribuíram para o meu saber, que apoiaram e confiaram na minha capacidade...

... Obrigada!

**“Porque o Senhor é quem dá a sabedoria; e de sua boca é que procedem a ciência e a prudência”. (Provérbios 2:6)**

## RESUMO

**“Atividade moluscicida de óleos essenciais de plantas aromáticas da região Amazônica maranhense”.** A esquistossomose é uma das doenças endêmicas mais importantes e difundidas no mundo com ocorrência intimamente vinculada a precárias condições socioambientais. O parasito responsável por essa doença, *Schistosoma mansoni*, necessita da participação de caramujos do gênero *Biomphalaria* para completar seu ciclo de vida. Segundo a Organização Mundial de Saúde, uma das formas de combate da esquistossomose é através do controle malacológico, interrompendo o ciclo biológico do helminto responsável pela doença. Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade moluscicida de óleos essenciais de cinco plantas aromáticas com ocorrência na Amazônia maranhense, bem como caracterizar a composição química dos óleos essenciais e sua ação tóxica a organismos não alvo, a fim de apontar uma alternativa viável e sustentável para o controle da esquistossomose, doença endêmica em vários estados brasileiros incluindo o estado do Maranhão. Os óleos essenciais foram extraídos de partes aéreas de espécies vegetais coletadas no Parque Nacional das Nascentes do Rio Parnaíba, Alto Parnaíba – MA, utilizando a técnica de hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger, por um período de três horas. A composição química destes óleos foi determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa. Entre as espécies coletadas, foram selecionados os óleos que demonstraram rendimento acima de 0,7%. A atividade moluscicida dos óleos essenciais selecionados foi testada em cinco diferentes concentrações contra *Biomphalaria glabrata* seguindo a metodologia padrão preconizada pela Organização Mundial de Saúde (1983). A avaliação de toxicidade foi realizada frente a organismos não alvo, peixes *Danio rerio*, através de método estático, sem reposição de água, padronizada pela ABNT NBR 15088. Os resultados foram expressos em concentrações letais das atividades biológicas, com nível de confiança de 95%, obtidas por regressão linear, modelo probit, e comparadas por análise de variância, seguida de teste de Tukey. Os óleos essenciais das espécies *Eugenia puniceifolia*, *Hyptis dilatata*, *Lippia gracilis* e *Lippia acitidens* foram caracterizados pela predominância de compostos monoterpênicos. Por outro lado, o óleo essencial de *FG20151* demonstrou ausência de monoterpenos e predominância de sesquiterpenos oxigenados. Todos os óleos essenciais avaliados mostraram bioatividade frente *B. glabrata* com valores de  $CL_{90}$  entre 27,41 e 182,33  $\mu\text{g/mL}$ . Os óleos essenciais apresentaram baixa toxicidade aguda para os peixes *Danio rerio*, quando comparados à

toxicidade do moluscicida comercial sintético Bayluscide. A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que, as espécies estudadas apresentam potencial para serem usadas como fontes de substâncias bioativas com ação moluscicida. O desafio é promover inovação no campo das doenças negligenciadas, área que necessita de investimentos e pesquisas com retorno satisfatório.

**Palavras- chave:** Caramujos. Controle. Esquistossomose. Óleo essencial.

## ABSTRACT

**“Molluscicide activity of essential oils from aromatic plants maranhense Amazon region”.** Schistosomiasis is one of the most important endemics and widespread diseases in the world with closely linked occurrence to environmental conditions precarious. The parasite responsible for this disease, *Schistosoma mansoni*, requires the participation of *Biomphalaria* snails to complete their life cycle. According to the World Health Organization, one of the ways to combat this disease is to perform the mollusc control to avoid the helminth’s life cycle. This study aimed to evaluate the molluscicidal activity of essential oils of herbs occurring in Amazon area of Maranhão, Brazil and characterize the chemical composition and toxicity from non-target organisms of these oils to point viable and sustainable alternative to control the schistosomiasis that is an endemic disease in several Brazilian states, including the state of Maranhão. Essential oils were extracted from the aerial parts of plant harvested in the Rio Parnaíba National Park, Alto Parnaíba – MA, by hydrodistillation in Clevenger-type apparatus during a period of three hours. The chemical composition of these essential oils was analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry. Among the collected species, the essential oils with a yield above 0,7% were selected to our study. The molluscicidal activity of each essential oil was tested at five different concentrations against *Biomphalaria glabrata* following the standard method recommended by World Health Organization (1983). The toxicity assessment was carried out against non-target organisms, zebrafish through static method, without replacement water, standardized by NBR 15088. The results were expressed by lethal concentrations with 95% confidence intervals and calculated using a probit regression model, and the data were submitted to analysis of variance followed by Tukey test. Essential oils of species *Eugenia punicifolia*, *Hyptis dilatata*, *Lippia gracilis* and *Lippia acitidens* were characterized by the predominance of monoterpene compounds. In the other hand, the essential oil of *FG20151* showed no monoterpenes and predominance of sesquiterpenes oxygenates. All evaluated essential oils showed bioactivity against *B. glabrata* with LC<sub>90</sub> values between 27.41 and 182.33 µg/mL. Although the essential oils studied exhibited acute toxicity to zebrafish fish in lethal concentrations molluscicide, they were less toxic when compared to the toxicity of the synthetic commercial Bayluscide molluscicide. Thus, these results show that these species have the potential to be used as sources of

bioactivity compounds with molluscicide property. The challenge is to promote innovation in the field of neglected diseases, that needs investment and research with satisfactory return.

**Keywords:** Snails. Control. Schistosomiasis. Essential oils.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Mapa da Amazônia Legal Brasileira.....	20
<b>Figura 2.</b> Esquema das rotas biossintéticas dos metabólitos secundários. ....	22
<b>Figura 3.</b> Representações da molécula de isopreno .....	23
<b>Figura 4.</b> Fatores que influenciam quantitativamente e qualitativamente o acúmulo de metabólitos secundários na planta .....	24
<b>Figura 5.</b> Ciclo de transmissão do <i>Schistosoma mansoni</i> .....	29
<b>Figura 6.</b> Precárias condições socioambientais e coleções de água com a presença de caramujos <i>Biomphalaria</i> em área urbana periférica do município de São Luís.....	31
<b>Figura 7.</b> Característica conquioliológica de <i>Biomphalaria</i> .....	32
<b>Figura 8.</b> <i>Hyptis dilatata</i> Benth .....	40
<b>Figura 9.</b> <i>Eugenia punicifolia</i> (Kunth) DC.....	42
<b>Figura 10.</b> <i>Lippia gracilis</i> Schauer. ....	44
<b>Figura 11.</b> <i>Lippia acutidens</i> Mart. & Schauer. ....	45
<b>Figura 12.</b> Porcentagem de monoterpenos hidrocarbonetos (MH), monoterpenos oxigenados (MO), sesquiterpenos hidrocarbonetos (SH) e sesquiterpenos oxigenados (SO) identificados nos óleos voláteis .....	54
<b>Figura 13.</b> Taxa de mortalidade dos caramujos <i>Biomphalaria glabrata</i> em diferentes concentrações dos óleos essenciais estudados.....	60

**Figura 14.** Valores quantitativos (CL<sub>90</sub>) do efeito moluscicida dos óleos *Eugenia punicifolia* (EP); *Hyptis dilatata* (HD); *FG20151* (FG); *Lippia acutidens* (LA) e *Lippia gracilis* (LG) comparados ao padrão sulfato de cobre (SC) ..... 61

**Figura 15.** Fórmulas estruturais dos compostos majoritários identificados nos óleos essenciais..... 62

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Rendimento de óleo essencial de espécies aromáticas coletadas na Amazônia maranhense, Parque Nacional da Nascente do Parnaíba-MA, Brasil.....	51
<b>Tabela 2.</b> Constituintes identificados nos óleos essenciais de espécies aromáticas coletadas na Amazônia maranhense, Parque Nacional da Nascente do Parnaíba- MA, Brasil. ....	52
<b>Tabela 3.</b> Concentrações letais dos óleos essenciais obtido de espécies de ocorrência na Amazônia maranhense sobre caramujos <i>Biomphalaria glabrata</i> .....	58
<b>Tabela 4.</b> Toxicidade de óleos essenciais em peixes <i>Daio rerio</i> .....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS / SIGLAS

AChE	Acetilcolinesterase
ACh	Acetilcolina
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
CL <sub>50</sub>	Concentração letal capaz de provocar a morte de 50% dos indivíduos testados
CL <sub>90</sub>	Concentração letal capaz de provocar a morte de 90% dos indivíduos testados
CLs	Concentrações letais
CuSO <sub>4</sub>	Sulfato de cobre
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSS	Dodecil sulfato de sódio
OE	Óleo Essencial
OMS	Organização Mundial de Saúde
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
WHO	World Health Organization

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	vi
<b>ABSTRACT</b>	viii
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b>	x
<b>LISTA DE TABELAS</b>	xii
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS</b>	xiii
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	15
<b>2 OBJETIVOS</b>	18
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b>	19
<b>3.1 Plantas aromáticas da Amazônia</b>	19
<b>3.2 Óleos essenciais</b>	21
3.2.1 Composição química dos óleos essenciais	21
3.2.2 Obtenção e aplicação dos óleos essenciais	24
<b>3.3 A esquistossomose mansônica</b>	27
3.3.1 Ciclo biológico do parasito <i>Schistosoma mansoni</i>	28
3.3.2 A esquistossomose e o ambiente	29
3.3.3 Moluscos de importância epidemiológica	32
<b>3.4 Estratégias de controle da esquistossomose em áreas endêmicas</b>	33
3.4.1 Moluscidas	35
<b>3.5 Famílias e espécies aromáticas em estudo</b>	39
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	46
4.1 Coleta e identificação das espécies vegetais	46
4.2 Extração e seleção dos óleos essenciais	46
4.3 Análise dos compostos químicos dos óleos essenciais	47
4.4 Bioensaio frente à <i>Biomphalaria glabrata</i>	48
4.5 Teste de toxicidade aguda	49
4.6 Análise dos dados	50
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	51
<b>6 CONCLUSÃO</b>	69
<b>REFERÊNCIAS</b>	70

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças negligenciadas são enfermidades causadas por agentes infecciosos ou parasitos, passíveis de serem prevenidas, controladas, erradicadas, cujo tratamento é inexistente, precário ou desatualizado. Essas doenças prevalecem em condições de pobreza e contribuem para a manutenção do quadro de desigualdade social, uma vez que representam forte entrave ao desenvolvimento dos países (SAUCHA et al., 2015).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (2008), as doenças negligenciadas são um problema de saúde pública global que incapacitam ou matam milhões de pessoas por ano. Embora exista financiamento para pesquisas relacionadas a essas doenças, um dos obstáculos existentes para a concretização do direito à saúde, deve-se à ausência de investimento em medicamentos para as doenças da pobreza, justificado pelo reduzido potencial de retorno lucrativo para a indústria farmacêutica, uma vez que a população atingida é de baixa renda e, em sua maioria, de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (MADUREIRA et al., 2013).

Apesar dos importantes avanços no controle das doenças infecto-parasitárias nas últimas seis décadas, principalmente quanto àquelas relacionadas à transmissão hídrica, grande parte das doenças negligenciadas ainda persiste no Brasil, dentre as quais se destaca a esquistossomose (TIBIRIÇA et al., 2011).

A esquistossomose mansoni permanece como uma importante doença no contexto da saúde pública brasileira e demanda ações estratégicas para sua eliminação (BRASIL, 2013). De acordo com estimativas do Ministério da Saúde (2014), cerca de 25 milhões de brasileiros vivem em áreas sob o risco de contrair a esquistossomose. Atualmente, a transmissão ocorre em todas as regiões do país, sendo que as áreas endêmicas e focais abrangem 19 Unidades Federadas, onde as maiores taxas de incidência ou prevalência para esquistossomose têm sido registradas nas regiões Nordeste e Sudeste (BRASIL, 2016).

O Maranhão é um dos estados da federação que apresenta índices consideráveis desta doença, com distribuição endêmica em 20 dos seus 217 municípios e 29 municípios apresentam focos isolados (BRASIL, 2011; CANTANHEDE et al., 2014).

Trata-se de uma doença de veiculação hídrica, uma vez que, o parasito responsável por desencadear essa afecção, *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907), além do homem, necessita da participação de um hospedeiro intermediário para completar seu ciclo vital, representado,

no Brasil, por caramujos de água doce do gênero *Biomphalaria*, especialmente *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), espécie reconhecida como a mais importante, em decorrência de sua extensa distribuição geográfica, dos elevados índices de infecção e da eficiência na transmissão do *S. mansoni* (SCHOLTE et al., 2012); portanto, a transmissão da esquistossomose depende da existência do portador humano eliminando ovos do parasito; da presença de planorbídeos do gênero *Biomphalaria*; e finalmente, do contato do homem com águas contaminadas com larvas do parasito, claramente vinculado às precárias condições socioambientais que tanto atuam no surgimento quanto manutenção da infecção pelo *S. mansoni* (DOS SANTOS et al., 2016).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estabelece que uma das vias de combate aos helmintos que possuem moluscos em seu ciclo biológico é o controle da população malacológica. Essa é uma estratégia essencial nos programas de controle integrado da esquistossomose como forma de reduzir o risco de transmissão da doença, uma vez que, apenas o tratamento de pacientes infectados não impede a infecção e reinfecção pelo *S. mansoni*. Desta forma, alguns autores abordam que a quimioterapia deve ser conjugada com o controle das populações dos moluscos para que o ciclo evolutivo do helminto seja interrompido (CANTANHEDE et al., 2010; PEREIRA FILHO et al., 2014).

Para controlar a fauna planorbídica, várias substâncias sintéticas com efeito moluscicida já foram testadas, no entanto, até a niclosamida (Bayluscide®), único produto moluscicida aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, apresenta efeito tóxico para animais co-habitantes, além disso, os caramujos *Biomphalaria* tem demonstrado resistência a esse produto. Outro fator que dificulta a sua utilização é seu alto custo que inviabiliza o uso rotineiro em países pobres (BRAZ FILHO, 2010).

A preocupação com os impactos ambientais causados pela niclosamida desestimulou a utilização deste produto nas campanhas de controle da esquistossomose e atualmente está fora de uso no Brasil e em outros países (SILVA-FILHO et al., 2009), sendo recomendado somente em situações especiais que requerem uma drástica e rápida redução da transmissão (BARBOSA et al., 2012).

Nesse contexto, substâncias presentes em vegetais têm sido estudadas, visando a busca de novas alternativas para obtenção de um produto moluscicida natural, facilmente biodegradável e com baixa toxicidade, para que possam ser utilizados em campanhas de controle da esquistossomose, combatendo o hospedeiro intermediário desta doença. Entre as

plantas testadas no Brasil com potencial atividade moluscicida, destacam as das famílias Euphorbiaceae (PATEL et al., 2011), Lamiaceae (SANTOS et al., 2012), Lauraceae (COUTINHO et al., 2007), Fabaceae (DOS SANTOS et al., 2010), Myrtaceae (GUSMAN et al., 2014) e Verbenaceae (TELES et al., 2010).

Pesquisas mostram que a atividade moluscicida das plantas deve está relacionada aos princípios ativos dos vegetais provenientes do seu metabolismo secundário. Os mais destacados são as saponinas (TREYVAUD et al., 2000), os taninos (VINAUD et al., 2008) e os componentes dos óleos essenciais, como monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides (SOLÓRZANO-SANTOS & MIRANDA-NOVALES, 2012).

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

As plantas aromáticas da Amazônia são consideradas uma fonte renovável apropriada para obtenção de óleos essenciais, com uma estimativa de cerca de 1.250 espécies aromáticas produtoras de óleos essenciais nessa região e que carecem de estudos quanto suas características morfológicas, composição química e novas atividades biológicas (MAIA & ANDRADE, 2009).

Diante da diversidade de substâncias bioativas presentes em óleos essenciais e disponibilidade de recursos naturais; bem como do cenário epidemiológico da esquistossomose, sobretudo de sua relevância em estados do Nordeste do Brasil, torna-se importante a investigação e descoberta de novas substâncias provenientes de plantas da região, com propriedades tóxicas sobre *B. glabrata*, a fim apontar alternativa viável e sustentável para o controle da esquistossomose contribuindo para o avanço científico e tecnológico do país.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Avaliar a atividade moluscicida de cinco óleos essenciais de plantas aromáticas da região amazônica maranhense sobre *Biomphalaria glabrata*.

### 2.2 Específicos

Selecionar espécies aromáticas coletadas na região amazônica maranhense;

Analisar a composição química dos óleos essenciais;

Determinar a toxicidade dos óleos essenciais sobre *B. glabrata*;

Verificar a toxicidade aguda dos óleos essenciais estudados em peixes *Danio rerio*;

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Plantas aromáticas da Amazônia

A Amazônia apresenta uma expressiva fração da diversidade mundial de plantas, animais e microrganismos. Estima-se a existência de quarenta mil espécies de plantas vasculares, das quais, trinta mil são endêmicas na região amazônica (FORZZA et al., 2010). Essa floresta abrange quatro milhões de quilômetros quadrados (km<sup>2</sup>) no território brasileiro e se estende a nove estados do país (Figura 1). Nesta região, há registros de duas mil espécies medicinais usadas pela população local como medicamentos, além de cerca de 1.250 espécies de plantas aromáticas (MAIA & ANDRADE, 2009).

Plantas aromáticas são espécies vegetais que possuem aroma e/ou perfume, capazes de sensibilizar o olfato, geralmente de forma agradável, cujos princípios ativos são constituídos, total ou majoritariamente, por essências (CORREA JÚNIOR et al., 1994).

As plantas aromáticas são usadas desde tempos imemoriais pelos índios e fazem parte do cotidiano amazônico, independente do estrato social, religião ou grupo étnico. Foram apropriadas pelos brancos e seus descendentes caboclos e ribeirinhos, urbanos, classe média ou alta, que as utilizam na alimentação, na medicina, na cosmética natural, na perfumaria e nos rituais da aromaterapia amazônica (BARATA, 2012). Embora o conhecimento do poder de plantas aromáticas seja milenar, somente nos últimos anos tem havido um interesse maior por parte de farmácias de manipulação, indústrias alimentícia e de medicamentos, e em vários ramos da biotecnologia, constituindo um mercado altamente promissor (HOMMA, 2012).

Os recursos naturais aromáticos da Amazônia são considerados uma fonte renovável apropriada para a produção de óleos essenciais e produtos derivados com interesse comercial. As 12 principais famílias de plantas aromáticas que predominam na região amazônica são (em ordem decrescente): Piperaceae, Asteraceae, Myrtaceae, Lamiaceae, Annonaceae, Lauraceae, Euphorbiaceae, Verbenaceae, Scrophulariaceae, Anacardiaceae, Burseraceae e Rutaceae (MAIA & ANDRADE, 2009).

A Amazônia é rica em espécies aromáticas, contudo diversos recursos naturais se perdem a cada quilômetro quadrado de floresta destruída. Estima-se que o desmatamento tenha devastado até o ano de 2015 cerca de 413.506 km<sup>2</sup> de floresta e a principal consequência do desflorestamento na Amazônia é a perda de biodiversidade (INPE, 2016).

O Estado do Maranhão (oeste do meridiano 44°) foi incorporado à Amazônia brasileira pela Lei 1.806, de 06 de janeiro de 1953, e representa um dos estados que mais desmataram a floresta. Hoje, a Amazônia maranhense apresenta menos de 25% de sua vegetação original (INPE, 2015).

No Maranhão, a região amazônica propriamente dita é compreendida pelas regiões a oeste do paralelo 44 (Figura 1) e detém 26% do bioma amazônico (MARLÚCIA et al., 2011). Aparece no cenário nacional como uma das áreas de maior diversidade vegetal, contudo quanto menor a quantidade de informações sobre a Amazônia maranhense e possíveis formas de utilização sustentável, mais difícil é conscientizar a população da necessidade de sua conservação. Muito ainda tem que se investir no conhecimento da sua flora, pois poucas espécies têm sido descritas quanto às suas características morfológicas, composição química e atividades biológicas (MUNIZ, 2006; MARLÚCIA et al., 2011).

**Figura 1.** Mapa da Amazônia Legal Brasileira



Fonte: Imazon (2013).

## 3.2 Óleos essenciais

Os óleos essenciais (OE) são produtos abundantes em plantas aromáticas, às quais conferem odor e sabor característicos. A designação de “óleo” é devido a algumas características físico-químicas como, por exemplo, a de serem geralmente líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente, no entanto, é importante ressaltar que os óleos essenciais não possuem ácidos graxos sendo quimicamente diferentes da composição glicerídica dos óleos fixos. Sua principal característica é a volatilidade, que os diferenciam dos óleos de composição graxa, cujos componentes presentes são fixos (PENGELLY, 2004).

Segundo a International Standard Organization - ISO 9235 (1997), os óleos voláteis (conhecidos também como óleos essenciais, óleos etéreos ou essências) são produtos obtidos de partes de plantas por meio da destilação por arraste de vapor d'água, bem como os produtos obtidos por prensagem dos pericarpos de frutos cítricos. De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas.

Os óleos essenciais formam-se num grande número de plantas, sendo compostos por substâncias do metabolismo secundário, que não estão diretamente relacionados com o processo de crescimento, desenvolvimento e reprodução dos vegetais (GARCÍA & CARRIL, 2011). Esses óleos são produzidos e armazenados em estruturas secretoras especializadas, tais como tricomas glandulares, canais oleíferos, células ou bolsas secretoras, que podem estar em vários órgãos dos vegetais. Assim, dependendo da espécie vegetal, os óleos essenciais podem estar presentes nas folhas, flores, ramos/caules, frutos, sementes ou raízes de diversas espécies (BAKKALI et al., 2008).

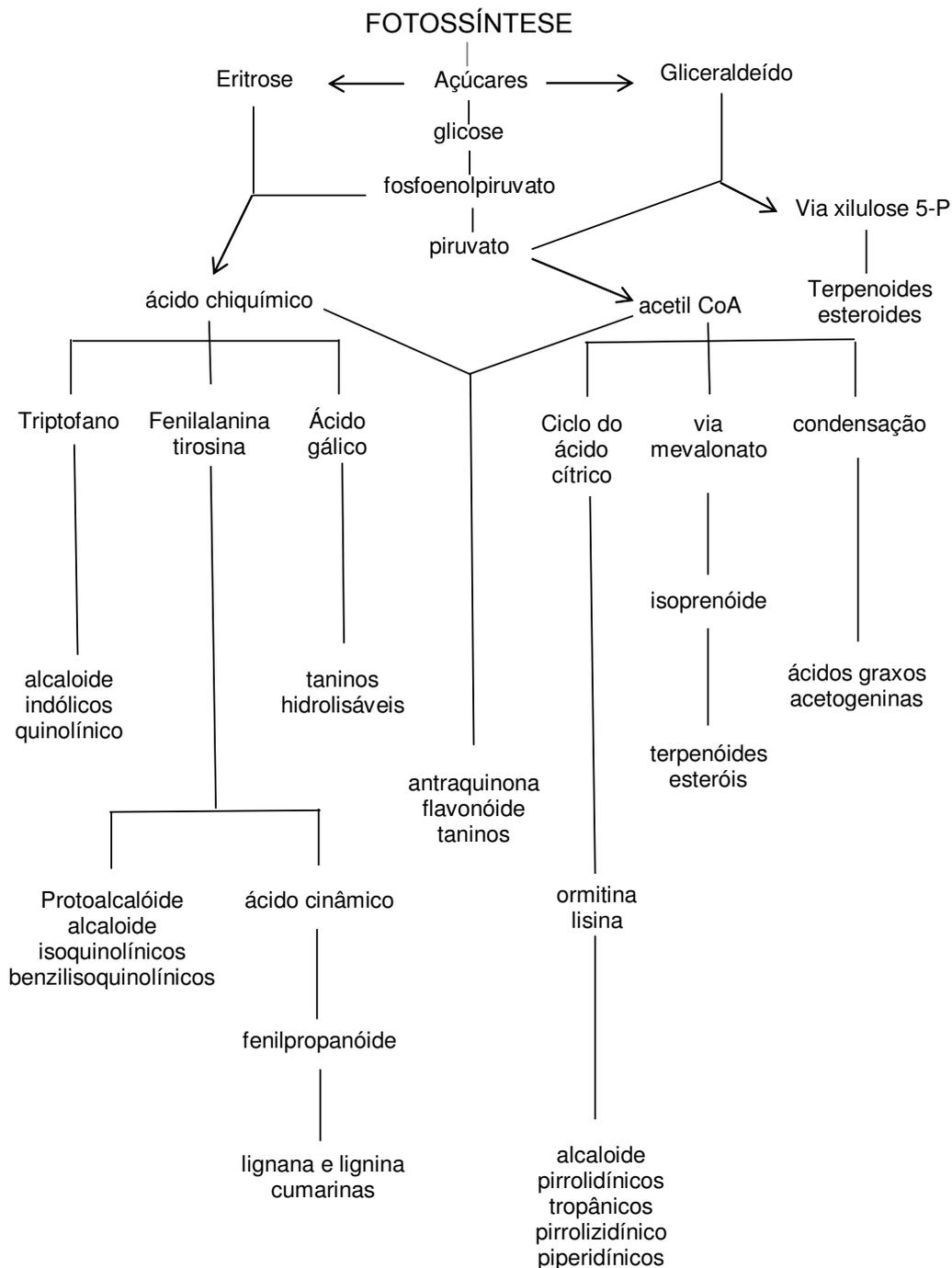
Os óleos essenciais foram considerados durante muito tempo como “desperdício fisiológico” ou produtos de desintoxicação, tal como se dizia dos produtos do metabolismo secundário. Entretanto, com os avanços científicos, são atribuídas aos OEs várias funções ecológicas necessárias para sobrevivência do vegetal em seu ecossistema, tais como, a inibição da germinação de sementes (alelopatia), proteção contra calor ou frio, predadores, atração de polinizadores ou para repelir insetos (BARREIRO, 2006).

### 3.2.1 Composição química dos óleos essenciais

Do ponto de vista químico, os óleos essenciais são misturas orgânicas complexas, que podem variar entre dezenas ou mesmo centenas de substâncias voláteis. Essas substâncias

pertencem principalmente à classe dos terpenos que derivam da via do ácido mevalônico ou da rota da xilulose-5-P e à classe dos fenilpropanóides, produtos obtidos pela via chiquimato (SIMÕES et al., 2010). A origem destes metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose formada através da fotossíntese (Figura 2).

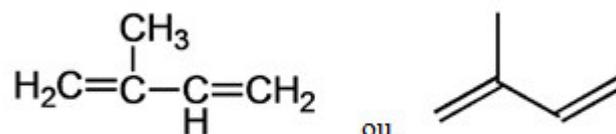
**Figura 2** - Esquema das rotas biossintéticas dos metabólitos secundários



Fonte: adaptado de Lupe et al. (2007).

Os terpenos são, geralmente, os constituintes mais importantes dos óleos essenciais (MAIA & ZOGHBI, 1998). Estes compostos são constituídos por unidades contendo cinco átomos de carbono, denominadas unidades isoprênicas (Figura 3). A “regra do isopreno” permite classificá-los de acordo com o número de unidades isoprênicas que os formam, sendo assim, os terpenos podem ser considerados usualmente como produtos resultantes da ligação de várias unidades de isopreno (FONTES & ALÇADA, 2008).

**Figura 3** - Representações da molécula de isopreno



Fonte: Fontes & Alçada (2008).

Os terpenos mais simples são os hemi-terpenos, formados por apenas uma unidade de isopreno, sendo bastante instáveis e difíceis de serem isolados de produtos de plantas. Os monoterpenos são constituídos por duas unidades de isopreno (C10), os sesquiterpenos por três (C15), os diterpenos, por quatro unidades (C20), triterpenos por seis (C30) e tetraterpenos por oito (C40) unidades isoprênicas. Existem ainda os politerpenos formados por mais de oito unidades de isopreno (BUCHANAN et al., 2000). Os constituintes terpênicos podem apresentar diversas funções orgânicas, tais como álcoois, cetonas, aldeídos, ésteres, fenóis e hidrocarbonetos (SIMÕES et al., 2010). Dentre os compostos terpênicos, os mais frequentes nos óleos essenciais são os monoterpenos e os sesquiterpenos (SILVA et al., 2009).

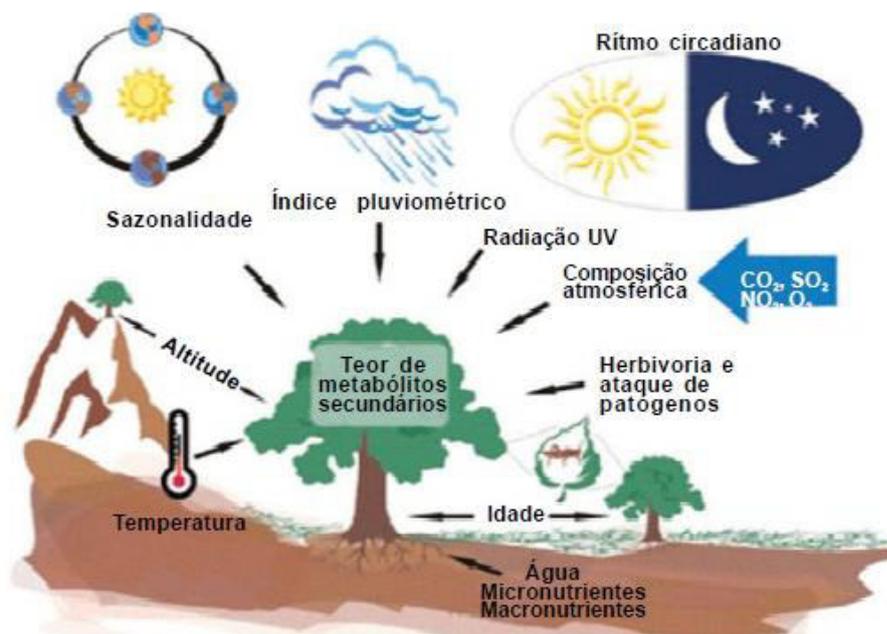
É importante ressaltar que a composição química do óleo essencial pode variar consideravelmente de espécie para espécie. Os fatores responsáveis por essa variabilidade têm diversas naturezas, podendo-se classificar como intrínsecos, que dependem da genética e fisiologia da planta (SIMÕES et al., 2010) ou extrínsecos, como condições ambientais e de colheita (CUNHA et al., 2012).

Sendo assim, os óleos essenciais, assim como quaisquer metabólitos secundários, representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante (Figura 4), portanto sua síntese e proporções no vegetal são frequentemente afetadas pelas condições ambientais (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Apesar dos compostos químicos presentes nos óleos essenciais apresentarem-se em diferentes concentrações, sempre há a predominância de uma até três substâncias, designados de componentes majoritários, que caracterizaram a essência dessa espécie vegetal (BAKKALI et al., 2008).

Os constituintes dos óleos essenciais, geralmente são identificados por técnicas cromatográficas e espectrais (ADAMS, 2007). Essa identificação é importante para a compreensão e previsão dos respectivos efeitos biológicos do óleo essencial (COELHO, 2009).

**Figura 4.** Fatores que influenciam quantitativamente e qualitativamente o acúmulo de metabólitos secundários na planta.



Fonte: Gobbo-Neto & Lopes (2007).

### 3.2.2 Obtenção e aplicação dos óleos essenciais

Os óleos essenciais podem ser extraídos por diversos métodos. Esses métodos variam conforme a localização do óleo essencial na planta e com a proposta de utilização do mesmo. Independente do método de extração utilizado, o rendimento de óleo essencial obtido geralmente é muito baixo, inferior a 1%. Raramente, obtem-se rendimentos com dois dígitos como o que ocorre nos botões florais de cravo, com rendimentos de até 15% (SILVEIRA et al., 2012).

Para obtenção dos óleos essenciais, os métodos de extração mais comuns são:

1. Enflourage ou enfloração: método utilizado apenas por algumas indústrias de perfumes, empregado para extrair óleo essencial de pétalas das flores. As pétalas são depositadas, a temperatura ambiente, sobre uma camada de óleo fixo, durante certo período de tempo, funcionando como líquido extrator. Quando esgotadas, as pétalas são substituídas por novas até a saturação total, este processo se repete por várias semanas. Na sequência a gordura é tratada com álcool e para obter o óleo, o álcool é destilado a baixa temperatura. É um processo lento, complexo, caro, mas o produto obtido possui alto valor comercial (BIASI & DESCHAMPS, 2009).

2. Arraste por vapor d'água: é o método mais utilizado para a extração de óleos essenciais a nível mundial, onde é possível obter óleos de diversas partes do vegetal (ROMDHANE & TIZAOUI, 2005). Neste processo o vapor d' água atravessa os tecidos da biomassa, levando consigo o óleo contido no interior de suas glândulas. O óleo vaporiza-se com o choque térmico, sendo “arrastado pelo vapor” até atingir o condensador, onde a mistura formada de óleo e hidrolato, resfria-se e volta à fase líquida, havendo a separação do óleo e hidrolato pelas diferenças de polaridade e densidade das substâncias. Neste método, a planta é colocada sobre uma placa perfurada, a certa distância do fundo do extrator, ou em outro recipiente sem água, de modo a evitar o contato direto com o solvente em ebulição (SARTOR, 2009).

3. Hidrodestilação: é o método mais utilizado em escala laboratorial. O material vegetal a ser destilado fica em contato direto com a água, e quando esta entra 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, e quando se resfria, forma uma mistura heterogênea, com duas fases, que são separados devido à diferença de polaridade e densidade entre a água e o óleo (CUNHA, 2009). Nessa extração, é comum utilizar o aparelho tipo Clevenger (BIASI & DESCHAMPS, 2009).

4. Extração por solventes orgânicos: método em que os óleos essenciais são extraídos por meio de solventes apolares, como hexano, benzeno, tolueno, dentre outros que preservem melhor a integridade dos compostos presentes. A extração por solvente dá origem a dois produtos: o concreto, que é o produto da primeira fase, resultante da extração com os solventes apolares; e o absoluto, que por sua vez é obtido a partir do próprio concreto, após ser submetido a outro tipo de solvente, desta vez polar, como o etanol (SIMÕES et al., 2010).

5. Prensagem: método empregado exclusivamente para extrair óleo das cascas de frutos cítricos, que apresenta seus óleos essenciais em bolsas no pericarpo. O pericarpo é prensado por uma prensa hidráulica, e a camada que contém o óleo essencial é, então, coletada e, posteriormente, separa-se o óleo da emulsão formada com água, através de decantação, centrifugação ou destilação fracionada (PINHEIRO, 2003).

6. Extração por CO<sub>2</sub> supercrítico: método que permite recuperar os aromas naturais de vários tipos e não somente óleo essencial, de um modo bastante eficiente. É o método ideal para extração industrial de óleos essenciais. Nenhum traço de solvente permanece no produto obtido, tornando-o mais puro do que aqueles obtidos por outros métodos. Para tal extração, o CO<sub>2</sub> é primeiramente liquefeito através de compressão e, em seguida, aquecido a uma temperatura superior a 31 °C. Nessa temperatura, o CO<sub>2</sub> 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 CO<sub>2</sub> retorna ao estado gasoso, resultando na sua total eliminação (MSAADA et al., 2012)

7. Turbodestilação: método adequado para a extração de óleos onde o acesso às bolsas oleíferas é naturalmente mais difícil e de lenta obtenção, como é o caso de cascas, madeiras, raízes e sementes. Neste processo, as plantas são imersas na água, e o vapor circula em meio a esta mistura de planta e água. Através deste processo, a mesma água é continuamente reciclada e usada pelo sistema. Dessa forma, reduz-se as dificuldades de acesso e, conseqüentemente, o tempo da destilação (OLIVEIRA & JOSÉ, 2007).

Os óleos essenciais produzidos por plantas aromáticas são empregados como matérias-primas na indústria de química fina, para aplicação direta em produtos como perfumes, fragrâncias e cosméticos (BIZZO et al., 2009); nas indústrias de medicamentos (fitofármacos) sendo solicitados pelos seus efeitos sobre o sistema digestivo e aparelho respiratório, pela atividade analgésica e anti-inflamatória ou por efeitos inespecíficos, particularmente sobre a pele e tecidos expostos (COELHO, 2009); na horticultura (inseticidas, fungicidas, bactericidas, larvicidas) e como recurso terapêutico (GNATTA et al., 2011).

As aplicações de óleos essenciais como ingredientes funcionais em formulações alimentícias, cosméticas ou ainda em formulações sanitizantes, tem despertado grande interesse no setor industrial devido à grande aceitação dos consumidores por produtos naturais, bem como pelos danos à saúde propiciados pelos aditivos sintéticos (SCHERER et al., 2009).

A literatura atual apresenta ainda vários relatos sobre atividade biológica de óleos essenciais, decorrente da grande variedade e diversidade de suas composições químicas, a exemplo de atividade antioxidante (MIRANDA et al., 2016), antisséptico (CUNHA & ROQUE, 2013), larvicida (SANTANA et al., 2015; DIAS et al., 2015), moluscicida (COSTA, et al., 2015), antibacteriana (MILLEZI et al., 2014), anti-inflamatória (SILVA DE ARAUJO et al., 2016), antifúngica, antiviral (MOHAMMADI et al., 2014) e ação anticarcinogênica (ZU et al., 2010), demonstrando grande potencial para diversas atividades biológicas.

### **3.3 A esquistossomose mansônica**

De acordo com os dados da Organização Mundial da Saúde (2008), a esquistossomose é uma doença milenar que afeta, em suas diversas formas, cerca de duzentos milhões de indivíduos distribuídos em mais de 74 países entre os continentes da Ásia, América e África.

A forma mansônica é a mais disseminada no mundo, com endemicidade em 54 países (BRASIL, 2014), sendo uma doença parasitária de veiculação hídrica causada pelo helminto *S. mansoni* e caracterizada como a segunda maior doença tropical, atrás apenas para a malária (OPAS, 2006).

Dentre os países da América, o Brasil é o que possui a maior área endêmica da esquistossomose mansônica, que vem sendo considerada um grave problema de saúde pública no país, porque acomete cerca de seis milhões de pessoas, com número expressivo de formas graves e óbitos (BRASIL, 2014).

A doença é popularmente conhecida como barriga d'água, xistosa ou doença do caramujo e foi introduzida no Brasil no século XVII com a chegada de escravos africanos infectados, trazidos pela Colônia Portuguesa para o trabalho na lavoura canavieira da região nordeste do país (KATZ & ALMEIDA, 2003). Essa atividade utilizava grande aporte hídrico que somada às péssimas condições socioambientais e à existência dos hospedeiros intermediários da esquistossomose, criou as condições bio-ecológicas necessárias para o estabelecimento e transmissão da doença no país (SILVEIRA, 1989).

Embora os escravos africanos estivessem infectados por duas espécies do esquistossomo, *Schistosoma mansoni* e *Schistosoma haematobium* (Bilharz, 1852), somente a primeira se desenvolveu no Brasil. O ciclo evolutivo do *S. haematobium* não prosseguiu nas Américas, devido à falta do hospedeiro intermediário próprio dessa espécie (KATZ & ALMEIDA, 2003).

Atualmente, a transmissão da esquistossomose ocorre em todas as regiões do país, as áreas endêmicas e focais abrangem 19 estados, onde as maiores taxas de incidência ou prevalência têm sido registradas nas regiões Nordeste e Sudeste (BRASIL, 2016).

No estado do Maranhão, a doença foi registrada desde 1920 (CUTRIM et al., 1998). A microrregião da Baixada Maranhense mostra a maior prevalência da esquistossomose no Estado, juntamente com alguns bairros de periferia da capital São Luís (BRASIL, 2011). As estimativas da frequência desta doença no Maranhão indicam que existe uma tendência à elevação do número de casos dessa parasitose (SANTOS & MELO, 2011).

### 3.3.1 Ciclo biológico do parasito *Schistosoma mansoni*

O agente etiológico da esquistossomose mansônica é o trematódeo digenético *S. mansoni*, que infecta o ser humano e, eventualmente, outros animais vertebrados (REY, 1992; SILVA-SOUZA & VASCONCELOS, 2005).

Parte do ciclo de transmissão da enfermidade ocorre em águas doces (Figura 5). Os ovos de *S. mansoni* são eliminados nas fezes do hospedeiro definitivo infectado (homem ou outros vertebrados suscetíveis) que quando em contato com a água, eclodem, liberando uma larva ciliada denominada de miracídio, a qual se movimenta ativamente em busca do hospedeiro intermediário, caramujos do gênero *Biomphalaria*, para penetrá-lo. Após quatro semanas o caramujo desenvolve a forma infectante, a cercária, que é liberada influenciada pela luz solar e temperatura da água e estando pronta para infectar o hospedeiro definitivo, seja ele o homem ou qualquer vertebrado suscetível, reiniciando seu ciclo biológico (NEVES, 2010; REY, 2008).

O processo de penetração da cercária na pele humana dura normalmente de dois a 15 minutos e produz uma irritação de intensidade variável de indivíduo para indivíduo (urticária e pápulo-eritematoso). Uma vez nos tecidos do hospedeiro definitivo, as cercárias se transformam em esquistossômulos, que caem na corrente sanguínea e/ou linfática, atingem a circulação venosa, vão ao coração e aos pulmões, onde permanecem algum tempo e podem causar alterações mórbidas, posteriormente 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 parasito, onde se diferenciam sexualmente e crescem se alimentando de sangue. Ainda imaturos, migram para a veia porta e mesentéricas, onde completam sua evolução. Após acasalamento, os vermes adultos migram para as vênulas da submucosa

intestinal, onde acontecerão as posturas dos ovos, podendo eliminar até 300 ovos por dia, dos quais cerca da metade é eliminada nas fezes do hospedeiro definitivo. Os ovos de *S. mansoni* 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 impedir, 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).

**Figura 5.** Ciclo de transmissão do *Schistosoma mansoni*



Fonte: Brasil (2014).

### 3.3.2 Esquistossomose e o ambiente

O ambiente ocupa um papel determinante na disseminação das doenças infectoparasitárias no homem (MUÑOZ & FERNANDES, 2013). As relações entre saúde e ambiente têm sido observadas na ocorrência de diversas doenças desde épocas remotas, e podem ser evidenciadas através da análise de características epidemiológicas das áreas

próximas às fontes de contaminação e pela identificação de fatores ambientais adversos em locais onde há concentração de agravos à saúde (ELIAS & TINEM, 1995).

O termo ambiente é definido pela Organização Mundial de Saúde como “a totalidade de elementos externos que influem nas condições de saúde e qualidade de vida dos indivíduos ou das comunidades”. Neste contexto, o conceito de ambiente deve ser ampliado apresentando diferentes aspectos, como: 1. Ambiente Físico, que é constituído pelos fatores químicos, biológicos e físicos que têm influência sobre o parasito e o hospedeiro, como exemplos, pode-se apontar pH, teor de oxigênio, presença de matéria orgânica, temperatura, umidade, luminosidade (luz solar) e precipitação; 2. Ambiente Social, que envolve as condições de moradia, falta ou precariedade do acesso ao saneamento básico, sendo componentes fundamentais para a disseminação de doenças; 3. Ambiente Cultural, também ocupa um lugar de destaque, pois a educação de qualidade ajuda a população a exercer um papel fundamental no processo do autocuidado, favorecendo a promoção da saúde e a prevenção das doenças; e por fim deve-se considerar também o Ambiente Político, com as iniciativas governamentais para manter adequadas as condições de vida da população, promovendo abastecimento permanente de água segura, coleta e tratamento de esgoto, condições adequadas de moradia, oferta de serviços de saúde eficazes, entre outras condições, que são determinantes para evitar a proliferação de agentes infecciosos e vetores (MUÑOZ & FERNANDES, 2013).

A transmissão de *S. mansoni* depende do inter-relacionamento entre o ecossistema, as pessoas e suas condições sociais. Os elementos do meio físico podem constituir condições ecológicas favoráveis ao desenvolvimento da doença, porém, ela só se manifesta quando combinada com os aspectos sócio-culturais (BARRETO et al., 2011).

Por se tratar de uma doença de veiculação hídrica, a falta de instalações sanitárias adequadas; a presença de pessoas parasitadas e os hábitos de poluição fecal, resultante da falta de educação sanitária da população residente e de políticas para melhoria das condições de escoamento adequado e tratamento de esgoto, favorecem o contato humano com coleções de águas contaminadas com cercárias, determinando em diferentes níveis, a infecção por *S. mansoni* e contínuo aparecimento de novos casos dessa verminose (PEIXOTO & MACHADO, 2005). Associado a isso, o avanço e a disseminação da esquistossomose nas cidades brasileiras estão relacionados aos deslocamentos populacionais originados de áreas endêmicas e com a forma de ocupação e organização do espaço urbano periférico, que

acontece de maneira desordenada e caótica, desempenhando papel fundamental no processo de propagação da endemia (MARTINS et al., 2007).

Em áreas periféricas do município de São Luís, capital do Maranhão, as precárias condições socioambientais somadas à existência de coleções de água com a presença de caramujos do gênero *Biomphalaria* bem adaptados e infectados por *S. mansoni*, representam potenciais áreas de risco para transmissão da esquistossomose na zona urbana do município (OLIVEIRA et al., 2013) (Figura 6).

De um modo geral, caramujos do gênero *Biomphalaria* são encontrados em coleções de água doce com velocidade de fluxo inferior a 30 cm/s, mas podem também ocorrer em lagoas, pântanos, remansos de rios, margens de reservatórios ou coleções artificiais (valas de drenagem de esgoto; poças de água com alto teor de matéria orgânica) (BRASIL, 2014).

**Figura 6.** Precárias condições socioambientais e coleções de água com a presença de caramujos *Biomphalaria* (seta) em área urbana periférica do município de São Luís-MA.



Fonte: própria autora (2016)

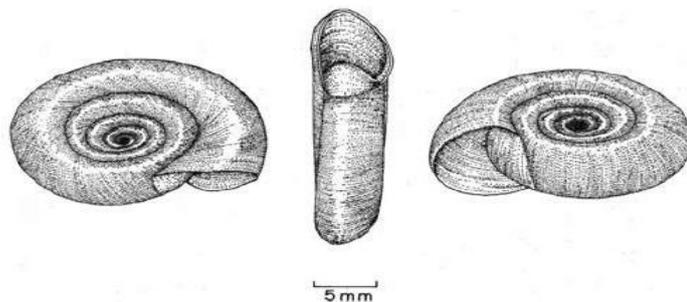
### 3.3.3 Moluscos de importância epidemiológica

Entre as classes pertencentes ao filo Mollusca, a Gastropoda constitui cerca de três quartos do número total de espécies do filo e merece destaque pela sua importância médica, incluindo vários táxons envolvidos em ciclos de parasitos, como os transmissores da esquistossomose e de outras helmintoses (AMARAL et al., 2008).

Os moluscos hospedeiros intermediários do parasito *S. mansoni* são descritos como da Subclasse Pulmonata, Ordem Basommatophora, Família Planorbidae e Gênero *Biomphalaria*, que constituem um elo imprescindível na transmissão da esquistossomose (REY, 1992; LUNA et al., 2005).

As características que permitem reconhecer o gênero *Biomphalaria* são: concha planispiral (Figura 7), com diâmetro variando nos indivíduos adultos entre 7 mm e 40mm; tentáculos longos e filiformes; olhos nas bases internas dos tentáculos; pé oblongo; boca contornada por mandíbula em forma de T; dente central da rádula bicúspide e sem denticulo acessório; glândulas salivares por fora do anel nervoso; hemolinfa vermelha; pênis simples coincidindo sua ponta com a abertura do canal do esperma (PARAENSE, 1975).

**Figura 7.** Característica conquiliológica de *Biomphalaria*; vista do lado direito, vista frontal e vista do lado esquerdo, respectivamente.



Fonte: Amaral et al. (2008).

A cor natural da concha de moluscos *Biomphalaria* é amarelo-palha, mas se modifica quando em contato com substâncias corantes dissolvidas na água dos criadouros, como o óxido de ferro, que confere às conchas coloração mais escura, passando por vários tons de marrom até o negro (AMARAL et al., 2008). Em relação ao tamanho da concha, é muito variado de acordo com a espécie de *Biomphalaria*, mas segundo Paraense (1955), os

caramujos que se desenvolvem em ambientes lânticos são maiores do que os de ambientes lóticos, em decorrência da grande quantidade de alimento.

No Brasil há ocorrência de dez espécies do gênero *Biomphalaria* e uma sub-espécie, sendo separadas em relação à infecção por *S. mansoni* (BRASIL, 2014). Destas, três espécies foram encontradas naturalmente infectadas pelo *S. mansoni*: *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) e *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) e duas são hospedeiras potenciais: *Biomphalaria amazonica* (Paraense, 1966) e *Biomphalaria peregrina* (Orbigny, 1835). As demais espécies: *Biomphalaria intermedia* (Paraense; Deslandes, 1962), *Biomphalaria kuhniana* (Clessin, 1883), *Biomphalaria schrammi* (Crosse, 1864), *Biomphalaria oligoza* (Paraense, 1975); *Biomphalaria occidentalis* (Paraense, 1981) e a sub-espécie *Biomphalaria tenagophila guaibensis* (Paraense, 1984) não são hospedeiras naturais (BARBOSA et al., 2012).

Das três espécies de *Biomphalaria* transmissoras de *S. mansoni* no Brasil, *B. glabrata* se destaca como a mais importante, por se mostrar altamente suscetível em decorrência da compatibilidade entre parasito-hospedeiro, e por sua distribuição geográfica em cerca de dezesseis estados do Brasil, além do Distrito Federal (BRAGA, 2012).

As espécies *B. glabrata* e *B. straminea* têm área de ocorrência preferencialmente na região Nordeste e no Estado de Minas Gerais, enquanto *B. tenagophila* ocupa principalmente, as regiões Sudeste e Sul (CARVALHO & CALDEIRA, 2004). O habitat natural dos mosluscos *Biomphalaria* são coleções de água doce com pouca correnteza ou parada, vivem preferencialmente em águas rasas e próximo às margens (BARBOSA et al., 2012).

### **3.4 Estratégias de controle da esquistossomose em áreas endêmicas**

No Brasil, o programa de controle da esquistossomose teve início em 1975, com a criação do Programa Especial para Controle da Esquistossomose - PECE, que consistia em um programa vertical e baseado principalmente no tratamento em massa dos doentes (quimioterapia) (CANTANHEDE et al., 2010). Até então, o Brasil não apresentava nenhum programa oficial de controle desta doença (GUIMARÃES, 2007). Em 1993, este programa foi descentralizado para os estados e, em seguida, para os municípios, tendo sido, finalmente, integrado à rede de atenção à saúde no período 2007–2010 (BARRETO et al., 2011).

Em 2011, o Brasil passa a ser signatário da Resolução WHA65-21 da OMS que propõe a eliminação da transmissão da esquistossomose; uma vez que a expansão do número

de indivíduos acometidos por esta doença no país ainda era preocupante. A partir de então, o programa brasileiro de controle da esquistossomose passa a ter como objetivo principal a eliminação da doença, com a redução do número de casos a níveis aceitáveis (menores que 5%) nas áreas de endemicidade elevada e nas áreas de baixa endemicidade, o objetivo é a interrupção da transmissão, o que significa a não existência de casos (BRASIL, 2014).

A esquistossomose é um problema de saúde pública que persiste no Brasil, sobretudo pelas dificuldades no controle da transmissão. O controle dos hospedeiros intermediários (caramujos), integrado ao tratamento quimioterápico dos doentes, além de melhoria no saneamento básico e práticas de educação em saúde, formam um conjunto de estratégias promissoras para o combate da esquistossomose (FENWICK & SAVIOLI, 2011; BRASIL, 2014).

O controle dos caramujos é um dos métodos efetivo para o domínio da transmissão da esquistossomose, pois interrompe o ciclo de vida do parasito e, conseqüentemente, impede que o ser humano adquira esquistossomose (BARBOSA et al., 2012).

O controle da população malacológica abrange três métodos: o físico; o biológico e o químico (WHO, 1993).

**Método Físico:** consiste, principalmente, na eliminação de criadouros através de alterações no ambiente. Essas alterações podem ser de drenagem de áreas alagadas; aterro de pequenas coleções hídricas contaminadas; mudança no curso de canais e córrego; revestimento e a canalização dos cursos d'água; retirada de plantas aquáticas das margens dos criadouros entre outras (NEVES, 2010; AMARAL et al., 2008). Essas operações promovem alterações drásticas nos habitats e requer investimentos, constante manutenção e geralmente envolvem projetos caros de infra-estrutura (BARBOSA, 1995).

**Método Biológico:** envolve a introdução de organismos com ação predadora, competidora, parasitária ou patogênica sobre os moluscos hospedeiros, reduzindo assim a população de caramujos (SOUZA & LIMA, 1997). O molusco *Pomacea haustum* (Reeve, 1856) por exemplo, já demonstrou competição por espaço físico com *B. glabrata* quando introduzido em ambiente natural no município de Baldim-MG, substituindo significativamente populações desta espécie (MILWARD-DE-ANDRADE & CARVALHO, 1979). Porém, em alguns locais, espécies de *Pomacea* e *Biomphalaria* coexistiram por até dez anos sem alterações das densidades populacionais dos planorbídeos (BRASIL, 2014). Estudos em caráter experimental tem sido realizado para avaliar a eficácia do método, no

entanto a execução deste método não é muito viável, pois pode causar sérios problemas ambientais, ainda mais quando se trata de introdução de espécies exóticas que podem reduzir ou eliminar outras espécies nativas (AMARAL et al., 2008).

**Método Químico:** consiste na aplicação de produtos tóxicos aos moluscos (moluscidas) nos criadouros. A aplicação deve ser realizada em trechos de comprovada importância epidemiológica e caso a extensão a ser tratada seja superior a 500 metros, deve-se instalar duas ou mais estações de tratamento (BRASIL, 2014).

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

#### 3.4.1 Moluscidas

Segundo a OMS (1991) moluscidas são substâncias utilizadas para eliminação de moluscos que vivem em jardins, lavouras, estufas e campos, assim como as utilizadas para controlar caramujos vetores de parasitos importantes em saúde pública. A aplicação de moluscidas em criadouros naturais dos caramujos hospedeiros de *S. mansoni* é uma prática recomendada pela OMS (WHO 1965; 2008).

O envenenamento de caramujos com moluscidas provoca a retração da massa cefalopodal para o interior da concha ou um inchaço com conseqüente prolongamento de sua massa cefalopodal para fora da concha devido à quebra do equilíbrio osmótico que está sob controle neuro-hormonal (McCULLOUGH et al., 1980).

Os moluscidas podem ser classificados em sintéticos e naturais. Diversas substâncias sintéticas foram testadas em larga escala com ação moluscida, mas poucos merecem destaque. Podemos citar o sulfato de cobre, pentaclorofenato de sódio (conhecido como pó-da-china), carbonato de cobre, Gramaxone, hidróxido de cálcio, *N*-triltimorfolina (Frescon) e niclosamida (Bayluscid) (STURROCK, 1995; NEVES, 2010). Entretanto, problemas como resultados insatisfatórios quanto à sua toxicidade em relação aos moluscos e/ou por afetarem a fauna e a flora locais levaram ao desuso dessas substâncias (REY, 2001).

O único moluscida sintético indicado nas campanhas de controle da esquistossomose foi a niclosamida, comercialmente conhecido como Bayluscide®. É um produto de alta eficiência contra todos os estágios de desenvolvimento dos moluscos *Biomphalaria* e também a formas larvárias de *Schistosoma*, mesmo em baixas concentrações (MATA et al., 2011). Entretanto, apresenta baixo potencial sob a ação da luz solar, alta toxicidade para animais co-

habitantes e plantas submersas, causando impactos negativos no meio ambiente, além de possuir alto custo operacional (MOREIRA et al., 2010; LOPES et al., 2011).

Os impactos ambientais causados pela niclosamida desestimularam a utilização deste produto nas campanhas de controle da esquistossomose. Atualmente está fora de uso no Brasil e em outros países (RUIZ et al., 2005; SILVA-FILHO et al., 2009), sendo recomendado somente em situações especiais que requerem uma drástica e rápida redução da transmissão (BARBOSA et al., 2012).

A preocupação com o desenvolvimento de resistência dos caramujos aos moluscidas sintéticos disponíveis, a baixa seletividade apresentada por esses produtos e a procura por substâncias facilmente degradadas têm incentivado a pesquisa de moluscidas de origem vegetal como medida de controle alternativo à proliferação dos caramujos (LEYTON et al., 2005). Dessa forma, plantas da flora de áreas endêmicas da esquistossomose, de fácil propagação, ciclo evolutivo curto e com baixa ou nenhuma toxicidade a animais da área de ocorrência desses caramujos vêm sendo estudadas, visando a descoberta de um moluscida ideal (LUNA et al., 2005). Estes produtos naturais, em geral, são de baixo custo, não prejudiciais ao meio ambiente e obtidos a partir de recursos renováveis (SILVA-FILHO et al., 2009).

O interesse pelo uso de moluscidas de origem vegetal na tentativa de controle da esquistossomose data da década de 1930, quando foi sugerido o plantio de *Balanites aegyptiaca* L. (Balanitaceae), uma árvore típica do deserto, vulgarmente conhecida como palma do deserto, ao longo dos cursos de água do Sudão e do Sudeste da África, onde se encontravam focos de transmissão da esquistossomose. Os frutos desta planta ao caírem na água, inibiam o aumento da densidade populacional de caramujos (ARCHIBALD, 1933; WAGNER, 1936). Em 1982, foi determinado que os compostos responsáveis pela atividade moluscida presentes nos frutos eram três saponinas do tipo espirostano que foram identificadas como balatininas 1, 2 e 3 (LIU & NAKANISHI, 1982).

Desde a década de 1930, plantas tem sido testadas em várias partes totalizando centenas de espécies vegetais estudadas (MOTT, 1987), através de extratos obtidos com solventes aquosos, alcoólicos e lipofílicos de caules, cascas, raízes, flores, folhas ou frutos (KLOOS & MCCULLOUGH, 1987).

No Brasil, os primeiros estudos com moluscidas naturais foi demonstrado pela atividade de extratos aquosos do caule de *Sejania* sp. (cipó-timbó) e de frutos de *Sapindus*

*saponária* L. (saboneteira) sobre caramujos *B. glabrata* (PINTO & ALMEIDA, 1944). A partir de então, a maioria dos estudos relativos à avaliação de moluscicidas naturais tem sido voltada para ensaios utilizando extratos vegetais (CANTANHEDE et al., 2010).

Os princípios ativos dos vegetais com atividade moluscicida estão relacionados principalmente a produtos do seu metabolismo secundário. Os mais destacados são as saponinas (TREYVAUD et al., 2000), os taninos (VINAUD et al., 2008), e derivados terpênicos dos óleos essenciais, como os monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides (SOLÓRZANO-SANTOS & MIRANDA-NOVALES, 2012). Outras classes também foram relatadas, como os esteroides, que provavelmente ocasionam uma inflamação no caramujo (CHIFUNDERA et al., 1993) e acetogeninas (LUNA et al., 2006).

Diversos vegetais continuam sendo testados na busca de novas espécies com potencial moluscicida (SANTOS et al., 2010). Das plantas testadas no Brasil com potencial atividade moluscicida, presentes principalmente nas regiões de maior prevalência da esquistossomose; Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste; destacam as das famílias Euphorbiaceae (PATEL et al., 2011), Lamiaceae (SANTOS et al., 2012), Lauraceae (COUTINHO et al., 2007), Fabaceae (DOS SANTOS et al., 2010), Myrtaceae (GUSMAN et al., 2014), Verbenaceae (TELES et al., 2010).

Alguns estudos de revisão vêm sendo publicados, permitindo uma visualização do perfil moluscicida de diversas famílias e gêneros e também de espécies e classes de metabólitos com maior potencial para serem usados no controle desses caramujos, evitando a transmissão da esquistossomose. Cantanhede et al. (2010) relataram atividade moluscicida de extratos de 38 espécies vegetais distribuídas em 24 gêneros e 17 famílias botânicas, demonstrando mortalidade de 50 a 90% de caramujos do gênero *Biomphalaria*. Alves (2013) evidenciou que 259 extratos de plantas, 16 frações e 66 compostos isolados foram testados em *B. glabrata*, dos quais 60% dos extratos vegetais e 75% das frações estudadas demonstraram atividade moluscicida em *B. glabrata*. As amostras foram obtidas de 200 espécies vegetais, distribuídas em 62 famílias botânicas, sendo que Asteraceae, Solanaceae, Euphorbiaceae e Fabaceae foram as famílias mais representativas apresentando alto potencial para serem utilizadas como moluscicida. Neste mesmo estudo, os autores verificaram que em relação aos compostos naturais isolados os que apresentaram ação sobre estes moluscos foram saponinas (44,7%), diterpenos (37,3%), alcaloides (2,9%), cromenos (2,9%), monoterpenos iridoides (2,9%), proteínas (2,9%), cumarinas (1,4%), sesquiterpenos (1,4%) e taninos (1,4%).

Embora moluscicidas naturais sejam biodegradáveis, em determinadas concentrações, mesmo dentro dos valores exigidos pela OMS, os derivados vegetais podem revelar riscos. Nesse contexto, faz-se necessário realizar testes de toxicidade das plantas que demonstram atividade moluscicida (LUNA et al., 2005; SANTOS et al., 2007).

Para avaliação de toxicidade, o peixe é o vertebrado mais recomendado, pois apresenta sensibilidade e permite análise, durante o ensaio, de possíveis alterações fisiológicas e comportamentais (RAPADO et al., 2013) e são animais que podem estar co-habitando com os caramujos em ambientes naturais. Peixes da espécie *Danio rerio* (Hamilton, 1822) é considerado um organismo padrão para ensaios toxicológicos, sendo largamente utilizada em testes de ecotoxicologia aquática (ABNT, 2011). Além disso, já foi utilizado para avaliar os efeitos tóxicos de efluentes industriais (HOLANDA, 2012), de inseticidas, herbicidas (NAKAGOME et al., 2007; SILVA et al., 2010) e de látex vegetal (OLIVEIRA-FILHO et al., 2010) sendo considerado bom indicador de toxicidade ambiental. *D. rerio* já teve o seu genoma completamente sequenciado, é amplamente estudado por apresentar muitos gens com funções semelhantes ao da espécie humana (DAHM, 2006) e conhecidamente semelhante aos modelos de mamíferos e dos seres humanos em ensaios de toxicidade (JONES, 2007).

Embora se comprove a necessidade de avaliação de possíveis efeitos tóxicos de agentes moluscicidas, a exemplo do composto sintético niclosamida que apresenta excelente ação sobre os moluscos, mas também é tóxico para outros seres, ainda são poucos os trabalhos que associam a avaliação sobre os moluscos e possível existência de toxicidade.

Mesmo com essa deficiência, existe um crescente interesse de grupos de pesquisas no desenvolvimento de tecnologias apropriadas que permitam às comunidades afetadas o uso de produtos naturais com propriedades moluscicida (AMARAL, 2008) o que pode ser comprovado pelo número crescente de publicações avaliando produtos obtidos de plantas com ação contra moluscos transmissores de doenças, destacando a esquistossomose.

Considerando que os óleos essenciais de plantas são candidatos em circulação, uma vez que se apresentam altamente ativos para diversas atividades biológicas, conforme já citadas, e estão prontamente disponíveis em países tropicais, além de ser economicamente viável (LAHLOU, 2004) e baseado na importância do estudo de novas fontes sustentáveis para controle da esquistossomose, este trabalho foi desenvolvido estudando óleos essenciais de cinco plantas aromáticas de ocorrência na região Amazônica maranhense conforme descrições a seguir.

### 3.5 Famílias e espécies aromáticas em estudo

#### 3.5.1 *Hyptis dilatata* Benth (Lamiaceae)

Estas espécies pertencem à família botânica Lamiaceae (antiga Labiatae) que é constituída por plantas herbáceas a arbustivas, caracterizadas por apresentar caule e ramos tetragonais em corte transversal, flores fortemente zigomorfas, bilabiadas, e ovário com estilete ginobásico (BASÍLIO et al., 2006).

Segundo o APG (2003), a família Lamiaceae compreende aproximadamente 258 gêneros e 7193 espécies, com ocorrência desde regiões tropicais até áreas de clima temperado. No Brasil, existe cerca de 30 gêneros e 496 espécies nativas, sendo muitas destas espécies endêmicas ao nordeste e região amazônica brasileira (HARLEY, 2012).

Essa família apresenta uma grande variedade de classes de micromoléculas, existindo representantes da via do acetato, da via do ácido chiquímico e provenientes de biossíntese mista (MENEZES, 1994). Importantes compostos biossintetizados pelo metabolismo secundário de suas espécies, como alcaloides, flavonoides, terpenos, cumarinas, lignóides e os óleos essenciais, tem despertado grande interesse pelo seu estudo por apresentarem atividades farmacológicas já descritas (FALCÃO & MENEZES, 2003; LIMA & CARDOSO, 2013).

No Brasil, o gênero *Hyptis* Jacquin abrange o maior número de representantes da família Lamiaceae, com 69,5% de espécies endêmicas, apresentando grande variabilidade de metabólitos secundários, em especial os óleos essenciais, que conferem as principais características organolépticas do vegetal e têm grande valor junto a diversas comunidades devido as suas propriedades terapêuticas (HARLEY, 2012). Espécies desse gênero são popularmente utilizadas para o tratamento de infecções gastrointestinais, câimbras, dores e no tratamento de infecções da pele (BOTREL et al., 2010). Para esse gênero, já tem comprovada as atividades antimicrobiana (SARTORATTO et al., 2004), fungicida (OLIVEIRA et al., 2004), citotóxica, anti-inflamatória, anti-HIV e inseticida (FALCÃO & MENEZES, 2003).

Podem-se destacar duas espécies desse gênero com ocorrência na Amazônia maranhense e que foram avaliadas nessa pesquisa quanto a seu potencial moluscicida: *FG20151* e *Hyptis dilatata* Benth.

*Hyptis dilatata* Benth, popularmente conhecido como hortelãzinho do mato, é uma herbácea aromática, nativa não endêmica do Brasil. Apresenta haste ereto, flores e folhas sésseis, numerosos pelos em toda a superfície foliar, margens crenada, ápice agudo e nervura

central robusta (Figura 8). No Brasil, possui ocorrência confirmada na região norte e envolve ainda os domínios fitogeográficos da Amazônia e cerrado (FLORA BRASILIENSIS, 2005).

**Figura 8.** *Hyptis dilatata* Benth



Fonte: Jiménez et al. (2014).

Os estudos para essa espécie descritos na literatura concentram-se em análises fitoquímicas de seu óleo essencial e extratos. Estes estudos revelaram a predominância de monoterpenos oxigenados no óleo essencial de *H. dilatata* (MELO, 2013; JIMÉNEZ et al., 2014) e a presença de diterpenos tricíclicos no extrato de suas folhas (URONES et al., 1998). A ocorrência dos diterpenos foi relatada quase exclusivamente em apenas nove espécies do gênero *Hyptis* (PIOZZI et al., 2009). Melo (2013), ao realizar estudo do perfil químico de óleo essencial dessa espécie, relatou também o seu potencial antioxidante, e mais recentemente, Fausto et al. (2015) propôs que o extrato das folhas de *H. dilatata* apresenta compostos com potencial antimicrobianos e citotóxicos a linhagens de células cancerígenas.

### 3.5.2 *Eugenia punicifolia* (HBK) DC (Myrtaceae)

A família Myrtaceae compreende cerca de 140 gêneros e 3.500 espécies de árvores e arbustos, destacando-se como uma das famílias mais importantes do ponto de vista econômico, industrial, ornamental e alimentar (MORAIS et al., 2014). São encontradas em

regiões tropicais e subtropicais do globo, representadas principalmente por plantas frutíferas (OLIVEIRA et al., 2005). No Brasil ocorrem aproximadamente 23 gêneros e 1.000 espécies que estão amplamente distribuídas em todos os ecossistemas brasileiros com destaque para região Amazônica (SILVA et al., 2005). No Maranhão, há cerca de 60 espécies em 6 gêneros (ARAGÃO & CONCEIÇÃO, 2007).

As espécies brasileiras pertencem à tribo *Myrteae* DC., na qual encontra-se o gênero *Eugenia* L. considerado um dos maiores da família Myrtaceae, com mais de 600 espécies, das quais cerca de 400 são encontradas no Brasil e assumem destaque especial por serem utilizadas na medicina tradicional (OLIVEIRA et al., 2005).

Em estudos químicos com espécies de *Eugenia* já foram isolados flavonoides e taninos, além de triterpenos e óleos essenciais (LUNARDI et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2005; RODRIGUES et al., 2013). Várias atividades farmacológicas já foram comprovadas como anti-inflamatória e analgésica (FALCÃO et al., 2005), antifúngica (LIMA et al., 2006), anti-leishmania (RODRIGUES et al., 2013), antipirética (HUSSEIN et al., 2003), hipotensiva (CONSOLINI et al., 1999), antioxidante (VELÁZQUEZ et al., 2003), antidiabética (BARBOSA-FILHO et al., 2005) e arritmias ou insuficiência cardíaca (VENDRUSCOLO et al., 2005).

*Eugenia puniceifolia* (HBK) DC é uma espécie rústica de ocorrência na América do Sul (Brasil, Paraguai e Venezuela) sendo encontrada em muitos estados brasileiros com ampla distribuição na região amazônica (COSTA et al., 2010). Cresce como um arbusto prostrado (com ramos deitados) apresenta caule castanho amarronzado, cascudo, reticulado, as folhas lanceoladas, opostas e pecioladas com textura coriácea, margem inteira, não possui brácteas, as flores são de coloração branca, dispostas em panículas e possuem pedúnculos de 0,9 a 2,6 cm de comprimento (Figura 9) (MORAIS et al., 2014). O fruto é vermelho escuro quando maduro e se configura como uma baga globosa, dotada de polpa comestível e adstringente (PENA, 1998). Devido as características do seu fruto, *E. puniceifolia* é popularmente conhecida como cereja do campo.

**Figura 9.** *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC.



Fonte: Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.  
< florado brasil.jbrj.gov.br > Acesso em: 08 Jul. 2016

Estudos químicos do óleo essencial dessa espécie revelaram as classes dos monoterpenos e sesquiterpenos como componentes principais, sendo o mesmo perfil observado para a maioria das espécies de *Eugenia* investigadas (MAIA et al., 1997; APEL et al., 2004; VILA et al., 2004). Em relação a pesquisas etnofarmacológicas desenvolvida por Basting et al (2014), foi verificada indicação popular da espécie *E. punicifolia* na forma de decocção ou infusão como um agente terapêutico natural para tratar a dor e a inflamação. Nesse mesmo estudo, os autores comprovaram essas ações em ensaios *in vitro*, alicerçando o uso popular de *E. punicifolia* e demonstrando o potencial terapêutico desta planta para desenvolvimento de medicamentos com propriedades antinociceptiva, anti-inflamatórios, além de gastroprotetores (BASTING et al., 2014).

Já se tem comprovado o efeito farmacológico de extrato aquoso dessa espécie sobre a neurotransmissão nicotínico-colinérgica (GRANGEIRO et al., 2006) e a avaliação da capacidade anti-inflamatória de extratos orgânicos sobre lesão muscular em camundongos distróficos sob a influência da ativação seletiva do receptor de acetilcolina (LEITE et al., 2010). Além disso, há relato na literatura que as folhas pulverizadas de *E. punicifolia* são promissoras como adjuvante no tratamento da *diabetes mellitus* tipo 2 (SALES et al., 2014) e segundo conhecimento indígena e africano, é conhecida como “insulina vegetal” (JORGE et al., 2000).

### 3.5.3 *Lippia gracilis* Schauer e *Lippia acutidens* Mart (Verbenaceae)

Entre as plantas utilizadas como medicinais, destacam-se as espécies da família Verbenaceae. Esta família compreende 35 gêneros e 1.035 espécies, muitas são exclusivamente brasileiras e outras com distribuição tropical e subtropical (GOMES et al., 2011). Uma característica da família é a presença de tricomas secretores, geralmente produtores de óleos essenciais de grande valor medicinal (FAVORITO, 2009).

Os gêneros mais representativos em número de espécies são: *Verbena*, *Lippia*, *Citharexylum*, *Stachytarpheta*, *Glandularia* e *Duranta* (SANTOS et al., 2008).

O gênero *Lippia*, segundo maior da família Verbenaceae, possui aproximadamente 200 espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores, cujos maiores centros de dispersão se encontram em países das Américas do Sul e Central (PASCUAL et al., 2001). Aproximadamente 120 espécies desse gênero encontram-se no Brasil, principalmente na região norte e nordeste, e se destacam por seu aroma forte e geralmente agradável e pelo seu aspecto chamativo no período da floração (GOMES et al., 2011).

No nordeste do Brasil as espécies de *Lippia* são popularmente utilizadas para o tratamento de resfriados, gripes, bronquites e tosse. Em muitos casos, as partes usadas são as folhas e flores na forma de infusão ou decocto administradas oralmente ou através de emplastos (PASCUAL et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2006).

Os estudos referentes à composição química das espécies de *Lippia* evidenciam, principalmente, os constituintes voláteis. Entretanto, outras substâncias como flavonoides, iridoides e naftoquinonas também são citados como presentes (DOMÍNGUEZ et al., 1989; BARBOSA et al., 2006; LIN et al., 2007).

Nesse estudo, foram estudadas duas espécies pertencentes a este gênero: *Lippia gracilis* Schauer e *Lippia acutidens* Mart.

*Lippia gracilis* Schauer é uma planta aromática endêmica do nordeste brasileiro, própria de vegetação semi-árido, conhecida popularmente como alecrim-de-tabuleiro ou alecrim-da-chapada (LORENZI & MATOS, 2002). Apresenta-se como um arbusto de aproximadamente 2,5 cm de altura, bem ramificada, de folhas pequenas e flores brancas (Figura 10) ambas bastante odoríferas e ricas em óleo essencial (GOMES et al., 2011).

**Figura 10.** *Lippia gracilis* Schauer



Fonte: Fapitec (2015).

A composição química do óleo essencial da espécie *Lippia gracilis* de diferentes regiões tem sido investigada através de cromatografia gasosa, determinando que o carvacrol (SILVA et al., 2008; M. NETO, 2010; MATOS, 1999), timol (LEMOS et al., 1992; FRANCO et al., 2014; BITU et al., 2012), p-cimeno (NEVES et al., 2008; MARRETO et al., 2008; MENDES et al., 2010) são os componentes majoritários que aparecem com maior frequência.

Alguns estudos examinaram as propriedades farmacológicas de *L. gracilis* demonstraram que os compostos presentes no seu óleo essencial tem apresentado forte ação antimicrobiana contra bactérias e fungos patógenos de células animal e vegetal (BOTELHO et al., 2007; ALBUQUERQUE et al., 2006), ações antinociceptiva, anti-inflamatória (MENDES et al., 2010), antibacteriana (BITU et al., 2012; PESSOA et al., 2005), moluscicida (TELES et al., 2010), larvicida (DIAS et al., 2015) além de ter demonstrado atividade citotóxica para várias linhas de células cancerígenas (RIBEIRO et al., 2012).

Entre as suas utilizações medicinais populares têm sido relatados o tratamento de doenças cutâneas, infecções da garganta e boca, congestão nasal, problemas vaginais, tratamento da acne, panos brancos, impigens, caspa, queimaduras e feridas (MATOS, 1999; ALBUQUERQUE et al., 2007; GOMES et al., 2011).

*Lippia acutidens* Mart. & Schauer é uma espécie bastante característica pelas lâminas foliares coriáceas, ovais, com margem denteada-ciliada, possui fores de coloração roxa. É um subarbusto nativo e endêmico do Brasil com ocorrência nos estados da Bahia, Goiás, Maranhão e Tocantins (SALIMENA & MULGURA, 2015). Essa espécie tem sido pouco estudada não sendo encontrados trabalhos com óleo essencial de *L. acutidens* ou relatos de atividades farmacológicas para essa espécie. Os estudos científicos com esta espécie resumem-se a levantamento florístico de regiões, sendo os exemplares preservados na forma de exsicatas e depositados em bancos de dados de herbários (Figura 11).

**Figura 11.** *Lippia acutidens* Mart. & Schauer



Fonte: Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. < florado brasil.jbrj.gov.br >

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Coleta e identificação das espécies vegetais

Partes aéreas de plantas aromáticas foram coletadas de espécimes adultas no Parque Nacional das Nascentes do Rio Parnaíba, Alto Parnaíba-MA, Brasil (10° 2' 2" S; 45° 58' 3" W) em maio de 2014. As exsicatas de identificação botânica estão depositadas no Herbário João Murça Pires do Museu Emílio Goeldi, Belém, Pará, Brasil, onde foi realizada a identificação das espécies. As coletas foram realizadas com anuência do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO (nº: 28007-2), órgão vinculado ao Instituto Chico Mendes, adentando às exigências do Ministério do Meio Ambiente do Brasil (INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 154, DE 01 DE MARÇO DE 2007, atualizada pela INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 3, DE 1 DE SETEMBRO DE 2014).

### 4.2 Extração e seleção dos óleos essenciais

As partes aéreas das espécies coletadas (folhas e galhos finos) foram secas ao ar livre e pulverizadas em moinho de facas, obtendo-se um pó classificado como grosso (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Para a obtenção dos óleos essenciais, os pós foram submetidos separadamente a hidrodestilação utilizando um sistema de vidro tipo Clevenger durante 3h. Após as extrações, os óleos foram tratados com sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), para retirar resíduos de água. Em seguida, cada material foi centrifugado e os óleos essenciais obtidos foram acondicionados em ampolas de vidro âmbar e conservados em ambiente refrigerado, entre 5-10°C (COUTINHO, 2007).

O rendimento dos óleos foi calculado baseado na relação massa/massa, medida por sua densidade a partir do volume de cada óleo obtido por massa (g) dos vegetais em estudos, conforme fórmula a seguir (FARMACOPEIA BRASILEIRA IV, 1996).

Cálculo do rendimento dos óleos:

$$\%R_{\text{end}} = V_{\text{óleo}} \cdot \rho_{\text{óleo}} / m_{\text{planta}} \cdot 100$$

Onde:

$\rho_{\text{óleo}}$  = Densidade dos Óleos (g/mL)

$V_{\text{óleo}}$  = Volume de óleo extraído (mL)

$m_{\text{planta}}$  = Massa da planta utilizada para a extração, livre de umidade (g)

$R_{\text{end}}$  = Rendimento (%)

De um total de vinte e sete plantas aromáticas coletadas, foram selecionadas para realização dos testes biológicos e análise química, cinco espécies vegetais que apresentaram bom rendimento de óleo essencial durante as extrações (rendimento acima de 0,7%), segundo critério estabelecido por Serafini et al. (2002).

Todos os outros óleos foram analisados quanto a composição química e fazem parte do Projeto em rede, intitulado “Base de dados das plantas aromáticas e frutos da amazônia oriental (Pará e Maranhão)”, financiado pelo Edital Programa Pró-Amazônia CAPES nº 047/2012 e coordenado pelo Prof. Dr. José Guilherme Maia (UFPA), sendo o Prof. Dr. Victor Mouchereck coordenador local.

### **4.3 Análise e identificação de componentes dos óleos essenciais**

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM) foi o método utilizado para separar, quantificar e identificar os componentes químicos presentes nos óleos essenciais. Os óleos foram analisados por CG-EM (Thermo DSQ-II Focus) nas seguintes condições de operação: coluna capilar de sílica fundida Scientific DB-5 (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e com 0,25 µm de espessura de filme); programa de temperatura: 60-240 °C a 3 °C/min; gás de arraste: hélio (velocidade linear de 32 cm/s); injeção: tipo "splitless" (0,1 mL da amostra diluída em hexano). Os espectros de massas foram obtidos com um impacto eletrônico de 70 eV, 0,84 scan/sec de m/z 40 a 550. A quantificação de cada componente presente nos óleos essenciais foi realizada pela área do pico de cada substância no cromatograma (%) (MAIA et al., 2001). A identificação dos componentes voláteis foi baseada na correspondência dos seus índices de retenção linear (Índice Kováts) calculado em relação aos tempos de retenção de uma série homóloga de n-alcenos e no padrão de fragmentação observados nos espectros de massas com amostras autênticas existentes nas bibliotecas espectrais de referência do sistema de dados e na literatura (ADAMS, 2007; NIST, 2005).

#### 4.4 Bioensaio frente *Biomphalaria glabrata*

##### 4.4.1 Coleta, manutenção e identificação dos moluscos

O organismo-teste utilizado para o presente estudo foi o molusco da espécie *Biomphalaria glabrata* Say 1818, coletados no Bairro Sá Viana, São Luís-MA (2° 33' 35.1"S; 44° 18' 05.3" W), localidade que apresenta criadouros de planorbídeos com índices de caramujos positivos para *S. mansoni* (FRANÇA, 2011). Os caramujos capturados foram quantificados e mantidos em condições de laboratório: aquários de vidro (20 litros) contendo água desclorada, sob aeração constante, a temperatura de 25°C e alimentados com alface *in natura* (MALEK, 1985). Durante a manutenção dos planorbídeos, 10% do total de caramujos coletados foram separados para a confirmação da espécie, realizada pela análise de características conquiliológicas e da morfologia interna, descritas por Paraense (1975).

##### 4.4.2 Verificação de infecção por *S. mansoni* em caramujos

Durante quatro semanas, os moluscos *B. glabrata* foram examinados para verificar possível infecção por *S. mansoni*. Semanalmente foram isolados em recipientes de vidro com 5 ml de água desclorada, e expostos à luz e ao calor de lâmpadas de 60 W, durante aproximadamente duas horas (SMITHERS & TERRY, 1974). Após a foto-estimulação, foram observados com auxílio de estereomicroscópio, para verificar se houve eliminação cercárias de *S. mansoni*. Dentre os caramujos não infectados, foram selecionados os adultos com conchas de diâmetro de 15 a 20 mm, para os testes de atividade moluscicida.

##### 4.4.3 Ensaio moluscicidas

O teste da atividade moluscicida seguiu a metodologia padrão preconizada pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1965). Os ensaios consistiram na imersão de cinco caramujos *B. glabrata* em soluções aquosas dos óleos essenciais a 0,1% de dimetilsulfóxido (DMSO) por 24 horas, em concentrações que variaram de 100 a 200 µg/mL. Após exposição, os moluscos foram lavados, introduzidos em aquários com água desclorada e alimentados com alface, permanecendo sob observação por mais 24 horas, com registro e retirada dos caramujos mortos. Os óleos que apresentaram 90-100% de mortalidade dos moluscos em concentrações abaixo de 200 µg/mL foram considerados ativos e submetidos a testes definitivos. Neste ensaio, foram expostos 10 caramujos por concentração de óleo essencial,

que variaram de 8 a 200 µg/mL, obedecendo a relação de 50 mL de solução/caramujo. Os recipientes utilizados no ensaio foram tampados com filmes plásticos com pequenas perfurações, para evitar a fuga dos caramujos expostos. A metodologia utilizada seguiu a do teste acima descrito, variando apenas a leitura da mortalidade que foi feita até 48 horas da exposição dos moluscos às soluções avaliadas. A mortalidade foi indicada pela ausência de contração muscular, extravasamento de hemolinfa e/ou retração massa cefalopodal para dentro da concha (MACCULLOUGH, 1980). Em todos os ensaios, foram introduzidos grupos de controle negativo utilizando água desclorada com DMSO 0,1% (tensoativo utilizado para diluição dos óleos essenciais) e controle positivo realizado com a substância de referência sulfato de cobre (15µg/mL). Os ensaios foram realizados em triplicatas. Após o período de experimentação, todos os caramujos, vivos ou mortos, foram expostos diretamente à solução concentrada de hipoclorito de sódio para completa letalidade.

#### **4.5 Teste de toxicidade aguda para peixes**

Os óleos essenciais que demonstraram atividade moluscicida, foram submetidos à avaliação de toxicidade frente a peixes *Danio rerio* (Teleostei, Cyprinidae), uma espécie tropical, ovípara, onívora, de comprimento variando entre 4 e 5 centímetros vulgarmente conhecida como paulistinha ou *zebrafish*, usado como indicador de ecotoxicidade. Os peixes utilizados foram obtidos de uma piscicultura comercial. Após a aquisição, os peixes foram aclimatados, mantidos em aquário com capacidade de 70L com um filtro biológico externo, sob aeração constante e com troca parcial de água de 50% a cada 48h, com retirada por sifonamento dos resíduos (fezes e restos de ração) depositados no fundo do aquário. Após o período de aclimação, os lotes dos peixes foram avaliados quanto à sensibilidade através ensaios utilizando dodecil sulfato de sódio (DSS) como substância de referência nas concentrações 1,75; 3,5; 7,0; 14; 28 µg/mL.

O ensaio de toxicidade foi realizado por método estático, sem reposição de água, padronizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 15088, 2011), utilizando peixes adultos (3,0 a 4,0 cm). Grupos de quatro organismos foram colocados em mini-aquários (1,5L) contendo óleo e DMSO 0,1% diluídos em água, obedecendo a proporção de 1 grama de peixe para um litro de solução-teste. As concentrações das soluções-teste foram baseadas nas CLs apresentadas na atividade moluscicida. Os resultados avaliados para as CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> determinadas no ensaio moluscicida, foram expressos de forma qualitativa como

“Tóxico” ou “Não Tóxico” referenciando o tempo de exposição. Posteriormente calculou-se as  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$  para os peixes. O experimento teve duração de 48h, sendo que a cada 24h foi verificado o número de animais mortos e aferidas variáveis tais como pH, oxigênio dissolvido e temperatura. Controle negativo (água desclorada e DMSO 0,1%) foi incluso no teste. Esse ensaio foi desenvolvido conforme aprovação da Comissão de Ética no Uso Animal da Universidade Federal do Maranhão (Registro: 34/15).

#### **4.6 Análise dos dados**

As concentrações letais (50 e 90%) de cada planta foram obtidas por análise de regressão linear modelo probit (software SPSS®, versão 13.0), assumindo nível de confiança 95%. As médias das CLs de cada óleo foram submetidas à análise de variância com pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), utilizando-se o software Assistat beta (versão 7.7).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Identificação das espécies e composição química dos óleos essenciais

As espécies selecionadas para este estudo estão descritas na Tabela 1, com seus respectivos rendimento de óleo essencial, e código de identificação. As cinco espécies identificadas são pertencentes a três famílias aromáticas, sendo duas Lamiaceae, duas Verbenaceae e uma Myrtaceae. Segundo Maia & Andrade (2009), essas famílias estão entre as dez principais famílias de plantas aromáticas que predominam na região amazônica, sendo consideradas fontes renováveis apropriadas para a produção de óleos essenciais e aromas.

**Tabela 1:** Dados das espécies aromáticas coletadas na Amazônia maranhense, Parque Nacional da Nascente do Parnaíba-MA, Brasil e rendimento de seus óleos essenciais.

Espécies aromáticas	Nome vulgar	Parte da planta utilizada	Rend. Óleo (%)*	Código da amostra**
LAMIACEAE				
<i>Hyptis dilatata</i> Benth	hortelãzinho do mato	folhas / ramos finos	4,7	MA-19
FG20151	--	folhas / ramos finos	1,57	MA-04
MYRTACEAE				
<i>Eugenia puniceifolia</i> (HBK) DC	cereja do campo	folhas	1,58	MA-11
VERBENACEAE				
<i>Lippia gracilis</i> Schauer	alecrim-de-tabuleiro	folhas / ramos finos	7,34	MA-01
<i>Lippia acutidens</i> Mart.		folhas / ramos finos	0,79	MA-25

\* volume de óleo em mL/massa de planta aromática; \*\* Códigos de registro das amostra no Herbário João Murça Pires

A caracterização cromatográfica permitiu a identificação de cinquenta e dois compostos diferentes presentes nos óleos estudados, dos quais vinte e um pertencem à classe de monoterpenos e trinta e um são sesquiterpenos. A composição química, assim como as abundâncias relativas (área percentual relativa dos picos no cromatograma) dos constituintes identificados nos óleos essenciais das cinco espécies aromáticas estão listadas na Tabela 2.

**Tabela 2:** Constituintes identificados nos óleos essenciais de espécies aromáticas coletadas na Amazônia maranhense, Parque Nacional da Nascente do Parnaíba- MA, Brasil.

COMPOSTOS <sup>b</sup>	Abundância relativa (%) <sup>a</sup>						
	IK calc. <sup>c</sup>	IK lit.	E.P	H.D	FG	L.A	L.G
$\alpha$ -Thujene	924	931	–	–	–	–	0.38
$\alpha$ -Pinene	937	932	58.65	11.92	–	0.65	–
Camphene	953	946	1.87	2.57	–	1.7	–
Abinene	969	969	–	–	–	2.54	–
$\beta$ -Pinene	982	974	–	1.82	–	–	–
Myrcene	986	988	–	–	–	0.88	–
$\beta$ -myrcene	993	991	–	–	–	–	2.08
$\alpha$ -Terpinene	1015	1016	–	–	–	0.23	–
o-Cymene	1028	1022	–	6.88	–	2.51	4.87
Limonene	1032	1024	5.25	2.51	–	–	–
1,8-Cineole	1036	1026	13.06	19.8	–	26	–
Tagetone<dihydro->	1048	1046	–	–	–	4.32	–
$\gamma$ -Terpinene	1059	1054	–	6.11	–	–	0.98
Linalool	1099	1095	–	–	–	13.07	–
Camphor	1152	1141	–	37.98	–	5.78	–
Borneol	1169	1165	2.55	–	–	1.42	–
Terpinen-4-ol	1178	1174	–	–	–	1.33	–
$\alpha$ -Terpineol	1198	1186	5.92	1.35	–	0.72	–
Thymol-methyl ether	1232	1232	–	–	–	–	1,35
trans-Linalool oxide acetate	1286	1286	–	–	–	0.99	–
Thymol	1292	1289	–	–	–	–	57.94
$\alpha$ -Copaene	1370	1374	–	–	1.59	1.97	–
$\beta$ -Bourbenene	1378	1387	–	–	2.14	–	–
$\beta$ -Elemene	1390	1391	–	–	1.4	–	–
$\beta$ -Caryophyllene	1419	1418	2.04	1.54	13.75	3.05	–
$\alpha$ -Santalene	1420	1420	–	–	1.78	–	–
$\alpha$ -Bergamotene	1432	1430	–	–	1.04	–	–
trans-Muuroala-3,5-diene	1449	1450	–	–	–	1.4	–
Aromadendrene< allo>	1452	1458	–	–	8.44	1.12	–
$\alpha$ -Humulene	1455	1452	–	–	–	–	0.73
Germacrene-D	1474	1480	–	–	1.42	1.85	–
$\gamma$ -Patchoulene	1482	1484	–	–	–	0.84	–
Bicyclogermacrene	1488	1494	–	–	–	1	–
Viridiflorene	1491	1490	–	–	–	0.34	–
$\alpha$ -Amorphene	1506	1506	–	–	1.42	–	–
7-epi-alpha-Selinene	1510	1514	–	–	–	0.9	–
$\delta$ -Amorphene	1512	1511	–	–	3.77	–	10.96

$\gamma$ -Cadinene	1513	1513	–	–	2.15	–	–
trans-Calamene	1527	1529	–	–	2.01	–	–
trans- $\alpha$ -bisabolene	1549	1549	–	–	2.97	–	–
Caryolan-8-ol	1573	1571	0.38	–	–	–	–
Spathulenol	1575	1577	–	–	6	3.33	–
Caryophyllene oxide	1579	1582	–	–	1.5	4.06	–
Globulol	1585	1583	–	–	1.73	–	–
Humulene epoxide II	1600	1606	–	–	2.48	1.09	11.38
1,6-Humulenedien-3-ol	1619	1619	–	–	9.27	–	–
1,10-di-epi-Cubenol	1621	1619	–	–	1.4	–	–
t-Muurolol	1640	1642	–	–	10.28	–	–
$\alpha$ -Eudesmol	1647	1652	–	–	–	0.84	–
Pogostol	1652	1651	0.53	–	–	–	–
$\alpha$ -Cadinol	1654	1653	–	–	15.79	–	–
trans-Farnesol	1728	1714	–	–	2.42	–	–
<b>Total identificado (%)</b>			<b>90.25</b>	<b>92.48</b>	<b>94.75</b>	<b>83.93</b>	<b>90.67</b>

<sup>a</sup> Calculado a partir das áreas relativas dos picos nos cromatogramas.

<sup>b</sup> Compostos listados em ordem de eluição em coluna DB - 5MS

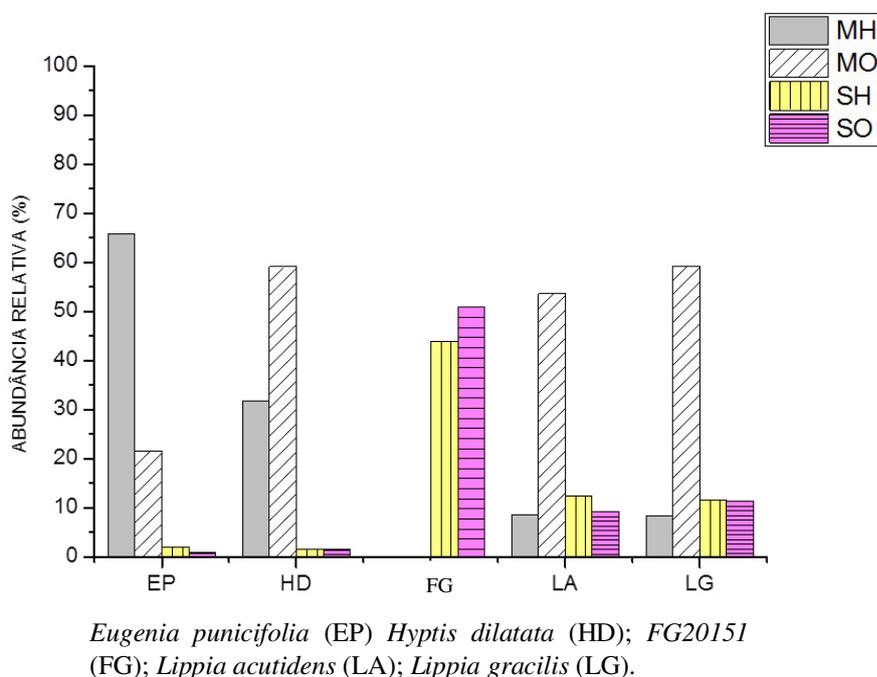
<sup>c</sup> Índice Kovats calculado durante a corrida em uma coluna capilar de sílica fundida, DBS5/30m  
IK lib: Índice de Kovatz da biblioteca (Adams, 2007).

EP: *Eugenia punicifolia*; HD: *Hyptis dilatata*; FG: *FG20151*; LA: *Lippia acutidens*; LG: *Lippia gracilis*.

Os óleos essenciais (OEs), também chamados óleos voláteis, são misturas naturais de substâncias lipofílicas, que podem conter até 60 componentes em diferentes concentrações e caracterizados pela presença de um a três componentes em concentrações relativamente elevadas (20 a 70%) comparadas aos outros componentes presentes (TEIXEIRA et al., 2014). Os OEs são formados principalmente por metabólitos secundários das classes dos monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides (SIMÕES et al., 2010).

Levando em consideração o critério estabelecido por Knudsen et al. (1993), os compostos terpênicos presentes nos óleos essenciais foram agrupados em quatro classes químicas principais: monoterpenos hidrocarbonetos, monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos hidrocarbonetos e sesquiterpenos oxigenados. Uma comparação do conteúdo total das espécies terpênicas presentes nas cinco amostras, demonstrou o maior teor de monoterpenos totais nos óleos *Hyptis dilatata* (90,94%), seguido por *Eugenia punicifolia* (87,3%), *Lippia gracilis* (67,6%) e *Lippia acutidens* (61,15%) (Figura 12). Por outro lado o óleo essencial de *FG20151* demonstrou ausência de monoterpenos e predominância de sesquiterpenos oxigenados (94,75 %).

**Figura 12.** Porcentagem de monoterpenos hidrocarbonetos (MH), monoterpenos oxigenados (MO), sesquiterpenos hidrocarbonetos (SH) e sesquiterpenos oxigenados (SO) identificados nos óleos voláteis das espécies aromáticas estudadas.



No óleo de *Eugenia puniceifolia* foi possível identificar nove compostos, representando 90,25% do teor de voláteis. Este óleo foi caracterizado pela predominância de monoterpenos hidrocarbonados, cujos compostos majoritários foram o  $\alpha$ -pineno (58,65%) e 1,8-Cineol (13,06%) correspondendo a mais da metade do teor volátil presente no óleo. Perfil semelhante foi observado no óleo essencial das espécies congêneres *Eugenia brasiliensis* Lam., e *Eugenia sulcata* Spring ex Mart, com maior teor de monoterpenos, entre os quais  $\alpha$ -pineno e 1,8-cineol foram predominantes em ambas espécies (MORENO et al., 2007; RAMOS, et al., 2010). Estes compostos monoterpênicos são geralmente identificados em óleos essenciais de espécies do gênero *Eugenia* (COLE et al., 2007). Outros compostos majoritários também têm sido relatados em estudo fitoquímico da espécie *E. puniceifolia*. Oliveira et al. (2005), encontraram a presença dos monoterpenos  $\alpha$ -pineno e 1,8-cineol nos óleos essenciais de folhas desta espécie coletadas em duas regiões de Matas Serranas no estado de Pernambuco, porém os constituintes majoritários registrados foram o linalol (44%; 61,2%) e  $\beta$ -cariofileno (22,7%; 16,2%). O composto  $\beta$ -cariofileno também foi observado na composição da amostra

coletada no estado do Maranhão em quantidades menores (2,04%), por outro lado, não foi identificado neste estudo a presença do monoterpene linalol.

Variações na composição química do óleo essencial de uma mesma espécie de regiões distintas, como Matas Serranas de Pernambuco e Amazônia maranhense podem ser atribuídas às diferenças dos parâmetros climáticos e geográficos, como temperatura, índice pluviométrico, tipo de solo, entre outros fatores ambientais que influenciam na produção dos metabólitos secundários (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

O óleo de *Hyptis dilatata* foi caracterizado pela predominância de monoterpenos oxigenados, sendo cânfora (37,98%) e 1,8-cineol (19,8%) os compostos majoritários, seguido pelos hidrocarbonetos monoterpênicos  $\alpha$ -pineno (11,92%) e o-cimeno (6,88%). Utilizando a mesma parte da planta e a mesma metodologia para obtenção do óleo essencial de *H. dilatata* coletadas na porção da Amazônia oriental no estado do Maranhão, Melo (2013) revelou a predominância de monoterpenos, sendo cânfora (16,0%) e o-cimeno (10,5%) os principais compostos, o que está de acordo com os compostos majoritários apresentados identificados neste trabalho para o óleo da mesma espécie. As semelhanças entre o perfil químico desta amostra de *H. dilatata* e da amostra identificada neste estudo pode estar relacionada a igualdade dos parâmetros climáticos e geográficos das regiões de coleta das amostras comparadas.

Jiménez et al. (2014) indicam também a cânfora como componente majoritário, com teor de 43,8%, para exemplares de *H. dilatata* coletado na Colômbia e relatam a predominância dos monoterpenos oxigenados no óleo essencial. Assim, as composições mostraram algumas similaridades quanto ao composto majoritário e aos demais constituintes identificados nesse estudo, que também foram relatados para os exemplares da Colômbia:  $\beta$ -cariofileno (12,8%),  $\alpha$ -pineno (2,2%), cineol (0,2%), o-cimeno (0,4%),  $\alpha$ -terpineno (0,2%)  $\gamma$ -terpineno (0,3%), limoneno (2,2%),  $\beta$ -pineno (0,7%) e canfeno (0,6%), porém apresentando diferenças significativas em suas quantidades relativas. Além disso, esses autores descreveram outros compostos não identificados nesse estudo, a exemplo do monoterpene hidrocarbonado  $\delta$ -3-careno (11%) e o sesquiterpene oxigenado palustrol (6%).

O óleo de *FG20151* por sua vez caracterizou-se por conter apenas misturas de sesquiterpenos, apresentando como constituinte majoritário o  $\alpha$ -cadinol (15,79%), e elevados teores de  $\beta$ -cariofileno (13,75%) e o t-muurolol (10,28%). O alto teor de sesquiterpenos no óleo essencial de *FG20151* é relatado na literatura (TCHOUMBOUGNANG et al., 2005;

SANTOS et al., 2008). No entanto, a composição química de *FG20151* é variável como demonstrado por Tchoumboungang et al. (2005) que investigaram a composição química do óleo essencial das folhas frescas de *FG20151* da região úmida do oeste de Camarões (África Central), e demonstraram que D-germacreno (28%) e  $\beta$ -cariofileno (22,1%) foram os principais componentes. Santos et al. (2008) identificaram o calamusenone (24,64%) como principal componente em cultivares de Sergipe, sendo descrito pela primeira vez a ocorrência desse composto no gênero desta espécie.

A espécie *FG20151* demonstrou a variabilidade de quimiotipos quando comparado a dados reportados na literatura. As diferenças existentes nestes estudos podem ser devido à variação genética intra-espécies, ou a outros fatores, como tipo de material usado na extração (fresco ou seco) e localização geográfica.

Embora pertençam a espécies de mesmo gênero, os óleos essenciais de *L. acutidens* e *L. gracilis* demonstraram perfis químicos bem diferentes, apresentando apenas dois compostos em comum (o-cimeno e humuleno epoxido II) de um total de vinte e sete compostos identificados para *L. acutidens* e nove para *L. gracilis*. Os componentes majoritários anunciados para essas duas espécies foram os monoterpenos 1,8-cineol (26%) e timol (57,94%), respectivamente. O conteúdo e as composições de óleos essenciais podem diferir significativamente, mesmo no mesmo gênero, bem como em diferentes fases de maturação e diferentes órgãos (TIRADO et al., 1995).

O perfil químico da espécie *L. gracilis* obtido nesse estudo foi consistente com outros já relatados, havendo pouca variação no conteúdo terpênico relativo entre os óleos essenciais de *L. gracilis* coletadas no Nordeste do Brasil, porém variações quantitativas foram observadas. O óleo essencial de folhas desta espécie coletadas em Balsas, município do estado do Maranhão, apresentou mais de 70% do composto timol em sua composição (FRANCO et al., 2014). Bitu et al. (2012) também relataram a presença do timol (44,42 %) como composto dominante na composição química do óleo essencial de *L. gracilis* obtido de amostras cultivadas no estado do Ceará.

O óleo essencial de *L. gracilis* apresentado nesse estudo foi caracterizado como espécime do tipo químico timol, uma vez que já foi relatado na literatura quimiotipos da espécie onde o composto predominante é o carvacrol, isômero do timol (SILVA et al., 2008; M. NETO, 2010). Em trabalhos anteriores foi observado que óleos essenciais do gênero *Lippia* coletados na Amazônia brasileira apresentam quantidades significativas de timol,

carvacrol, p-cimeno, 1,8-cineol,  $\gamma$ -terpineno, cariofileno, citral e carvona (MAIA et al., 2005; SILVA et al., 2009; DAMASCENO et al., 2011). Desta forma, deve-se considerar que os quimiotipos de *L. gracilis* podem resultar do polimorfismo da planta, levando em conta, principalmente, tempo e local de coleta (FRANCO et al., 2014).

O óleo essencial de *Lippia acutidens* não foi previamente descrito, não havendo relatos de estudos realizados com frações voláteis desta espécie, sendo este o primeiro trabalho com relato de composição química e atividade biológica do óleo essencial de *L. acutidens*. Neste estudo, 27 compostos foram identificados no óleo essencial de *L. acutidens*. A caracterização química revelou ser constituída majoritariamente por monoterpenos (61,15%) e sesquiterpenos (21,79%), possui 1,8-cineol e linalol como constituinte dominante com teores de 26% e 13,07% respectivamente, seguido por cânfora (5,78%), dihidro-tagetone (4,32%), óxido de cariofileno (4,06%), espatulenol (3,33%),  $\beta$ -cariofileno (3,05%), abinene (2,54%) além de outros compostos em teores menores, o que representou 83,93% do total de voláteis presentes no óleo essencial da espécie.

As variações encontradas nas composições químicas dos óleos avaliados nesse estudo, relacionadas tanto aos componentes majoritários, quanto aos tipos de componentes e quantidades relativas, em geral são atribuíveis à influência das condições ambientais, alterações fisiológica e genética da planta, estado do material e método de extração utilizado (MARLÚCIA et al., 2011). Os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente, que podem influenciar as atividades enzimáticas em determinadas espécies e, conseqüentemente, interferir na biossíntese de metabólitos secundários, incluindo compostos terpênicos (TEIXEIRA et al., 2014).

Todas estas diferenças nos perfis dos óleos devem ser tomadas em consideração quando se propõe qualquer tipo de correlação entre a composição química e atividade biológica ou efeitos farmacológicos dos óleos. Dessa forma, a aplicação de óleos essenciais voltada para atividade biológica deve ser precedida do estudo e análise de sua composição química, fundamental 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 novos fármacos ou desenvolvimento de produtos para aplicações específicas, como a do presente estudo, em busca de substâncias de plantas com efeito moluscicida.

Este estudo permitiu caracterizar a composição química de algumas espécies aromáticas de ocorrência na região amazônica maranhense e no caso da espécie *L. acutidens*, é o primeiro relato na literatura científica relacionado com a análise das frações voláteis das partes aéreas desta espécie.

## 5.2 Avaliação moluscicida sobre caramujos *B. glabrata*.

Neste trabalho, com exceção do óleo essencial de *L. gracilis*, foram apresentados os primeiros estudos de óleos essenciais das espécies *Eugenia punicifolia*, *Hyptis dilatata*, *FG20151* e *Lippia acutidens* quanto à atividade moluscicida.

Os óleos essenciais das cinco espécies estudadas apresentaram atividade moluscicida frente a caramujos adultos da espécie *B. glabrata* nas concentrações avaliadas (Tabela 3).

**Tabela 3.** Concentrações letais dos óleos essenciais obtido de espécies de ocorrência na Amazônia maranhense sobre caramujos *Biomphalaria glabrata*

Espécies Aromáticas	Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	<i>Biomphalaria glabrata</i> *	
		CL <sub>50</sub>	CL <sub>90</sub>
<i>Eugenia punicifolia</i> (HBK) DC	200	98,91	170,13
	100		
	75		
	50		
	25		
<i>Hyptis dilatata</i> Benth	200	112,64	182,33
	100		
	75		
	50		
	25		
<i>FG20151</i>	75	39,57	62,74
	50		
	30		
	25		
	15		
<i>Lippia acutidens</i> Mart.	100	76,08	98,5
	75		
	60		
	50		
	45		
<i>Lippia gracilis</i> Schauer	30	19,09	27,41
	20		
	15		
	10		
	8		

\*Análise realizada 24h após exposição. Não foi observado mortalidade de caramujos expostos no controle negativo, solução de DMSO a 0,1%. O controle positivo exibiu 100% de mortalidade dos caramujos, solução com 15 $\mu\text{g/mL}$  de sulfato de cobre.

Os óleos essenciais mostraram-se ativos contra *B. glabrata* em concentrações letais 50% variando de 19,9 µg/mL - 112,64µg/mL e CL<sub>90</sub>% de 27,41 µg/mL - 182,33µg/mL, analisados 24 h após exposição.

Segundo as diretrizes da WHO (1983), uma planta com propriedade moluscicida é considerada ativa se ocasionar 90% de mortalidade, em concentrações de até 100 µg/mL. Das cinco espécies estudadas, três apresentaram CL<sub>90</sub> abaixo de 100 µg/mL, sendo elas: *Lippia gracilis*; *Lippia acutidens* e *FG20151* com CL<sub>90</sub> de 27,41 µg/mL; 98,5 µg/mL 62,74 µg/mL respectivamente. Dessa forma, estas espécies foram consideradas plantas moluscicidas com atividade significativa conforme as normas da Organização Mundial de Saúde.

Os valores normatizados pela WHO, teoricamente sugerem um limite para que os efeitos tóxicos causados pelos compostos presentes no vegetal sejam os menores possíveis em organismos não alvo. Assim, quanto menor for a concentração na dose letal (90-100% de letalidade dos caramujos), melhores serão as condições de uso desses compostos no meio ambiente, e uma menor quantidade do material será utilizado (MOREIRA et al., 2010).

Uma forte atividade foi observada durante os ensaios biológicos nas concentrações de 100 e 200 µg/mL do óleo essencial de *L. gracilis*, causando letalidade imediata de todos os caramujos expostos, com liberação de hemolinfa. Essa mortalidade significativa foi verificada a partir da concentração de 30 µg/mL, em um intervalo de tempo de até 24h de exposição. Para os demais óleos, houve este efeito nas mesmas concentrações (100 e 200 µg/mL), no entanto foi observado a partir de 5 horas de exposição. Respostas rápidas contra os moluscos mostram que estes óleos contêm provavelmente neurotoxinas que podem apresentar sensibilidade ao sistema neuromuscular dos moluscos expostos (YOUSSEF & SHAALAN, 2011).

Outra observação importante neste experimento foi que, a partir da concentração de 50 µg/mL, os caramujos, ao entrarem em contato com a solução do óleo essencial de *L. acutidens*, estenderam anormalmente toda a massa cefalopodal para fora de suas conchas com inchaço exagerado, ou seja, além das estruturas que comumente se observa, projetaram o colo e a sola plantar. Segundo Rey (2001), a massa cefalopodal que se projeta normalmente para fora consiste nos tentáculos, cabeça e pé, demonstrando comportamento habitual quando o molusco se locomove.

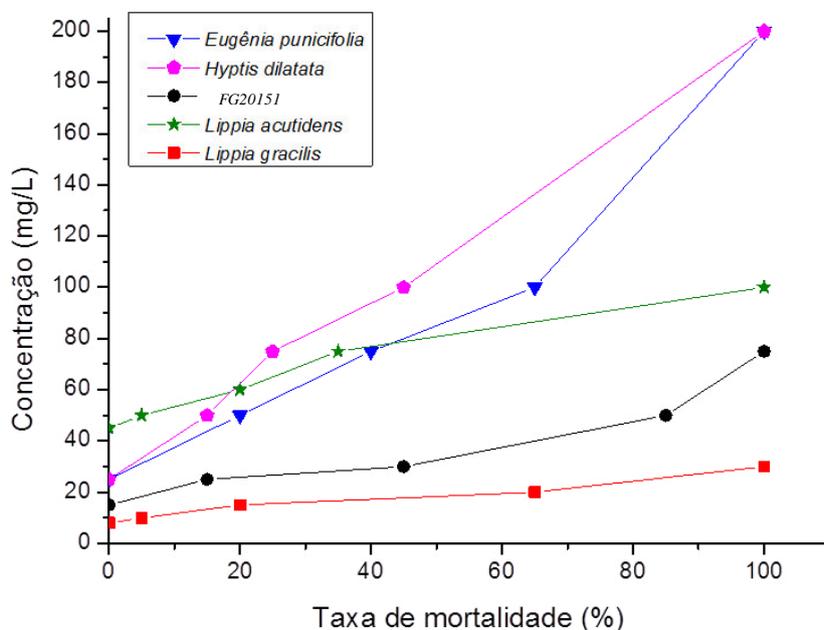
Estas observações reforçam os efeitos descritos por McCullough et al. (1980), que relataram que o envenenamento com moluscicidas provoca no caramujo a retração da massa

cefalopodal para o interior da concha ou um inchaço com consequente prolongamento para fora da concha devido à quebra do equilíbrio osmótico que está sob controle neuro-hormonal.

Nos demais óleos, foi observado somente a retração da massa cefalopodal para o interior da concha sem resposta ao estímulo de toque, além da liberação de hemolinfa, característica apresentada por todos os indivíduos considerados mortos. Mesmo nas concentrações dos óleos essenciais de *H. dilatata* e *E. puniceifolia*, onde não foram observados taxas de mortalidade elevadas em concentrações inferiores a 100 µg/mL, foi identificado ainda, diferenças no comportamento desses organismos, como a diminuição da capacidade motora e da alimentação. Tais mudanças no comportamento sugerem uma reação própria destes moluscos frente a um agente agressor.

As taxas de mortalidade de *B. glabrata* para cada concentração dos respectivos óleos essenciais estudados, foram ascendentes de acordo com aumento das concentrações, indicando uma tendência de mortalidade concentração-dependente, ou seja, há uma forte relação entre a taxa de mortalidade de *B. glabrata* e a concentração (Figura 13).

**Figura 13.** Taxa de mortalidade dos caramujos *Biomphalaria glabrata* em diferentes concentrações (mg/L) dos óleos essenciais estudados

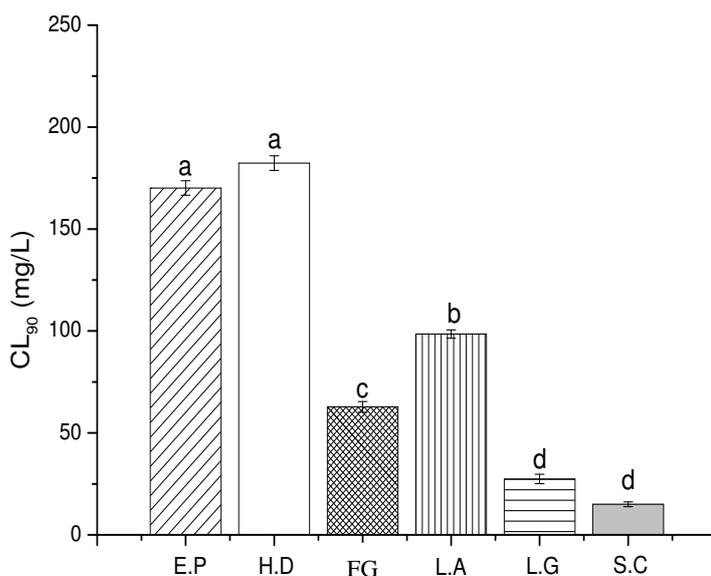


A taxa de percentagem da mortalidade dos caramujos frente ao óleo de *L. gracilis*, *FG20151* e *L. acutidens* torna-se constante a partir das concentrações 30 µg/mL, 75 µg/mL e 100 µg/mL respectivamente, concentrações em que atingem 100% de mortalidade dos moluscos. Os óleos *FG20151* e *E. puniceifolia* ocasionaram mortalidade de 100% em concentrações mais elevadas. O desempenho dos óleos essenciais foi se tornando mais efetivo com o aumento de suas concentrações provavelmente devido ao maior contato dos caramujos expostos aos compostos presentes nos óleos essenciais.

Em análise comparativa da atividade moluscicida dos diferentes óleos testados, pode-se perceber que houve diferença significativa entre os grupos expostos, evidenciando a existência de uma heterogeneidade entre os valores das CL<sub>90</sub> encontradas para os óleos testados, exceto os de *E. puniceifolia* e *H. dilatata* que não apresentaram diferenças significativas entre si (Figura 14).

O óleo essencial de *L. gracilis* foi o que apresentou a melhor concentração letal aos moluscos, não diferindo estatisticamente do padrão utilizado, sulfato de cobre. Os óleos que seguiram com as melhores concentrações foram *FG20151* e *L. acutidens*. As concentrações letais dos óleos *E. puniceifolia* e *H. dilatata* apresentaram os mesmos efeitos sobre *B. glabrata*.

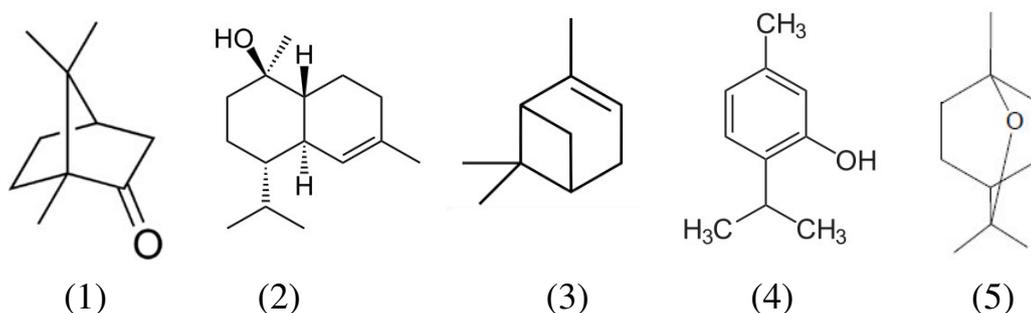
**Figura 14.** Valores quantitativos (CL<sub>90</sub>) do efeito moluscicida dos óleos *Eugenia puniceifolia* (EP); *Hyptis dilatata* (HD); *FG20151* (FG); *Lippia acutidens* (LA) e *Lippia gracilis* (LG) comparados ao padrão sulfato de cobre (SC).



\*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A atividade do óleo volátil está relacionada à configuração química dos componentes, às proporções em que estão presentes e às interações entre eles (MELO et al., 2011). A estrutura química dos compostos majoritários identificados nos óleos essenciais avaliados são apresentadas na figura 15.

**Figura 15.** Fórmulas estruturais dos compostos majoritários identificados nos óleos essenciais



(1) Cânfora: composto majoritário de *Hyptis dilatata*; (2)  $\alpha$ -cadinol: composto majoritário de *FG20151*; (3)  $\alpha$ -pineno: composto majoritário de *Eugenia punicifolia*; (4) Timol: composto majoritário de *Lippia gracilis*; (5) 1,8-cineol: composto majoritário de *Lippia acutidens*.  
Fonte: El-Sayed AM 2016.

A partir dos resultados do perfil fitoquímico das espécies estudadas foi possível associar a atividade moluscicida com a presença de alguns compostos identificados nos óleos, através da busca de atividades já descritas para esses compostos relatados na literatura.

O óleo essencial de *L. gracilis*, espécie que obteve melhor resposta moluscicida, foi caracterizado pela predominância do monoterpene oxigenado timol (57,94 %) em seu perfil químico. A atividade moluscicida desse óleo pode estar associada a presença deste composto, uma vez que o potencial moluscicida do timol foi relatada por Radwan et al. (2008) que demonstraram a atividade desse composto contra caramujos do mesmo gênero de ocorrência no Egito, *Biomphalaria alexandrina* (Ehrenberg, 1831), aplicando  $CL_{90}$  de 13,92  $\mu\text{g/mL}$ .

O potencial moluscicida do óleo de *L. gracilis*, também foi relatado por Teles et al. (2010) que obtiveram resultados similares, demonstrando expressiva mortalidade de *B. glabrata* com o óleo dessa espécie, sendo o timol o composto majoritário (24%). O valor da  $CL_{90}$  obtida por Teles et al. (2010) foi de 82,8  $\mu\text{g/mL}$ , bem superior a  $CL_{90}$  de 27,41  $\mu\text{g/mL}$  obtida nesse estudo. A variação das concentrações letais encontradas pode estar diretamente

relacionada à diferença do teor de timol existente nos óleos comparados. Foi observado que quanto menor a concentração letal, maior a quantidade de timol existente.

Outras atividades biológicas do óleo essencial de *Lippia gracilis* rico em timol tem sido descrito na literatura. Bitu et al. (2012) avaliando atividade antimicrobiana do óleo de *L. gracilis* (44,42% de timol) obtiveram relevante atividade contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* em concentrações de 64 a 512 µg/mL. Franco et al. (2014) também testaram atividade antimicrobiana do óleo de *L. gracilis* (73,5% de timol) obtendo significativa inibição no crescimento de espécies fúngicas em concentração de 5 µg/mL. Os autores sugeriram que a atividade poderia ser atribuída a presença de timol, composto majoritário, uma vez que o timol já teve comprovada atividade antibacteriana e antifúngica relatadas na literatura (BOTELHO et al., 2007; FUSELLI et al., 2008). Botelho et al. (2007) demonstraram que *Candida albicans*, era suscetível tanto ao óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham., rico em timol (56,7%) quanto ao timol puro.

Os monoterpenos oxigenados 1,8-cineol e cânfora, identificados como predominantes nos óleos de *L. acutidens* e *H. dilatata*, respectivamente, não tem sua atividade moluscicida relatada na literatura em estudos anteriores. Logo, a atividade moluscicida desses óleos pode estar relacionada aos compostos majoritários presentes ou associada a outros compostos que mesmo em pequenas concentrações podem se apresentar ativos ou devido ao sinergismo dos constituintes presentes nos óleos.

Outras atividades biológicas já foram relatadas para esses compostos e se mostraram ativos. Segundo Prates et al. (1998) os monoterpenos 1,8-cineol e cânfora foram capazes de matar 100% das larvas do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) em 5 e 60 minutos respectivamente. Segundo esses autores, os mesmos efeitos também foram observados para o óleo essencial do capim-gordura (*Melinis minutiflora* Beauv) contendo estes compostos, apesar de não terem relatado as concentrações utilizadas para desencadear essa função. A literatura evidencia ainda, um potencial uso benéfico do cineol como agente anti-inflamatório, analgésico, antioxidante, com uso farmacêutico no preparo de inalantes e xaropes para tosse (SEFIDKON et al., 2008; SANTOS & RAO, 2000), além de possuir alto potencial antimicrobiano (SONBOLI et al., 2006).

A significativa atividade moluscicida do óleo essencial da espécie *FG20151* (CL<sub>90</sub> 62,74 µg/mL) registrada neste estudo está relacionada aos compostos sesquiterpenicos presentes, uma vez que não foi observado compostos de outra classe neste óleo. Os

sesquiterpenos oxigenados  $\alpha$ -cadinol,  $\tau$ -muurolol e o sesquiterpeno hidrocarbonado  $\beta$ -cariofileno são os que representam as maiores quantidades no óleo essencial dessa espécie, porém, somente o composto  $\beta$ -cariofileno já teve sua atividade moluscicida descrita, mostrando-se atóxico frente *B. glabrata* em concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$  quando extraído de plantas aromáticas do nordeste brasileiro (ROUQUAYROL et al., 1972). Isso sugere que a atividade moluscicida do óleo essencial de *FG20151* pode ser resultado de uma interação entre os metabólicos sesquiterpenicos presentes. É importante salientar que a maioria dos sesquiterpenos presentes em óleos essenciais apresenta atividade biológica mais intensificada quando estão combinados, o que deve à ação sinérgica (SANTOS et al., 2008).

Na literatura não há relatos da atividade moluscicida do  $\alpha$ -cadinol e  $\tau$ -muurolol, entretanto esses compostos foram descritos como ativos para outras atividades biológicas já comprovadas, a exemplo de atividade bactericida inibindo o crescimento desses microrganismos (DORMAN & DEANS, 2000), além disso, o  $\alpha$ -cadinol possui alto potencial citotóxico contra linhagens de células cancerígenas (SYLVESTRE et al., 2006).

O óleo essencial de *FG20151*, já demonstrou potencial antibacteriana considerável contra bactérias Gram-positivas de elevada patogenicidade e potencial antifúngica em linhagens de *C. albicans* (SANTOS et al., 2008; NASCIMENTO et al., 2008). Outras atividades comprovadas para este óleo essencial são de efeito antinoceptivo e anti-inflamatório (RAYMUNDO et al., 2011). A composição química dos óleos de *FG20151* descrito para essas atividades também apresentava predominância de sesquiterpenos.

Nenhum estudo sobre a atividade moluscicida do óleo essencial das folhas de *E. puniceifolia* tem sido relatada até a presente data. Além disso, tem havido poucas investigações sobre outras atividades biológicas deste óleo. No geral, os óleos essenciais do gênero *Eugenia* possuem comprovada atividade antioxidante (VICTORIA et al., 2012), antibacteriana e antifúngica (LAGO et al., 2011; COSTA, 2010), antipirético (AMORIM et al., 2009) e tripanocida (SANTOS et al., 2012).

O óleo essencial de *Eugenia puniceifolia*, avaliado neste estudo, demonstrou atividade sobre caramujos transmissores da esquistossomose. Nesta espécie aromática foram identificados nove compostos voláteis que podem estar agindo de modo sinérgico para desencadear essa atividade moluscicida ou estar relacionada a predominância do composto majoritário. Ao  $\alpha$ -pineno, composto majoritário identificado no óleo dessa espécie, tem sido atribuídas atividades repelentes de mosquitos (WANG et al., 2008), propriedades

antimicrobianas inibindo cepas bacterianas de *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes* (LEITE et al, 2007), além de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (BURT, 2004). Silva et al. (2012) avaliando o efeito de  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno em células fúngicas também obtiveram resultados positivos para *C. albicans*, eliminando 100% do inóculo dentro de 1 hora. A evidência científica sugere ainda que  $\alpha$ -pineno pode ser um broncodilatador (RUSSO, 2011), e mais recentemente o  $\alpha$ -pineno foi identificado como um composto anti-proliferativo ativo em carcinoma de células de hepatoma inibindo crescimento celular do cancro do fígado, demonstrando potencial como medicamento anti-tumoral (CHEN et al., 2014; CHEN et al., 2015). Várias outras atividades biológicas estão associados com pinenos, incluindo o uso como um inseticida natural (SILVA et al., 2012) e pode apresentar também potencial moluscicida, por isso, a atividade desse composto contra *B. glabrata* já está sendo testada como continuidade desse estudo para confirmar a influência de seu efeito no óleo essencial de *E. puniceifolia* sobre o mais importante hospedeiro intermediário de *S. mansoni* no Brasil.

O  $\alpha$ -pinene foi identificado em três das cinco plantas analisadas. Esta substância é um monoterpeno bicíclico (Figura 16) e normalmente classificada como um dos principais constituintes presente em óleos essenciais.

O esclarecimento da relação entre a estrutura química dos compostos presentes nos óleos essenciais e a atividade biológica (QSAR) aumenta as chances de obtenção de novos agentes moluscicidas mais ativos, seletivos e biodegradáveis (MATOS ROCHA, 2013), sendo importante a investigação da atividade de seus compostos isolados para elucidar os constituintes bioativos presentes nestes óleos. Geralmente os componentes principais determinam as propriedades biológicas dos óleos essenciais, porém não se pode descartar a possibilidade da ação sinérgica dos mesmos (BAKALLI et al., 2008).

### **5.3 Avaliação da toxicidade aguda em peixes**

Outra atividade biológica abordada na pesquisa foi a toxicidade dos óleos essenciais, uma vez que apresentaram atividade sobre *B. glabrata*. Esse estudo é importante para que possam ser utilizados de modo seguro no controle de moluscos transmissores da esquistossomose em ambientes naturais (SANTOS et al., 2007; CANTANHEDE et al., 2010).

O único moluscicida que pode ser empregado em grande escala no controle de caramujos transmissores de *S. mansoni* é a niclosamida (Bayluscid) segundo a OMS. Contudo, as efetivas concentrações com ação moluscicidas deste produto sintético, provocam concomitantemente a mortalidade de peixes, tornando-se um problema quando é utilizado principalmente, em áreas em que a pesca se torna uma importante fonte de renda e alimento para a população (OLIVEIRA-FILHO et al., 2010).

Neste estudo, peixes *D. rerio* foram utilizados para avaliar o grau de toxicidade em espécies não alvo da atividade moluscicida. Esta espécie é largamente utilizada em testes de ecotoxicologia aquática e considerada bom indicador de toxicidade ambiental (ABNT, 2011).

Com relação aos ensaios de sensibilidade, que precederam os testes de toxicidade, os resultados indicaram que os lotes de peixes apresentaram pouca variação, sendo que a CL<sub>50</sub> (96 h) obtida foi de 8,017 µg/L, considerada adequada para a realização dos ensaios toxicológicos (BICHARA et al., 2014).

Os parâmetros físico-químicos da água dos grupos controle e experimentais mantiveram-se estáveis durante o teste de toxicidade aguda e foram considerados satisfatórios segundo ABNT (2011), não interferindo assim no resultado do ensaio. Os valores mínimos e máximos das amostras avaliadas foram: temperatura (23,9 a 24,5°C); oxigênio (8,3 a 8,5 mg O<sub>2</sub>. L<sup>-1</sup>), pH (8,2 a 8,7). Todos os ensaios foram considerados válidos uma vez que não foi observada mortalidade de peixes nos frascos controle.

Neste estudo, os óleos essenciais foram considerados tóxicos aos peixes quando avaliados nas concentrações letais (CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>) apresentadas no ensaio moluscicida, e foi observado mortalidade de 100% dos peixes, demonstrando que os óleos são tóxicos não só aos moluscos, mas também a organismos não alvo. Algumas anormalidades também foram registradas durante o ensaio com *D. rerio*, quando expostos ao óleo de *L. gracillis*, como natação errática, abdômen estendido, exoftalmia e forma anormal da cabeça. Estes efeitos ocorreram no início do período de exposição.

Os óleos essenciais de *L. gracilis* e *FG20151*, que apresentaram no ensaio moluscicida concentrações letais em conformidade com as exigências da OMS, foram testados ainda em outras concentrações para determinar as CL<sub>90</sub> e CL<sub>50</sub> para peixes, a fim de comparar seu efeito tóxico com a concentração letal registrada na literatura para o moluscicida sintético niclosamida.

Rapado et al. (2013) avaliaram o efeito tóxico do moluscicida sintético comercial Bayluscide (niclosamida) em peixes *D. rerio* e demonstrou a alta toxicidade com CL<sub>50</sub> de 0,12 µg/mL. Esse resultado foi comparado as CL<sub>50</sub> obtida neste estudo e foi observado uma significativa diferença entre os valores, demonstrando que os óleos apresentam baixa toxicidade em relação ao niclosamida (Tabela 4).

Outros trabalhos também demonstraram a alta toxicidade de niclosamida sobre outras seis espécies de peixes de água doce em concentrações muito baixas (1 µg/mL) ocasionando mortalidade de 100% nas primeiras seis horas de exposição (ROUQUAYROL et al., 1973).

**Tabela 4.** Toxicidade de óleos essenciais para peixes *Danio rerio*

Óleos Essenciais/ Compostos	TOXICIDADE AGUDA <i>Danio rerio</i>		
	*CL <sub>50,90</sub> caramujos	CL <sub>90</sub> (µg/mL)	CL <sub>50</sub> (µg/mL)
<i>Eugenia punicifolia</i>	Tóxico <sup>1</sup>	—	—
<i>Hyptis dilatata</i>	Tóxico	—	—
<i>FG20151</i>	Tóxico	12,19	6,78 <sup>a</sup>
<i>Lippia acutidens</i>	Tóxico	—	—
<i>Lippia gracilis</i>	Tóxico	8,36	5,2 <sup>b</sup>
Niclosamida <sup>2</sup>	—	—	0,12 <sup>c</sup>

\* Concentrações letais obtidas após 48 horas de exposição

<sup>1</sup>Toxicidade baseada na concentração letal 50 e 90% para *Biomphalaria glabrata*

<sup>2</sup>Dado obtido na literatura (Rapado et al., 2013. doi:10.1371/journal.pntd.0002251.t004)

As médias das CL<sub>50</sub> seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os óleos essenciais aqui estudados ainda não são moluscicidas naturais ideais e recomendáveis para utilização em ambiente naturais de ocorrência dos moluscos, como rios e lagos, pois os mesmo apresentaram toxicidade para a espécie de peixe avaliada, podendo então ser considerados com potencial tóxico para agredir outras espécies que co-habitam essas áreas. No entanto, é possível a utilização desses óleos em criadores artificiais dos hospedeiros intermediários da esquistossomose, como valas, esgotos a céu aberto e outros tipos de poças

d'água que ocorrem frequentemente em áreas de prevalência da esquistossomose, onde não há infraestrutura sanitária e de péssimas condições socioambientais, uma vez que nesses ambientes, raramente se encontram outras espécies co-habitando esses locais. É importante ressaltar que nas áreas de coleta dos moluscos utilizados nesse estudo, há predominância de alagados artificiais. Além dessa observação, nota-se que, a niclosamida, moluscicida sintético utilizado em situações críticas da doença, possui custo muito elevado, não podendo ser utilizados por população de baixa renda, que buscam por um produto de origem natural de fácil acesso e de baixo custo, além de apresentar toxicidade a espécie *D. rerio* superior aos óleos analisados nesse estudo.

## 6 CONCLUSÃO

Neste estudo, relatamos uma investigação sobre os efeitos moluscicida de óleos essenciais de plantas aromáticas da Amazônia maranhense, demonstrando atividade significativa dos óleos de três espécies frente a moluscos *B. grablata*, considerando os padrões determinados pela Organização Mundial de Saúde. Quanto à toxicidade frente a organismo não alvo (*D. rerio*), observou-se efeito tóxico, no entanto, estes são mais baixos que o apresentado pelo moluscicida comercial sintético Bayluscide. Dessa forma, a partir desses resultados, pode-se concluir que esses óleos referentes as espécies *L. acutidens*, *L. gracilis* e *FG20151* demonstraram potencial para utilização em criadouros artificiais, como valas e esgotos a céu aberto, onde não há espécies co-habitando a área com os caramujos, sem riscos de afetar a biodiversidade da região.

Além disso, este estudo permitiu caracterizar a composição química da espécie aromática *L. acutidens*, sendo o primeiro relato na literatura científica relacionado com a análise das frações voláteis das partes aéreas desta espécie.

Nossos dados reforçam a importância de produtos vegetais como fonte de novos compostos bioativos e mostram a importância de bioensaios preliminares como uma triagem de sua potencialidade biológica. Os resultados demonstraram o potencial de bioatividade dos óleos essenciais e justificam a continuidade dos estudos para formulação de produtos para uso em campo.

## REFERÊNCIAS

- ABNT. Ecotoxicologia aquática: Toxicidade aguda – método de ensaio com peixes. NBR 15088: 2011. Rio de Janeiro: **Associação Brasileira de Normas Técnicas**, 2011.
- ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**, Allured, Carol Stream, Ill,USA, 4th edition, 2007.
- ALBUQUERQUE, C. C et al. Antimicrobial action of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**, v. 49, n. 4, p. 527-535, 2006.
- ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of Brazil: a quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 325–354, 2007.
- ALVES, L. P. L. **Atividade moluscicida em *Biomphalaria glabrata* Say: revisão e avaliação do látex de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (Euphorbiaceae)** 2013. 116 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente), Universidade Federal do Maranhão, São Luís - MA, 2013.
- 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.
- AMORIM, A C. L. et al. Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga). **Phytomedicine**, v. 16, n. 10, p. 923-928, 2009.
- ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 141, n. 4, p. 399-436, 2003.
- APEL, M. A. Essential oils composition of *Eugenia florida* and *Eugenia mansoi*. **J Essent Oil Res** v. 16, p. 321-322, 2004.
- ARAGÃO J. G.; CONCEIÇÃO, G. M. **Importância, diversidade e distribuição geográfica**. 2007. 71f. Monografia (Graduação em Ciências com habilitação em Biologia) – Universidade Estadual do Maranhão, Caxias, 2007.
- ARCHIBALD, R. G. The use of the fruit of the tree *Balanites aegyptiaca* in the control of schistosomiasis in the Sudan. **Trans Roy Soc Trop Medicine and Hygiene**, v.27, p. 207-210, 1933.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

- BARATA, L. E. S. A economia verde: Amazônia. **Ciencia e Cultura**, São Paulo, v. 64, n. 3, 2012. Available from <[http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S000967252012000300011&lng=en&nrm=iso](http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S000967252012000300011&lng=en&nrm=iso)>. access on 14 Mai 2016.
- 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.
- BARBOSA, F. G.; LIMA, M. A. S.; BRAZ-FILHO, R.; SILVEIRA, E. R. Iridoid and phenylethanoid glycosides from *Lippia alba*, **Biochem Syst Ecol**, v. 34, p. 819, 2006.
- BARBOSA, F. S. **Tópicos em malacologia médica**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1995.
- BARBOSA-FILHO, J. M et al. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. **Rev Bras Farmacogn** v. 15, p. 392-413, 2005.
- BARREIRO, A. P. **Produção de biomassa, rendimento e composição do óleo essencial de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) em função de reguladores vegetais**. 2006. 96 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2006.
- 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://bvsms.saude.gov.br/bvs/artigos/artigo\\_saude\\_brasil\\_3.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/artigos/artigo_saude_brasil_3.pdf)
- BASÍLIO, I. J. L. D et al. Estudo farmacobotânico comparativo das folhas de *Hyptis pectinata* (L.) Poit. E *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae). **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 25, n. 4, p. 518-525, 2006.
- BASTING, R. T et al. Antinociceptive, anti-inflammatory and gastroprotective effects of a hydroalcoholic extract from the leaves of *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC. in rodents, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 157, n. 18, p. 257-267, 2014.
- BIASI, L. A.; DESCHAMPS, C. **Plantas aromáticas: do cultivo à produção de óleo essencial**. Curitiba: Layer Studio Gráfico e Editora Ltda, 2009.
- BICHARA, D. et al. Set-up of an infrared fast behavioral assay using zebrafish (*Danio rerio*) larvae, and its application in compound biotoxicity screening. **J. Appl. Toxicol.**, 34: 214–219, 2014.
- BISPO, M. D et al. Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis* leaves in experimental animals. **J. Ethnopharmacol**, v. 76, p. 81-86, 2001.
- BITU, V. et al. Phytochemical screening and antimicrobial activity phytochemical of essential oil from *Lippia gracilis*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 22, n. 1, p. 69-75, Jan./Feb. 2012.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422009000300005&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000300005&lng=en&nrm=iso)>. access on 13 June 2016.

BOTELHO, M.A. et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Braz J Med Biol Res**, Ribeirão Preto, v. 40, n. 3, p. 349-356, Mar. 2007. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-879X2007000300010&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2007000300010&lng=en&nrm=iso)>. access on 30 May 2016.

BOTREL, P. P. et al. Teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marruboides* Epl., Lamiaceae em função da sazonalidade. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, n. 3, p. 533-538, 2010.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em 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. 100 p.: Il. Available at: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano\\_integrado\\_acoes\\_estrategicas\\_hanseníase](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano_integrado_acoes_estrategicas_hanseníase)

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Vigilância da esquistossomose mansoni: diretrizes técnicas**. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2014. 144 p. : Il.

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

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. 35 p.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422010000100040&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000100040&lng=en&nrm=iso)>. access on 05 May 2016.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville, Maryland: American Society of Plant Physiologists, USA. pp 1251-1268, 2000.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.223–253, 2004.

CANTANHEDE, S. P. D. et al. Atividade moluscicida de plantas: uma alternativa profilática. **Rev. bras. farmacogn.**, Curitiba, v. 20, n. 2, p. 282-288, may 2010. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-695X2010000200024&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2010000200024&lng=en&nrm=iso)>. access on 05 may 2016.

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. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 47, n. 1, p. 79-85, Feb. 2014. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0037-86822014000100079&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822014000100079&lng=en&nrm=iso)>. access on 05 May 2016.

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

CHEN, W. et al. Inhibitory effects of  $\alpha$ -pinene on hepatoma carcinoma cell proliferation. **Asian Pac J Cancer Prev**. v. 7, p.3293-3297, 2014.

CHEN, W. et al. Anti-tumor effect of  $\alpha$ -pinene on human hepatoma cell lines through inducing G2/M cell cycle arrest. **Journal of Pharmacological Sciences**. v.127, p.332-338, 2015.

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.

COELHO, M. G. **Óleos essenciais para aromaterapia**. 2009.123f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Bioempreendedorismo em Plantas Aromáticas e Medicinais). Escola de Ciências, Universidade do Minho, 2009.

COLE, R. A. et al. Chemical composition of essential oils of seven species of *Eugenia* from Monteverde, Costa Rica. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n.12, p.877- 886, 2007.

CONSOLINI, A. E.; BALDINI, O. A. N.; AMAT, A. G. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive. **J Ethnopharmacol**, v. 66, p. 33-39, 1999.

CORREA JÚNIOR, C.; LIN, C. M.; SCHEFFER, M. C. **Cultivo de Plantas Medicinais, Condimentares e Aromáticas**. São Paulo: FUNEP, 1994.

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). **Rev. bras. plantas med.**, Botucatu, v. 17, n. 4, supl. 1, p. 707-712, 2015.

Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-05722015000500707&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722015000500707&lng=en&nrm=iso)>. access on 13 June 2016.

COSTA, D. P. et al . Influence of fruit biotypes on the chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Eugenia uniflora* leaves. **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo, v. 21, n. 5, p. 851-858, 2010. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-50532010000500012&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532010000500012&lng=en&nrm=iso)>. access on 30 May 2016.

COSTA, M. P. F da.; FERNANDES, L. D.; PIMENTEL, R. R. Análise da Anatomia Floral da *Eugenia puniceifolia* (Humb., Bonpl. & Kunth) DC. **Rev. Saúde & Ambiente**, v. 5, n. 2, 2010.

COUTINHO, D. F. et al. A composition and 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.

CUNHA, A. P. et al. **Plantas Aromáticas e Óleos Essenciais Composição e Aplicações**. Lisboa: Fundação Caloust Gulbenkian, 2012.

CUNHA, A. P., et al. **Fármacos aromáticos (Plantas aromáticas e óleos essenciais)**. In: Cunha, A. P. d. (ed.) Farmacognosia e Fitoquímica. 2ª ed. Lisboa Fundação Caloust Gulbenkian p.339 - 401, 2009.

CUNHA, A. P.; ROQUE, O. R. **Aromaterapia - Fundamentos e Utilização**, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2013.

CUTRIM, R. N. M.; CHIEFFI, P. P; MORAES, J. C. Schistosomiasis mansoni in the “Baixada Ocidental Maranhense”, state of Maranhão, Brazil: cross-sectional studies performed in 1987 and 1993. **Rev Inst Med Trop**. São Paulo, v.40, p.165-171, 1998.

DAHM, R. The Zebrafish Exposed: "See-through" mutants may hold the key to unraveling the mysteries of embryonic development. **American Scientist**, v.. 94, n. 5, p. 446-453, 2006.

DAMASCENO, E. I. T. et al . Antioxidant capacity and larvicidal activity of essential oil and extracts from *Lippia grandis*. **Rev. bras. farmacogn.**, Curitiba , v. 21, n. 1, Feb. 2011. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-695X2011000100014&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2011000100014&lng=en&nrm=iso)>. access on 24 May 2016. Epub Feb 04, 2011

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

DOMÍNGUEZ, X. A et al. Chemical constituents of *Lippia graveolens*, **Planta Med.** v.55, p. 208- 209, 1989.

DORMAN, H. J. D; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.308-316, 2000.

- DOS SANTOS, A. D. et al. Análise espacial e características epidemiológicas dos casos de esquistossomose mansônica no município de Simão Dias, nordeste do Brasil. **Revista de Patologia Tropical / Journal of Tropical Pathology**, [S.l.], v. 45, n. 1, p. 99-114, fev. 2016. ISSN 1980-8178. Disponível em: <<https://revistas.ufg.emnuvens.com.br/iptsp/article/view/39978>>. acesso em: 26 abr 2016.
- 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
- ELIAS, M.S.; TINEM, R.N. Estudo do impacto das ações de saneamento segundo condições de vida e saúde em Curitiba-PR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE EPIDEMIOLOGIA. Salvador. **Anais**. Salvador, 1995
- FALCÃO, D. Q.; MENEZES, F. S. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 84, n. 3, p. 69-74, 2003.
- FALCÃO, R. E. A. et al. Evaluation of the orofacial antinociceptive profile of the ethyl acetate fraction and its major constituent, rosmarinic acid, from the leaves of *Hyptis* on rodents. **Rev. bras. farmacogn.**, Curitiba, v. 26, n. 2, p. 203-208, Apr, 2016. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-695X2016000200203&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2016000200203&lng=en&nrm=iso)>. access on 07 July 2016.
- FALCÃO, H. S et al. Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. **Rev Bras Farmacogn**, v.16, p. 381-391, 2005.
- FARMACOPEIA BRASILEIRA . Brasília: ANVISA , 5ª ed., v. 1, p. 546, v.2, p. 904, 2010.
- FARMACOPEIA BRASILEIRA IV-PARTE 1. 4a Ed. São Paulo: Atheneu, 1320p, 1996.
- FAUSTO, A.; EDISSON, T.; KATHERINE, B.; LUIS, E. D.; JAIME, R.; CARLOS, J. Cytotoxic and antimicrobial diterpenes isolated from *Hyptis dilatata*. **Current Bioactive Compounds**, v. 11. n. 3, p. 189 – 197, 2015.
- FAVORITO, S. **Tricomas Secretores de *Lippia stachyoides* Cham. (Verbenaceae): Estrutura, Ontogênese e Secreção**. 2009. 89f. Dissertação (Mestrado – Área de Concentração em Morfologia e Diversidade Vegetal) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, 2009.
- FENWICK, A.; SAVIOLI, L. Schistosomiasis elimination. **Lancet Infectious Disease**, v. 11, n. 5, p. 346-47, 2011.
- FLORA BRASILIENSIS, Vol. VIII, Part I, Fasc. 22 Coluna 107 - 108, revisado em 2005.
- FONTES, R.; ALÇADA, N. **A bioquímica e a química orgânica**, 2008. Available from <[http://bioquimica.med.up.pt/ensino/fcnaup/quimicaorganica/1011/pdf/Bioquimica\\_e\\_Quimica\\_Organica.pdf](http://bioquimica.med.up.pt/ensino/fcnaup/quimicaorganica/1011/pdf/Bioquimica_e_Quimica_Organica.pdf)>

FORZZA, R. C. org., et al. **Introdução: síntese da diversidade brasileira**. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v. 1, p. 19-42, 2010.

FRANÇA, C. R. **Presença de caramujos ambientais e fatores ambientais que favorecem a ocorrência da esquistossomose no Sá-Viana, São Luís, Maranhão – Brasil**. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2011.

FRANCO, C. da S. Composition and antioxidant and antifungal activities of the essential oil from *Lippia gracilis* Schauer. **African Journal of Biotechnology**, vol. 13, n. 30, p. 3107–3113, 2014.

FUSELLI, S. R. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Citrus* essences on honeybee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*, the causal agent of *American foulbrood*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 10, p. 2067-2072, 2008.

GARCÍA, A. A.; CARRIL, E. P. Metabolismo secundario de plantas. **Reduca (Biología)**, v. 2, n. 3, p. 119-145, 2011.

GUIMARÃES, M. C. A. **Avaliação do controle e vigilância do hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*, no Vale do Ribeira, e observações do seu parasitismo**. 2007. Tese de Doutorado (Pós graduação em Saúde pública). Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 2007.

GNATTA, J. R. et al. O uso da aromaterapia na melhora da autoestima. **Rev. esc. enferm. USP**, São Paulo, v. 45, n. 5, p. 1113-1120, Oct. 2011. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S008062342011000500012&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S008062342011000500012&lng=en&nrm=iso)>. access on 14 Jan 2016. .

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOMES, S. V. F.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Eclét. Quím.**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 64-77, 2011. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-46702011000100005&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-46702011000100005&lng=en&nrm=iso)>. access on 11 July 2016.

GRANGEIRO, M.S et al. Pharmacological effects of *Eugenia punicifolia* (Myrtaceae) in cholinergic nicotinic neurotransmission. **Journal of Ethnopharmacology** v. 108, pp. 26-30, 2006.

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.

HARLEY, R et al. Lamiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB8239>>. Acesso em: 30 de jun 2016.

HARLEY, R. M. Checklist and key of genera and species of the Lamiaceae of the Brazilian Amazon. **Rodriguésia**, v. 63, n. 1, p. 129-144, 2012.

HOLANDA, J. N. et al. Avaliação ecotoxicológica da água de lavagem da purificação de biodiesel de soja metílico utilizando *Danio rerio* como organismo-teste. **Boletim do laboratório de hidrobiologia**, v.25, p.13-20, 2012.

HOMMA, A. K. O. Extrativismo vegetal ou plantio: qual a opção para a Amazônia?. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 26, n. 74, p. 167-186, jan. 2012. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/eav/article/view/10631/12373>>. Acesso em: 06 June 2016. doi:<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-40142012000100012>

HUSSEIN, S. A. M et al. Polyoxygenated flavonoids from *Eugenia edulis*. **Phytochemistry**, v. 64, p. 883-889, 2003.

INPE. Projeto PRODES - **Monitoramento do Desmatamento na Amazônia Legal por Satélite**, 2016. Disponível em: <<http://www.obt.inpe.br/prodes/index.php>>. Acesso em: 30 mai.2016.

INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 154, DE 01 DE MARÇO DE 2007. Ministério do Meio Ambiente. Brasil. Institui o Sistema de a de Autorização e Informação em Biodiversidade – Sisbio.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Aromatic natural raw materials – Vocabulary: **ISO 9235**. Genebra, 1997. 8p. Disponível em:<<http://www.iso.org/iso/search.htm>>. Acesso em: 10 mai 2016

JIMÉNEZ, L. F. et al. Componentes volátiles de *Eriope crassipes*, *Hyptis conferta*, *H. dilatata*, *H. brachiata*, *H. suaveolens* y *H. mutabilis* (Lamiaceae). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, May. 2014. Disponible en:<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85631010007>> ISSN 0717-7917. acesso em 21 de mayo 2016.

JONES, R. Let Sleeping Zebrafish Lie: A New Model for Sleep Studies. **PLoS Biol**, v. 5, n.10, p. e281, 2007.

JORGE, L. I. F.; AGUIAR, J. P. L.; SILVA, M. L. P. Anatomia foliar de pedra-hume-caá (*Myrcia sphaerocarpa*, *Myrcia guianensis*, *Eugenia puniceifolia* Myrtaceae). **Acta Amazônica**, v. 30, n. 1, p. 49-57, 2000.

KATZ, N.; ALMEIDA, K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. **Cienc. Cult.**, São Paulo, v. 55, n. 1, Jan. 2003. Available from <[http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0009-67252003000100024&lng=en&nrm=iso](http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252003000100024&lng=en&nrm=iso)>. access on 11 June 2016.

KLOOS, H.; McCULLOUGH, F.S. Plants with Recognized Molluscicidal Activity. In: Mott KE. **Plants Molluscicides**. Ed. UNDP/ World Bank/ WHO, 1987. p. 45-108.

KNUDSEN, J. et al. Floral scents \_ a checklist of volatile compounds isolated by head-space techniques. **Phytochemistry**. v. 33, p. 253-280, 1993.

LAGO, J. H. G. et al. Chemical and biological evaluation of essential oils from two species of myrtaceae- *Eugenia uniflora* L. and *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kauser. **Molecules** v.16, n.12,p. 9827–9837, 2011.

LAHLOU, M. Study of the molluscicidal activity of some phenolic compounds: structure-activity relationship. **Pharm Biol**. v.42, p.258-61, 2004.

LEITE, A. M. et al . Inhibitory effect of beta-pinene, alpha-pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo , v. 43, n. 1, p. 121-126, Mar. 2007. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-93322007000100015&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322007000100015&lng=en&nrm=iso)>. access on 30 May 2016.

LEITE, P. E. C et al. Antiinflammatory activity of *Eugenia puniceifolia* extract on muscular lesion of mdx dystrophic mice. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 111, p. 1652-1660, 2010.

LEMOS, T. L. G et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essencial oils from Brazilian plants. **Fitoterapia**, v. 63, p. 266-268, 1992.

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.

LEYTON, V. et al. Atividade moluscicida de princípios ativos de folhas de *Lycopersicon esculento* (Sonanales, Solanaceae) em *Biomphalaria glabrata* (Glastopoda, Planorbidea). **Iberingea, Sér. Zool.**, v. 95, n. 2, p. 213-216, 2005.

LIMA, I. O et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Rev Bras Farmacogn**, v.16, p.197-201, 2006.

LIMA, R. K; CARDOSO, M. G. Família Lamiaceae: Importantes Óleos Essenciais com Ação Biológica e Antioxidante. **Revista Fitos Eletrônica**, [S.l.], v. 3, n. 03, p. 14-24, 2013. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/78/77>>. Acesso em: 07 jul. 2016.

LIN, L. Z.; MUKHOPADHYAY, S.; ROBBINS, R. J.; HARNLY, J. M. Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis, **J Food Compost Anal**. v. 20, n. 5, p.361-369, 2007.

LISBOA, A. C. C. D et al. Antinociceptive effect of *Hyptis* leaves extracts. **Fitotererapia**, v. 77, p. 439, 2006.

LIU, H. W.; NAKANISHI, K. The structure of balanitins, potent molluscicides isolated from *Balanites aegyptiaca*. **Tetraedron**, v. 38, p. 513-519, 1982.

LOPES, T. C. et al. Avaliação moluscicida e perfil fitoquímico das folhas de *Caryocar brasiliense* Camb. **Revista Cadernos de Pesquisa**, v. 18, n. 3, p. 23-30, 2011.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Ed: Nova Odessa, São Paulo. Instituto Plantarum, 615p, 2002.

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

LUNA, J.S. et al. Acetogenins in *Annona muricata* L. (Annonaceae) leaves are potent moluscicides. **Natural Product Research**, v. 20, n. 3, p. 253-257, 2006.

LUNARDI, I et al. Triterpenic acids from *Eugenia moraviana*. **J Braz Chem Soc**, v.12, p.180-183, 2001.

M. NETO, R. et al. O óleo essencial de *Lippia gracilis* Schauer, Verbenaceae, em ratos diabéticos. **Rev. bras. farmacogn.**, Curitiba, v. 20, n. 2, p. 261-266, May 2010. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-695X2010000200021&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2010000200021&lng=en&nrm=iso)>. access on 22 May 2016.

MADUREIRA, A. S.; RAMOS, E. M. B.; SENA, J. P. Inovação em saúde no Brasil: o caso das doenças negligenciadas. **Cad. IberAmer. Direito Sanit.**, Brasília, v. 2, n.2, p. 658, 2013.

MAIA, J. G. S. et al. Essential oil variation in *Lippia glandulosa* Schauer. **J. Essent. Oil Res.** v.17, p. 676-680, 2005.

MAIA, J. G. S.; ANDRADE, E. H. A. Database of the Amazon aromatic plants and their essential oils. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 595-622, 2009. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422009000300006&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000300006&lng=en&nrm=iso)>. access on 05 May 2016.

MAIA, J. G. S.; ZOGHBI, M. das G. B. **Óleos essenciais da Amazônia: inventário da flora aromática**, In: Tópicos especiais em Tecnologia de Produtos Naturais, Coordenadores FARIA, L. J. G. de; COSTA, C. M, L., NUMA/POEMA/UFPA, Série POEMA n.7, p. 129 e 133, Belém, 1998.

MAIA, J. G. S.; ZOGHBI, M. G. B.; LUZ, A. I. R. Essential oil of *Eugenia punicifolia* (HBK) DC. **J Essent Oil Res**, v.9, p.337-338, 1997.

MAIA, J. G. S. et al. **Plantas Aromáticas na Amazônia e Seus Óleos Essenciais**. 1. ed., v. 1, Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 2001.

MALAN, K et al. The essential oil of *Hyptis*. **Planta Med**, v. 54, n. 6, p. 531-532, 1988.

MALEK, E. A. Snail hosts of Schistomiasis and other snail transmitted diseases in Tropical America: a manual. **Pan American Health Organization**: Washington, p. 325, 1985.

MARLÚCIA, B. M. et al. **Amazônia Maranhense: Diversidade e Conservação**. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 2011.328 p.: il.

MARRETO, R.N et al. Thermal analysis and gas chromatography coupled mass spectrometry analyses of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex containing *Lippia gracilis* essential oil. **Thermochimica Acta**, v. 475, p. 53-58, 2008.

MARTINS, F.T. et al. Uso de árvore de decisão para predição da prevalência de esquistossomose no Estado de Minas Gerais, Brasil. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SENSORIAMENTO REMOTO, 13., 2007, Florianópolis. **Anais Florianópolis**, p. 2841-2848, 2007.

MATA, R. C. S. et al. Molluscicidal activity of compounds isolated from *Euphorbia conspicua* N. E. Br. **Journal of Brazil Chemical Society**, v. 22, n. 10, p. 1880-87, 2011.

MATOS ROCHA, T. J. et al. Estudo do efeito moluscicida de espécies vegetais em embriões e caramujos adultos de *Biomphalaria glabrata* SAY, 1818 (GASTROPODA, PLANORBIDAE). **Revista de Patologia Tropical**, [S.l.], v. 42, n. 2, Jul. 2013. ISSN 1980-8178. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/iptsp/article/view/25524>>. Acesso em: 01 Jan. 2016.

MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais da medicina popular do Nordeste**. Fortaleza: Editora da UFC, 1999.

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

MELO, J. L. M. Bioprospecção da atividade antimicrobiana e anticolinesterásica de óleos essenciais de espécies de *Hyptis* com ocorrência na amazônia oriental. **Resumos do XXIV seminário de iniciação científica da UFPA**: ISSN 2176-1213, 2013.

MELO, N. I. et al. Schistosomicidal activity of the essential oil of *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae) against *Schistosoma Mansoni* adult worms. **Molecules**, v.16, p.762-773, 2011.

MENDES, S. S et al. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, p. 391–397, 2010.

MENEZES, F. S. Base química de tendências filogenéticas em Lamiiflorae. **Tese de Mestrado**, Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, p. 94, 1994.

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

MILWARD-DE-ANDRADE, R.; CARVALHO, O. S. Colonização de *Pomacea haustum* (Reeve, 1856) em localidade com esquistossomose mansoni: Baldim, MG (Brasil). (Prosobranchia, Pilidae). **Revista de Saúde Pública**, v. 13, p. 92-107, 1979.

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

MOHAMMADI, A. et al. Antifungal activities and chemical composition of some medicinal plants. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 468, p.1-8, 2014. Available from <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1156523314001243>> access on 13 June 2016

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, n. 3, p. 16-27, 2010.

MORENO, P.R. H. et al . Essential oil composition of fruit colour varieties of *Eugenia brasiliensis* Lam. **Sci. agric. (Piracicaba, Braz.)**, Piracicaba, v. 64, n. 4, p. 428-432, Aug. 2007.

MOTT, K. E. **Plant Molluscicide**. Chichester: John Wiley & Sons LTD, New York, UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, 1987. 326 p.

MSAADA, K. et al. Comparison of Different Extraction Methods for the Determination of Essential oils and related compounds from Coriander (*Coriandrum sativum* L.). **Acta Chimica**, v. 59, p. 803-813, 2012. Disponível em <<http://europepmc.org/abstract/MED/24061362>> access on 02 May 2016.

MUNIZ, F. H. **A vegetação da região de transição entre a Amazônia e o Nordeste: diversidade e estrutura**. In: Emanuel Gomes de Moura. (Org.). Agroambientes de transição entre o Trópico Úmido e o Semi-árido do Brasil: atributos, alterações e uso na produção familiar. 2 ed. São Luís: Programa de Pós-graduação em Agroecologia/UEMA, v. 1, p. 53-69, 2006.

MUÑOZ, S. S.; FERNANDES, A. P.M. As doenças infecciosas e parasitárias e seus condicionantes socioambientais. In: Principais doenças infecciosas e parasitárias e seus condicionantes em populações humanas. **Licenciatura em Ciências USP/ Univesp**. Módulo 5, p. 16, 2013.

- NAKAGOME, F. K. et al. Toxicidade aguda de alguns herbicidas e inseticidas utilizados em lavouras de arroz irrigado sobre o peixe *Danio rerio*. **Pest.: Rev. Ecotox. Meio Amb.** v.17, p. 117-22, 2007.
- NASCIMENTO, P. F.C. et al. *Hyptis* essential oil: chemical composition and anti-Streptococcus mutans activity. **Oral Diseases.** v 14, p. 485–489, 2008.
- NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**, 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.
- NEVES, I. A et al. Chemical composition of the leaf oils of *Lippia gracilis* Schauer from two localities of Pernambuco. **The Journal of Essential Oil Research** , v. 20, p. 157-160, 2008.
- NIST, **Mass Spectral Library** (NIST/EPA/NIH), National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, Md, USA, 2005.
- OLIVEIRA, D. da S. et al. 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.
- OLIVEIRA, D. R et al. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil. **J Ethnopharmacol**, v.108, p.103-108, 2006.
- OLIVEIRA, R.N. de; DIAS, I.J.M.; CAMARA, C.A.G. Estudo comparativo do óleo essencial de *Eugenia punicifolia* (HBK) DC. de diferentes localidades de Pernambuco. **Rev. bras. farmacogn.**, João Pessoa , v. 15, n. 1, p. 39-43, Mar. 2005 . Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-695X2005000100009&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2005000100009&lng=en&nrm=iso)>. access on 24 May 2016.
- OLIVEIRA, S. M.; JOSÉ, V. L. A. **Processo de extração de óleos essenciais**. Instituto de tecnologia do Paraná. Dossiê técnico, 2007.
- OLIVEIRA-FILHO, E. C. et al. Comparative toxicity of *Euphorbia milii* látex and synthetic molluscicides to Biomphalaria glabrata embryos. **Chemosphere**, v.81, p. 218-227, 2010.
- PAIXÃO, M.S et al. *Hyptis*: redox protection and orofacial antinociception. **Phyther. Res.** v. 27, p. 1328-1333, 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. **Arq. Museu Nac**, Rio de Janeiro, v. 55, p. 105-128, 1975.
- PASCUAL, M. E et al. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v.76, p. 201–214, 2001.
- PATEL, A. et al. Stable Molluscicide Formulation of an Aqueous Extract of *Euphorbia myrsinites*. **Phyther. Res.**, v.25, p. 1412–1414, 2011.

PEIXOTO, L. E.; MACHADO, M. I. Vigilância ambiental em saúde: ocorrência de *Biomphalaria peregrina* e *B. schrammi* em áreas de influência da usina hidrelétrica de Miranda, Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 2005, Campo Grande. **Anais.** v. 23, p. 1-9, Campo Grande 2005,

PENA, M. A. A. **Alguns aspectos agrônômicos da planta medicinal *Eugenia punicifolia* De Candolle (pedra-ume-caá).** Monografia (Graduação) - Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Agrárias, Manaus, 1998. 74 f

PENGELLY, A. **Efeito de um fitocomposto no desenvolvimento de leitões submetidos ao desafio experimental com *Salmonella typhimurium*.** 2004. 137 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Produção Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2004.

PEREIRA FILHO, A. A. et al . Evaluation of the molluscicidal potential of hydroalcoholic extracts of *Jatropha gossypifolia* Linnaeus, 1753 on *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 56, n. 6, p. 505-510, Dec. 2014. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0036-46652014000600505&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652014000600505&lng=en&nrm=iso)>. access on 01 May 2016.

PESSOA, D. D et al. Antibacterial activity of the essential oil from *Lippia* . **Fitoterapia**, v. 76, p. 712–714, 2005.

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

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

PIOZZI, F; BRUNO, M.; ROSSELLI, S.; MAGGIO, A. Chem Inform Abstract: The diterpenoids from the genus *Hyptis* (Lamiaceae), **Heterocycles**, v. 78, n. 6, p. 1413 – 1426, 2009.

PRATES, H. T. et al . Identification of some chemical components of the essential oil from Molasses Grass (*Melinis minutiflora* Beauv.) and their Activity Against Cattle-Tick (*Boophilus microplus*). **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo, v. 9, n. 2, p. 193-197, Apr. 1998 . Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-50531998000200013&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50531998000200013&lng=en&nrm=iso)>. access on 28 May 2016

RADWAN, M. A. et al. Potential of some monoterpenoids and their new N-methyl carbamate derivatives against Schistosomiasis snail vector, *Biomphalaria alexandrina*. **Ecotoxicol. Environ. Saf** v.71, p.889-894, 2008.

RAMOS, M. F. de S. et al. Essential oils from myrtaceae species of the Brazilian Southeastern maritime forest (Restinga). **Journal of Essential Oil Research**, v. 22, n. 2, p. 109-113, 2010.

RAPADO, L. N. et al. Schistosomiasis Control Using Piplartine against *Biomphalaria glabrata* at Different Developmental Stages. **PLoS Negl Trop Dis**, v.7, n.6, 2013. doi:10.1371/journal.pntd.0002251

RAYMUNDO, L. J. R. P. et al. Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the *Hyptis* essential oil. **Journal of ethnopharmacology**, v.134, n.3, p. 725-32, 2011.

REY, 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.

REY, L.; **Parasitologia Médica**, 2ª ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1992.

RIBEIRO, S. S et al. Evaluation of the cytotoxic activity of some Brazilian medicinal plants. **Planta Medica**, v.78, p. 1601–1606, 2012.

RODRIGUES, K. A. F et al. *Eugenia uniflora* L. essential oil as a potential anti-leishmania agent: effects on leishmania amazonensis and possible mechanisms of action, **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013.

ROMDHANE, M.; TIZAOUI, C. The kinetic modeling of a steam distillation unit for the extraction of aniseed (*Pimpinella anisum*) essential oil. **J. Chem. Technol. Biotechnol**, v. 80, p. 759-766, 2005.

ROUQUAYROL, M. Z. et. al. Atividade moluscicida de plantas do Nordeste Brasileiro (III). **Rev. Bras. Farm.**, 1972.

ROUQUAYROL, M. Z. et. al. Atividade Moluscicida de *Pithecelobium multiflorum*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 7:1, 1973.

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.

RUSSO, E. B. Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. **British Journal of Pharmacology**. v. 163 p. 1344–1364, 2011. <http://dx.doi.org/10.1111/bph.2011.163.issue-7>.

SALES, D. S et al. *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC. as an Adjuvant Treatment for Type-2 Diabetes Mellitus: A non-Controlled, Pilot Study, **Phytother. Res.**, v. 28, p. 1816–1821, 2014.

SALIMENA, F. R. G.; MULGURA, M. E. Notas taxonômicas em Verbenaceae do Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 66, n. 1, p. 191-197, Mar. 2015. Available

from<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2175-78602015000100191&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2175-78602015000100191&lng=en&nrm=iso)>. access on 22 May 2016.

SANTANA, H. T. et al . Essential oils of leaves of Piper species display larvicidal activity against the dengue vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Rev. bras. plantas med.**, Botucatu , v. 17, n. 1, p. 105-111, Mar. 2015. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S151605722015000100105&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151605722015000100105&lng=en&nrm=iso)>. access on 14 Mai 2016

SANTOS, A. de M.; MELO, A. C. F. L. Prevalência da esquistossomose num povoado do Município de Tutóia, Estado do Maranhão. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 44, n. 1, p. 97-99, Feb. 2011. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S003786822011000100021&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003786822011000100021&lng=en&nrm=iso)>. access on 13 Mai 2016.

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, E. A. et al. Bioactivity evaluation of plant 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, F. A; RAO, V. S. N. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. **Phytotherapy Research**, v.14, p.240-244, 2000.

SANTOS, H. S et al. Diterpenoscasbanos e acetofenonas de *Croton nepetaefolius* (Euphorbiaceae). **Quím Nova**, v. 31, n. 3 p. 601–604, 2008.

SANTOS, K. K.A. et al. Cytotoxic, trypanocidal, and antifungal activities of *Eugenia jambolana* L. **Journal of Medicinal Food**, v. 15, n. 1, p. 66, 2012.

SANTOS, N. C. et al. Toxicidade e avaliação de atividade moluscicida de folhas de *Turnera ulmifolia* L. **Rev bras Bioc**;8(4):324-329, 2010.

SANTOS, P. O. et al . Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hyptis*. **Quím. Nova**, São Paulo , v. 31, n. 7, p. 1648-1652, 2008. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422008000700009&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422008000700009&lng=en&nrm=iso)>. access on 24 May 2016.

SANTOS, R. I. **Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários**. In: C.M.O. Simões, E.P. Schenkel, G. Gosmann, J.C.P. Mello, L.A. Mentz & P.R. Petronick (eds.). Farmacognosia - da planta ao medicamento, 5ed. Florianópolis: UFSC, p. 403-434, 2004.

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.

SARTORATTO, A et al. Composition and Antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, n.4, 2004.

SAUCHA, C. V. V.; SILVA, J. A. M. da; AMORIM, L.. Condições de saneamento básico em áreas hiperendêmicas para esquistossomose no estado de Pernambuco em 2012. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v.24, n.3, p. 497-506, set. 2015. Disponível em <[http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1679-49742015000300015&lng=pt&nrm=iso](http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742015000300015&lng=pt&nrm=iso)>. acesso em 21 abr. 2016.

SCHERER, R. et al . Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Rev. bras. plantas med.**, Botucatu, v. 11, n. 4, p. 442-449, 2009. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S151605722009000400013&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151605722009000400013&lng=en&nrm=iso)>.access on 14 Jan 2016.

SCHOLTE, R. G. C. et al. Spatial distribution of *Biomphalaria* spp., the intermediate host snails of *Schistosoma mansoni*, in Brazil. **Geospat Health**. v.6, n.3. p. 95–S101, 2012.

SEFIDKON, F. et al. Effect of distillation methods and harvesting times on the essential oil and cineole content of *Eucalyptus dealbata*. **Chemistry of Natural Compounds**, Tehran-Iran, v. 44, n. 2 p. 250-253, 2008.

SERAFINI, L.A. et al. **Extrações e aplicações de óleos essenciais de plantas aromáticas e Medicinais**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002.

SILVA DE ARAUJO, S. et al. Prospecção de patentes biotecnológicas com óleo essencial em microemulsão como agente anti-inflamatório **GEINTEC - Gestão, Inovação e Tecnologias**, v.5, n2, p. 2058-2065, Jun. 2015. Disponível em <<http://revistageintec.net/portal/index.php/revista/article/view/414/549>>. Acesso em 01 Mai 2016.

SILVA FILHO, C. R. M. da et al. Avaliação da bioatividade dos extratos de cúrcuma (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae) em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata*. **Rev. bras. farmacogn.**, João Pessoa , v. 19, n. 4, p. 919-923, Dec. 2009. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-695X2009000600022&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2009000600022&lng=en&nrm=iso)>. access on 05 May 2016.

SILVA, B. M. et al. Toxicidade aguda dos herbicidas diuron e hexazinona à *Danio rerio*. **Pest.: Rev. Ecotox. Meio Amb.** v. 20, p. 17-28, 2010.

SILVA, C. B. da et al . Composição química e atividade alelopática do óleo volátil de *Hydrocotyle bonariensis* Lam (araliaceae). **Quím. Nova**, São Paulo, v. 32, n. 9, p. 2373-2376, 2009. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422009000900026&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000900026&lng=en&nrm=iso)>. access on 08 June 2016.

- SILVA, J. M. C.; RYLANDS, A. B.; FONSECA, G. A. B. O. Destino das áreas de endemismo da Amazônia. **Megadiversidade**, Belo Horizonte, v.1, n.1, p.124-131, 2005.
- SILVA, N. A da S. et al. Essential oil composition and antioxidant capacity of *Lippia schomburgkiana* Schauer. **Nat. Prod. Commun.** v. 4, p. 1281-1286, 2009.
- SILVA, W. J. da. et al. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. **Bioresour. Technol.** 99: 3251-3255, 2008.
- SILVA-SOUZA, N; VASCONCELOS, S. D. Histopathology of *Holochilus brasiliensis* (Rodentia: Cricetidae) infected with *Schistosoma mansoni* (Schistosomatida: Schistosomatidae). **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 2, p. 145-50, 2005.
- SILVEIRA, A. C. Controle da esquistossomose no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, suppl. I, p. 91-104, 1989.
- SILVEIRA, J. C et al. Levantamento e análise de métodos de extração de óleos essenciais. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.8, n.15; p. 2012.
- SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.
- SMITHERS, S. R; TERRY, R. J. Immunology of schistosomiasis. **Boletim da Organização Mundial de Saúde**. v. 51, p. 553-595, 1974.
- SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NO VALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 136-141, 2012.
- SONBOLI, A. et al. Antimicrobial activity of six constituents of essential oil from *Salvia*. Department of Biology, **Medicinal Plants and Drugs Research Institute**, Shahid Beheshti University. Mar, 2006.
- SOUZA, C. P.; LIMA, L. C. **Moluscos de interesse parasitológico do Brasil**. 2. ed. Belo Horizonte: FIOCRUZ/CPqRR, 1997.
- STURROCK, R. F. Current concepts of snail control. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, n. 2, p. 241-48, 1995.
- SYLVESTRE, M. et al. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. **J Ethnopharmacol.** v. 103, p. 99–102, 2006.
- TCHOUMBOUGNANG, F. et al. Aromatic plants of tropical Central Africa. XLVIII. Comparative study of the essential oils of four *Hyptis* species from Cameroon: *H. lanceolata* Poit., *H. pectinata* (L.) Poit., *H. spicigera* Lam. and *H. suaveolens* Poit. **Flavour Fragr. J.** v. 20, p. 340–343, 2005.

TEIXEIRA, J. P. F. et al. Caracterização dos óleos essenciais em frutos de nove genótipos de tangerina. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v.35, n.1, p.1-10, 2014.

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/journal/AJB/article-abstract/C0AE02824912>

TIBIRIÇA, S. H. C. et al. A esquistossomose mansoni no contexto da política de saúde brasileira. **Ciênc. saúde coletiva**, Rio de Janeiro, v. 16, supl. 1, p. 1375-1381, 2011. Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-81232011000700072&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232011000700072&lng=pt&nrm=iso)>. acesso em 05 maio 2016.

TIRADO, B. C. et al. Comparative study of *Colombian citrus* oils by highresolution gas chromatography and gas chromatographymass spectrometry. **J Chromatogr** v.697, p. 501-513, 1995.

TREYVAUD, V.; MARSTON, A.; DYATMIKO, W.; HOASTETTMANN, K. Molluscicidal saponins from *Phytolacca icosandra*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 603-609, 2000.

URONES, J. G.; MARCOS, S. S.; DIEZ, D.; CUBILLA, L. R. Tricyclic diterpenes from *Hyptis dilatata*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 6, p. 1035-1038, 1998.

VELÁZQUEZ, E et al. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. **Fitoterapia**, v. 74, p. 91-97, 2003.

VENDRUSCOLO, G. S et al. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Rev Bras Farmacogn**, v. 15, p. 361-372, 2005.

VICTORIA, F. N. et al. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 8, p. 2 668-2674, 2012.

VILA, R. et al. Constituents and biological activity of the essential oil of *Eugenia acapulcensis* Steud. **J Essent Oil Res**, v.16, p. 384-386, 2004.

VINAUD, M. R.; LINO JÚNIOR, R. de S.; BEZERRA, J.C.B. Activity of *Stryphnodendron polyphyllum*, a plant from brazilian savannah, against hemocytes of *Biomphalaria glabrata*, na intermediate host of *Schistosoma mansoni*. **Rev. Paras. Trop.**, v. 37 n. 3, p. 237-246, 2008.

WAGNER, V.A. The possibility of eradicating billarzia by extensive planting of the tree Balanites. **South Afr. Med.J** . v. 10, p. 10-11, 1936.

WANG, Zongde et al. QSAR study of mosquito repellents from terpenoids with a six-member-ring. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 2854-2859, 2008.

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 plant molluscicides.** Geneva, 1983.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Safe use of pesticides,** 29 p, 1991.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The Control Social Context of Schistosomiasis and its Control.** World Health Organization, Geneva, 2008.

YOUSSEF, R. S; SHAALAN, E. A. Mosquitocidal activity of some volatile oils against *Aedes caspius* mosquitoes. **J Vector Borne Dis.** v. 48, p.113-5, 2011.

ZU, Y. et al. Activities of ten essential oils towards propionibacterium acnes and PC-3, A549 e MCF-7 Cancer Cells. **Molecules,** v.15, p.3200-3210, 2010. Disponível em <<http://www.mdpi.com/1420-3049/15/5/3200>> acesso 13 Jun 2016.