

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA  
CURSO DE QUÍMICA INDUSTRIAL

**NATHÁLIA ATHAN JORGE**

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MOLUSCICIDA DO ÓLEO  
ESSENCIAL DE *Citrus limon* L. (LIMÃO) FRENTE AO CARAMUJO TRANSMISSOR  
DA ESQUISTOSSOMOSE (*Biomphalaria glabrata*)**

São Luís

2017

**NATHÁLIA ATHAN JORGE**

**Estudo químico e avaliação da atividade moluscicida do óleo essencial de *Citrus limon* L. (limão) frente ao caramujo transmissor da esquistossomose (*Biomphalaria glabrata*)**

Monografia apresentada ao Curso de Química Industrial como requisito para obtenção do grau de bacharela em Química Industrial.

São Luís

2017

NATHALIA ATHAN JORGE

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MOLUSCICIDA DO ÓLEO  
ESSENCIAL DE *Citrus limon* L. (LIMÃO) FRENTE AO CARAMUJO TRANSMISSOR  
DA ESQUISTOSSOMOSE (*Biomphalaria glabrata*)**

Monografia apresentada ao Curso de  
Química Industrial como requisito para  
obtenção do grau de bacharela em Química  
Industrial.

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/2017.

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho**  
Doutor em Química Analítica  
(Orientador)

---

**Prof. Dr. Nestor Ewerton Mendes Filho**  
Doutor em Química Analítica  
(Co-orientador)

---

**Rayone Wesly Santos de Oliveira**  
Químico Licenciado

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”*

Arthur Schopenhauer

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço em primeiro lugar a Deus pois sem ele eu não teria forças para essa longa jornada, o que seria de mim sem a fé que nele tenho.

Agradeço aos meus pais, Marcia Cristina e Ivo José, meus maiores incentivadores. Obrigada pelas orações em meu favor, pela preocupação para que estivesse sempre andando pelo caminho correto. Obrigada pelo incentivo nas realizações dos meus sonhos.

As minhas irmãs, Danielle e Michelle, pela compreensão e companheirismo nos momentos mais difíceis. A minha família, pelo apoio, e incentivo a mim destinado.

Ao meu professor orientador, Dr. Victor Elias Mouchrek Filho, pelo auxílio e paciência na orientação sempre com simpatia, e pelo fornecimento de material para pesquisa do tema.

Ao professor Nestor pela amizade, e disponibilidade sempre que precisei. A os meus professores que foram de fundamental importância na minha formação.

Aos meus amigos que sempre tiveram ao meu lado dando apoio e cumplicidade. E a todos os meus colegas de curso que acompanharam minha jornada;

As pessoas que conheci no meu intercâmbio, em especial Guilherme Batalha, Marlon Simms e Paola Gonçalves pela amizade que ultrapassou as fronteiras e foram minha família quando estava longe;

A professora Ivone Garros Rosa e aos colegas do Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada (NIBA), em especial Aline Nogueira, Karla Araújo e João Leite Jr., pela atenção dispensada;

E a todos que contribuíram de alguma forma para eu finalizar esse trabalho.

**Estudo químico e avaliação da atividade moluscicida do óleo essencial de *Citrus limon* L. (limão) frente ao caramujo transmissor da esquistossomose (*Biomphalaria glabrata*)**

RESUMO

O uso de moluscicida de origem vegetal no controle da esquistossomose tem motivado pesquisas de novas substâncias, entre elas, os óleos essenciais. Nesta pesquisa, o óleo essencial foi extraído da casca de *Citrus limon* Linneo por meio de hidrodestilação, determinando-se as propriedades físico-químicas, quantificando-se os componentes majoritários e minoritários pela técnica de cromatografia gasosa acoplado à espectrometria de massas (CG-EM), sendo o constituinte majoritário do *Citrus limon* Linneo, o l-limoneno, com teor de 48,99 % e caracterizando-o por espectrometria na região do infravermelho comparando-se com o seu padrão. Os resultados mostraram um rendimento (m/m) de 0,46 % para o *Citrus limon* Linneo. O óleo foi testado quanto à atividade moluscicida, através da técnica preconizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Calculou-se a concentração letal (CL<sub>50</sub>) do óleo pelo método Reed-Muench e Pizzi respectivamente. O óleo extraído da casca de *Citrus limon* Linneo além de ser atóxico, com CL<sub>50</sub> de 13,18 mg.L<sup>-1</sup> alcançou o melhor resultado quanto a atividade moluscicida com CL<sub>50</sub> de 20,60 mg.L<sup>-1</sup> para o padrão de l-limoneno mostrando-se, portanto, ser bastante ativo frente ao caramujo *Biomphalaria glabrata*.

PALAVRAS-CHAVE: óleos essenciais, toxicidade, moluscicida.

**Chemical study and evaluation of molluscicidal activity of *Citrus limon* L. (lemon) essential oil against the schistosomiasis transmitting snail (*Biomphalaria glabrata*)**

ABSTRACT

The use of plant molluscicide in controlling schistosomiasis has motivated the survey in the search for new, among them the essential oil. This survey, the essential oil extracted from bark of *Citrus limon* Linneo through hydrodistillation, determining the physico-chemical properties, quantifying the majority and minority components of each essential oil by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS), where the majority constituent of *Citrus limon* Linneo, the majority was l-limonene, 48.996 % characterizing by in the region infrared spectrometry compared with the standard. The results showed an income (m/m) 0.46 % for *Citrus limon* Linneo. These oil has been tested as a molluscicide, through the technique recommended by the World Health Organization (WHO). Estimated the lethal concentration (CL<sub>50</sub>) of oil by Reed-Muench and Pizzi respectively. The oil extracted from the bark of *Citrus limon* Linneo was considered to be nontoxic with CL<sub>50</sub> 13,8 mg.L<sup>-1</sup>, achieving the best result as a molluscicide with CL<sub>50</sub> activity 20,6 mg.L<sup>-1</sup> for the stand of l-limonene, thus being the very active front in the snail *Biomphalaria glabrata*.

KEY WORDS: essential oils, toxicity, molluscicide.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Parte do sistema montagem para a realização da hidrodestilação no Pavilhão Tecnológico – UFMA durante o processo do óleo essencial da casca do <i>Citrus limon</i> L. Fonte: dados da pesquisa.....	18
<b>Figura 2.</b> <i>Citrus limon</i> L. Fonte: Gomes et al. (2001).....	20
<b>Figura 3.</b> Algumas estruturas de componentes encontrados no óleo essencial do limão. Fonte: Silva (2009).....	22
<b>Figura 4.</b> Fórmula estrutural do Limoneno. Fonte: Mundo Educação (2017) .....	23
<b>Figura 5.</b> Estruturas enantioméricas do Limoneno. Fonte: Novo Elemento (2017).....	23
<b>Figura 6.</b> (a) <i>B. Glabrata</i> , (b) <i>B. stramineae</i> (c) <i>B. Tenagophila</i> . Fonte: Surveillance and Control of Mollusks with Epidemiological Importance. Technical directives: Schistosomiasis.....	25
<b>Figura 7.</b> Caramujo da espécie <i>Biomphalaria glabrata</i> . Fonte: dados da pesquisa.....	25
<b>Figura 8.</b> Ciclo evolutivo. Fonte: Filo Platelminthes, 2009.....	27
<b>Figura 9.</b> (a) os ovos; (b) o miracídio. Fonte: Sinclair Stammers/OMS/TDR.....	28
<b>Figura 10.</b> Cercária da <i>S.mansoni</i> . Fonte: Sinclair Stammers/OMS/TDR.....	28
<b>Figura 11.</b> Fórmula estrutural da niclosamida. Fonte: Anvisa, 2017	30
<b>Figura 12.</b> Imagens da coleta, dos moluscos <i>Biomphalaria glabrata</i> , realizada em fev/2017 no bairro do Sá Viana, São Luís – MA. Fonte: dados da pesquisa.....	33
<b>Figura 13.</b> Organismos coletados ( <i>Biomphalaria glabrata</i> ) e armazenados no NIBA - Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada, UFMA, em fev/2017. Fonte: dados da pesquisa.....	34
<b>Figura 14.</b> Cinética referente ao rendimento de extração dos óleos em função do tempo, com massa de 30g e temperatura de 100°C. Fonte: Dados da pesquisa.....	41
<b>Figura 15.</b> Espectro do branco KBr. Fonte: Dados da pesquisa.....	43
<b>Figura 16.</b> Espectros na região do infravermelho do padrão do limoneno e óleo essencial do <i>Citrus limon</i> Linneo. Fonte: Dados da pesquisa.....	44
<b>Figura 17.</b> Cromatograma da amostra do óleo das cascas do <i>Citrus limon</i> Linneo, apresentando os picos selecionados e identificados através da comparação dos respectivos espectros de massas com a espectroteca NIST21. Fonte: Dados da pesquisa.....	45
<b>Figura 18.</b> Espectros de massas: (a) Composto da amostra do óleo extraído das cascas do <i>Citrus limon</i> Linneo referente ao pico 7 do cromatograma da Figura 16 (b) Proposta de identificação através da espectroteca NIST21 – TCC. Fonte: dados da pesquisa.....	47
<b>Figura 19.</b> Espectros de massas: (a) Composto da amostra do óleo extraído das cascas do <i>Citrus limon</i> Linneo referente ao pico 4 do cromatograma da Figura 16 (b) Propostas de identificação através da espectroteca NIST21. Fonte: dados da pesquisa.....	48

<b>Figura 20.</b> Espectros de massas: (a) Composto da amostra do óleo extraído das cascas do <i>Citrus limon</i> Linneo referente o pico 2 do cromatograma da Figura 16 (b) Propostas de identificação através da espectroteca NIST21 – TCC. Fonte: Dados da pesquisa.....	49
<b>Figura 21.</b> Espectros de massas: (a) Composto da amostra do óleo extraído das cascas do <i>Citrus limon</i> Linneo referente o pico 6 do cromatograma da Figura 16 (b) Proposta de identificação através da espectroteca NIST21 – TCC. Fonte: dados da pesquisa.....	50
<b>Figura 22.</b> Espectros de massas: (a) Composto da amostra do óleo extraído das cascas do <i>Citrus limon</i> Linneo referente o pico 3 do cromatograma da Figura 16 (b) Proposta de identificação através da espectroteca NIST21. Fonte: Dados da pesquisa.....	51
<b>Figura 23.</b> Fragmentação do sabineno. Fonte: MATA ( 2003).....	52
<b>Figura 24.</b> Teste de positividade dos caramujos realizado no NIBA (UFMA). Fonte: dados da pesquisa.....	53
<b>Figura 25.</b> Percentual de mortalidade por tempo de exposição e observação para o teste piloto. Fonte: Dados da pesquisa.....	54
<b>Figura 26.</b> Percentual de mortalidade pelas concentrações do óleo essencial <i>Citrus limon</i> Linneo. Fonte: dados da pesquisa.....	55
<b>Figura 27.</b> Taxa de mortalidade dos caramujos nas cinco concentrações diferentes do óleo essencial de <i>Citrus limon</i> Linneo. Fonte: dados da pesquisa.....	56
<b>Figura 28.</b> Estimativa da CL <sub>50</sub> do óleo essencial de <i>Citrus limon</i> Linneo pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de caramujos vivos e mortos em função do logaritmo da concentração aplicada. Fonte: Dados da pesquisa.....	57
<b>Figura 29.</b> Tempo de observação e exposição X concentrações das soluções da atividade moluscicida do padrão. Fonte: Dados da pesquisa.....	58
<b>Figura 30.</b> Estimativa da CL <sub>50</sub> do óleo essencial do limão pelo método Reed-Muench a partir do acumulados de caramujos vivos e mortos em função do logaritmo da concentração aplicada. ....	58
<b>Figura 31.</b> Grupo controle do branco e do Tween 80.....	59

## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1.</b> Parâmetros físico-químicos do óleo essencial estudado.....	40
<b>Tabela 2.</b> Compostos identificados na amostra do óleo essencial extraído das cascas de <i>Citrus limon</i> Linneo.....	46
<b>Tabela 3.</b> Mortalidade dos caramujos após testes nas diferentes concentrações do óleo essencial extraído das cascas de <i>Citrus limon</i> Linneo.....	56
<b>Tabela 4.</b> Tempo de observação e exposição e concentrações das soluções da atividade moluscicida do padrão.....	57
<b>Tabela 5.</b> Mortalidade dos caramujos após testes nas diferentes concentrações do padrão de l – limoneno.....	58

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 DESENVOLVIMENTO .....	14
2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	14
2.1.1 Considerações gerais sobre óleos essenciais.....	14
2.1.2 Aspectos gerais sobre o limão .....	20
2.1.3 Considerações gerais sobre o óleo essencial do <i>Citrus limon</i> Linneo .....	22
2.1.4 Esquistossomose.....	24
2.1.5 Atividade moluscicida .....	29
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
2.2.1 Material.....	31
2.2.2 Métodos.....	32
2.2.3 Caracterização físico-química do óleo essencial.....	35
2.2.4 Análise espectrométrica vibracional na região do infravermelho .....	36
2.2.5 Análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) .	36
2.2.6 Amostragem dos moluscos <i>Biomphalaria glabrata</i> .....	37
2.2.7 Análise estatística da concentração letal (CL50).....	39
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	40
2.3.1 Avaliação dos parâmetros físico-químicos dos óleos essenciais.....	40
2.3.2. Avaliação da cinética de extração e rendimento dos óleos essenciais.....	41
2.3.3 Análise espectroscópica vibracional na região do infravermelho.....	42
2.3.4 Avaliação das características químicas dos óleos essenciais obtidas por cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas (CG-EM) .....	44
2.3.5 Captura e teste da positividade dos caramujos.....	51
2.3.6 Avaliação da atividade moluscicida.....	52
2.3.7 Atividade moluscicida do padrão.....	56
2.3.8 Avaliação do teste controle .....	59
3 CONCLUSÃO .....	60
REFERÊNCIAS .....	62

## 1 INTRODUÇÃO

A doença esquistossomose mansônica pode ser classificada como infecto-parasitária, tendo como causador o trematódeo *Schistosoma mansoni*, cujas formas adultas instalam-se nos vasos mesentéricos homem e as formas intermediárias se desenvolvem em caramujos gastrópodes, *Biomphalaria glabrata*. Inicialmente, trata-se de uma doença assintomática, porém a mesma pode evoluir causando danos graves à saúde ou até mesmo a morte. A sua presença constante em diversos países e regiões e sua evolução associada aos danos causados ao ser humano fazem com que a esquistossomose seja encarada enquanto problema de saúde pública. (Ministério da Saúde, 2014).

A esquistossomose mansoni ocorre, principalmente, na zona tropical, já foi registrada em 54 países, com destaque para a África e Leste do Mediterrâneo, regiões do Delta do Nilo e países como Egito e Sudão. Além de atingir, a América do Sul, como por exemplo: a região do Caribe, Venezuela e Brasil. Em nosso país, estima-se que cerca de 1,5 milhão de pessoas vivem sob o risco de contrair a doença.

A esquistossomose manifesta-se e desenvolve-se num ciclo e a maneira mais eficaz para o seu controle é interrompendo esse ciclo evolutivo, principalmente com a redução das populações dos moluscos hospedeiros intermediários. Os métodos de controle são classificados em três tipos: biológico, físico e químico.

O biológico baseia-se com a introdução de organismos com ação predadora, competidora, parasitária ou patogênica em relação aos moluscos hospedeiros. O físico consiste na implantação e manutenção de fatores capazes de impedir o desenvolvimento das populações desses animais. O método químico compreende na aplicação de produtos tóxicos (moluscicidas) nos criadouros. Como as três modalidades implicam impacto ambiental em qualquer escala, suas implementações dependem de estudos prévios, obedecendo a legislação ambiental (Ministério da Saúde, 2008).

A esquistossomose é causada pelo parasita *Schistosoma mansoni* que se hospeda no ser humano, mas que necessita de caramujos de água doce como hospedeiros intermediários para desenvolver seu ciclo evolutivo. (Varella, Drauzio. 2017). A lesão principal é a reação granulomatosa causada pelos ovos e essa é encontrada principalmente no intestino e no fígado do homem. (USP).

Como já mencionado, a medida primordial no combate à essa doença é a eliminação e/ou redução da população dos moluscos. Por questões econômicas e ecológicas, o uso de moluscidas biodegradáveis, de baixo custo e com aplicação fácil é cada vez mais indicado em criadouros. (WHO, 1983). Existe uma grande diferença química entre óleos essenciais, óleos vegetais e óleos minerais. Os primeiros são misturas de terpenos e oxigenados, juntos com outros tipos de compostos orgânicos, os óleos vegetais são ésteres da glicerina com ácidos graxos de longas cadeias, enquanto que os óleos minerais são parafinas líquidas misturadas a outros hidrocarbonetos de peso molecular elevado. (WILLIANS, 1996).

A sociedade tem demandado produtos orgânicos isentos de toxicidade, buscando menor agressão ao meio ambiente. Neste sentido, as plantas estão sendo exploradas, cada vez mais, para uso de seus extratos brutos e/ou óleos essenciais (Morais, 2009). E nesse sentido, há uma preferência muito grande ao uso dos óleos essenciais, por esses se encaixarem muito bem nos requisitos de eficácia e menor agressão ambiental. Existe uma grande diferença química entre óleos essenciais, óleos vegetais e óleos minerais. Os primeiros são misturas de terpenos e oxigenados, juntos com outros tipos de compostos orgânicos, os óleos vegetais são ésteres da glicerina com ácidos graxos de longas cadeias, enquanto que os óleos minerais são parafinas líquidas misturadas a outros hidrocarbonetos de peso molecular elevado. (WILLIANS, 1996). A constituição química dos óleos essenciais de frutas cítricas compreende hidrocarbonetos monoterpênicos e sesquiterpênicos e monoterpênicos oxigenados. O óleo volátil da casca do fruto e das folhas de *Citruslimon* L. é rico em limoneno, b-pineno, g-terpineno, terpinoleno, neral e geranial (GHELARDINI et al., 1999; BISSET; VEKIARI et al., 2002).

Com base no exposto, foi estudada e avaliada a atividade moluscida do óleo essencial extraído das cascas do *Citruslimon* Linneo, frente ao caramujo transmissor da esquistossomose (*Biomphalaria glabrata*), com o objetivo de buscar um produto natural que possa ser usado como alternativa no controle da doença, interrompendo assim seu ciclo evolutivo. Assim, o objetivo deste trabalho foi extrair, quantitativamente, o óleo essencial do limão; caracterizar o óleo essencial por processo físico-químico, espectrometria vibracional na região do infravermelho e

cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas; avaliar a atividade moluscicida do óleo essencial, utilizando o método preconizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e; avaliar a concentração letal (CL50) do óleo essencial.

## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 2.1.1 Considerações gerais sobre óleos essenciais

De acordo com a *International Organization for Standardization (ISO)*, óleos voláteis ou essenciais são os produtos obtidos de partes de plantas por destilação por arraste com vapor d'água, bem como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos (*Rutaceae*). De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Essas denominações derivam de algumas de suas características físicas, como por exemplo a de serem geralmente líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente, advindo daí a designação de óleo. A sua principal característica, a volatilidade, difere-os dos óleos fixos que são misturas de substâncias lipídicas obtidas geralmente de sementes. O aroma agradável e intenso da maioria dos óleos essenciais, também é uma característica muito marcante, sendo, por isso, que também são chamados de essências. Eles são solúveis em solventes orgânicos, como éter, recebendo, por isso, a denominação de óleos etéreos. Em água os óleos essenciais apresentam solubilidade limitada, mas suficiente para aromatizar as soluções aquosas, que são denominadas de hidrolatos (SIMÕES et al., 2007).

No que se refere à composição química, os óleos essenciais diferem-se dos vegetais e minerais, sendo os primeiros constituídos por terpenos e compostos oxigenados, juntos com outros tipos de substâncias orgânicas. Os óleos vegetais são ésteres da glicerina com ácidos graxos de longas cadeias. Enquanto, os óleos minerais são parafinas líquidas misturadas a outros hidrocarbonetos de peso molecular elevado.

A constituição química dos óleos essenciais é muito complexa, chegando a algumas centenas de compostos com diferentes funções orgânicas. A esse respeito Simões et al. (2007) esclarecem que os constituintes dos óleos variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, éteres, fenóis, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos contendo enxofre. Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes

concentrações; normalmente, um deles é o composto majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades em forma de traços (SIMÕES et al., 2007).

O termo terpenóides denomina todas as substâncias cuja biossíntese deriva de unidades de isoprenos, compostos com cinco átomos de carbono. Os terpenóides mais frequentes em óleos essenciais são pertencentes das classes dos monoterpenos e sesquiterpenos compostos que apresentam em suas estruturas uma e duas unidades de isopreno, respectivamente (GOUNARIS, 2010; SARKER et al., 2006; SIMÕES et al., 2007).

A estrutura química geral dos terpenos é  $C_{10}H_{16}$ , como por exemplo, o limoneno o qual está presente na maioria das vezes em compostos cítricos, ocorrem também como diterpenos, triterpenos e tetraterpenos ( $C_{20}$ ,  $C_{30}$  e  $C_{40}$ ), bem como hemiterpenos ( $C_5$ ); e sesquiterpenos ( $C_{15}$ ); quando os compostos contêm elementos adicionais, geralmente o oxigênio, são denominados terpenóides. Terpenóides são sintetizados a partir de unidades de acetato, e como tal eles compartilham suas origens com ácidos graxos. Eles diferem dos ácidos graxos que contêm extensas ramificações e ciclização. Exemplos de terpenóides comuns são o metanol e cânfora (monoterpenos) e farnesol e artemisin (sesquiterpenos), (COWAN, 1999).

Quanto aos métodos de extração dos óleos essenciais, eles variam de acordo com a região da planta em que ele se encontra, bem como com a proposta de utilização dos mesmos. Os mais comuns são: enfloração (*enfleurage*), arraste por vapor d'água, extração com solventes orgânicos, prensagem e extração por  $CO_2$  supercrítico (MOUCHREK FILHO, 2000).

Na indústria, o método mais empregado para extrair é a destilação pelo vapor de água em consequência da sua maior simplicidade e economia, permite tratar de uma única vez quantidades enormes de matéria-prima. Porém, uma destilação rápida pode induzir a formação de um produto contendo predominantemente constituintes mais voláteis e desprovidos das melhores características. Enquanto isso, uma extração prolongada, além de encarecer o óleo essencial, também pode sobrecarregar dos compostos de aromas menos estimados. A experiência determinou,

para cada planta, o momento em que deve cessar a operação, para obter o produto de melhor qualidade e a preço mais baixo (MOUCHREK FILHO, 2001).

Em pequena escala, por possuírem tensão de vapor mais elevada do que água, os óleos essenciais são arrastados pelo vapor d'água, um aparelho de Clevenger pode ser utilizado para a destilação por vapor d'água. O óleo essencial obtido, após separar-se da água, deve ser seco com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro. Esse procedimento, embora clássico, pode levar à formação de artefatos em função da alta temperatura empregada. Preferencialmente, esse método é utilizado para extrair óleos de plantas frescas (MOUCHREK FILHO, 2000).

A especificação das condições de extração no processo de destilação, como o tempo de extração do óleo essencial, está diretamente relacionada com a qualidade do óleo essencial, pois é um dos principais parâmetros físico-químicos da indústria de essências, no que se refere à qualidade e à natureza econômica do processo (CHAAR, 2000; MOUCHREK, 2000).

No que diz respeito ao valor econômico, segundo Teles (2003) os óleos essenciais são largamente utilizados em muitas indústrias para conferir aromas especiais em inúmeros produtos, tais como perfumes, cosméticos, sabonetes, condimentos, além de serem usados como insumos em diversos produtos em indústrias de plásticos, tintas, borrachas, inseticidas, entre outras. O grande número de compostos químicos presentes nos óleos essenciais, apresentam inúmeras atividades biológicas também, avaliadas em vários estudos, como larvicida, anti-inflamatória, pesticida, inseticida, moluscicida, carrapaticida, antioxidante, anti-séptica, herbicida, antioxidante, entre outras atividades (CHENG, 2003).

A conservação dos óleos essenciais, em função da relativa instabilidade das moléculas que os constituem, torna-se difícil, uma vez que podem sofrer diferentes tipos de degradação: fotoisomerização, fotociclicização (citrais), ruptura oxidativa de propenilfenóis, peroxidação de hidrocarbonetos e decomposição de cetonas e alcoóis (limoneno), dentre outras. Estas degradações podem modificar as propriedades e/ou pôr em dúvida a inocuidade do produto (COSTA, 1994).

Alguns procedimentos que buscam o controle de qualidade de matérias-primas vegetais ricas em óleos voláteis podem ser achados em farmacopeias. Diversos

experimentos podem ser utilizados para a identificação dessas alterações, tais como: avaliação da miscibilidade em etanol, medidas físicas (índice de refração  $[\eta]D^{20}$ , densidade relativa  $[d]_{20}$ , viscosidade e às vezes ponto de solidificação), determinação de índices de acidez, ésteres do ácido ftálico, em algumas ocasiões, busca de óleos graxos e óleos essenciais resinificados, determinação do resíduo de evaporação, dentre outros.

No que diz respeito às técnicas utilizadas para separar e quantificar substâncias componentes dos óleos essenciais, a cromatografia gasosa (CG) é geralmente a mais utilizada em função do seu alto poder de diferenciação e por ser um método simples usado para separação e quantificação dos componentes de óleos essenciais, geralmente empregada juntamente com algum detector, como um espectro de massa, que fragmenta e verifica os elementos oriundos do analito (SIMÕES et al., 2007).

#### **2.1.1.1 Extração de óleo**

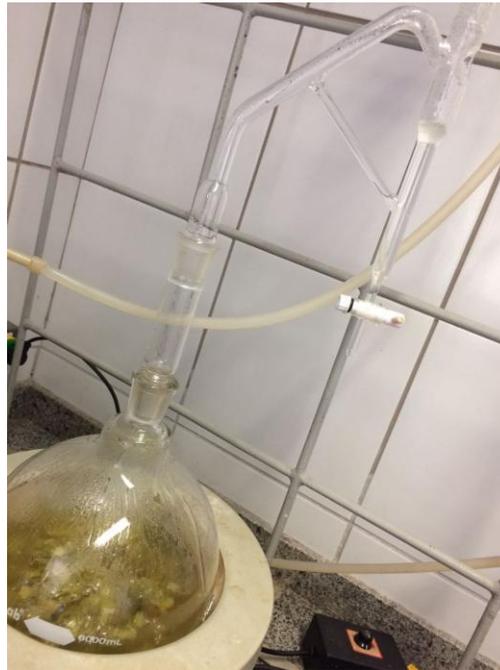
Como já mencionado anteriormente, a determinação das condições de extração de óleos voláteis é uma etapa muito importante, por ser um fator determinante na relação entre a composição química e a qualidade do óleo extraído, embora todas as partes de uma planta possam acumular óleo essencial, sua composição pode variar segundo a localização na planta (SIMÕES et. al., 2007).

Existem vários métodos de extração dos óleos essenciais, variando de acordo com a região da planta em que ele se encontra, e com a proposta de utilização do mesmo. Os mais comuns são: enfloração, prensagem, extração com solventes orgânicos, extração por fluido supercrítico e arraste por vapor d'água (MOUCHREK FILHO, 2000).

Na indústria de óleos essenciais existem três tipos de extrações, distinguidas pela forma como se estabelece o contato entre a amostra e a água, na fase líquida ou de vapor; a primeira é chamada de hidrodestilação, onde a amostra fica imersa na água contida numa caldeira; a segunda de destilação pela água e vapor, onde uma rede colocada na parte inferior de uma caldeira mais alta separa a água da amostra e a terceira de destilação pelo vapor de água, onde a amostra é colocada em uma caldeira

e o vapor de água ali injetado provém de um gerador próprio, independente. A indústria utiliza, de preferência, o vapor d'água por ser reduzido o contato com a água, relativamente aos métodos anteriores, é menos acentuada a hidrólise dos ésteres e a polimerização de outros constituintes, em particular dos aldeídos (WILLIANS, 1996). Porém, dentre as opções citadas, a escolhida nesse trabalho foi a extração por arraste por vapor d'água, que é um dos métodos mais simples e mais utilizados conforme Figura 1.

**Figura 1.** Parte do sistema montagem para a realização da hidrodestilação no Pavilhão Tecnológico – UFMA durante o processo do óleo essencial da casca do *Citruslimon* L. Fonte: dados da pesquisa



#### 2.1.1.2 Fatores que afetam a extração

Alguns fatores afetam, diretamente, a produção natural dos óleos voláteis e a sua composição nas plantas, como por exemplo:

- a) Localização geográfica: As diferentes características geográficas e climáticas interferem diretamente sobre o modo como as plantas adaptam-se e desenvolvem-

se, influenciando assim na produção dos metabólitos secundários produzidos de acordo com a sua necessidade (HARTMANN, 2007).

- b) Sazonalidade: A variação climática das estações do ano pode influenciar na composição química dos óleos voláteis, como em cujo teor de monoterpenos oxigenados é maior no inverno e de sesquiterpenos hidrocarbonetos é maior no verão (HUSSAIN et al., 2008).
- c) Fase fenológica: A composição química dos óleos voláteis pode variar de acordo com a idade da planta e a fase fenológica em que se encontram, como observado que produz níveis mais altos de sesquiterpenos hidrocarbonetos, considerados mais voláteis, nos meses correspondentes às fases de floração e frutificação, possivelmente para favorecer sua polinização e dispersão (LAGO et al., 2007).
- d) Biotipo: A composição química dos óleos voláteis de plantas aromáticas da mesma espécie que apresentam biotipos com e sem tricomas glandulares pode variar significativamente, em que os monoterpenos ocorrem predominantemente no biotipo glandular (TELLES et al., 1999).
- e) Quimiotipo: A evolução das plantas em resposta às condições ambientais sob as quais viveram ao longo do tempo resultou em grande variabilidade genética, que promove diferenças químicas intraespecíficas nos óleos voláteis de plantas da mesma espécie, morfológicamente idênticas e até mesmo cultivadas nas mesmas condições ambientais (LAHLOU, 2004).
- f) Condições de cultivo: A disponibilidade limitada de água pode restringir a biossíntese de terpenóides, como por exemplo, a seca severa reduz a emissão de compostos orgânicos voláteis (OWEN; PEÑUELAS, 2005).
- g) Interação com o meio ambiente: A taxa de emissão de monoterpenos pode aumentar sob injúria e herbivoria (OWEN; PEÑUELAS, 2005).
- h) Defesa contra microrganismos fitopatogênicos: Plantas aromáticas podem responder à invasão de fitopatógenos produzindo fitoalexinas de caráter lipofílico, que podem atuar em nível molecular tendo como alvo principal a membrana celular desses microrganismos (INOUE et al., 2004).
- i) Atração de polinizadores e dispersores de sementes: Por serem sésseis, as plantas produzem compostos voláteis que atraem agentes polinizadores e dispersores, fato

evidenciado por estudos que comprovam que terpenos são reconhecidos pelo aparelho olfativo dos insetos (GERSHENZON; DUDAREVA, 2007).

### 2.1.2 Aspectos gerais sobre o limão

Sabe-se que plantas cítricas foram introduzidas no Brasil pelas primeiras expedições colonizadoras, provavelmente na região que hoje é o Estado da Bahia. Entretanto, com melhores condições para se cultivar e produzir do que nas próprias regiões de origem, estas plantas se expandiram por todo o país. A citricultura brasileira detém a liderança mundial e tem se destacado pela promoção do crescimento socioeconômico, contribuindo com a balança comercial nacional e principalmente, como geradora de empregos, diretos e indiretos, na zona rural (CUNHA et al., 1996).

Existem várias espécies que pertencem ao gênero *Citrus* no Brasil, e dentre elas tem o *Citrus limon* L. (limão verdadeiro). Esse é o fruto do limoeiro (Figura 2), tendo origem na região sudeste da Ásia, sendo uma árvore pertencente à família das *Rutaceas*, perenifólia, com 3 a 6 metros de altura, com numerosos ramos e espinhos. Folhas unifolioladas de cor verde, formato lanceolada, elíptico - ovada de 6 - 12,5 cm de comprimento e 3 - 6 cm de largura; ponta obtusa; margem serrada – dentada; folhas verdes; flores solitárias ou em racimos axilares, amareladas em forma de botão; pétalas brancas na parte superior e púrpura abaixo; fruto oblongo ou oval, 7 - 12 cm de comprimento, amarelo claro ou dourado; casca mais ou menos grossa e com presença de glândulas, dependendo das variedades; sementes pequenas, ovais e pontiagudas (OJASTI et al., 2001).

**Figura 2.** *Citrus limon* L. Fonte: Gomes et al. (2001)



Em termos de aplicação, o *Citrus limon* é muito utilizado na culinária, em molhos, aperitivos, sorvetes, licores, etc. O seu óleo extraído da semente também pode ser aproveitado na indústria alimentícia, pois apresenta alto grau de instauração, baixo teor de ácidos graxos livres como o caprílico, mirístico, palmítico, esteárico, oléico, linoléico, linolênico e araquídico (GRASSI FILHO, 2005, REDA 2005). Além de se fazer parte da composição de produtos de limpeza, perfumaria e medicamentos (AZAMBUJA, 2012).

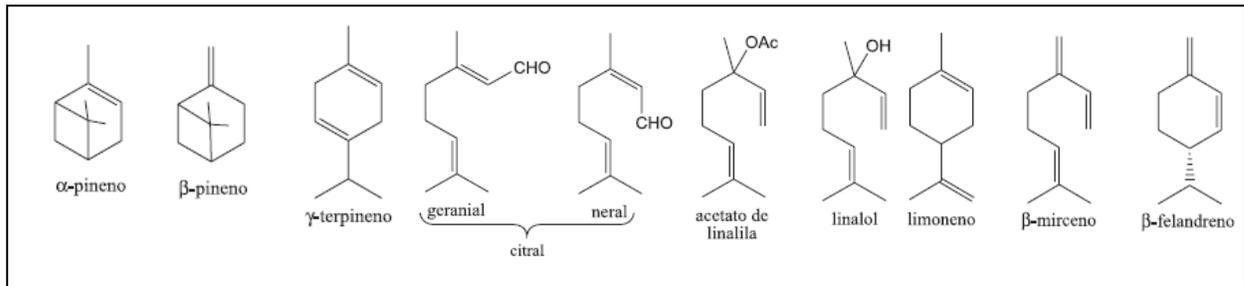
Sua aplicabilidade terapêutica tem indícios na antiguidade e as propriedades que lhe eram atribuídas são confirmadas em estudos recentes (ARIAS; RAMÓN-LACA, 2005). No Brasil, o limão tornou-se popular, principalmente, devido a sua eficácia no combate de diversas patologias, tais como infecções, febres, aterosclerose, acidez gástrica, alterações do fígado e biliares entre outras. Além de possuir propriedades, como: antibiótica, antitérmica, anti-inflamatória, vermífuga, antisséptica, antiespasmódica, etc (MOREIRA, 2002; RAQUEL, 2007). Seus constituintes como o linalol, citral, citronelal, felandrina, hidrocarbonetos terpenicos, limonina, limoleno, ácidos orgânicos (cítrico e málico), bioflavonóides, pectinas, vitamina A, vitamina B1, vitamina B2, niacina, sais minerais (potássio, fósforo, ferro, cálcio, sódio, magnésio, enxofre, cloro), vitamina C (ácido ascórbico), são os responsáveis por essas propriedades terapêuticas (COELHO, 2000; VENDRUSCOLO et al., 2005; FENNER, 2006; AGRA et al., 2007; PENIDO; SILVA, 2007).

Por apresentar uma vasta variação na sua composição e propriedades, a produção de limão destina-se também para extração do óleo essencial contido na casca dos frutos. Este óleo é comumente utilizado por indústrias de bebidas de refrigerantes, como também para fabricação de cosméticos, essências aromáticas (GRASSI FILHO et al., 2005).

O constituinte em majoritário do óleo essencial extraído do *Citrus limon* é o l-limoneno. Com relação aos aldeídos, há um predomínio do citral, ao qual se atribui as propriedades aromáticas deste óleo. Além do citral ainda existem outros compostos, como: os monoterpenos ( $\alpha$ -tujeno,  $\alpha$  e  $\beta$  - pipeno, canfeno, mirceno,  $\alpha$  e  $\beta$ -felandreno,  $\alpha$  e  $\gamma$ -terpineno, terpinoleno,  $\beta$ -ocimeno, p-cimeno, 3-careno); monoterpenos oxigenados (hidrato de sabineno, linalol, endo-fenhol, cânfora, citrnelol, borneol, terinterpineol,

nerol, neral, geraniol, geranial, citronelol); sesquiterpenos ( $\sigma$ -elemeno, E-caryphelleno,  $\alpha$ -trans-bergaboleno,  $\alpha$ -humuleno, E-  $\beta$ - farneseno, curcumeno, valenceno, biciclogermacreno,  $\alpha$ -muroleno  $\alpha$  e bisaboeno); sesquiterpeno oxigenados (álcool carypheleno, germacreno,  $\alpha$ -muurolo,  $\alpha$ -cadinol,  $\alpha$ - bisabolol, E-farnesol) e outros compostos como o ácido palmítico e ácido linoleico (Figura 3). De um modo geral o óleo essencial é descrito em relação a composição com teor de 92 a 94% de hidrocarbonetos e 6 a 8 % de compostos oxigenados (COELHO, 2000; LOTA et al., 2002; FERHAT et al., 2007; AZUBA, 2012).

**Figura 3.** Algumas estruturas de componentes encontrados no óleo essencial do limão. Fonte: Silva (2009)



### 2.1.3 Considerações gerais sobre o óleo essencial do *Citruslimon*Linneo

A constituição química dos óleos essenciais de frutas cítricas compreende hidrocarbonetos monoterpênicos e sesquiterpênicos e monoterpênicos oxigenados. O óleo volátil da casca do fruto e das folhas de *Citrus limon* L. é rico em limoneno,  $\beta$ -pineno,  $\gamma$ -terpineno, terpinoleno, neral e geranial (GHELARDINI et al., 1999; BISSET; VEKIARI et al., 2002).

O limoneno (IUPAC: 1-metil-4-isopropenilciclohex-1-eno), é o componente químico majoritário, uma substância química, orgânica, natural, pertencente à família dos terpenos, classe dos monoterpênicos, de fórmula molecular  $C_{10}H_{16}$  (Figura 4) encontrado em frutas cítricas (cascas principalmente de limões e laranjas), volátil, por isso responsável pelo cheiro que essas frutas apresentam. Possui massa molecular 136 g/L, cuja molécula ao apresentar um centro quiral muitas espécies de plantas podem biosintetizá-lo nas formas de seus enantiômeros(Figura 5) e na forma racêmica,

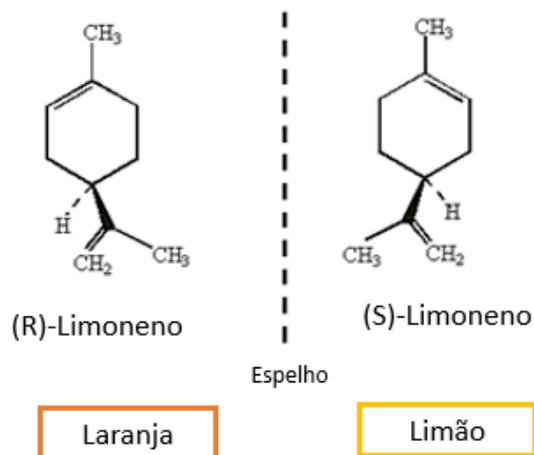
ou seja, é opticamente ativo, extraído na forma de óleo da casca de frutas cítricas como a laranja e o limão.

Por possuir um centro quiral, concretamente um carbonoassimétrico, apresenta isomeria óptica. Portanto, existem dois isômeros ópticos: o d - limoneno e o l - limoneno. A nomenclatura IUPAC correta é R - limoneno e S - limoneno (Figura 5). Curiosamente, os enantiômeros podem ser facilmente diferenciados através do odor, o d-Limoneno possui odor de laranja e o l-Limoneno de limão(SCHLISCHTING, 2008).

**Figura 4.** Fórmula estrutural do Limoneno. Fonte: Mundo Educação (FOGAÇA, 2017)



**Figura 5.** Estruturas enantioméricas do Limoneno. Fonte: Novo Elemento (2017)



#### 2.1.4 Esquistossomose

A esquistossomose, conhecida como barriga d'água, xistosa, doença do caramujo, xistossomose transmitida por caramujo, da espécie *Biomphalaria glabrata* (RAGHAVAN et al., 2003) é uma doença complexa devido aos seus variados fatores causais e sua ampla distribuição geográfica, motivo pelo qual se encontra inserida no contexto das doenças consideradas problema de saúde pública (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1994).

No Brasil, a esquistossomose mansônica é endêmica provocando, anualmente, um número expressivo de formas graves e óbitos. Considera-se uma doença endêmica, aquela que existe constantemente em determinado lugar, atacando um número maior ou menor de indivíduos. A doença ocorre em localidades sem saneamento ou com saneamento básico inadequado, sendo adquirida pela pele e pelas mucosas devido ao contato do homem com águas contaminadas com as formas infectantes de *S. mansoni* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1995).

Entretanto, para que ocorra a transmissão da doença, é indispensável a presença dos hospedeiros definitivo (o homem que excreta os ovos do verme pelas fezes) e intermediário (caramujo aquático do gênero *Biomphalaria* que libera as larvas infectantes do *Schistosoma mansoni* nas coleções hídricas utilizadas pelos seres humanos susceptíveis à doença) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1995).

Atualmente, existem dez espécies e uma subespécie do gênero *Biomphalariae*, destas, três são hospedeiras intermediárias naturais (*B. glabrata*, *B. tenagophila* *B. straminea*) (Figura 6) e duas (*B. amazonicae* *B. peregrina*) são hospedeiras intermediárias potenciais, uma vez que só se infectam experimentalmente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1995).

**Figura 6.** (a) *B. Glabrata*, (b) *B.stramineae*, (c) *B. Tenagophila*. Fonte: Surveillance and Control of Mollusks with Epidemiological Importance. Technical directives: Schistosomiasis.



O *Biomphalaria glabrata* (Figura 7), reconhecido popularmente como caramujo, pertencente ao reino Animália, da classe Gastropoda, e da família Planorbidea é um importante vetor do *Schistosoma mansoni* nas Américas, devido ao alto potencial biológico de infecção natural e vasta distribuição (SOUZA et al., 1995; BARBOSA et al., 2000), sendo encontrado em todos os Estados brasileiros desde a Paraíba até o Rio Grande do Sul e também em algumas áreas do Pará, Maranhão e Piauí, ao norte e Goiás e Mato Grosso no Centro-Oeste.

**Figura 7.** Caramujo da espécie *Biomphalaria glabrata*. Fonte: dados da pesquisa



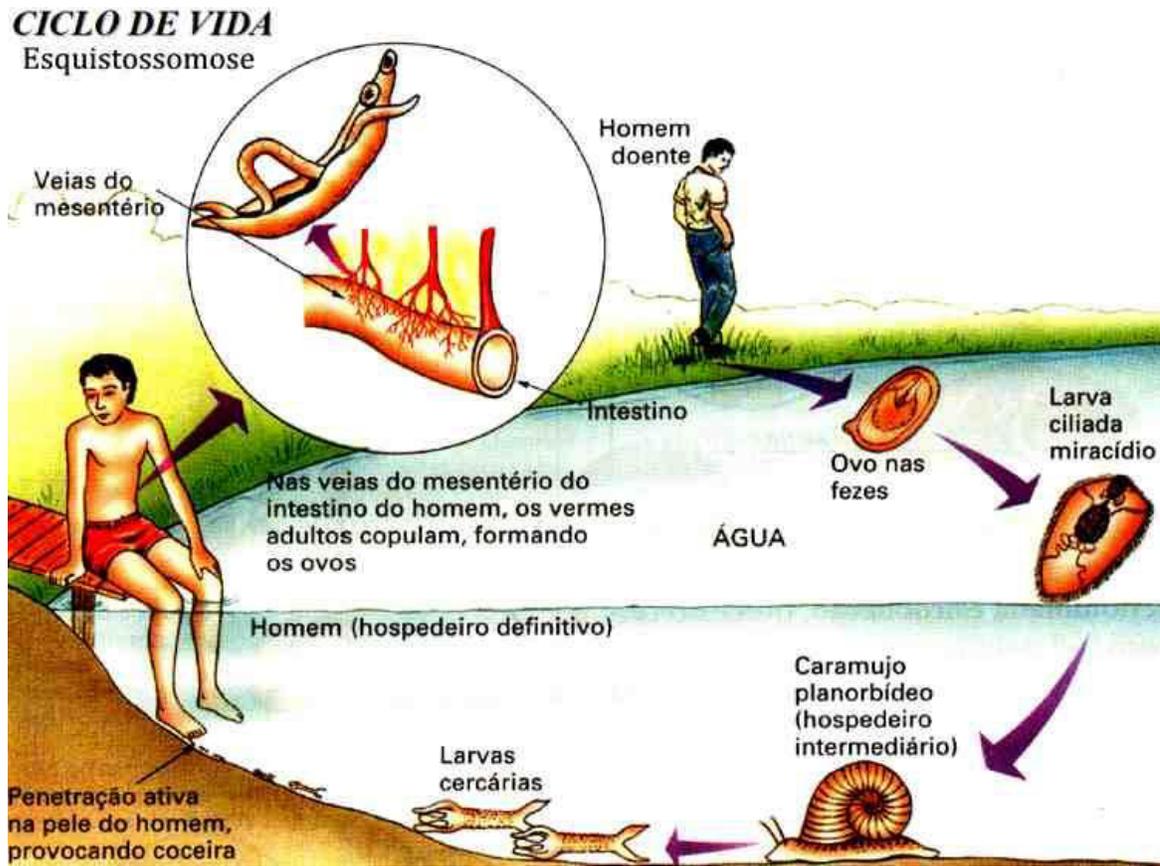
Os índices elevados da esquistossomose mansoniana correspondem, na maioria dos casos, à presença do molusco *B. glabrata*, principal hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni* (COUTO, 2005). Os métodos de controle são classificados em três tipos: biológico, físico e químico. O biológico baseia-se com a introdução de organismos com ação predadora, competidora, parasitária ou patogênica em relação aos moluscos hospedeiros. O físico consiste na implantação e manutenção de fatores capazes de impedir o desenvolvimento das populações desses animais. O método químico compreende na aplicação de produtos tóxicos (moluscidas) nos criadouros. Como as três modalidades implicam impacto ambiental em qualquer escala, suas implementações dependem de estudos prévios, obedecendo a legislação ambiental (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Segundo Santos et al. (2007), a esquistossomose se enquadra nas chamadas doenças negligenciáveis. Portanto, os estudos com plantas com propriedades moluscidas, que sejam de fácil acesso à população, representa uma forma de redução do risco de transmissão da esquistossomose, pois age diretamente no ciclo da doença e constitui-se uma alternativa de baixo custo (LEMMICH et al., 1995; LUNA et al., 2006).

#### **2.1.4.1 Ciclo evolutivo**

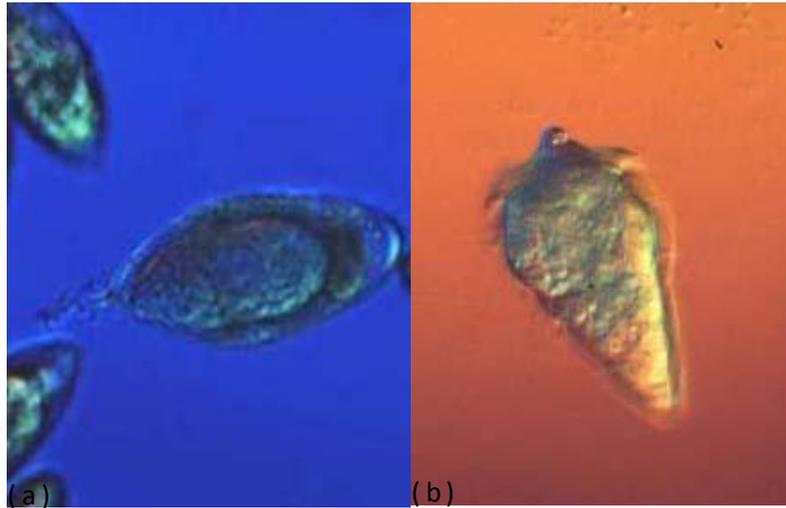
O ciclo evolutivo acontece de duas formas, uma no interior do caramujo e outra no interior do homem (Figura 8).

**Figura 8.** Ciclo evolutivo. Fonte: Filo Platelmintes, 2009



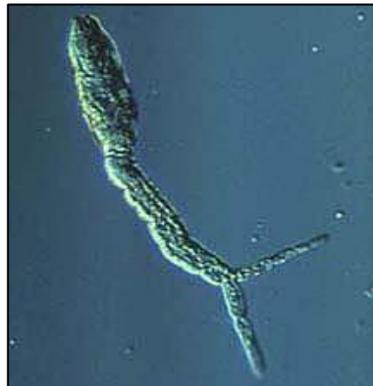
O homem, quando doente, elimina ovos do verme pelas fezes. Estes, em contato com a água, rompem-se e libertam o miracídio (Figura 9) que é a larva ciliada, que nada ativamente, penetrando no caramujo pelo tegumento.

**Figura 9.** (a) os ovos; (b) o miracídio. Fonte: Sinclair Stammers/OMS/TDR



Por reprodução assexuada, os miracídios transformam-se em esporocistos primários, que produzem internamente esporocistos secundários; estes desenvolvem cercárias de cauda bifurcada após 25 a 35 dias (Figura 10).

**Figura 10.** Cercária da *S.mansoni*. Fonte: Sinclair Stammers/OMS/TDR



As cercárias, por estímulo de luz e calor, deixam o caramujo e passam para a água, onde nadam à procura de contato com o hospedeiro vertebrado; neste penetram ativamente através da pele e perdem a cauda. Após a penetração no vertebrado, as cercárias dão origem a esquistossômulos, que podem ser destruídos na derme, ou ganhar a circulação geral, sendo arrastadas para o coração e pulmões, de onde migram ativamente até o fígado. Ao chegar no sistema porta intra-hepático, os

esquistossômulos desenvolvem-se até a fase adulta 28 a 48 dias após a penetração no órgão. Os vermes adultos machos e fêmeas acasalam-se e migram para as vênulas da parede intestinal, encaminhando-se contra a corrente sanguínea da veia aorta e das veias mesentéricas. As fêmeas eliminam até 300 ovos por dia. Em torno de 22% dos ovos chega à luz intestinal e saem com as fezes, e o restante fica retido nos tecidos do fígado e paredes do intestino, dando origem a granulomas. Os parasitos podem viver de 20 a 25 anos no organismo humano não tratado (CUNHA, 1970; SOUZA; LIMA, 1990; REY, 2001).

### 2.1.5 Atividade moluscicida

Para ser considerada moluscicida, a substância deve eliminar o caramujo em todas as fases do seu ciclo de vida e no seu habitat natural, possuir baixas concentrações, baixo custo, ser estável no armazenamento em condições tropicais; fácil de transportar e aplicar; ter ação letal seletiva a caramujos, ser inócuo para o homem, animais domésticos, peixes e plantas, não sofrer decomposição na água e no solo e ser estável em condições de temperatura e irradiação solar (WHO, 1965, 1983 e 2002).

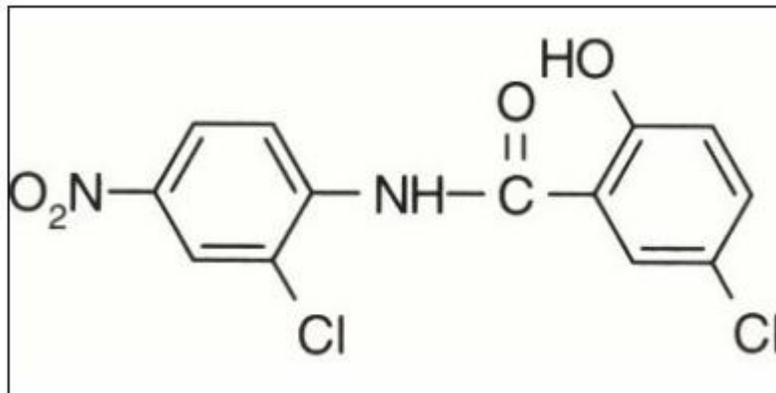
Lembrando que, o ciclo do *Schistosoma mansoni* pode ser interrompido com a utilização de plantas ricas em substancias moluscicidas que são eficazes no controle do caramujo (CARVALHO et al., 1998; RUG, RUPPEL, 2000). Estudos com extratos vegetais, visando a obtenção de moluscicidas têm sido realizados. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1965, 1983, 2002), um guia de avaliação de plantas com potencial moluscicida foi publicado, o qual define que um bom moluscicida deve apresentar efeito tóxico em moluscos adultos em concentração menor ou igual a 20 mg.L<sup>-1</sup> do extrato solúvel e menor ou igual a 100 mg.L<sup>-1</sup> do extrato bruto, além de ser atóxico para os demais organismos do meio.

A Organização Mundial de Saúde (WHO, 1983) recomenda que, após a identificação de uma espécie com potencial moluscicida, sejam realizados estudos do perfil químico do vegetal, seguido da identificação da estrutura química responsável pela ação moluscicida, ensaios em campo, de estabilidade do composto e de toxicidade. Não existe uma ordem determinada para esses estudos. No passado,

diversos produtos foram testados e utilizados em campo, porém somente a niclosamida é aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (CAS n.º 50-65-7) como agente moluscicida e permanece disponível comercialmente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1995).

A niclosamida (Figura 11), substância comercialmente conhecida como Bayluscide, com nomenclatura (IUPAC) de 2',5'dicloro-4'-nitrosalicilanilida, fórmula molecular  $C_{13}H_8Cl_2N_2O_4$ . No Brasil, seu uso é exclusivo em Campanhas de Saúde Pública, no controle da esquistossomose, no combate aos caramujos vetores, fazendo com que aumente a procura por substâncias de origem vegetal, facilmente biodegradáveis e com baixa toxicidade (NEVES, 2004).

**Figura 11.** Fórmula estrutural da niclosamida. Fonte: Anvisa, 2017



Os caramujos são considerados mortos quando a sua massa cefalopodal estiver retraída para o interior da concha, liberar a hemolinfa ou então estiver inchada e estendendo o cefalópode para fora da concha (MCCULLOUGH et al., 1980).

Segundo Chifundera et al. (1993), as substâncias como terpenóides, esteróides e saponinas, oriundas do metabolismo secundário dos vegetais, são potenciais agentes moluscicidas. Ao testar as saponinas extraídas de *Agave decipiens*, Abdel-Gawad, (1999), obteve 90% de mortalidade de *Biomphalaria alexandrina* (espécie transmissora da esquistossomose no Egito).

Algumas espécies como *Piper marginatum* produzem substâncias de composição química e ação conhecidas, que agem como moluscicida e cercaricida, e tem atividades antiespasmódicas com ação seletiva em receptores muscarínicos e histaminérgicos da musculatura lisa ileal, enquanto *Piper nigrum* produz compostos com ampla utilização como estimulante indutor da secreção de bile, combate à cólera, flatulência, diarreia e artrite (MAIA, 2002).

## **2.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.2.1 Material**

Esta pesquisa envolveu a utilização de equipamentos usuais em um tratamento analítico de plantas aromáticas e em testes de atividade moluscicida e toxicidade.

- a) Moinho elétrico
- b) Extrator de Clevenger
- c) Coletor dos moluscos
- d) Reservatório dos moluscos
- e) Expositor dos moluscos a luz
- f) Estereoscópio de análise
- g) Refratômetro
- h) Balança digital

- i) Picnômetro
- j) Espectrofotômetro de infravermelho
- k) Cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas

### **2.2.2 Métodos**

Os métodos utilizados nos experimentos deste trabalho são descritos a seguir:

#### **2.2.2.1 Coleta das amostras**

##### **2.2.2.1.1 Frutos da planta: *Citrus limon* Linneo**

Os frutos do limão foram obtidos em supermercado da rede varejista do município de São Luís – MA. Os frutos foram identificados como *Citrus limon* Linneo, registrado no Herbário – Ático Seabra da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) sob o número 100379, levados ao Laboratório de Óleos Essenciais do Pavilhão Tecnológico da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) para retirar as cascas dos frutos, cortá-las e realizar a extração do óleo essencial.

##### **2.2.2.1.2. Moluscos: *Biomphalaria glabrata***

Os moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata* foram coletados no mês de fevereiro do ano de 2017 no bairro Sá Viana, região da periferia do município de São Luís. No local haviam muitas áreas alagadas como podem ser observadas na Figura 12.

**Figura 12.** Imagens da coleta, dos moluscos *Biomphalaria glabrata*, realizada em fev/2017 no bairro do Sá Viana, São Luís – MA. Fonte: dados da pesquisa



Essas áreas são consideradas apropriadas ao desenvolvimento desses seres por disponibilizarem de água limpa parada, exposição a luz solar e proliferação de vegetação aquática. Esses fatores favoráveis fizeram com que a coleta tenha sido realizada com sucesso, obtendo-se um total de 334 organismos vivos. A coleta foi realizada em equipe, no tempo máximo de 30 minutos, como pode ser visualizada na Figura 13.

**Figuras 13.** Organismos coletados (*Biomphalaria glabrata*) e armazenados no NIBA - Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada, UFMA, em fev/2017. Fonte: dados da pesquisa



#### 2.2.2.2 Extração do óleo essencial das cascas dos limões

O óleo essencial foi extraído pelo processo de hidrodestilação, no qual o sistema era constituído por um Clevenger de vidro acoplado a um balão de fundo redondo de 6000 mL, com uma manta aquecedora controlando-se a temperatura a 100°C. E para que a condensação do óleo evaporado ocorresse de maneira controlada e mais eficaz, o sistema todo estava conectado ao banho ultratermostático que mantia a temperatura da água que circundava o condensador para que não ultrapassasse os 13° C. Para a extração, foram utilizados 386 g da amostra de casca com 6000 mL de

água destilada. O óleo extraído foi secado por meio da percolação com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , armazenado em um coletor de vidro envolto em papel alumínio sob refrigeração, a fim de evitar perdas de constituintes voláteis.

### **2.2.2.3. Rendimento de extração do óleo essencial da casca dos limões**

O cálculo do rendimento da extração foi expresso em percentagem, na relação massa/massa pela medida da densidade, observando o volume máximo obtido de cada óleo por massa (g) dos vegetais em estudo, conforme fórmula abaixo (FARMACOPEIA BRASILEIRA IV, 1996). Tal relação foi descrita a seguir:

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

Onde:

V = volume total do óleo extraído (ml)

d = densidade do óleo (g/ml)

m = massa do vegetal (g)

### **2.2.3 Caracterização físico-química do óleo essencial**

As propriedades físico-químicas determinadas do óleo essencial foram: densidade, solubilidade em etanol (90% v/v), índice de refração, cor e aparência.

#### **2.2.3.1 Densidade**

Determinou-se a densidade do óleo essencial utilizando um picnômetro de 1,0 mL, previamente seco, tarado e aferido, onde foi adicionada a amostras à 25 °C, pesando-as em seguida (IAL, 1985).

### 2.2.3.2 Solubilidade em etanol (90%)

Para se determinar a solubilidade, foi colocado um volume constante do óleo e foram adicionados volumes proporcionais da solução alcoólica previamente preparada a 90% (v/v) até solubilização total.

### 2.2.3.3 Índice de refração

A determinação do índice de refração foi realizada com auxílio de uma pipeta de Pasteur de vidro para adicionar as amostras do óleo diretamente sobre o prisma do refratômetro, a uma temperatura de 26.8 °C, fazendo-se, então, as leituras.

### 2.2.3.4 Cor e Aparência

A técnica utilizada foi visual, onde, sob um fundo branco, se comparou a cor do óleo com cores conhecidas e para a aparência se fez uma inspeção do óleo no que diz respeito a sua transparência ou limpidez.

## 2.2.4 Análise espectrométrica vibracional na região do infravermelho

O espectro na região do infravermelho foi obtido no equipamento modelo IR PRESTIGE-21, operando com resolução de 8.0 cm<sup>-1</sup> e o intervalo analisado foi de 400 a 4000 cm<sup>-1</sup>. A partir de uma mistura de uma alíquota de brometo de potássio (KBr) anidro com uma gota do óleo essencial, a pastilha foi preparada para análise. Essa mistura, então, foi triturada e prensada à alta pressão, para garantir a passagem da luz.

## 2.2.5 Análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

Os constituintes do óleo essencial foram identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) na **Central Analítica da Universidade de São Paulo (USP)**. Foi dissolvido 1,0 mg da amostra em 1000 µL de diclorometano (pureza 99,9%). As condições de análise foram as seguintes: Método :

Adams.M; Volume injetado: 0,3  $\mu\text{L}$ ; Coluna : Capilar HP-5MS (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano ) (Equivalente DB-5MS ou CP-Sil 8CB LB/MS), nas dimensões (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ); Gás de arraste : He (99,9995); 1,0 mL/min; Injetor : 280 oC, modo Split (1:10); Forno : 40 °C (5,0 min.) até 240 °C numa taxa de 4 °C .min<sup>-1</sup>, de 240 °C até 300 °C (7,5 min) numa taxa de 8 °C.min<sup>-1</sup> ); tT = 60,0 min; □ Detector : EM1; EI (70 eV) Modo varredura (0,5 seg/scan), Faixa de massas: 40 – 500 daltons (uma) Linha transferência: 280 °C. Filamento: desligado 0,0 a 4,0 min - Espectrômetro de massas tipo quadrupolo linear.

Para a identificação dos compostos na amostra utilizou-se o programa AMDIS (Automated Mass spectral Deconvolution Mass & Identification System).

### **2.2.6 Amostragem dos moluscos *Biomphalaria glabrata***

As amostras dos moluscos *Biomphalaria glabrata* foram capturados no mês chuvoso de fevereiro do ano de 2017, nas áreas com baixo saneamento no bairro Sá Viana, São Luís - Ma, com utilização de EPI's - equipamento de proteção individual, como por exemplo: botas, luvas, óculos, etc. A técnica de coleta foi realizada de acordo com a proposta de Brasil (2007), efetuando uma varredura com uma concha nas áreas submersas e os caramujos capturados foram recolhidos em um recipiente de vidro com tampa, com água do próprio criadouro.

A busca dos mesmos foi realizada em diversos pontos do criadouro, a fim de obter uma boa amostragem e depois levados para o NIBA (Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada) da UFMA, para posteriores análises.

#### **2.2.6.1. Análise do teste de positividade dos moluscos**

Os moluscos foram mantidos em laboratório por 30 dias sendo analisados a cada 07 dias, para confirmação da ausência de infecção por *Schistosoma mansoni*. Para isso, foram colocados 05 caramujos em recipientes de vidro transparente com 25 mL de água desclorada, ou seja, 5 mL/caramujo, exposto à luz (lâmpadas de 60 W) por uma hora com uma distância de 30 cm para estimular a liberação das cercárias (SMITHERS; TERRY, (1965) apud SOUZA, (1992)) e levados para serem analisados,

através de visualização com auxílio de uma lupa estereoscópica (8x). Aqueles que estivessem parasitados (positivos) seriam etiquetados e separados para futura análise individual e os que não apresentassem sinais de infecção pelo trematódeo no período de 30 dias seriam selecionados para o teste de atividade moluscicida.

#### **2.2.6.2. Teste para atividade moluscicida do óleo essencial das cascas dos limões**

Para a avaliação da atividade moluscicida foi utilizada a técnica recomendada pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1983), onde dois testes foram efetuados em triplicata.

No primeiro, denominado de teste piloto, preparou-se uma solução do óleo em estudo num volume de 500 mL na concentração de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  com adição de 0,15 mL de Tween 80 (tensoativo), onde foram colocados 10 moluscos adultos, negativos para *Schistosoma mansoni*, obtendo-se no final uma proporção de 50 mL/molusco e alimentando-os com alface hidropônica (MALEK, 1995). Os mesmos ficaram expostos na solução por 24 h, sob temperatura ambiente. Após isso, eles foram removidos da solução, lavados por duas vezes com água desclorada, colocados em um recipiente de vidro contendo 500 mL de água desclorada, alimentados com alface hidropônica e observados a cada 24 h, por 4 dias para avaliar o índice de mortalidade.

No segundo teste, denominado de concentração letal ( $CL_{50}$ ), utilizou-se a mesma metodologia do teste piloto. Foram preparadas soluções de cada óleo num volume de 500 mL nas concentrações de 10, 25, 50 e  $75 \text{ mg.L}^{-1}$  com adição de 0,15 mL de Tween 80 (tensoativo). Para o controle negativo, foram necessários dois testes também. No primeiro, colocou-se 500 mL de água desclorada e 10 moluscos foram inseridos em um recipiente de vidro. Por outro lado, no segundo, 10 moluscos foram imersos em uma solução com 0,15 mL de Tween 80 em 500 mL de água destilada. Ambos grupos de moluscos, desse segundo teste, foram alimentados com alface hidropônica e a análise foi realizada igualmente como nos testes anteriores.

### 2.2.7 Análise estatística da concentração letal (CL<sub>50</sub>)

A análise estatística dos dados foi realizada de acordo com o método de REED-MUENCH (1938), o qual parte do princípio de que um animal que sobreviva a certa dose, também irá sobreviver em qualquer outra dose menor que aquela, conseqüentemente o animal que morrer com certa dose, também irá morrer em doses maiores que aquela. A partir de uma tabela contendo os dados de mortalidade para cada concentração testada, é construído um gráfico onde se observa uma curva para o acúmulo de animais mortos em cada concentração e outra curva para o acúmulo de sobreviventes.

O ponto de intercessão entre as curvas é a Concentração Letal 50% (CL<sub>50</sub>), pois nesse ponto o número de animais sobreviventes é igual ao número de animais mortos (COLEGATE; MOLYNEUX, 1993). O intervalo de confiança foi calculado segundo o método de PIZZI (1950) no qual se constrói um gráfico do percentual de mortos versus logaritmo (log) da dose. A seguir determina-se o valor de - R., que é a diferença entre o log da dose que mata 75% das larvas e o log da dose que mata 25% das larvas. Calcula-se também a variável - h. que consiste na média das diferenças dos valores de log das doses. Com esses dados determina-se o log do erro padrão (SE), através da seguinte fórmula:

$$(SE)^2 = 0,79. h. [R/20]$$

Os valores: 0,79 (encontrado no dividendo) e 20 (situado no divisor) do quociente da radiação acima se referem aos fatores de conversão necessários para calcular o erro padrão estabelecido nas amostras. Finalmente, o valor do intervalo de confiança é igual a  $2 \times 10^{SE}$ .

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 2.3.1 Avaliação dos parâmetros físico-químicos dos óleos essenciais

Os parâmetros físico-químicos dos óleos essenciais são importantes não apenas para determinação da qualidade, como também para o controle da sua pureza. Os resultados são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Parâmetros físico-químicos do óleo essencial estudado

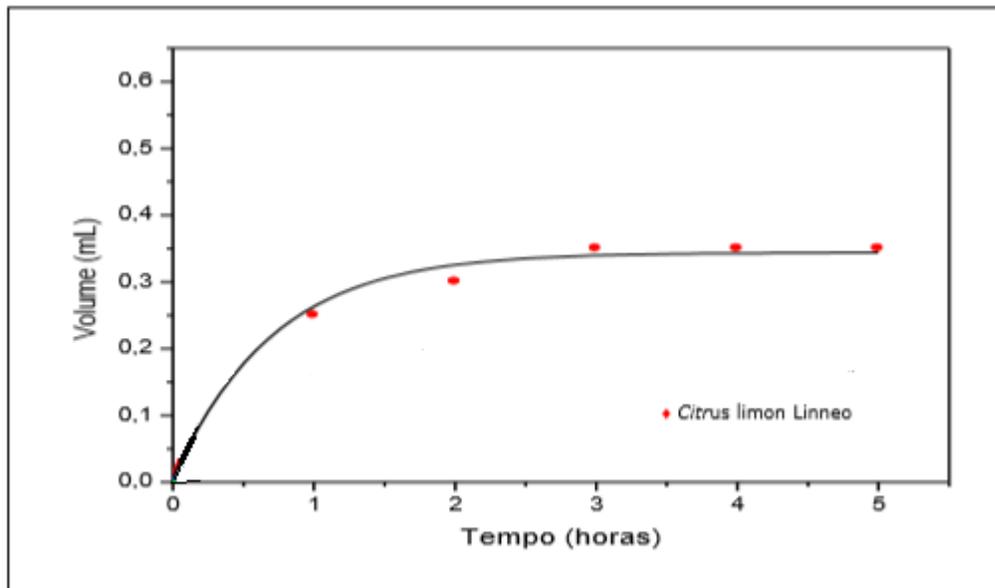
Parâmetros físico-químicos	Resultados (limão)
Densidade (g/ml)	0,8501
Índice de refração ( $N_D$ 26,8 C <sup>o</sup> )	1,455
Solubilidade em álcool a 90% (v/v)	1:3
Cor	Incolor
Aparência	Límpido
Rendimento	0,46

Segundo Kesterson et al. (1971), pesquisando os componentes do óleo extraído do *Citrus limon* Linneo encontrou como índice de refração, mínimo de 1,4738 e máximo de 1,4745, para Liberti et al. (1973) a densidade a 20 °C foi de 0,875 e o índice de refração mínimo de 1,4720 e máximo de 1,4753, para Di Giacomo et al. (1994), a densidade a 15 °C foi de 0,8572 e 0,8590 e para o índice de refração a 15 °C o mínimo foi de 1,4734 e o máximo de 1,4765 e Oliveira et al. (2010), a densidade 0,85 g.mL<sup>-1</sup>, solubilidade em álcool 90 % na proporção 1:6 (v/v), índice de refração 1,46 e rendimento 2,5 %. Comparando os valores para os óleos essenciais estudados com os da literatura, pode-se observar que houve uma similaridade entre eles, no que diz respeito aos parâmetros analisados. As pequenas diferenças nos valores encontrados podem ser atribuídas a fatores tais como época de coleta, diferentes tipos de solo, condições e tempo de armazenamento.

### 2.3.2. Avaliação da cinética de extração e rendimento dos óleos essenciais

A extração do óleo essencial foi realizada num tempo de 3 horas, para uma massa de 30 g de amostra até um volume de 300 mL de água destilada, a uma temperatura de 100 °C (Figura 14). O estudo revelou que a partir de uma razão de água dez vezes maior que a massa da amostra utilizada já se chegava à sua extração máxima, o qual influenciava consideravelmente no rendimento da extração e aspectos visuais do óleo. Quando era utilizada uma quantidade de água inferior à mínima requerida, havia o risco de queima da amostra e o baixo rendimento da extração. Por outro lado, a extração quando era realizada com uma quantidade exagerada de água, além do aumento do tempo de extração, ocorria ainda formação de hidrolato em grande quantidade.

**Figura 14.** Cinética referente ao rendimento de extração dos óleos em função do tempo, com massa de 30g e temperatura de 100°C. Fonte: Dados da pesquisa



Os rendimentos m/m foram calculados mediante a quantidade de óleo extraído, da massa e da densidade, para o *Citrus limon* Linneo de 0,46 %. O valor do rendimento do óleo essencial estudado apresenta-se próximo ao da literatura. Conforme Özcan e Chalchat (2002), a variação sazonal e a localidade são fatores

importantes para diferentes variedades de plantas com relação aos rendimentos de extração encontrados na literatura.

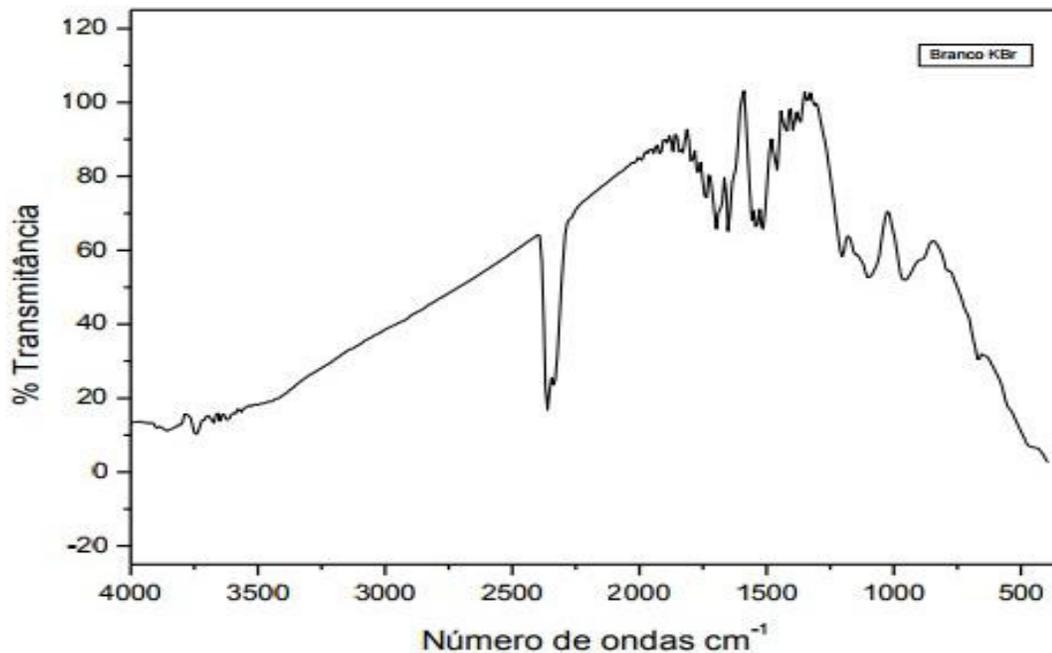
### 2.3.3 Análise espectroscópica vibracional na região do infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho é uma importante técnica de caracterização de compostos orgânicos, pois é capaz de reconhecer as mudanças estruturais em diferentes compostos. Esta se baseia no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibrações específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula.

#### 2.3.3.1 Branco com Brometo de potássio (KBr)

Para o branco foi utilizado o sal anidro altamente purificado de KBr por não absorver radiação infravermelha, com isso as únicas linhas espectrais a aparecer virão do analito. O espectro do branco com KBr pode ser observado na Figura 15.

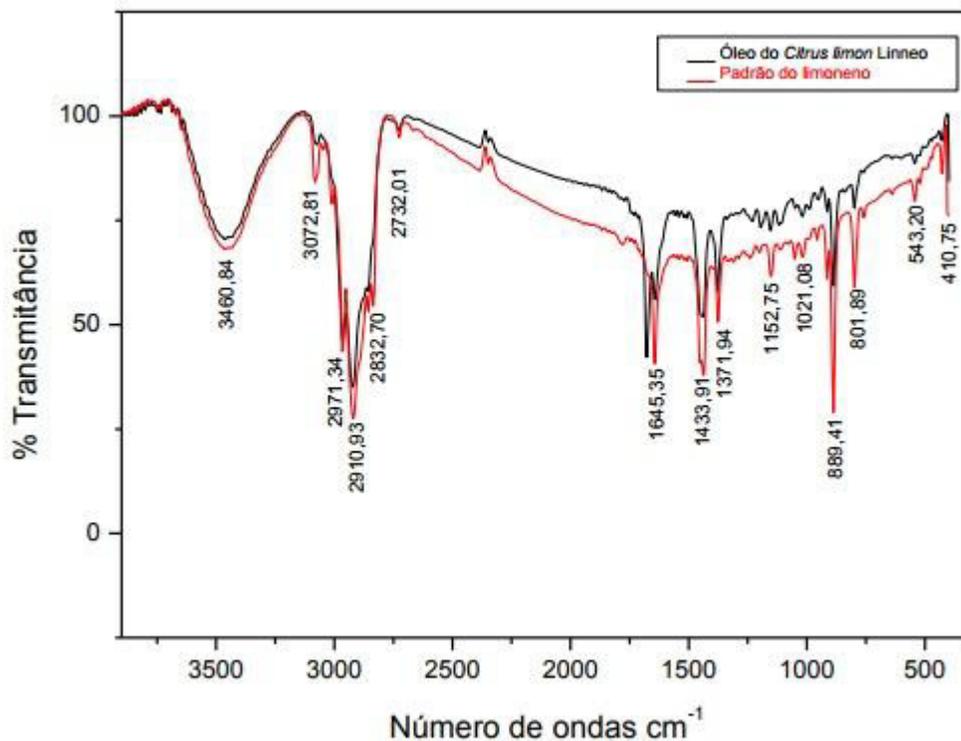
**Figura 15.** Espectro do branco KBr. Fonte: Dados da pesquisa



### 2.3.3.2 *Citrus limon* Linneo

Os espectros do padrão do limoneno e do óleo essencial da casca de *Citrus limon* Linneo na região do infravermelho podem ser observados na Figura 16, onde a semelhança das bandas de absorção nas mesmas frequências indica a presença de limoneno, como sendo o composto majoritário do óleo essencial.

**Figura 16.** Espectros na região do infravermelho do padrão do limoneno e óleo essencial do *Citrus limon* Linneo. Fonte: Dados da pesquisa



As bandas de absorção compreendida nas regiões de 2832 a 3460 cm<sup>-1</sup> na Figura 16 são atribuídas a estiramentos C—H fracas resultantes de vibrações de alquenos e as vibrações de deformação axial da ligação C=C acopla-se com a vibração de deformação axial das ligações C—C adjacentes, nas regiões 801 a 1645 cm<sup>-1</sup> (SILVERSTEIN et al., 2007).

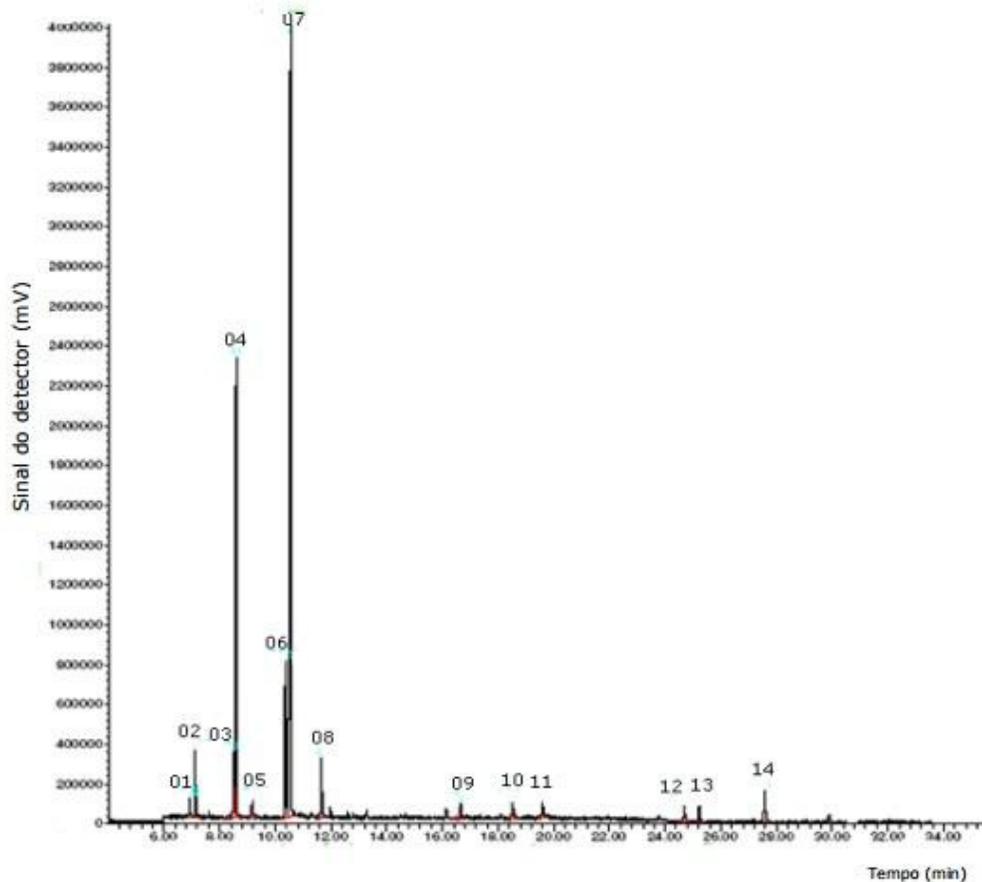
### 2.3.4 Avaliação das características químicas dos óleos essenciais obtidas por cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas (CG-EM)

Os cromatogramas dos óleos essenciais obtidos mostraram os componentes majoritários e minoritários.

#### 2.3.4.1 Óleo essencial do *Citrus limon* Linneo

O cromatograma do óleo essencial extraídos das cascas de *Citrus limon* Linneo pode ser observado na Figura 17.

**Figura 17.** Cromatograma da amostra do óleo das cascas do *Citrus limon* Linneo, apresentando os picos selecionados e identificados através da comparação dos respectivos espectros de massas com a espectroteca NIST21. Fonte: Dados da pesquisa



Na Tabela 2, podemos observar os constituintes identificados no óleo essencial do *Citrus limon* Linneo em ordem de tempo de retenção, observa-se 14 componentes na amostra, sendo o constituinte majoritário o limoneno com 48,996%.

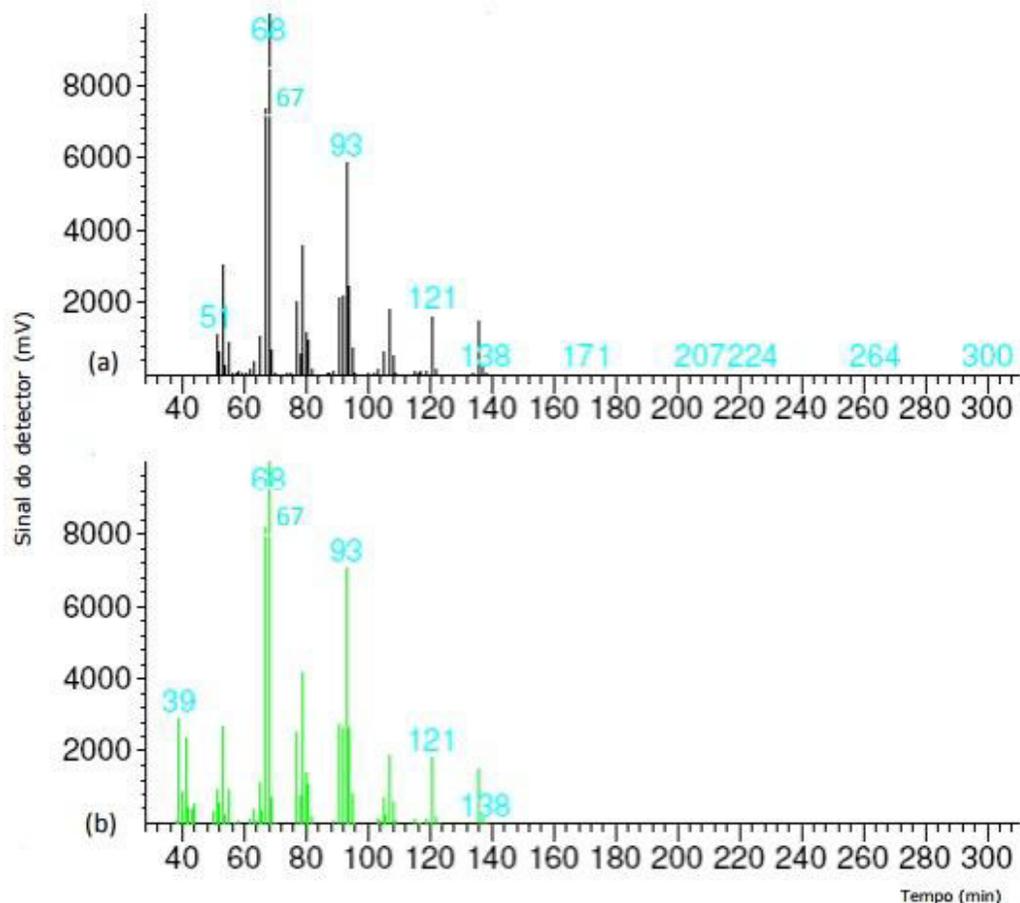
**Tabela 2.** Compostos identificados na amostra do óleo essencial extraído das cascas de *Citruslimon*Linneo

Pico <sup>1</sup>	<sup>2</sup> tr (min.)	Componentes	Teor(%)
1	6,923	Tujeno	0,880
2	7,126	$\alpha$ -Pinoeno	3,041
3	8,504	Sabineno	3,255
4	8,592	$\beta$ -Pinoeno	23,296
5	9,179	Mirceno	1,039
6	10,368	Etil Dimetil Benzeno	8,596
7	10,544	Limoneno	48,996
8	11,658	Terpineno	3,020
9	16,650	Terpineol	1,046
10	18,521	$\beta$ -Citral (Neral)	1,393
11	19,595	$\alpha$ -Citral (Geranial)	1,152
12	24,688	Nerolidol	1,207
13	25,236	Bergamoteno	1,024
14	27,586	Bisaboleno	2,056

**Nota:** <sup>1</sup>Número do pico pela ordem de eluição da coluna; <sup>2</sup>tr: Tempo de retenção dos composto.

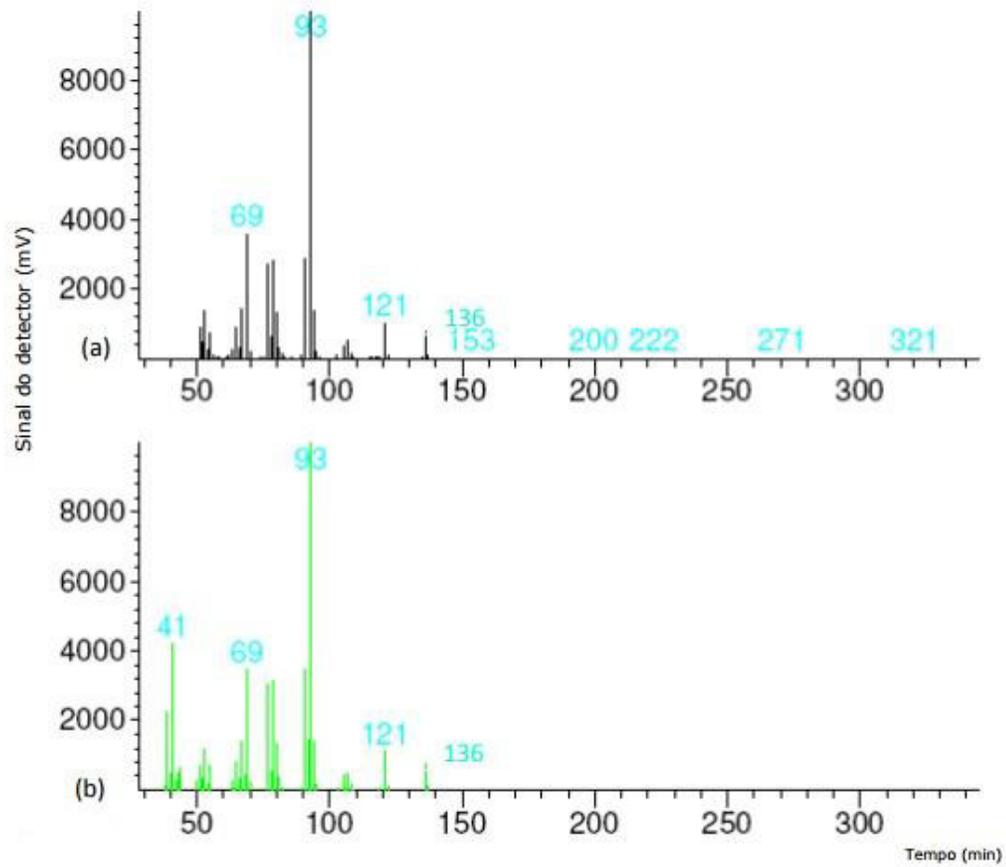
Na Figura 18 o espectro de massas corresponde ao constituinte majoritário identificado como limoneno no óleo essencial do *Citrus limon* Linneo e os possíveis fragmentos conforme o banco de dados da espectroteca e espectro de massa padrão constante na literatura (ADAMS, 2007). A fragmentação do limoneno já foi demonstrada na Figura 16.

**Figura 18.** Espectros de massas: (a) Composto da amostra do óleo extraído das cascas do *Citrus limon* Linneo referente ao pico 7 do cromatograma da Figura 16 (b) Proposta de identificação através da espectroteca NIST21 – TCC. Fonte: dados da pesquisa

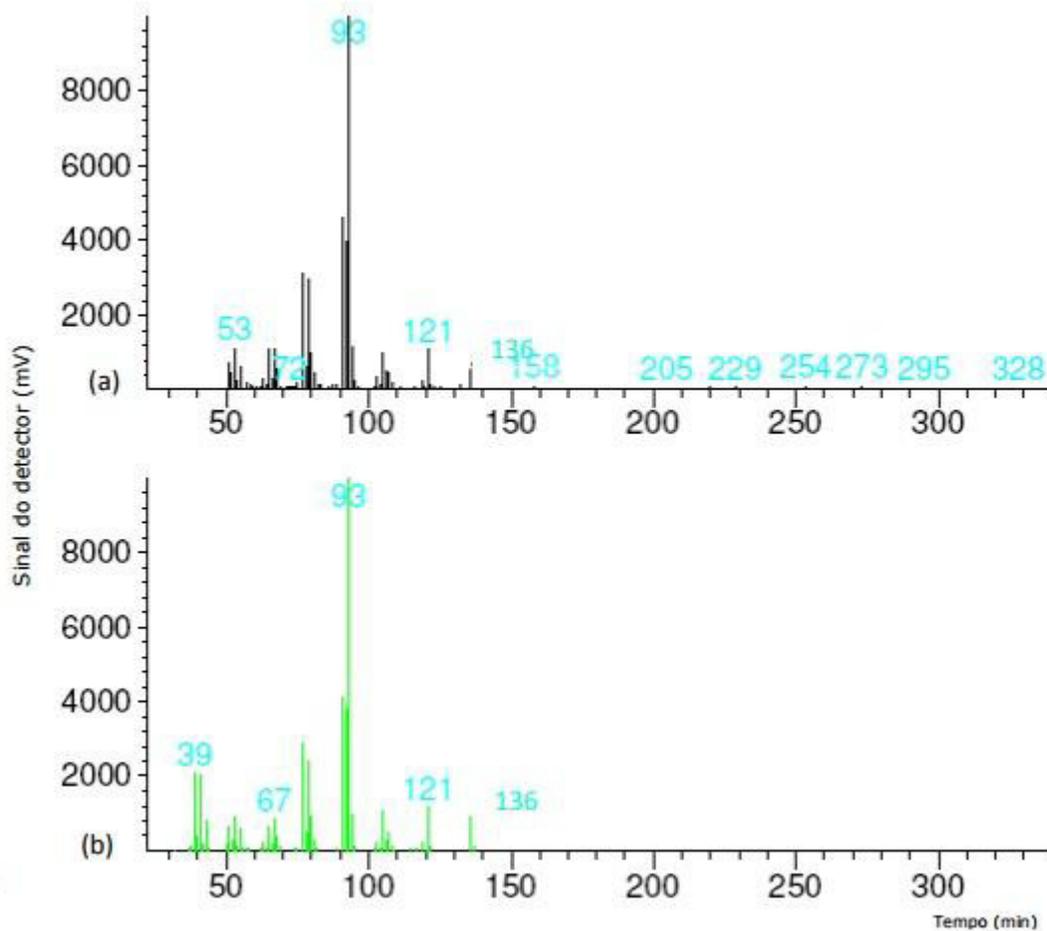


Nas Figuras 19 e 20 estão os espectros de massas corresponde ao constituinte identificado como  $\beta$  - Pineno e  $\alpha$  - Pineno respectivamente de fórmula  $C_{10}H_{16}$  e massa molecular correspondente a  $136 \text{ g.mol}^{-1}$  segundo a espectroteca e a literatura (FEITOSA et al., 2009; ADAMS, 2007).

**Figura 19.** Espectros de massas: (a) Composto da amostra do óleo extraído das cascas do *Citru limon* Linneo referente ao pico 4 do cromatograma da Figura 16 (b) Propostas de identificação através da espectroteca NIST21. Fonte: dados da pesquisa



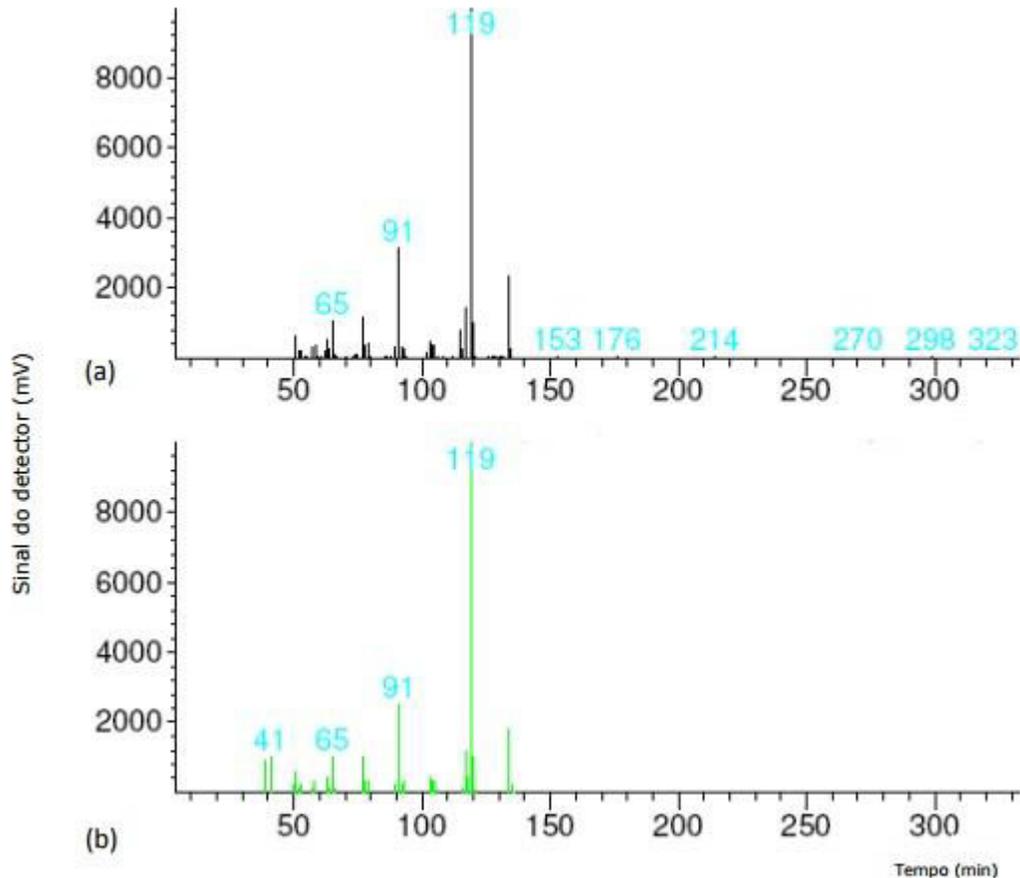
**Figura 20.** Espectros de massas: (a) Composto da amostra do óleo extraído das cascas do *Citrus limon* Linneo referente o pico 2 do cromatograma da Figura 16 (b) Propostas de identificação através da espectroteca NIST21 – TCC. Fonte: Dados da pesquisa



Esses hidrocarbonetos monoterpênicos apresentam o pico molecular  $m/z$  136 e o pico característico em  $m/z$  121, referente à perda do grupo metil. O espectro de massa apresenta ainda o pico em  $m/z$  93, o qual pode ser originado da subsequente perda do grupo  $(-CH_2)_2$  (SILVERSTEIN et al., 2007).

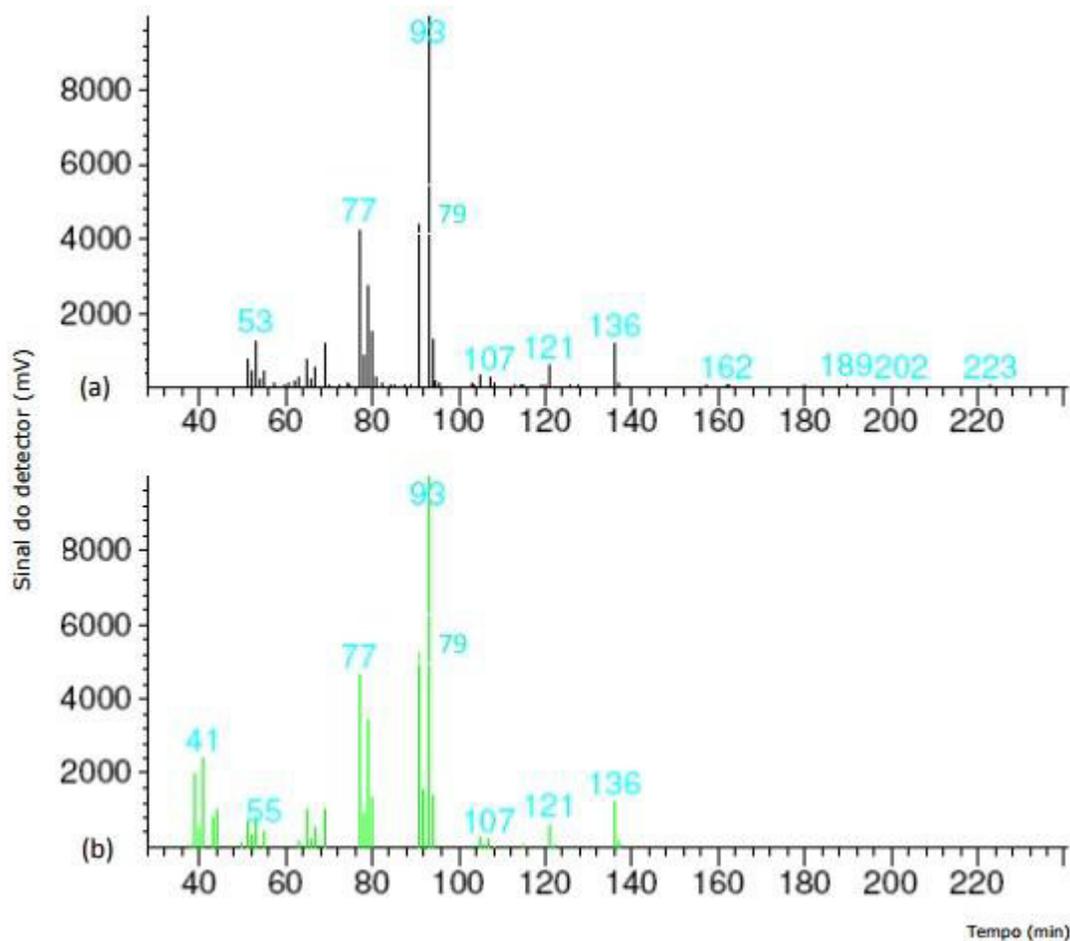
O espectro de massas do composto referente ao pico 6 do cromatograma da Figura 16, identificado como etildimetil benzeno pode ser visto na Figura 21.

**Figura 21.** Espectros de massas: (a) Composto da amostra do óleo extraído das cascas do *Citrus limon* Linneo referente o pico 6 do cromatograma da Figura 16 (b) Proposta de identificação através da espectroteca NIST21 – TCC. Fonte: dados da pesquisa



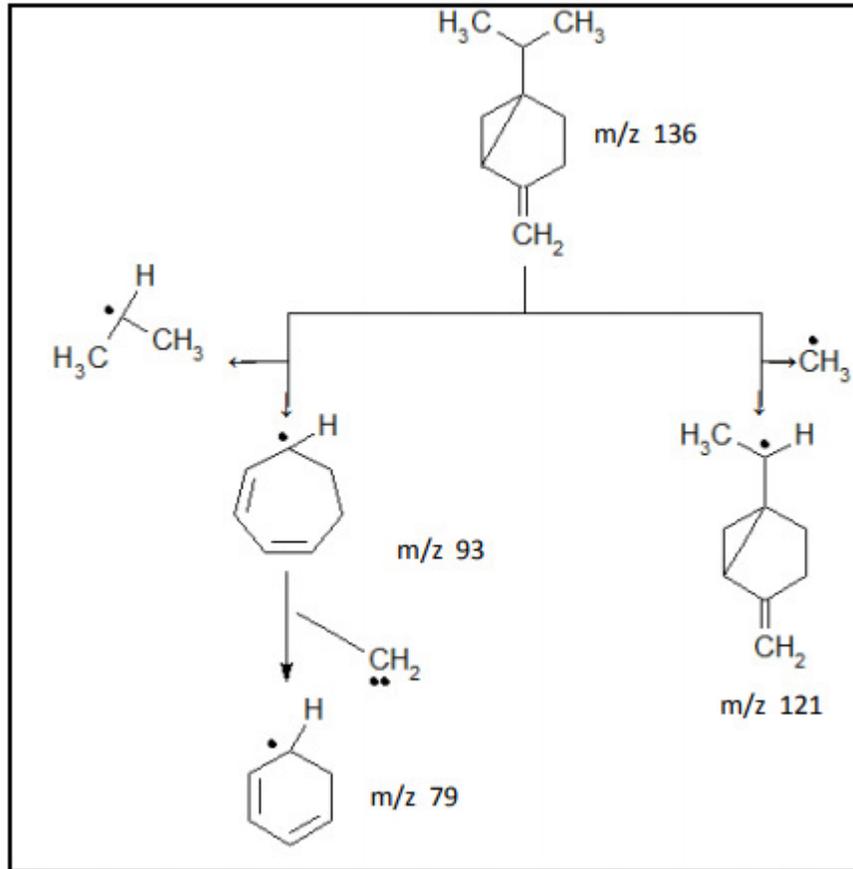
De acordo com a fragmentação do composto etildimetil benzeno de  $m/z$  134, apresenta o pico característico em  $m/z$  119 referente à perda do grupo metil; enquanto o pico em  $m/z$  91 indica a formação de um anel de benzeno com cadeia lateral alquila. O íon de massa 91 na maioria dos casos tem sido proposto como o cátion tropílio e não o cátion benzila. Observa-se ainda um pico  $m/z$  65 resultante da eliminação de uma molécula neutra de acetileno do íon tropílio (SILVERSTEIN et al., 2007). Na Figura 22 o espectro de massas corresponde ao constituinte identificado como sabineno e os possíveis fragmentos.

**Figura 22.** Espectros de massas: (a) Composto da amostra do óleo extraído das cascas do *Citrus limon* Linneo referente o pico 3 do cromatograma da Figura 16 (b) Proposta de identificação através da espectroteca NIST21. Fonte: Dados da pesquisa



A fragmentação do sabineno pode ser observada na Figura 23, onde apresenta o pico molecular  $m/z$  136, mostrando ainda o pico  $m/z$  121 referente a perda do grupo metila, enquanto o pico  $m/z$  93, cuja estrutura  $C_7H_9^+$ , pode ser em decorrência da isomerização seguida de clivagem alílica e o pico  $m/z$  79 originados subsequente pela perda do grupo metileno.

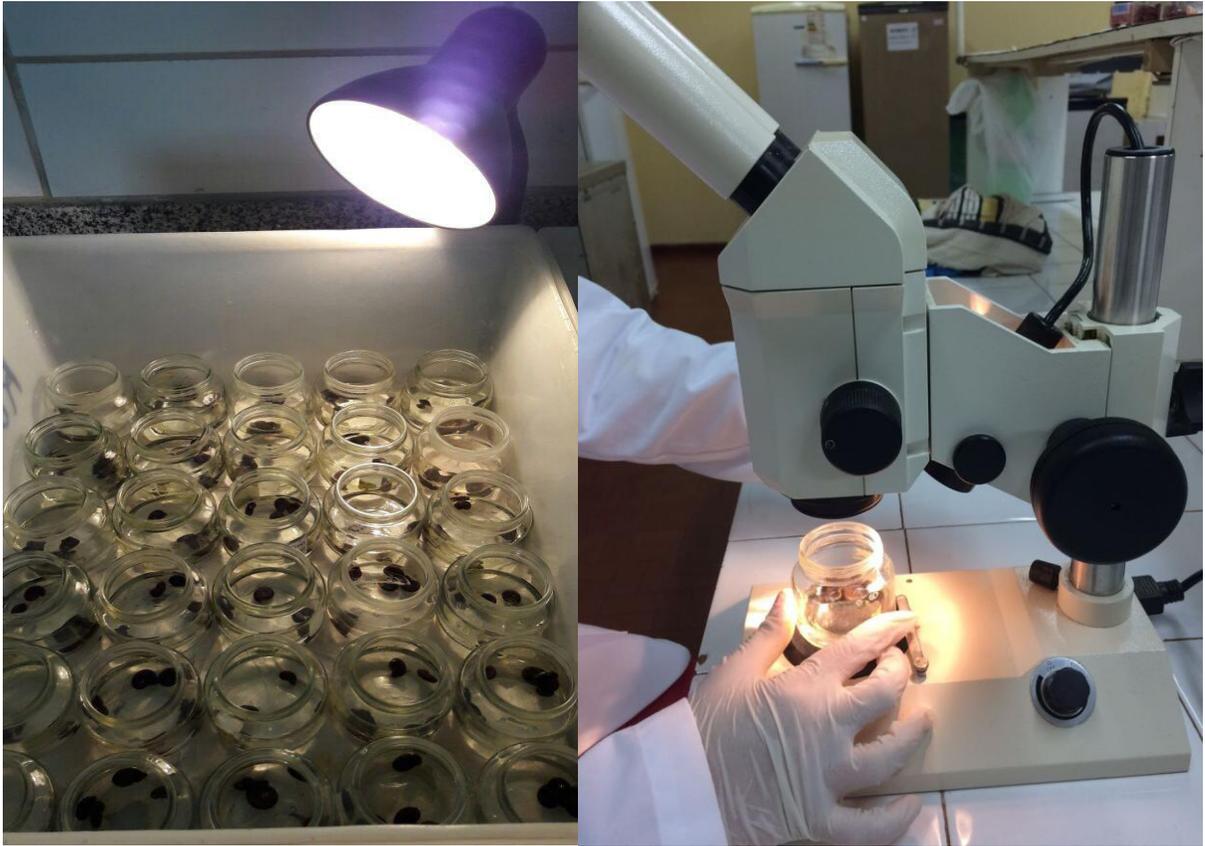
**Figura 23.** Fragmentação do sabineno. Fonte: MATA ( 2003)



### 2.3.5 Captura e teste da positividade dos caramujos

Os moluscos foram coletados no mês de fevereiro do ano de 2017 (período chuvoso na região) por conter maior proliferação pois os terrenos ficam alagados, principalmente, pela falta de saneamento, colaborando para que esses animais encontrem e permaneçam num ambiente propício. Foram realizados 4 testes de positividade, um em cada semana em que os bichos permaneceram no Niba, e não foram detectados vestígios de contaminação pela cercaria *Artemia salina*. Dessa forma, comprovou-se que nesse período não havia risco de contágio e disseminação da esquistossomose naquele local de coleta (bairro Sá Viana, São Luís – MA). Tal procedimento pode ser observado na Figura 24.

**Figura 24.** Teste de positividade dos caramujos realizado no NIBA (UFMA). Fonte: dados da pesquisa



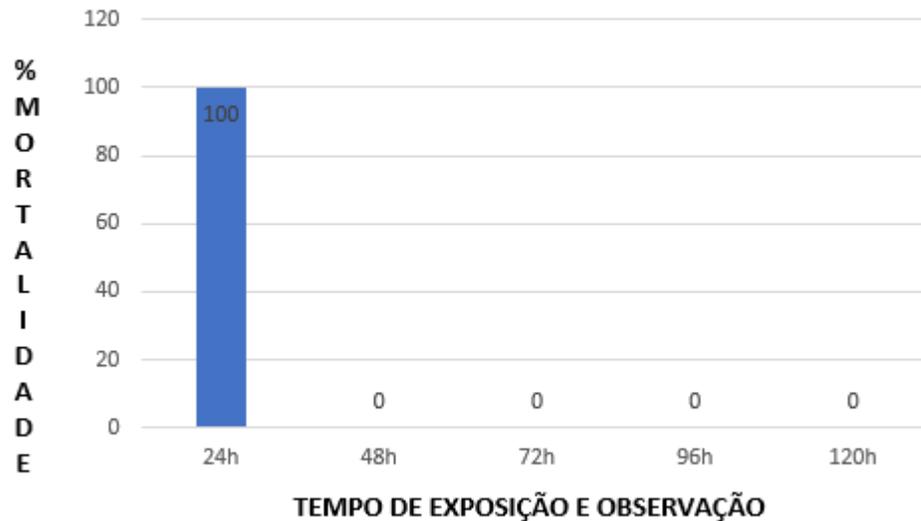
### **2.3.6 Avaliação da atividade moluscicida**

A metodologia da Organização Mundial de Saúde é a referência oficial para pesquisas de plantas e seus princípios ativos, com finalidade de averiguar seus potenciais quanto à atividade moluscicida (SILVA; SOUZA, 2002).

#### **2.3.6.1 Avaliação do teste piloto**

Neste estudo foi realizado um teste piloto com os óleos essenciais, na concentração de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$ . Os percentuais de mortalidade pelo tempo de exposição e observação de cada óleo podem ser observados no gráfico da Figura 25.

**Figura 25.** Percentual de mortalidade por tempo de exposição e observação para o teste piloto. Fonte: Dados da pesquisa



Embora os óleos essenciais extraídos das espécies de plantas em estudo já tenham muitas publicações em atividades biológicas, a sua atividade moluscicida, na literatura consultada, ainda há pouca avaliação. Esta é a primeira vez que esse óleo juntamente com seu padrão são submetidos a ensaios de atividade moluscicida contra caramujos adultos do gênero *Biomphalaria glabrata*. Inicialmente, foram realizados os testes pilotos na concentração de 100 mg.L<sup>-1</sup> para verificar se existe ou não atividade moluscicida dos óleos. O estudo mostrou que o mais eficaz foi o óleo extraído das cascas de *Citrus limon* Linneo, visto que eliminou 100% dos caramujos exposto no período de 24 horas. Caracterizando que o óleo possuía componentes capazes de eliminar os caramujos adultos do gênero *Biomphalaria glabrata*.

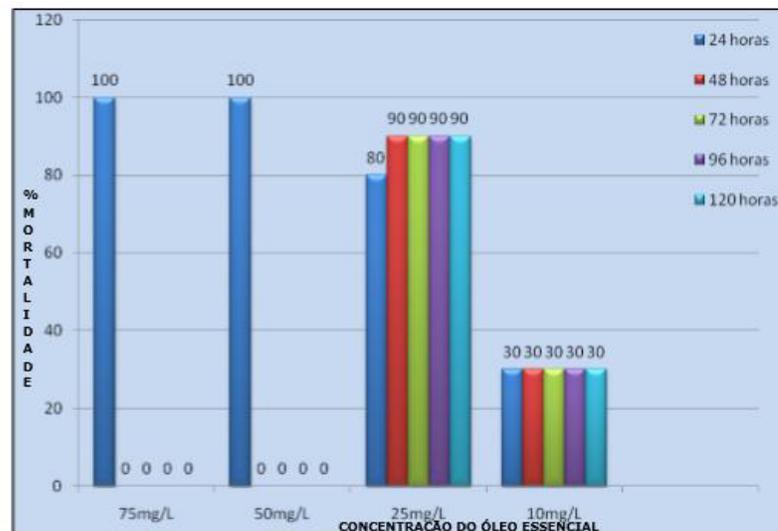
### 2.3.6.2 Avaliação da concentração letal

Para cada óleo essencial foram realizados testes nas concentrações de 75, 50, 25 e 10 mg.L<sup>-1</sup>, onde determinou-se a menor concentração letal.

### 2.3.6.2.1 *Citrus limon* Linneo

Para a avaliação da concentração letal do óleo essencial *Citrus limon* Linneo o gráfico da Figura 26 mostra os percentuais de mortalidade pela concentração.

**Figura 26.** Percentual de mortalidade pelas concentrações do óleo essencial *Citrus limon* Linneo. Fonte: dados da pesquisa



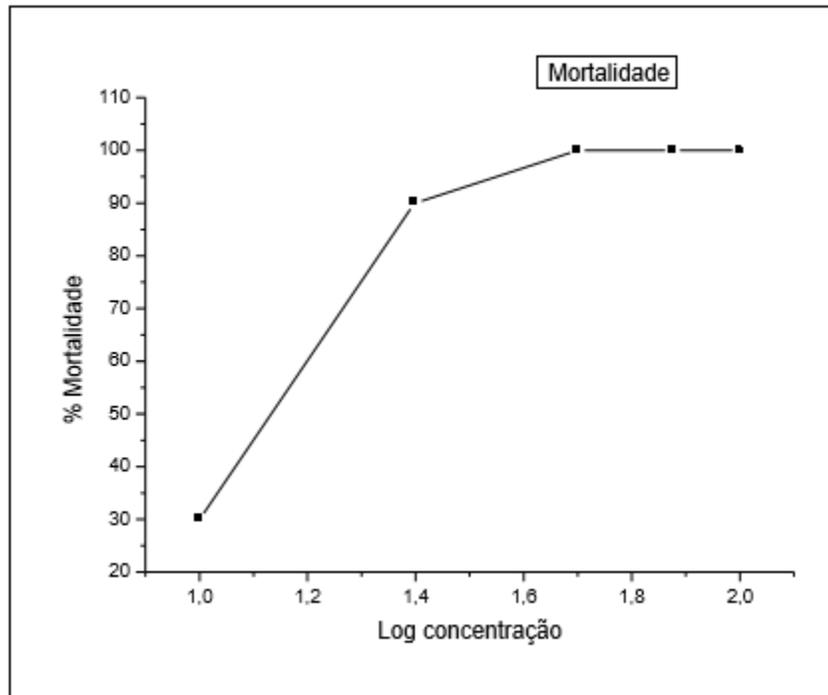
Observa-se no gráfico que houve uma mortalidade de 100% em vinte e quatro horas de exposição dos caramujos nas concentrações de 50 e 75 mg.L<sup>-1</sup>; na concentração de 25 mg.L<sup>-1</sup> em 24 horas a mortalidade foi de 80%, passando para 90% em 48 horas, permanecendo até final dos teste e em 10 mg.L<sup>-1</sup> a mortalidade foi de 30%. A Tabela 3 mostra os dados dos testes efetuados em triplicatas nas diferentes concentrações, através de uma média das três repetições para cada uma das cinco concentrações testadas.

**Tabela 3.** Mortalidade dos caramujos após testes nas diferentes concentrações do óleo essencial extraído das cascas de *Citrus limon* Linneo

CONCENTRAÇÃO (mg.L <sup>-1</sup> )	LOG CONCENTRAÇÃO	MORTOS	VIVOS	ACUMUL. VIVOS	ACUMUL. MORTOS	% MORTALIDADE
100	2	10	0	0	42	100
75	1,8751	10	0	0	32	100
50	1,699	10	0	0	22	100
25	1,398	9	1	1	12	90
10	1	3	7	8	3	30

A taxa de percentagem da mortalidade dos caramujos frente ao óleo de *Citrus limon* Linneo é mostrada na Figura 27, mostrando-se constante a partir do logaritmo da concentração 1,699 (concentração 50 mg.L<sup>-1</sup>).

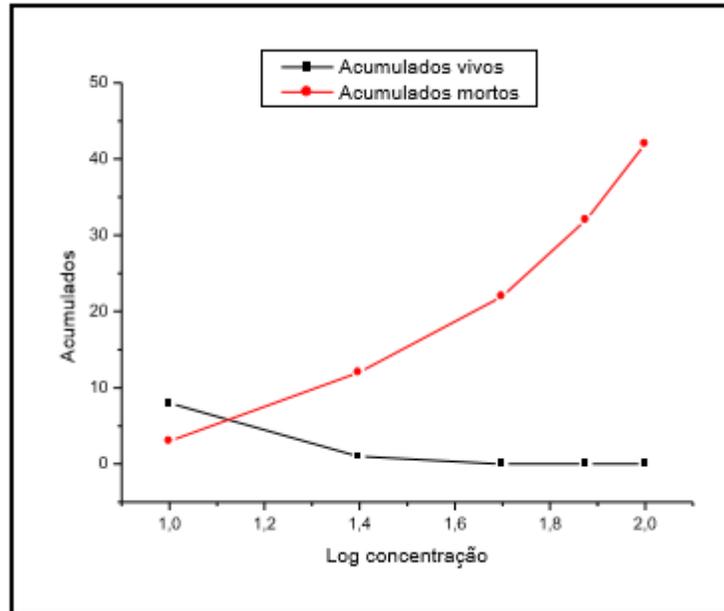
**Figura 27.** Taxa de mortalidade dos caramujos nas cinco concentrações diferentes do óleo essencial de *Citrus limon* Linneo. Fonte: dados da pesquisa



A concentração Letal 50% (CL<sub>50</sub>) foi encontrada próxima ao logaritmo da concentração 1,12 calculada através da intersecção das curvas de acumulados mortos e acumulados vivos, tendo como resultado a concentração de 13,18 mg.L<sup>-1</sup> para o óleo essencial de acordo com gráfico da Figura 28.

**Figura 28.** Estimativa da  $CL_{50}$  do óleo essencial de *Citrus limon* Linneo pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de caramujos vivos e mortos em função do logaritmo da concentração aplicada.

Fonte: Dados da pesquisa



### 2.3.7 Atividade moluscicida do padrão

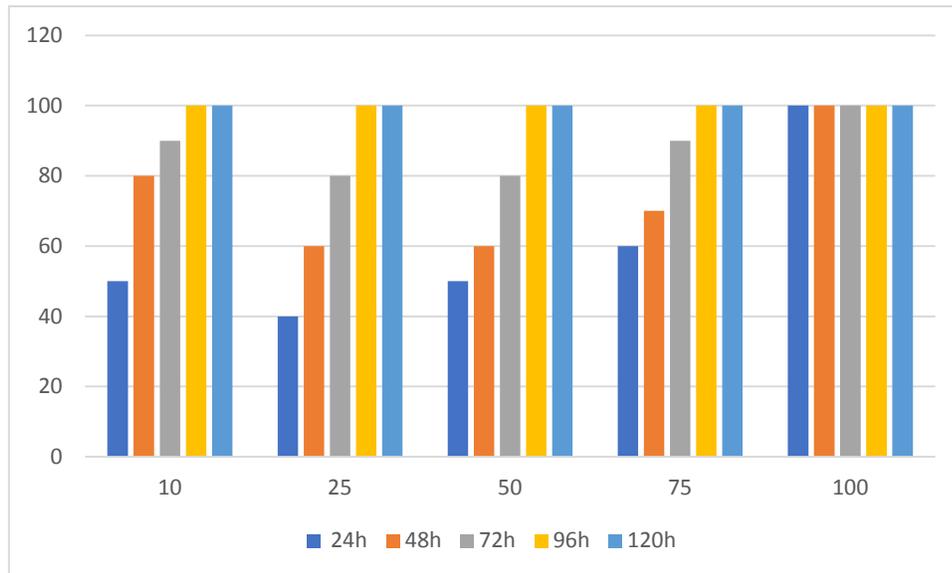
Durante o teste utilizando o padrão como moluscicida, observaram-se os seguintes dados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Tempo de observação e exposição e concentrações das soluções da atividade moluscicida do padrão.

CONCENTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL (mg.L <sup>-1</sup> )	CONCENTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL				
	24h	48h	72h	96h	120h
10	50	80	90	100	100
25	40	60	80	100	100
50	50	60	80	100	100
75	60	70	90	100	100
100	100	100	100	100	100

Ressalta-se que, no primeiro dia os organismos foram expostos às soluções com padrão com as seguintes concentrações: 10 mg.L<sup>-1</sup>, 25 mg.L<sup>-1</sup>, 50 mg.L<sup>-1</sup>, 75 mg.L<sup>-1</sup> e 100 mg.L<sup>-1</sup> (Figura 29). Após 24h dessa exposição, os moluscos foram devidamente lavados com água desclorada e colocados em béqueres com água desclorada e alface crespa e analisados diariamente no horário das 14 h.

**Figura 29.** Tempo de observação e exposição X concentrações das soluções da atividade moluscicida do padrão. Fonte: Dados da pesquisa



Os dados são demonstrados graficamente acima com as coordenadas tempo de observação e exposição versus concentrações das soluções. A solução com concentração 100 mg.L<sup>-1</sup> mostrou melhor resultado desde o primeiro dia de análise. A curiosidade desse experimento consta nas soluções de concentração 10 mg.L<sup>-1</sup> e 25 mg.L<sup>-1</sup>, pois ao contrário do que se esperava, a concentração de 10 mg.L<sup>-1</sup> apresentou uma atividade moluscicida mais forte, com índice de mortalidade maior em relação à concentração 25 mg.L<sup>-1</sup>. Um dos fatores que podem explicar tal índice é o mecanismo de defesa dos moluscos que se contraem no interior da concha afim de diminuir a exposição ao meio externo.

De acordo com a Tabela 5, para cada concentração em um determinado tempo em (h) o teste foi realizado e os dados sobre o número de caramujos vivos e mortos foram encontrados através da média das 5 concentrações testadas. A taxa de

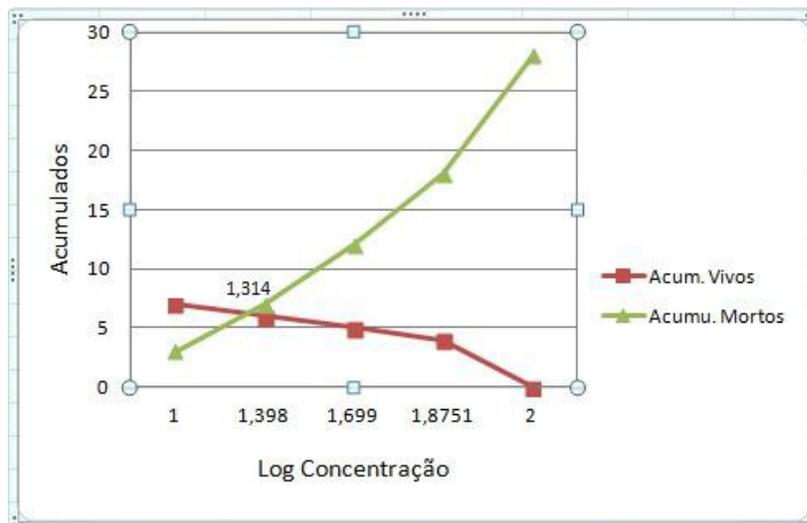
percentagem da mortalidade dos caramujos frente ao óleo do *Citrus limon Linneo*, o que se observa é que a mortalidade é diretamente proporcional ao logaritmo da concentração, conforme a Figura 30.

**Tabela 5.** Mortalidade dos caramujos após testes nas diferentes concentrações do padrão de l - limoneno

Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	Log Concentração	Mortos	Vivos	Acumulados Vivos	Acumulados Mortos	Mortalidade %
100	2	10	0	0	28	100
75	1,8751	6	4	4	18	60
50	1,699	5	5	5	12	50
25	1,398	4	6	6	7	40
10	1	3	7	7	3	30

A Figura 30 mostra que a Concentração Letal 50% (CL<sub>50</sub>) foi encontrada próxima ao Logaritmo da Concentração 1,314 calculada através da intersecção das curvas de acumulados mortos e acumulados vivos, tendo como resultado a concentração letal de 20,60 mg.L<sup>-1</sup> com um intervalo de confiança de 95% a 2,98 mg.L<sup>-1</sup>.

Figura 30. Estimativa da CL<sub>50</sub> do óleo essencial do limão pelo método Reed-Muench a partir do acumulados de caramujos vivos e mortos em função do logaritmo da concentração aplicada.



O resultado encontrado, em termos de potencial moluscicida, obtido com o óleo essencial da casca do *Citrus limon Linneo*, onde a concentração letal em 50% (CL<sub>50</sub>) foi de 13,18 mg.L<sup>-1</sup>. Portanto, dentro do estabelecido pela OMS (1983), na qual indica que a planta só deva ser considerada moluscicida quando a mortalidade nas concentrações iguais ou inferiores a 20 mg.L<sup>-1</sup> para extratos e que possam ser submetidos a ensaios em campo. Da mesma forma como foi realizado para o óleo, foi calculado através da intersecção das curvas de indivíduos acumulados vivos e indivíduos acumulados mortos para o padrão I – limoneno (Figura 30), obteve-se CL<sub>50</sub> de 20,60 mg.L<sup>-1</sup>.

Desta forma a CL<sub>50</sub> obtida qualifica o óleo essencial da casca do *Citrus limon Linneo* como um agente moluscicida forte, enquanto que o seu padrão I - limoneno exibiu eficácia moluscicida abaixo dos valores recomendados, estando fora das especificações.

Segundo Lahlou (2014), a atividade biológica de óleos essenciais está diretamente relacionada com a sua composição química. Essa relação de composição e atividade, muitas vezes sugere que a atividade biológica de um óleo pode ser atribuída tanto a seus majoritários, quanto a componentes presentes em menor concentração. É possível que eles ajam em conjunto sinergicamente, contribuindo para toxicidade total do óleo testado.

### **2.3.8 Avaliação do teste controle**

Neste estudo os caramujos do grupo controle com água desclorada (branco) e com o Tween 80 permaneceram ativos e se alimentando, não havendo interferência na bioatividade como pode ser observado na Figura 31.

**Figura 31.** Grupo controle do branco e do Tween 80



### 3 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos nos estudos analíticos e na avaliação da toxicidade e atividade moluscicida do óleo essencial extraídos da casca de CitruslimonLinneo concluem-se que:

O rendimento do óleo essencial extraído da casca de CitruslimonLinneo de 0,46%, valores consideráveis para extração por hidrodestilação;

Os parâmetros físico-químicos do óleo essencial estudado apresentaram valores semelhantes ao obtidos pela literatura;

A caracterização por CG-EM permitiu identificar os componentes majoritários e minoritários do óleo em estudo, oriunda da casca de CitruslimonLinneo, o limoneno com 48,996%;

A espectroscopia na região do infravermelho veio comprovar os resultados obtidos por CG-EM, mostrando os componentes majoritários do óleo quando comparado ao seu respectivo padrão, no que diz respeito às suas absorbâncias e seus deslocamentos químicos;

Para o teste piloto, a atividade moluscicida do óleo apresentou uma mortalidade de 100% em 24 h para o extraído da casca de CitruslimonLinneo indicando

a presença de componentes tóxicos nos óleos frente ao caramujo da espécie *Biomphalaria glabrata*; A atividade moluscicida do óleo essencial extraído da casca de *Citrus limon* Linneo alcançou um ótimo resultado frente ao caramujo *Biomphalaria glabrata*, mostrando que sua concentração letal 50% (CL50) foi de 13,18 mg.L<sup>-1</sup>, abaixo do preconizado pela ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS).

A atividade moluscicida do padrão l-limoneno durante os experimentos foi considerada forte, porém apresentou resultados satisfatórios com concentrações maiores do que o óleo essencial em estudo, fato esse que pode ser explicado pela sinergia dos demais componentes presentes no óleo essencial da casca do *Citrus limon* Linneo.

## REFERÊNCIAS

ABDEL-GAWAD, M.; EL-SAYED, M. M.; ABDEL-HAMED, E. S. Molluscicidal steroidal saponins and lipid content of agave decipiens. **Fitoterapia**, n.70, p371-381, 1999.

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F. BARBOSA FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmognosia**, v. 17. n1, p.114-140, 2007.

AZAMBUJA, W. **Óleo essencial de limão**. Disponível em: <<http://oleosessenciais.org/oleo-essencial-de-limao/>> . Acesso em: 13 mar. 2017.

BISSET NM, Wichtl M 2001. Herbal drugs and phytopharmaceuticals. 2.ed. Medpharm: Boca Raton, CRC / Stuttgart.

CARVALHO, O. S.; MASSARA, C. L.; GUERRA, H. L.; CAMPOS, Y. R.; CALDEIRA, R. L.; CHAVES, A.; KATZ, N. Re-avalution of schistosomiasis mansoni in Minas Gerais-Brazil III. Noroeste de Minas mesoregion. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 40: 277-279, 1998a.

CHAAR, J. S. **Estudos analíticos e modificação química por acetilação do linalol contido no óleo essencial da espécie *Aniba duckei* Kostermans**. 2000. 150 p. Tese (Doutorado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, UFSCar, São Carlos, 2000.

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

COELHO, A. M.; PAULA, J. E.; ESPÍNDOLA, L. Atividade larvicida de extratos vegetais sobre *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae), em condições de laboratório. **Biossay**, v. 4, 2000.

COLEGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J. **Bioactive Natural Products: Detection, Isolation, and Structural Determination**, 1993.

FARMACOPEIA BRASILEIRA IV – PARTE 1. 5. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2010, 1.320 p.

FERHAT, M.A.; MEKLATI, B.Y.; CHEMAT, T.F. Comparison of different isolation methods of essential oils from Citrus fruits: cold pressing, hydrodistillation and microwave "dry" distillation. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 22, p.494-504, 2007

FENNER, R.; BETTI, A.H.; MENTZ, L. A.; RATES, S.M.K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciência e Farmacologia**, v. 42, n. 3, 2006

GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N.; SALVATORE, G.; MAZZANTI, G. Local anesthetic activity of the essential oil of *Lavandula angustifolia*. **Planta Med**, v. 65, p. 700-703, 1999.

GRASSI FILHO, H.; PENTEADO, B.B.; SANTOS, C.H. Preparo de amostras e métodos para a determinação do teor de Óleo essencial de frutos de limoeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal - SP, v. 27, n. 1, p. 191-193, Abril 2005

GOMES, E. C.; ELPO, E. R. S.; GABRIEL, M. M.; LOPES, M. Plantas Medicinais com características tóxicas usadas pela população de Morretes, PR. **Revista Visão Acadêmica**, Curitiba, vol.2, n.2, p.7780, 2001.

Lahlou, Mouhssen, et al. "The potential effectiveness of essential oils in the control of human head lice in Morocco." *International Journal of Aromatherapy* 10.3-4 (2001): 108-123.

LEMMICH, E.; CORNETT, C.; FURU, P.; JORSTIAN, C. L.; KNUDSEN, A. N.; OLSEN, C. E.; SALIH, A.; THILBORG, S. T. **Molluscicidal saponins from *C. nilotica***. *Phytochem.* v. 39, p. 63–68, 1995.

LOTA, M.L; SERRA, D. DE R.; TOMI, F.; JACQUEMOND, C.; CASANOVA, J. Volatile components of peel and leaf oils of lemon and lime species. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v.50, p.796-805, 2002

LUNA, J. S. Estudo de Plantas Bioativas. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

Lutz-IAL, Instituto Adolfo. "Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos (Vol. 1)." São Paulo: IMESP. [Links] (1985).

MAIA, J. G. S.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A. **Plantas aromáticas na Amazônia e seus óleos essenciais**. Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, PA. 2002.

MALEK, E. A. Snail Hosts of Schistosomiasis and other Snail Transmitted Diseases in Tropical América. In: BARBOSA, F. S. **Tópicos de Malacologia Médica**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1995, p. 300- 310.

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Secretaria de Políticas de Saúde, Proposta de Política Nacional de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos**. Ministério da Saúde, 1ª edição, 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Dengue: Situação epidemiológica**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/index.cfmportal.boletim>>. Acesso em: maio 2017.

Brasil. Ministério da Saúde. **Fundação Nacional de Saúde. Controle da esquistossomose: diretrizes técnicas**. Brasil. Ministerio da Saude. Fundacao Nacional da Saude, 1995.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. **Dengue: aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento / Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde**. – Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 20p.: il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos, nº 176), 2002.

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

NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 11.ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

OMS (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD). 1991. **Emprego inocuo de plaguicidas**, Genève, OMS. 29p.

OMS. Organização Mundial de Saúde. **OMS apóia estudo com plantas medicinais**. Disponível em: <[http://www.drashi.../fitoterapia\\_oms\\_apoia\\_estudos\\_com\\_plantas\\_medicinais.ht](http://www.drashi.../fitoterapia_oms_apoia_estudos_com_plantas_medicinais.ht)> Acesso em 17 jul. 2017.

OMS/OPAS, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE/ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE. Disponível em:

<[https://new.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&task=view&id=3168&Itemid=1](https://new.paho.org/bra/index.php?option=com_content&task=view&id=3168&Itemid=1)>. Acesso em jul. 2017.

PENIDO , A.AB. SILVA, M. W. B. **Guia Fitoterápico**, Facimp. p.11-14, p.59-65, 2007

RAGHAVAN,N. et al. **Comparative gene analysis of Biomphalariaglabrata hemocytes pre-and post-exposure to miracidia of Schistosoma mansoni.** *Molécul&BiochemicalParasitology*, n.126, p.181-191, 2003.

Rug, Melanie, and Andreas Ruppel. **"Toxic activities of the plant Jatropha curcas against intermediate snail hosts and larvae of schistosomes."** *Tropical Medicine&International Health* 5.6 (2000): 423-430.

SILVA-FILHO, C. R. M.; SOUZA, A. G.; CONCEIÇÃO, M. M.; SILVA, T. G.; SILVA, T. M. S.; RIBEIRO, A. P. L. Avaliação da bioatividade dos extratos de cúrcuma (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae) em *Artemia salina* e *Biomphalariaglabrata*. **Rev. bras. farmacogn.** v. 19, n. 4, 2002.

SILVA, R.S. MAGNO, C.R.; RIBEIRO, M. N.; BLOIS , B. S.O.; BLOIS, G.S.O. Óleo essencial de limão no ensino da cromatografia em camada delgada. **QuímicaNova**,v. 32, N. 8, p. 2234-2237, 2009

SILVA, W. J. **Atividade larvicida do óleo essencial de plantas existentes no Estado de Sergipe contra Aedes aegypti Linn.** 2006. 81p. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) - Progama de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente, UFSE, São Cristóvão-SE, 2006

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER F. X.; KIEMLE D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos.** 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; PETROVICK, L. A. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Porto Alegre: UFRGS, 2007.

SOUZA, C. P.; RIBEIRO, P. R. B.; GUIMARÃES, C. T.; JANNOTTI-PASSOS, L. K. & SOUZA, M. A., 1996. **Esquistossomose: a expansão de Biomphalariastraminea em Belo Horizonte, Minas Gerais.** *Cadernos de Saúde Pública*,12:541-544.

TELES, R. M. **Caracterização química, avaliação térmica e análise larvicida do óleo de AnibaduckeiKostermans contra Aedes aegypti.** 2009. 110p. Tese (Doutorado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, João Pessoa, 2009.

TELES, R. M. **Estudo analítico do linalol contido no óleo essencial extraído de galhos da espécie LAnibaduckeiKostermans e sua aplicação como agente**

**bactericida**. 2003. 99p. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, UFMA, São Luís, 2003.

USP, Universidade de São Paulo. **Darvin Futuro: histórico da doença**. Disponível em: [http://darwin.futuro.usp.br/site/finlay/quadroteorico/c\\_historicodoenca .htm](http://darwin.futuro.usp.br/site/finlay/quadroteorico/c_historicodoenca .htm)> Acesso em: mar 2017.

VENDRUSCOLO, G.S.; RATES, S. M. K. ; MENTZ, L. A. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmagnosia**, v.15, n.4,p. 361-372, 2005

WHO. World Health Organization. **Dengue bulletin: Epidemic dengue/dengue haemorrhagic fever: A global public health problem in the 21st century**, 1997.

WHO. World Health Organization. **Dengue bulletin: Situation of dengue/dengue haemorrhagic fever in SEA countries**, 2004.

WHO. Vector resistance to pesticides. Fifteenth report of the expert committee on vector biology and control **Tech. Rep. Ser.**, v. 818, p.1–55, 1992.

<[http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigilancia\\_controle\\_moluscos\\_import\\_epidemiologia\\_2ed.pdf](http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigilancia_controle_moluscos_import_epidemiologia_2ed.pdf)> Acesso em mar de 2017.

World health organization, ed. *Proposal for the multinational monitoring of trends and determinants in cardiovascular disease and protocol (MONICA project)*. WHO, 1983.

WILLIAMS, D. G. **The chemistry of essential oils**. England: Micelle Press. 334p., 1996.

Vekiari, Stavroula A., et al. "**Composition and seasonal variation of the essential oil from leaves and peel of a Cretan lemon variety.**" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50.1 (2002): 147-153.

Gounaris, Y. "**Biotechnology for the production of essential oils, flavours and volatile isolates. A review.**" *Flavour and fragrance journal* 25.5 (2010): 367-386.

SARKER, et al. "**A genomics resource for investigating regulation of essential oil production in *Lavandula angustifolia*.**" *Planta* 231.4 (2006): 835-845.

Cowan, Marjorie Murphy. "**Plant products as antimicrobial agents.**" *Clinical microbiology reviews* 12.4 (1999): 564-582.

Moucherek Filho, Victar Elias, Maria do Socorro Oliveira Vaz, and Sílvia Carvalho Maranhão. **"AVALIAÇÃO ORGANOLÉPTICA E ANÁLISE BROMATOLÓGICA, PARA FINS NUTRICIONAIS, DO CAMARÃO, CARANGUEJO ESURURU (IN NA TURA) CONSUMIDOS NA ILHA DE SÃO LUÍS-MA."**

Cheng, Sen-Sung, et al. **"Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae."** *Bioresource Technology* 89.1 (2003): 99-102.