

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

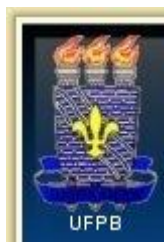


TESE DE DOUTORADO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E
ATIVIDADE MOLUSCICIDA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DA FOLHA
DE *Pimenta dioica* Lindl, CASCA DE *Citrus limon* Linneo E
RIZOMA DE *Zingiber officinale* Roscoe**

ROMER PESSÔA FERNANDES

**João Pessoa – PB – Brasil
maio/2011**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**



TESE DE DOUTORADO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E
ATIVIDADE MOLUSCICIDA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DA FOLHA
DE *Pimenta dioica* Lindl, CASCA DE *Citrus limon* Linneo E
RIZOMA DE *Zingiber officinale* Roscoe**

ROMER PESSÔA FERNANDES


**Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal da Paraíba
como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Doutor em
Química Analítica.**

**Orientador: Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho
2º Orientador: Prof. Dr. Antônio Gouveia de Souza**

**João Pessoa – PB - Brasil
maio/2011**

Caracterização Química, Avaliação da Toxicidade e Atividade Moluscicida dos Óleos Essenciais da Folha de *Pimenta dióica* Lindl, Casca de *Citrus limon* Linneo e Rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe.

Aprovada pela banca examinadora:



Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho
Orientador/Presidente



Prof. Dr. Antonio Gouveia de Souza
2º Orientador



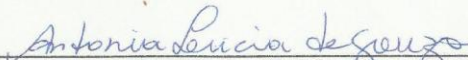
Profa. Dra. Denise Domingos da Silva
Examinadora



Profa. Dra. Marta Maria da Conceição
Examinador



Prof. Dr. Ary da Silva Maia
Examinador



Profa. Dra. Antonia Lúcia de Souza
Examinador

F363c Fernandes, Romer Pessoa.

Caracterização química, avaliação da toxicidade e atividade moluscicida dos óleos essenciais da folha de pimenta dióica Lindl, casca de Citrus limon Linneo e Rizoma de Zingiber officinale Roscoe.- João Pessoa, 2011.

130f. : il.

Orientadores: Victor Elias Mouchrek Filho, Antônio Gouveia de Souza

Tese (Doutorado) – UFPB/CCEN

1. Química Analítica. 2. Óleos essenciais. 3. Toxicidade. 4. Moluscicida.

UFPB/BC

CDU: 543(043)

DEDICAÇÃO

A Deus, por tudo que tenho conseguido ao longo da vida e por ter me ensinado o caminho da verdade, da paz e do amor.

A Zenith Pessôa Costa, minha mãe (in memoriam) e Aulette Fernandes Costa, meu pai (in memoriam) que sempre estiveram ao meu lado nos melhores e piores momentos de minha vida.

A Eisenhower, Stephenson, Rosemari e Rolf, meus irmãos; pelos momentos maravilhosos que passamos juntos.

Aos meus sobrinhos e Victor, o mais novo membro da família, com a força deles, a vida fica mais fácil.

Aos meus eternos amigos que fiz no caminhar da vida, em especial ao professor Mauro, Aroldo e Jobim (in memoriam).

A Arildo Capitão e família, um agradecimento especial, por ter proporcionado os melhores momentos de minha vida, vão estar sempre em meu coração.

Ao tentar se transpor etapas em nossas vidas encontramos aqueles que dificultam, mas também os que facilitam, os que incentivam e os que reprovam gratuitamente, cultiva-se amizades e as perde também... antíteses de viver. Mas só os verdadeiramente corajosos persistem até a última antítese da Vida.

Romer P. Fernandes

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr Victor Elias Mouchrek Filho, pelo incentivo, apoio e orientação segura oferecidos durante a minha vida acadêmica;

Ao Prof. Dr. Antônio Gouveia de Souza, pela confiança depositada e orientação para desenvolvimento deste trabalho;

A Prof^a Dra. Ivone Garros Rosa, por toda atenção, compreensão e colaboração durante todo o trabalho;

Ao Prof. Msc. Nêuton Silva-Souza, pelo grande apoio nas experiências;

Ao pessoal do NIBA, em especial a Adalberto Alves Pereira Filho, Clícia Rosane Costa França, Monique Santos do Carmo e Edna Maria da Silva, que me acolheram de braços abertos e tanto ajudaram para o sucesso desta pesquisa;

Aos professores e colegas do Pavilhão, em especial ao Prof. Dr. Nestor Everton Mendes Filho, Prof. Dr. Armando Barbosa Bayma, Prof^a Dra. Adenilde Ribeiro Nascimento, Prof. Dr. João Elias Mouchrek Filho e Prof. Dr. André Gustavo Lima de Almeida Martins, pelo estimado apoio, ajuda neste trabalho e pela amizade dedicada;

A Prof^a Denise Fernandes Coutinho Moraes e aos alunos Clarice e Thaise, pelo apoio nas análises da toxicidade e refração dos óleos;

Ao amigo Weber e família pela amizade dedicada durante esses anos de convivência e apoio nos momentos difíceis;

Ao amigo Antonio Clementino da Silva Filho, uma pessoa para todas as horas que se fizer necessária na vida;

A comunidade do Sá Viana, em especial ao Sr. William, que tanto colaborou com as coletas, que consegue sobreviver com garra e dignidade.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	i
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO	Viii
ABSTRACT	ix
CAPÍTULO 1	1
1 - INTRODUÇÃO	2
CAPÍTULO 2	5
2 - REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1- Considerações sobre plantas medicinais.....	6
2.1.1- <i>Pimenta dióica</i> Lindl	7
2.1.2- <i>Citrus limon</i> Linneo.....	8
2.1.3- <i>Zingiber officinale</i> Roscoe.....	10
2.2- Óleos essenciais.....	11
2.2.1- Extração.....	12
2.2.2- Análise dos componentes dos óleos essenciais.....	15
2.2.3- Óleo essencial da <i>Pimenta dióica</i> Lindl.....	17
2.2.4- Óleo essencial do <i>Citrus limon</i> Linneo.....	18
2.2.5- Óleo essencial do Gengibre, <i>Zingiber Officinale</i> Roscoe.....	19
2.2.6- Aplicabilidade industrial.....	20
2.3- Esquistossomose.....	20
2.3.1- Ciclo evolutivo.....	23
2.4- Atividade moluscicida.....	25
2.5- Toxicidade.....	28

CAPÍTULO 3	31
3- OBJETIVOS	32
3.1- Objetivo geral.....	32
3.2- Objetivos específicos.....	32
CAPÍTULO 4	33
4- PARTE EXPERIMENTAL	34
4.1- MATERIAIS	34
4.1.1- Moinho elétrico.....	34
4.1.2- Extrator de clevenger.....	34
4.1.3- Coletor de molusco.....	34
4.1.4- Reservatório dos moluscos.....	35
4.1.5- Expoitor dos moluscos a luz.....	35
4.1.6- Estereoscópio de análise.....	35
4.1.7- Refratômetro.....	35
4.1.8- Balança digital.....	35
4.1.9- Picnômetro.....	35
4.1.10- Espectrofotômetro de infravermelho.....	36
4.1.11- Cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas....	36
4.2- METODOLOGIA EXPERIMENTAL	36
4.2.1- Coleta das amostras.....	36
4.2.1.1- Folhas da planta: <i>Pimenta dióica</i> Lindl.....	36
4.2.1.2- Frutos da planta: <i>Citrus limon</i> linneo.....	37
4.2.1.3- Rizoma da planta: <i>Zingiber officinale</i> Roscoe.....	37
4.2.2- Extração dos óleos essenciais.....	37
4.2.2.1- Rendimento de extração do óleo essencial.....	38
4.2.3- Caracterização físico-química dos óleos essenciais.....	38
4.2.3.1- Densidade.....	39
4.2.3.2- Solubilidade em etanol (90 %)......	39
4.2.3.3- Índice de refração.....	39

4.2.3.4- Cor e aparência.....	39
4.2.4- Análise espectrométrica vibracional na região do infravermelho.....	40
4.2.5- Análise por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectroscopia de Massas (CG-EM).....	40
4.2.6- Amostragem dos caramujos.....	41
4.2.6.1- Análise para testar positividade dos caramujos.....	41
4.2.6.2- Teste para atividade moluscicida.....	42
4.2.6.3- Análise dos dados estatísticos do tamanho da amostra.....	43
4.2.7- Cultura de <i>Artemia salina</i>	43
4.2.7.1- Análise da toxicidade.....	44
4.2.8- Análise estatística da concentração letal(CL ₅₀).....	45
CAPÍTULO 5	47
5- RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1- Avaliação dos parâmetros físico-químicos dos óleos essenciais...	48
5.2- Avaliação da cinética de extração e rendimento dos óleos essenciais.....	49
5.3- Análise espectrocópica vibracional na região do infravermelho..	51
5.3.1- Branco com Brometo de potássio (KBr)	51
5.3.2- <i>Pimenta dióica</i> Lindl.....	52
5.3.3- <i>Citrus limon</i> Linneo.....	54
5.3.4- <i>Zingiber officinale</i> Roscoe.....	55
5.4- Avaliação das características químicas dos óleos essenciais obtidas por cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas (CG-EM).....	56
5.4.1- Óleo essencial da <i>Pimenta dióica</i> Lindl	56
5.4.2- Óleo essencial do <i>Citrus limon</i> linneo	69
5.4.3- Óleo essencial do <i>Zingiber officinale</i> roscoe.....	76

5.5- Captura e teste da positividade dos caramujos.....	86
5.6- Avaliação da atividade moluscicida.....	86
5.6.1- Avaliação do teste piloto.....	86
5.6.2- Avaliação da concentração letal.....	88
5.6.2.1- <i>Pimenta dióica</i> Lindl	88
5.6.2.2- <i>Citrus limon</i> linneo	91
5.6.2.3- <i>Zingiber officinale</i> roscoe.....	93
5.6.3- Avaliação do teste controle.....	97
5.7- Avaliação do teste de toxicidade.....	97
5.7.1- <i>Pimenta dióica</i> Lindl	97
5.7.2- <i>Citrus limon</i> linneo	99
5.7.3- <i>Zingiber officinale</i> roscoe.....	101
5.7.4- Avaliação do teste controle.....	102
CAPÍTULO 6	104
6- CONCLUSÕES	105
CAPÍTULO 7	107
7- PERSPECTIVAS FUTURAS	108
CAPÍTULO 8	109
8- REFERÊNCIAS	110

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ag	Aglae
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASTM	American Society for Testing and Materials
AMDIS	Automated mass spectral deconvolution mass & identification sytem
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrocopia de massas
CL ₅₀	Concentração letal 50%
EPI	Equipamento de proteção individual
EM	Espectrometria de Massas
eV	Elétron-Volt
FUNASA	Fundação Nacional da Saúde
FID	Detector de Ionização de Chamas
F.M.	Fórmula Molecular
IE	Impacto de elétrons
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
IV	Infravermelho
LACOM	Laboratório de combustíveis e materiais
mL	mililitro
mg	miligrama
mV	milivolts
m/z	Relação carga-massa
M+	Íon Molecular
ND25°	Índice de Refração a 25°C
nm	nanômetro
NIBA	Núcleo de imunologia básica

OMS	Organização Mundial de Saúde
RMN	Ressonância magnética nuclear
T_r	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta
Vis	Visível
ε	Absortividade molar
$\lambda_{m\acute{a}x}$	Comprimento de onda (nm) de absorção máxima
μL	microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Árvore e Folhas da <i>Pimenta dioica</i> Lindl.....	8
Figura 2.2. Árvore do <i>Citrus limon</i> Linneo e o fruto do limão.....	9
Figura 2.3. <i>Zingiber officinale</i> Roscoe: Planta e Rizoma.....	10
Figura 2.4. Fórmula estrutural do Eugenol.....	18
Figura 2.5. Fórmula estrutural do Limoneno.....	19
Figura 2.6. Fórmula Estrutural do Zingibereno.....	20
Figura 2.7. <i>B. glabrata</i> , <i>B. straminea</i> e <i>B. Tenagophila</i>	22
Figura 2.8. Caramujos da espécie <i>Biomphalaria glabrata</i>	22
Figura 2.9. Ciclo Evolutivo.....	23
Figura 2.10. Os ovos e o mirácido.....	24
Figura 2.11. Cercária da <i>S. mansoni</i>	24
Figura 2.12. Fórmula estrutural da Niclosamida.....	27
Figura 4.1. Cultura de <i>Artemia salina</i> Leach	44
Figura 5.1. Cinética referente ao rendimento de extração dos óleos em função do tempo, com massa de 30g e temperatura de 100°C.....	50
Figura 5.2. Espectro do branco KBr	52
Figura 5.3. Espectros na região do infravermelho: padrão do eugenol e do óleo essencial da <i>Pimenta dióica</i> Lindl.....	53
Figura 5.4. Espectros na região do infravermelho: padrão do limoneno e do óleo essencial do <i>Citrus limon</i> Linneo.....	54
Figura 5.5. Espectros na região do infravermelho: do óleo essencial do <i>Zingiber officinale</i> Roscoe.....	55
Figura 5.6. Cromatograma da amostra do óleo das folhas da <i>pimenta dióica</i> Lindl, apresentando os picos selecionados e identificados através da comparação dos respectivos espectros de massas com a espectroteca NIST21.....	57
Figura 5.7. Espectros de massas do composto eugenol.....	59
Figura 5.8. Fragmentação do eugenol.....	60

Figura 5.9. Espectros de massas do composto chavicol.....	61
Figura 5.10. Fragmentação do composto chavicol.....	62
Figura 5.11. Espectros de massas do composto β -mirceno.....	63
Figura 5.12. Clivagem bialílica do β -mirceno.....	64
Figura 5.13. Clivagem alílica do β -mirceno.....	64
Figura 5.14. Espectros de massas do composto limoneno.....	65
Figura 5.15. Reação de retro-Diels-alder na fragmentação do limoneno.....	66
Figura 5.16. Espectros de massas do composto 1-octen-3-ol.....	67
Figura 5.17. Fragmentação do composto 1-octen-3-ol.....	68
Figura 5.18. 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.....	69
Figura 5.19. Espectros de massas do composto limoneno.....	71
Figura 5.20. Espectros de massas do composto β - pineno.....	72
Figura 5.21. Espectros de massas do composto α - pineno.....	73
Figura 5.22. Espectros de massas do composto etil dimetil benzeno.....	74
Figura 5.23. Espectros de massas do composto sabineno.....	75
Figura 5.24. Fragmentação do composto sabineno.....	76
Figura 5.25. Cromatograma da amostra do óleo do rizoma <i>zingiber officinale</i> Roscoe, apresentando os picos selecionados e identificados através da comparação dos respectivos espectros de massas com a espectroteca NIST21.....	77
Figura 5.26. Espectros de massas e possíveis fragmentos do composto α -zingibereno.....	79
Figura 5.27. Fragmentação do composto α -zingibereno.....	80
Figura 5.28. Espectros de massas e possíveis fragmentos do composto geranial.....	81
Figura 5.29. Fragmentação do geranial.....	81

Figura 5.30. Espectros de massas do nerolidol.....	82
Figura 5.31. Espectros de massas e possíveis fragmentos do composto neral.....	83
Figura 5.32. Espectros de massas e possíveis fragmentos do composto β -sesquifelandreno.....	84
Figura 5.33. Fragmentação do β -sesquifelandreno	85
Figura 5.34. Gráfico do percentual de mortalidade por tempo de exposição e observação de cada óleo para o teste piloto.....	87
Figura 5.35. Gráfico do percentual de mortalidade pelas concentrações do óleo essencial da <i>Pimenta dióica</i> Lindl.....	88
Figura 5.36. Taxa de mortalidade dos caramujos nas cinco concentrações do óleo essencial de <i>Pimenta dióica</i> Lindl.....	90
Figura 5.37. Estimativa da CL ₅₀ do óleo essencial de <i>Pimenta dióica</i> Lindl pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de caramujos vivos e mortos.....	90
Figura 5.38. Gráfico do percentual de mortalidade pelas concentrações do óleo essencial da <i>Citrus limon</i> Linneo.....	91
Figura 5.39. Taxa de mortalidade dos caramujos nas cinco concentrações do óleo essencial de <i>Citrus limon</i> Linneo.....	92
Figura 5.40. Estimativa da CL ₅₀ do óleo essencial de <i>Citrus limon</i> Linneo pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de caramujos vivos e mortos.....	93
Figura 5.41. Gráfico do percentual de mortalidade pelas concentrações do óleo essencial da <i>Zingiber officinale</i> Roscoe.....	94
Figura 5.42. Taxa de mortalidade dos caramujos nas cinco concentrações do óleo essencial de <i>Zingiber officinale</i> Roscoe.....	95
Figura 5.43. Estimativa da CL ₅₀ do óleo essencial de <i>Zingiber officinale</i> Roscoe pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de caramujos vivos e mortos.....	96
Figura 5.44. Grupo controle do branco e do Tween 80.....	97

Figura 5.45. Taxa de percentagem da mortalidade das larvas nas concentrações do óleo essencial da <i>Pimenta dióica</i> Lindl.....	98
Figura 5.46. Estimativa da CL ₅₀ do óleo essencial de <i>Pimenta dióica</i> Lindl pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas vivas e mortas.....	99
Figura 5.47. Taxa de percentagem da mortalidade das larvas nas concentrações do óleo essencial de <i>Citrus limon</i> Linneo.....	100
Figura 5.48. Estimativa da CL ₅₀ do óleo essencial de <i>Citrus limon</i> Linneo pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas vivas e mortas.....	100
Figura 5.49. Taxa de percentagem da mortalidade das larvas nas concentrações do óleo essencial de <i>Zingiber officinale</i> Roscoe.....	101
Figura 5.50. Estimativa da CL ₅₀ do óleo essencial de <i>Zingiber officinale</i> Roscoe pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas vivas e mortas.....	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1. Parâmetros físico-químicos dos óleos essenciais estudados.....	48
Tabela 5.2. Compostos identificados na amostra do óleo essencial extraído da <i>Pimenta dióica</i> Lindl.....	58
Tabela 5.3. Compostos identificados na amostra do óleo essencial extraído da casca de <i>Citrus limon</i> Linneo.....	70
Tabela 5.4. Compostos identificados na amostra do óleo essencial do <i>Zingiber officinale</i> Roscoe.....	78
Tabela 5.5. Mortalidade dos caramujos após testes moluscidas com óleo essencial de <i>Pimenta dióica</i> Lindl.....	89
Tabela 5.6. Mortalidade dos caramujos após testes moluscidas com óleo essencial de <i>Citrus limon</i> Linneo.....	92
Tabela 5.7. Mortalidade dos caramujos após testes moluscidas com óleo essencial <i>Zingiber officinale</i> Roscoe.....	95
Tabela 5.8. Mortalidade das larvas após testes de toxicidade com óleo essencial <i>Pimenta dióica</i> Lindl.....	98
Tabela 5.9. Mortalidade das larvas após testes de toxicidade com óleo essencial <i>Citrus limon</i> Linneo.....	99
Tabela 5.10. Mortalidade das larvas após testes de toxicidade com óleo essencial <i>Zingiber officinale</i> Roscoe.....	101

Título: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE MOLUSCICIDA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DA FOLHA DE *PIMENTA DIOICA* LINDL, CASCA DE *CITRUS LIMON* LINNEO E RIZOMA DE *ZINGIBER OFFICINALE* ROSCOE

Autor: Romer Pessôa Fernandes

Orientadores: Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho

Prof. Dr. Antônio Gouveia de Souza

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, os óleos essenciais foram extraídos das folhas de *Pimenta dioica* Lindl, da casca de *Citrus limon* Linneo e do rizoma de *zingiber officinale* Roscoe 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 da *Pimenta dioica* Lindl, o eugenol, com teor de 85,67 %, do *Citrus limon* Linneo, o limoneno, com 48,99 % e do *Zingiber officinale* Roscoe, o zingibereno, com 27,14 % e caracterizando os majoritários por espectrometria na região do infravermelho comparando-se com os padrões. Os resultados mostraram um rendimento (m/m) de 1,80% para o óleo da *Pimenta dioica* Lindl de 0,96 % para o *Citrus limon* Linneo e de 0,71 % para o *zingiber officinale* Roscoe. Os óleos foram testados quanto à toxicidade (ensaio de letalidade com *Artemia salina*), utilizando o critério de Dolabela e como agente moluscicida, através da técnica preconizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Calculou-se a concentração letal (CL₅₀) dos óleos, além do limite de confiança a 95 % de probabilidade pelo método Reed-Muench e Pizzi respectivamente. Dentre os óleos estudados, o extraído da casca de *Citrus limon* Linneo além de ser atóxico, com CL₅₀ de 263,03 mg.L⁻¹ alcançou o melhor resultado quanto a atividade moluscicida com CL₅₀ de 13,18 mg.L⁻¹, mostrando-se, portanto, ser o mais ativo frente ao caramujo *Biomphalaria glabrata* comparado ao óleo extraído das folhas de *Pimenta dioica* Lindl e do rizoma de *zingiber officinale* Roscoe que obtiveram CL₅₀ de 39,81 e 56,2 mg.L⁻¹ respectivamente, não sendo considerados ativos.

PALAVRAS-CHAVE: óleos essenciais, toxicidade, moluscicida.

Title: CHEMICAL CHARACTERIZATION, EVALUATION OF TOXICITY AND EVALUATION OF THE MOLLUSCICIDAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS EXTRACTED FROM THE LEAF *PIMENTA DIOICA* LINDL, FROM THE PELL OF *CITRUS LIMON* LINNEO AND FROM THE RHIZOME OF GINGER, *ZINGIBER OFFICINALE* ROSCOE

Author: Romer Pessôa Fernandes


Advisors: Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho

Prof. Dr. Antônio Gouveia de Souza

ABSTRACT

The use of plant molluscicide in controlling schistosomiasis has motivated the survey in the search for new, among them the essential oils. This survey, the essential oils extracted from the leaves of *Pepper dioica* Lindl, bark of *Citrus limon* Linneo and Rhizome of *Zingiber officinale* Roscoe 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 *Pepper dioica* Lindl was eugenol, content of 85.673 %, in *Citrus limon* Linneo, the majority was limonene, 48.996 % and *Zingiber officinale* Roscoe, where the was zingibereno, with 27.14 %, characterizing by in the region infrared spectrometry compared with the standards. The results showed an income (m/m) 1.80 % for oil *Pepper dioica* Lindl 0.96 % for *Citrus limon* Linneo and 0.71 % of *Zingiber officinale* Roscoe. These oils have been tested for toxicity (lethality test with *Artemia salina*), using the criterion of Dolabella and as a molluscicide, through the technique recommended by the World Health Organization (WHO). Estimated the lethal concentration (Lc50) of oils beyond the limit of the 95 % interval by Reed-Muench and Pizzi respectively. Between the analysed oils in this research, the extracted from the peel of *Citrus limon* Linneo were considered to be nontoxic with Lc50 263,03 mg.L⁻¹, achieving the best result as a molluscicide with Lc50 activity 13, 18 mg.L⁻¹, thus being the most active front in the snail *Biomphalaria glabrata* in comparison with the oil stracted of *Pepper dioica* Lindl and the oil of the rhizome of *Zingiber officinale* Roscoe that Lc50 from 39,81 and 56,2 mg.L⁻¹, respectively being actives.

KEY WORDS: essential oils, toxicity, molluscicide.



CAPITULO I
INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

Os recursos terapêuticos eram predominantemente constituídos por plantas e extratos vegetais até o meado século XVIII. No Brasil, o guaraná e jaborandi são muito utilizados, tendo origem da cultura indígena. Atualmente a utilização desses vegetais não se restringe apenas às zonas rurais ou regiões desprovidas de assistências médicas e farmacêuticas (MOUCHREK FILHO, 2000; TELES 2003).

Segundo Nascimento (2004), com o advento da revolução industrial, a utilização de plantas diminuíram em função do desenvolvimento de drogas sintéticas. Porém, a preocupação do homem moderno na busca de uma vida saudável fez com que as pesquisas com plantas medicinais voltassem.

As plantas aromáticas e seus sub-produtos têm atraído a atenção de pesquisadores do mundo inteiro, por suas propriedades medicinais e organolépticas (TEIXEIRA *et al*, 1986). Essas plantas possuem substâncias biologicamente ativas, podendo ser usadas para fins terapêuticos ou para fornecer precursores para a síntese química farmacêutica. Existe uma grande variedade de espécies usadas popularmente para diversos fins, dos quais o conhecimento científico é escasso ou nulo. (TELES, 2003).

Nos últimos 30 anos, têm sido aconselhado pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 2002) os estudos com extratos de plantas consideradas medicinais (pelo conhecimento popular). A partir de 1978, segundo Soares (2002), a instituição passou a incentivar a comunidade científica a intensificar e divulgar os resultados.

Entre os produtos obtidos de plantas, encontram-se os óleos essenciais, os quais já são largamente utilizados na indústria para a

produção de sabonetes, perfumes e outros produtos de higiene pessoal.

As plantas utilizadas neste trabalho são conhecidas da comunidade científica e alguns estudos realizados com os óleos essenciais extraídos das espécies têm mostrado resultados interessantes: a pimenta da Jamaica (*Pimenta dioica* Lindl) possui efeito comprovadamente analgésico e antipirético (LOPEZ *et al.*, 1998); o gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) tem sido comprovado como agente antibacteriano (SRINIVASAN *et al.*, 2001) e utilizado contra distúrbios gastrintestinais (MARTINS *et al.*, 2001) e o óleo volátil de *Citrus limon* L. inibe o crescimento de *Cândida albicans* (EZZAT *et al.*, 2001).

A esquistossomose, causada pelo trematóide *Schistosoma mansoni*, é uma importante doença endêmica no Brasil e em muitos países tropicais, onde o caramujo *Biomphalaria glabrata* é o hospedeiro intermediário do *schistosoma mansoni* e transmissor para o homem, hospedeiro definitivo (Souza, Mendes 1991).

Para o controle da esquistossomose, além dos tratamentos das pessoas infectadas, é preciso que se faça um controle da população de caramujos, como forma de redução do risco de transmissão da doença. Na atualidade este controle é limitado a substâncias sintéticas, que acarretam em vários problemas para outras espécies da fauna, como também aos aplicadores por serem tóxicos, outra inconveniência é seu alto custo (WHO, 1983). Devido ao exposto, a utilização de moluscicida sintético é extremamente limitada a casos necessários (AMARAL, PORTO 1994).

Neste contexto, os óleos essenciais extraídos de plantas representam uma alternativa no controle do caramujo transmissor da esquistossomose, a fim de quebrar o ciclo evolutivo, antes que este venha contaminar o hospedeiro definitivo, levando os estudiosos

a pesquisarem substâncias oriundas de vegetais que pudesse contribuir na eliminação dos mesmos com mais eficiência (DOS SANTOS & SANT'ANA, 1999).

As plantas em estudo devem ser abundantes em áreas endêmicas da doença, ou serem facilmente cultiváveis, o produto ativo responsável pela toxidez deve estar presente em partes de fácil regeneração da planta, como folhas, flores, frutos e sementes. O princípio ativo deve ser extraído preferencialmente com água, o extrato deve manter-se ativo sob quaisquer alterações físicas e químicas (Kloos & McCullough, 1981; WHO, 1983).

Tendo em vista contribuir com a pesquisa científica voltada aos óleos essenciais, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar quimicamente, avaliar a toxicidade e a atividade moluscicida de óleos essenciais extraídos da folha de *pimenta dióica* Lindl, da casca do *Citrus limon* Linneo e do rizoma do *Zingiber officinale* Roscoe, espécies de plantas de grande importância medicinal e podem ser encontradas onde a doença é endêmica no Brasil.



CAPITULO II
REVISÃO DA LITERATURA

2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1- Considerações sobre plantas medicinais

O uso de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antigo quanto à civilização humana e por um longo período, as plantas e os minerais foram as principais fontes de medicamentos utilizadas pelo homem (RATES, 2001). De fato, Essawi e Srour (2000) descrevem que na Pré-História havia uso de plantas para combater doenças como bronquite, úlceras, pneumonias, desordens gastrintestinais, dentre outras.

Nesse contexto, as plantas são uma importante fonte de produtos biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Simões *et al.* (1999) referem que pesquisadores da área de produtos naturais mostram-se impressionados pelo fato desses produtos encontrados na natureza revelarem uma gama quase que inacreditável de diversidades em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas. Apesar de ser notável o volume de estudos nessa área, os dados disponíveis revelam que apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal.

Dessa maneira, Soares (2004) diz que esse interesse é fruto do incentivo dado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), após 1978, quando reconheceu a importância das plantas medicinais na cura de doenças, recomendando a divulgação, em nível mundial, dos conhecimentos necessários para o seu uso. Esse fato se torna ainda mais importante porque, de acordo com Nascimento (2004), estima-se que 80% da população mundial ainda utilizam direta ou indiretamente as plantas para o tratamento de saúde.

De acordo com Barbosa (2003), dados da OMS informam

que em 2003, os medicamentos derivados de vegetais representaram uma constância de 25% de todas as prescrições médicas nos Estados Unidos, e este percentual torna-se mais significativo na demonstração da importância das plantas medicinais e, também, como estímulo à sua investigação.

A respeito desse mercado que vem emergindo acentuadamente, é interessante ressaltar que as empresas do setor fitoterápico olham para as plantas de forma diferenciada, dentro do conceito da OMS, que preconiza o uso de todos os princípios ativos das plantas de forma integral. Câmara (2004) diz que este é o grande diferencial entre o fitofármaco (princípio ativo isolado) e o fitoterápico (princípios ativos integrais).

Calixto *et al.* (1997) explanam que as plantas têm sido empregadas na medicina popular para o tratamento de diversas doenças e alguns dos constituintes isolados dessas plantas, como os flavonóides, taninos, alcalóides, cumarinas e terpenos, parecem ser os principais responsáveis pelas ações analgésicas, anti-inflamatórias, antivirais, hipoglicemiantes, antiespasmódicas e antialérgicas desses vegetais. Salvat *et al.* (2001) relatam que muitas pesquisas com substâncias biologicamente ativas, isto é, de plantas medicinais, têm sido fontes de agentes terapêuticos muito proveitosos.

2.1.1- *Pimenta dioica* Lindl

A Pimenta da Jamaica, mundialmente conhecida como *Pimenta dioica* Lindl pertence à família Mirtácea, é uma árvore que mede de 6 a 15 m de altura, apresentando folhas pecioladas, elíptico alongadas e um forte aroma em todas as suas partes (Figura 2.1), originária da América Central e Oeste da Índia (CAVICCHIOLI, 1986; WEYERSTAHL, 1998). Ao chegar à Jamaica os exploradores espanhóis

ficaram impressionados com o gosto e aroma dos seus frutos e folhas.

Conforme, Guenther, (1950); Parry, (1969); Katzer, (2004), devido ao fruto seco da árvore da "allspice", foi atribuído o nome "pimenta", originário da palavra "pimienta" (termo espanhol para pimenta) por exploradores espanhóis, logo depois que Colombo descobriu o Novo Mundo. Este termo foi completamente impróprio, pois foi baseado somente na aparência visual com o grão de pimenta preta, no que diz respeito ao tamanho, forma e aroma.

No Brasil, a *Pimenta dioica* Lindl., apresenta alguns sinônimos como: pimenta da jamaica, pimenta de coroa e murta pimenta. A espécie apresenta a seguinte posição taxonômica: Reino: Vegetal; Divisão: Angiosperma; Classe: Dicotiledôneas; Ordem: Mirtales; Família: Mirtáceas; Gênero: Eugenia; Espécie: *Pimenta dioica* Lindl (PURSEGOLVE, 1960; PARRY, 1969; CORREA, 1998; BARROSO, 1978).



Fonte: O autor

Figura 2.1. Folhas da *Pimenta dioica* Lindl.

2.1.2- *Citrus limon* Linneo

O *Citrus limon* Linneo conhecido como limão verdadeiro é o fruto do limoeiro (Figura 2.2), tendo origem na região sudeste da Ásia, é uma árvore pertencente à família das Mirtáceas, perenifólia, pequena de 3 - 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; pecíolo curto e extensamente alado; folhas jovens avermelhadas; flores solitárias ou em racimos axilares, avermelhadas em forma de botão; pétalas brancas na parte superior e púrpura abaixo. 20 - 40 estames; 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).



Fonte: O autor

Figura 2.2. Árvore do *Citrus limon* Linneo e fruto do limão.

Segundo Raquel Patro, (2007), no Brasil o limão se popularizou devido a sua eficácia no combate de diversas patologias,

tais como infecções, febres, aterosclerose, acidez gástrica, alterações do fígado e biliares entre outras, por possuir propriedades antibiótica, antitérmica, antiinflamatória, vermífuga, anti-séptica e antiespasmódica.

2.1.3- *Zingiber officinale* Roscoe

O gengibre, também conhecido como *ajengibre*, *jengibre dulce* (Argentina e Espanha), *ginger* (Estados Unidos e Inglaterra), *gingembre* (França) é uma planta herbácea e perene, nativa do sudeste da Ásia e outros climas tropicais, que pertence à família *Zingiberaceae* (MORGAN, 1994).

A planta pode atingir 1,50 m e o rizoma – principal parte comercial do vegetal (o óleo também é de interesse) (Figura 2.3) é formada por ramificações horizontais, sendo usada como remédio, condimento, matéria-prima no preparo de bebidas (incluindo refrigerantes) e na indústria de perfumaria, conhecida na Europa á mais de 2000 anos e atualmente vários estudos têm sido publicados relatando os seus efeitos medicinais (NASCIMENTO, 2004; ANDRADE, 2004; AMBR, 2004).



Fonte: Bildegalleri (2004).

Figura 2.3. *Zingiber officinale* Roscoe: Rizoma.

2.2-Óleos essenciais

Os óleos essenciais, também denominados de óleos voláteis, são misturas complexas de substâncias orgânicas voláteis, formadas por componentes de consistência semelhante ao óleo. São constituídos basicamente de terpenos, terpenos oxigenados, sesquiterpenos oxigenados, ácidos graxos, materiais corantes, etc. (TELES 2003).

Os terpenos são classificados de acordo com a quantidade de unidades isoprênicas (C5): monoterpenos (C10); sesquiterpenos (C15); diterpenos (C20); triterpenos (C30) e carotenóides (C40). Todos os terpenos derivam de unidades do isopreno (2-metil-1,3-butadieno) (SIMÕES; SPITZER, 2004). O isopreno é composto de dois isômeros, o isopentenil pirofosfato (IPP) e o dimetil-alil-pirofosfato (DMAPP), os quais se ligam entre si, originando o geranyl pirofosfato (GPP), que é o precursor de quase todos os monoterpenos (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Este grande número de compostos químicos presentes nos óleos essenciais apresentam inúmeras atividades biológicas, avaliadas em vários estudos, como antiinflamatória, pesticida, inseticida, moluscicida, larvicida, carrapaticida, antioxidante, anti-séptica, herbicida, antioxidante, entre outras atividades (WORWOOD, 1995; DAVIS, 1996; CHENG, 2003).

Conforme a International Standard Organization (ISO), podemos definir como óleos essenciais:

[...] os produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste de vapor d'água, bem como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos (Rutácea). De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Também podem ser chamados de

óleos voláteis, óleos etéreos ou essências. Eles são assim chamados por serem: geralmente de aparência oleosa e líquidos, voláteis; geralmente possuem aroma agradável; solúveis em solventes apolares, como o éter. Em água, eles apresentam solubilidade limitada, mas o suficiente para aromatizar suas soluções aquosas, que nesse caso são denominadas hidrolatos.

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).

Devido à baixa solubilidade dos óleos essenciais em água, há necessidade de se utilizar um tensoativo hidrofílico, geralmente solúvel ou dispersível em água, empregado para se obter uma emulsão do tipo óleo em água (O/A). Neste trabalho utilizou-se o TWEEN 80 como dispersante ou solubilizante dos óleos, a serem estudados, tem como nome químico, monooleato Sorbitan Etoxilado, cuja fórmula molecular $C_{64}H_{124}O_{26}$, de peso molecular 1310,0 e densidade 1,06-1,09 g/mL, devido à característica hidrofílica da cadeia de polilioxietileno faz da linha TWEEN, tensoativos hidrofílicos, geralmente solúveis ou dispersíveis em água e empregados para obter emulsões do tipo óleo em água (O/A), como dispersantes ou solubilizantes de óleos (Merck 13, 7664).

2.2.1- Extração de óleo

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).

Segundo Mouchrek Filho (2000), o tempo de extração do óleo essencial é um dos principais parâmetros físico-químicos da indústria de essências, no que se refere à qualidade e à natureza econômica. Por isso, uma destilação rápida pode conduzir a um produto contendo predominantemente constituintes mais voláteis, porém destituído das melhores características; ao contrário, uma extração prolongada encarece o produto e também pode sobrecarregá-lo de compostos de aromas indesejáveis (CHAAR, 2000).

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).

A enfloração é um método que já foi bastante utilizado, mas atualmente é empregado apenas por algumas indústrias de perfumes, no caso de algumas plantas com baixo teor de óleo de alto valor comercial. É empregada para extrair óleo essencial de pétalas de flores onde as pétalas são depositadas, a temperatura ambiente, sobre uma camada de gordura, durante certo tempo. Em seguida, estas pétalas esgotadas são substituídas por novas até a saturação

total, quando a gordura é tratada com álcool. Para se obter o óleo essencial, o álcool é destilado a baixa temperatura e o produto assim obtido possuem alto valor comercial (WILLIANS, 1996).

Na prensagem, os pericarpos de frutos cítricos são prensados e a camada que contém o óleo essencial é, então, separada. Posteriormente, o óleo essencial é separado da emulsão formada com a água por decantação, centrifugação ou destilação fracionada (SIMÕES; SPITZER, 2004)

A extração de óleos essenciais com solventes orgânicos envolve o uso de compostos como o éter etílico, éter de petróleo ou diclorometano que, entretanto, extraem outros compostos lipofílicos, além do óleo essencial. Por isso, os produtos obtidos assim raramente possuem valor comercial (SIMÕES; SPITZER, 2004).

Pela extração por fluido supercrítico consegue-se recuperar os aromas naturais de vários tipos não somente óleo essencial, de modo bastante eficiente e, atualmente, é um dos métodos de escolha para extração industrial de óleos essenciais. Nenhum traço de solvente permanece no produto obtido, tornando-o mais puro do que aqueles obtidos por outros métodos. Para tal extração, o CO₂ é primeiramente liquefeito por compressão e, em seguida, aquecido a uma temperatura superior a 31 °C. Nessa temperatura, o CO₂ atinge um quarto estado, no qual sua viscosidade é análoga a de um gás, mas sua capacidade de dissolução é elevada como a de um líquido. Uma vez efetuada a extração, faz-se o CO₂ retornar ao estado gasoso, resultando na sua total eliminação (SIMÕES; SPITZER, 2004).

A extração por arraste por vapor d'água é um dos métodos mais simples e mais utilizados. 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 (WILLIANS, 1996).

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).

2.2.2- Análises dos componentes dos óleos essenciais

A análise química de separação e identificação dos constituintes dos óleos é feita por meio de técnicas de cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (ROBLES, 1998; WEYERSTAHL, 1998; KIRK, 1981) e espectroscópicas (SILVERSTEIN, 2007), dentre as quais as mais freqüentes são a espectrofotometria de ultravioleta (UV), infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMNH¹) e de carbono 13 (RMN C¹³) e a espectrometria de massas (EM), além do uso de bibliotecas contendo informações existentes na literatura de um grande número de substâncias já conhecidas (KOLLMANNBERGER, 1993; DI STASI, 1996; FAJARDO, 1997; CAVICCHIOLI, 1986; WEYERSTAHL et al., 1998; SILVERSTEIN, 2007).

A cromatografia gasosa permite determinar, qualitativamente e quantitativamente, as frações individuais que podem ser observadas nos cromatogramas (SCHREIER, 1984;

LANÇAS, 1993). Como os óleos são misturas complexas, requer uma aplicação de métodos analíticos mais modernos e instrumentação adequadas. A técnica baseia-se na separação da mistura em componentes individuais, na distribuição dos componentes da amostra entre a fase estacionária (sólido ou líquido) e uma fase móvel (gás ou líquido) (SCHREIER, 1984; LANÇAS, 1993).

A absorção molecular na região do UV e do Vis depende da estrutura eletrônica da molécula. A absorção de energia é quantizada e conduz à passagem dos elétrons de orbitais do estado fundamental para orbitais de maior energia em estado excitado. Para muitas estruturas eletrônicas esta absorção ocorre em uma porção acessível do UV. Na prática, a espectrofotometria no UV é limitada, na maior parte, aos sistemas conjugados (SILVERSTEIN, 2007).

Como alternativa para avaliações cromatográficas de compostos voláteis, podem ser usadas técnicas que proporcionam informação direta acerca da composição de uma amostra particular sem prévia separação dos componentes, isto é, os métodos espectroscópicos complementares. A espectroscopia no infravermelho pode ser usada para obter informações acerca dos grupos funcionais da composição dos óleos essenciais, principalmente grupos contendo oxigênio, uma vez que as vibrações moleculares são perceptíveis nessa região do espectro. Apesar de ser uma técnica altamente sensível, é pouco seletiva no caso de misturas de multicomponentes e difíceis para fazer medidas quantitativas de concentrações de componentes individuais (RALPH, 1983).

A espectroscopia na região do infravermelho (IV) é uma das ferramentas mais comuns para a identificação de compostos orgânicos e inorgânicos puros, pois, com exceção de poucas moléculas homonucleares, tais como O_2 , N_2 e Cl_2 , todas as espécies moleculares absorvem radiação no IV. A intensidade de absorção é

uma função da variação do momento de dipolo envolvido na vibração (CRACKER, 1987).

Duas categorias básicas de vibrações moleculares são conhecidas: as vibrações de deformações axiais e as de deformações angulares. Uma vibração de deformação axial (estiramento) envolve uma mudança contínua na distância interatômica ao longo do eixo da ligação entre dois átomos. Vibrações de deformação angular são caracterizadas pela mudança no ângulo entre duas ligações. O espectro IV é obtido depois que uma transformação de Fourier converte o interferograma do domínio do tempo à forma mais familiar do domínio de frequências. O interferograma é uma série oscilatória de combinações destrutivas ou construtivas, resultando de uma variação completa de comprimentos de onda (SILVERSTEIN, 2007).

Existem no mercado várias empresas que oferecem o conjunto cromatográfico a gás-espectrometria de massas (CG-EM), acoplado por meio de uma interface que aumenta a concentração da amostra no gás de arraste, aproveitando a maior difusibilidade do gás. A velocidade de varredura é grande o suficiente para permitir a obtenção de diversos espectros de massas por pico eluído no cromatógrafo (ADAMS, 2007).

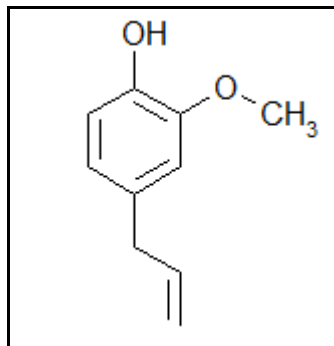
A conexão direta de colunas capilares de cromatografia gasosa ao espectrômetro de massas, sem a interface de enriquecimento, permite várias varreduras de massas rápidas em pontos diferentes de um pico cromatográfico, de modo a testar sua homogeneidade. Desse modo, é possível resolver picos cromatográficos parcialmente superpostos. Assim, a espectrometria de massas acoplada à cromatografia gasosa fornece as fragmentações dos componentes individuais separados (ADAMS, 2007).

Na técnica de impacto de elétrons (IE), mais comumente

usada em espectrometria de massas, um espectrômetro de massas bombardeia moléculas na fase vapor com um feixe de elétrons de alta energia e registra o resultado do impacto dos elétrons como um espectro de íons separados na base da razão massa/carga (m/z). A maior parte dos íons formados tem carga unitária. Os espectros de massas são obtidos rotineiramente com o uso de um feixe eletrônico de energia de 70 eV. O evento mais simples que pode ocorrer em fase gasosa é a remoção de um único elétron pelo feixe, com formação do íon molecular, um cátion-radical (M^+). O ponto simples representa o elétron desemparelhado. A maior parte dos íons desintegra-se em 10^{-10} - 10^{-3} s, dando, no caso mais simples, um fragmento carregado positivamente e um radical. Assim, forma-se certo número de fragmentos iônicos que podem ser posteriormente decompostos em fragmentos menores (SILVERSTEIN, 2007).

2.2.3- Óleo essencial da *Pimenta dióica* Lindl

O componente químico majoritário do óleo essencial extraído das folhas de *Pimenta dióica* Lindl é o eugenol (Figura 2.4), um líquido fracamente amarelado, que escurece ao ar, com aroma de cravo, e com sabor ardente e picante. (MOUCHREK FILHO, 2000). Este é muito usado como flavorizante (CRAVEIRO, 1981), antioxidante (FAJARDO, 1997), antiespasmódico (MOUCHREK FILHO, 2000), anti-séptico, agente bactericida, fungicida, inibidor inflamatório (OMS, 2002), antialérgico, na composição de cosméticos assim como no tratamento de AIDS (MONTEIRO, 2004) e atrativo de insetos (MONTEIRO, 2008).



Fonte: O autor

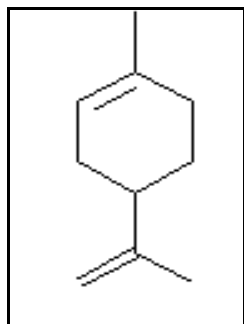
Figura 2.4. Fórmula estrutural do eugenol.

2.2.4- Óleo essencial do *Citrus limon* 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, b-pineno, g-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 $C_{10}H_{16}$, encontrado em frutas cítricas (cascas principalmente de limões e laranjas), volátil, por isso responsável pelo cheiro que essas frutas apresentam.

Por possuir um centro quiral, concretamente um carbono assimétrico, 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 2.5), porém se emprega com mais freqüência os prefixos d e l ou alfa e beta.



Fonte: O autor

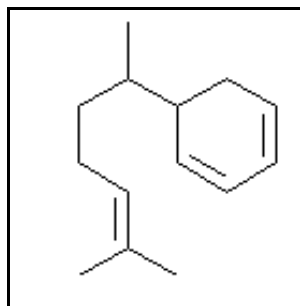
Figura 2.5. Fórmula estrutural do Limoneno.

2.2.5- Óleo essencial do Gengibre, *Zingiber officinale* Roscoe

Segundo Araújo (1999) o componente majoritário do óleo essencial de gengibre é o zingibereno ($C_{15}H_{24}$) (Figura 2.6), em média 30% presente no óleo. Por conseguinte, Morgan (1994) relata que grande parte das atividades farmacológicas encontradas nos extratos da planta é isolada dos rizomas e algumas frações de seus princípios ativos são: citral, 1,8-cineol, zingibereno, bisaboleno, geraniol, acetato de geranila, gingerol, shogaol, zingiberol, canfeno, felandreno, borneiol, lilanol, acetatos e caprilatos de zingiberol; além de aldeídos e cetonas.

O gingerol é descrito na literatura como princípio ativo que dá ao gengibre seu sabor característico e marcante (adocicado e ardente) (MORGAN, 1994 e ANDRADE, 2004). A respeito desse constituinte, o extrato de 6-gingerol possui comprovada atividade contra larvas *Shistosoma mansoni* (ALEJO *et al.*, 1999).

Hammer *et al.* (1999) estudaram diversos óleos essenciais frente a bactérias gram positivas e gram negativas e a atividade antibacteriana do óleo de gengibre foi comprovada para *Enterococcus faecalis* e *Klebsiella pneumoniae*, dentre outros microrganismos.



Fonte: O autor

Figura 2.6. Fórmula estrutural do zingibereno

2.2.6- Aplicabilidade industrial

As indústrias utilizam os óleos essenciais para conferir aromas especiais em inúmeros produtos, tais como perfumes, cosméticos, sabonetes, condimentos e etc., como também para mascarar odores desagradáveis em ambientes de trabalho e instalações sanitárias, e muito usadas como insumos em diversos produtos das indústrias de plásticos, tintas, borrachas, inseticidas e outras. (TELES, 2003).

2.3- Esquistossomose

A esquistossomose, conhecida como barriga d'água, xistosa, doença do caramujo, xistosomose 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 em vasta extensão do território, porque acomete milhões de pessoas, provocando, anualmente, um número expressivo de formas graves e

óbitos. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1995). Considera-se uma doença endêmica, aquela que existe constantemente em determinado lugar, atacando um número maior ou menor de indivíduos; já epidemia refere-se ao ataque rápido de uma doença, que acomete um grande número de pessoas ao mesmo tempo. A epidemia pode, também, ser o surto de agravamento de uma endemia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1995).

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 do homem na condição de hospedeiro definitivo, que excreta os ovos do verme pelas fezes, e dos caramujos aquáticos do gênero *Biomphalaria*, que atuam como hospedeiros intermediários, liberando as larvas infectantes do *Schistosoma mansoni* nas coleções hídricas utilizadas pelos seres humanos susceptíveis à doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1995).

A presença do hospedeiro intermediário constitui condição necessária e indispensável para que se desenvolva o ciclo do parasita. Atualmente, existem dez espécies e uma subespécie do gênero *Biomphalaria* e, destas, três são hospedeiras intermediárias naturais (*B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*) (Figura 2.7) e duas (*B. amazonica* e *B. peregrina*) são hospedeiras intermediárias potenciais, uma vez que só se infectam experimentalmente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1995).



Fonte: Surveillance and Control of Mollusks with Epidemiological Importance: technical directives: Schistosomiasis.

Figura 2.7. (a) *B. Glabrata*, (b) *B.straminea* e (c) *B. Tenagophila*.

O *Biomphalaria glabrata* (Figura 2.8), 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.



Fonte: O autor

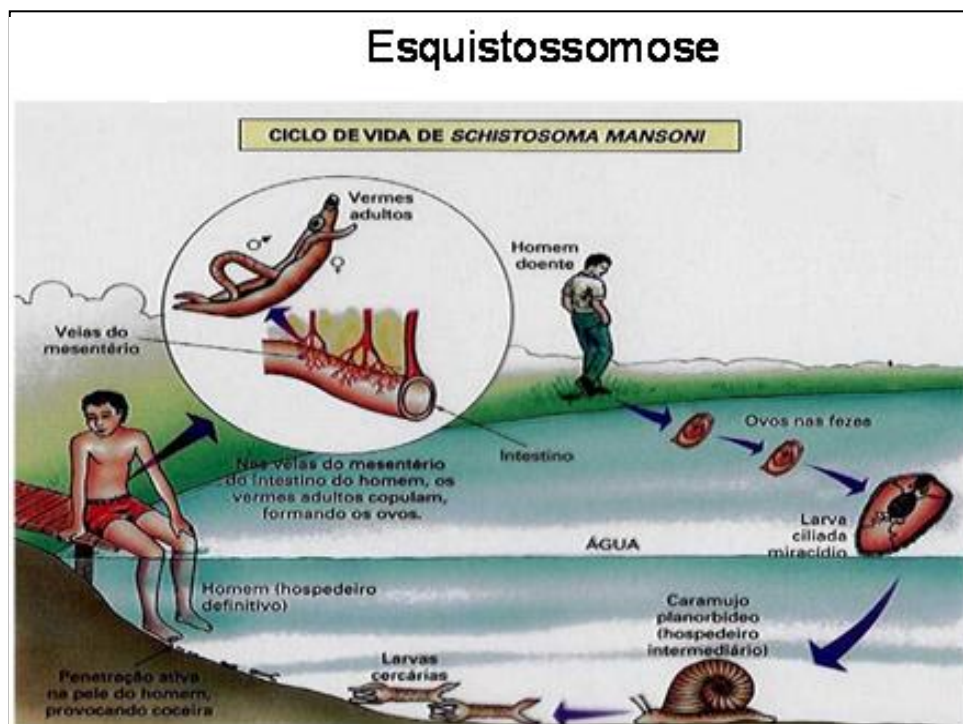
Figura 2.8. Caramujo da espécie *Biomphalaria glabrata*

Os índices elevados da esquistossomose mansonica correspondem, na maioria dos casos, à presença do molusco *B. glabrata*, principal hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni* (COUTO, 2005).

Segundo Santos *et al.*, (2007), a esquistossomose se enquadra nas chamadas doenças negligenciáveis. Portanto, os estudos com plantas com propriedades moluscicidas, 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).

2.3.1- Ciclo evolutivo

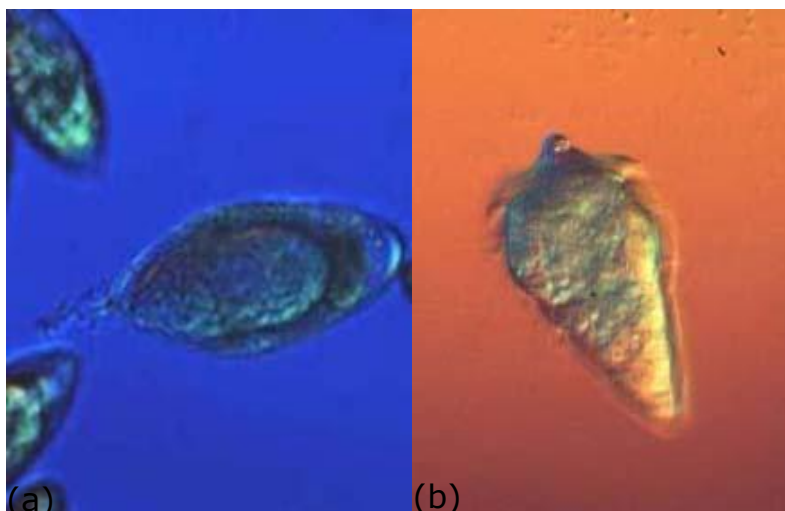
O ciclo evolutivo acontece de duas formas, uma no interior do caramujo e outra no interior do homem (Figura 2.9).



Fonte: Filo Platyhelminthes 2009

Figura 2.9. Ciclo evolutivo

O homem, quando doente, elimina ovos do verme pelas fezes. Estes, em contato com a água, rompem-se e libertam o miracídio (Figura 2.10) que é a larva ciliada, que nada ativamente, penetrando no caramujo onde penetram pelo tegumento.



Fonte: Sinclair Stammers/OMS/TDR

Figura 2.10. (a) Os ovos e (b) O miracídio.

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 2.11).



Fonte: Sinclair Stammers/OMS/TDR

Figura 2.11. Cercária da *S.mansoni*.

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, caminhando contra a corrente sanguínea da veia porta e das veias mesentéricas. As fêmeas eliminam ovos um a um, em fila, até 300 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).

2.4- 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).

O ciclo do *Schistosoma mansoni* pode ser interrompido com

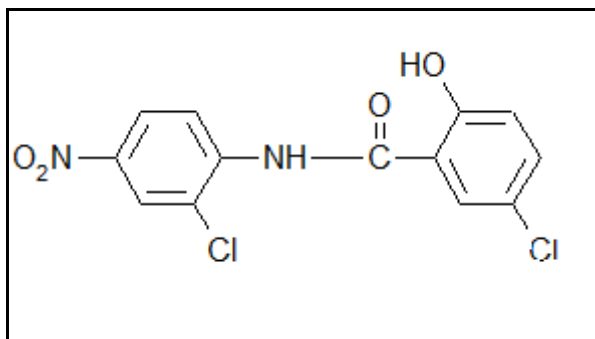
a utilização de plantas ricas em substâncias moluscidas que são eficazes no controle do caramujo (CARVALHO *et al.*, 1998; RUG, RUPPEL, 2000). Esses estudos com extratos vegetais, visando a obtenção de moluscidas têm sido realizados de acordo com as especificações da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1965, 1983, 2002), afim de padronizar os ensaios fitoquímicos publicou um guia de avaliação de plantas com potencial moluscida, onde define que um bom moluscida deve apresentar efeito tóxico em moluscos adultos em concentração menor ou igual a 20 mg.L⁻¹ do extrato solúvel e menor ou igual a 100 mg.L⁻¹ 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 moluscida, sejam realizados estudos do perfil químico do vegetal, seguido da identificação da estrutura química responsável pela ação moluscida, 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 moluscida e permanece disponível comercialmente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1995).

A niclosamida (Figura 2.12), substância comercialmente conhecida como Bayluscide, com nomenclatura (IUPAC) de 2',5-dicloro-4'-nitrosalicilanilida, fórmula molecular C₁₃H₈Cl₂N₂O₄, de uso exclusivo em Campanhas de Saúde Pública, no controle da esquistossomose, no combate aos caramujos vetores, sendo no Brasil, usada sob a responsabilidade da Fundação Nacional de Saúde. A sua baixa seletividade, podendo ser tóxica também sobre outras espécies da fauna e flora e a resistência de caramujos a essa

substância fazem com que aumente a procura por substâncias de origem vegetal, facilmente biodegradáveis e com baixa toxicidade (NEVES, 2004).



Fonte: O autor

Figura 2.12. Fórmula estrutural da niclosamida

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).

As pesquisas realizadas por Jurberg *et al.*, (1989) com 344 espécies, distribuídas em 73 famílias, demonstraram mortalidade de 20% a 100%, nas concentrações variaram de 0,5 mg/L a 20 mg/L, ou seja, dentro dos critérios estabelecidos pela OMS. As seguintes espécies, mostraram bons resultados: *Anacardium occidentale*, *Dasyphyllum brasiliensis*, *Delonix regia*, *Eclipta alba*, *Euphorbia cotinifolia*, *Euphorbia splendens*, *Euphorbia splendens var. Hisiopil*, *Euphorbia tirucalli*, *Macrosiphonia guaranitica*, *Magonia pubescens*, *Pithercolobium multiflocum* e *Buta gryeolens*.

Luna (2005) estudando 23 espécies de plantas da região nordeste sobre o molusco *B. glabrata*, dessas, o extrato das folhas de *Annona muricata* (graviola Annonaceae) na concentração de 100 mg.L⁻¹ foi eficaz em 100% na mortalidade dos moluscos adultos. A suspensão aquosa das folhas, sementes e cascas das raízes do *Guaiacum officinale*, apresentaram 100% de mortalidade para moluscos do gênero *B. glabrata*, nas concentrações de 20, 50 e 100mg.L⁻¹ (MENDES et. al., 1993). Pinheiro et al (2003), testando a atividade moluscicida do extrato metanólico de *Kielmeyera variabilis* Mart numa concentração de 12,5, 25, 50 e 100mg.L⁻¹ foi eficaz em 100%. Para o extrato de *Magonia pubescens* na concentração de 25 mg.L⁻¹, Corrêa, Bezerra et al, (2006) obteve 100% de mortalidade dos moluscos. Estudos realizados por Araujo (2008) do ácido úsnico extraído da *Cladonia substellata* Vainio numa concentração de 10 mg.L⁻¹ demonstraram uma mortalidade de 100% dos moluscos. Silva Filho et al (2009), estudando o extrato de cúrcuma (*Curcuma longa* L.. Zingiberacea) obteve um índice de mortalidade de 94% para uma concentração de 70 mg.L⁻¹.

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).

2.5- Toxicidade

Segundo Forbes e Forbes (1994), o teste de toxicidade tem como finalidade avaliar ou prever os efeitos tóxicos nos sistemas

biológicos e dimensionar a toxicidade relativa das substâncias.

Existem diversos ensaios que podem avaliar os efeitos tóxicos de extratos ou substâncias isoladas de plantas. No extrato, os órgãos de defesa de animais e os altos custos dos ensaios "in vivo" vem estimulando a substituição destes por testes "in vitro". Dentre estes; tem-se destacados o ensaio de letalidade com o microcrustáceo *Artemia salina*, que além de avaliar toxicidade geral, pode detectar compostos bioativos em extratos vegetais (MEYER et al., 1982).

Testes utilizando como bioindicador a *Artemia salina* já foram realizados por pesquisadores como, Ruiz et al. (2005), Santos et al. (2007), Silva-Filho et al. (2009). Os óleos essenciais em estudos foram submetidos ao bioensaio com *Artemia salina* para verificar a toxicidade frente a outros organismos que coabitam com caramujos.

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

O bioensaio de toxicidade com *Artemia salina* é em geral simples, rápido, sensível e barato, e consiste na estimativa da concentração de uma substância através da medida de uma resposta biológica, na qual existe apenas dois parâmetro envolvido: vida ou morte. O ensaio de letalidade permite a avaliação da toxicidade aguda e, portanto, é considerado essencial como bioensaio preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica, sendo

atualmente aceito pela comunidade científica (CAVALCANTE et al., 2001). Pode ser útil também para prever a toxicidade de extratos de plantas e orientar seu fracionamento fitoquímico (CÁCERES, 1996).

A *Artemia salina* vive em águas salinas e salobras de todo o mundo. Possui quatro estágios de desenvolvimento (ovo, náuplio, metanáuplio e adulto) e alguns mecanismos de adaptação que as tornam cosmopolitas, como a osmorregulação, a presença de pigmentos respiratórios como alternativas reprodutivas que facilitam a dispersão e a perpetuação dessa espécie. Os indivíduos adultos apresentam notável dimorfismo sexual e, em condições adequadas, é possível eclodir simultaneamente as larvas em cultura. O custo da implantação e manutenção da cultura de *Artemia salina* é muito baixo, o que faz desta, um excelente modelo experimental, utilizado nas mais diversas áreas da biologia. *Artemia salina* é amplamente conhecida como indicador de toxicidade em um bioensaio (Brine Shrimp Test), utilizando-se a Concentração Letal Média (CL₅₀) como parâmetro de avaliação da atividade biológica (toxicidade) de um composto ou extrato natural (LOPES et al., 2002).

Diversos trabalhos tentam correlacionar a toxicidade sobre *Artemia salina* com atividades como antifúngica, viruscida e antimicrobiana (MacRae, et al 1988), parasiticida (Sahpaz et al 1994), entre outras. McLaughlin, et al (1995) e colaboradores têm utilizado sistematicamente este bioensaio na avaliação prévia de extratos de plantas conhecidas como antitumorais. As frações ou substâncias ativas são posteriormente testadas em diferentes culturas de células tumorais, obtendo-se uma boa correlação.

Pesquisadores utilizam sistematicamente este bioensaio na avaliação prévia de extratos de plantas conhecidas como antitumorais (Meyer et al., 1982; Mclaughlin et al., 1993), mostrando-se boa correlação para substâncias com CL₅₀ < 10³ mg.L⁻¹.



CAPITULO III
OBJETIVOS

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivo geral

Caracterizar quimicamente os óleos essenciais extraídos das folhas de *Pimenta dioica* Lindl, da casca do *Citrus limon* Linneo e do rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe avaliando a toxicidade e testando atividade moluscicida.

3.2- Objetivos específicos

- Extrair quantitativamente os óleos essenciais;
- Caracterizar os óleos por processo físico químico, espectrometria vibracional na região do infravermelho e cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas;
- Avaliar a atividade moluscicida dos óleos essenciais, utilizando o método preconizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS);
- Avaliar a concentração letal (CL₅₀) dos óleos essenciais;
- Testar os óleos essenciais quanto a toxicidade frente a *Artemia salina*.



CAPITULO IV
PARTE EXPERIMENTAL

4-PARTE EXPERIMENTAL

Esses estudos foram desenvolvidos no Laboratório de Combustíveis e Materiais (LACOM) na Universidade Federal da Paraíba (UFPB) em parceria com o Laboratório de Físico-Química de Alimentos do Pavilhão Tecnológico da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada (NIBA) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e Central Analítica da Unicamp.

4.1- MATERIAIS

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

4.1.1- Moinho elétrico

Utilizou-se o moinho elétrico Tecnal, modelo TE-340 para a trituração da amostra da *Pimenta dióica* Lindl e um triturador para as amostras do *Citrus Limon* Linneo e *Zingiber officinale* Roscoe.

4.1.2- Extrator de Clevenger

Para a extração dos óleos essenciais foi utilizado um extrator de Clevenger de vidro, acoplado a um balão de fundo redondo com uma manta aquecedora como fonte de calor.

4.1.3- Coletor dos moluscos

O coletor consiste de uma concha associada a um cabo de madeira.

4.1.4- Reservatório dos moluscos

A armazenagem dos moluscos é feita em aquários de vidro com água desclorada.

4.1.5- Expositor dos moluscos a luz

A exposição dos moluscos é realizada em suportes metálicos, com três lâmpadas de 60 W.

4.1.6- Estereoscópio de análise

A análise é realizada em lupa STEMI SV6 marca ZEISS GERMANY.

4.1.7- Refratômetro

Utilizou-se um refratômetro de ABBE, modelo 2 WAJ, para as medidas de índice de refração.

4.1.8- Balança digital

As pesagens foram realizadas em balança digital MARTE AL 500, com precisão de 10^{-4} unidades.

4.1.9- Picnômetro

Um frasco de vidro especialmente confeccionado e aferido para 1mL.

4.1.10- Espectrofotômetro de infravermelho

Utilizou-se um espectrofotômetro IR PRESTIGE-21, FOURIER TRANSFORM INFRARED ESPECTROPHOTOMETER SHIMADZU.

4.1.11- Cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas

Os óleos essenciais foram analisados em um equipamento GC/EM, HP 5880, HEWLETT PACKARD.

4.2- METODOLOGIA EXPERIMENTAL

As metodologias realizadas nos experimentos deste trabalho são descritos a seguir.

4.2.1- COLETA DAS AMOSTRAS

4.2.1.1- Folhas da planta: *Pimenta dioica* Lindl

As folhas foram coletadas na Cooperativa Agrícola Mista do Projeto Onça LTDA, no município de Taperoá-BA, Brasil, em abril de 2009, registrada nos arquivos botânicos do Instituto Biodinâmico (IBD) de Botucatu de acordo com certificado n° CA021205, armazenadas em recipientes plásticos e transportados

para o Laboratório de Físico Química de Alimentos do Pavilhão Tecnológico da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), onde foram secas em temperatura ambiente, trituradas (em pó) e recolocadas no frasco para futura extração do óleo essencial.

4.2.1.2- Frutos da planta: *Citrus limon* Linneo

Os frutos do limão foram coletados no bairro do Sá Viana, situado na região da periferia do município de São Luis-Ma, diretamente do pé de limoeiro, sem uso de qualquer agrotóxico.

O galho e os frutos do limoeiro 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 Físico-Química de Alimentos do Pavilhão Tecnológico da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) para retirar as cascas dos frutos, triturar e extrair o óleo essencial.

4.2.1.3- Rizoma da planta: *Zingiber Officinale* Roscoe

Os rizomas de gengibre foram obtidos em supermercado da rede varejista de São Luís-Ma, identificados como *zingiber officinale* Roscoe, registrado no Herbário - Ático Seabra da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) sob o número 1678, levados ao Laboratório de Físico-Química de Alimentos do Pavilhão Tecnológico da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) para trituração e extração do óleo essencial.

4.2.2- EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação em

sistema de Clevenger de vidro acoplado a um balão de fundo redondo de 1000 mL, com uma manta aquecedora controlando-se a temperatura a 100 °C. Para a extração foram utilizados 30 gramas de cada amostra com 300 mL de água destilada, realizadas em triplicata e os óleos obtidos foram secos por meio da percolação com Na₂SO₄, armazenados em coletores de vidro envolto em papel alumínio sob refrigeração, a fim de evitar perdas de constituintes voláteis.

4.2.2.1- Rendimento de extração do óleo essencial

O cálculo do rendimento da extração foi avaliado de duas formas, uma, baseado na relação massa/volume, onde o volume foi sendo observado no próprio sistema de extração, sendo feitas seis extrações nos tempos 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; e 5,0 horas, e o melhor tempo foi determinado em função do rendimento de cada óleo essencial. A outra forma, expressa em porcentagem, na relação massa/massa pela medida da densidade, observando o volume máximo obtido de cada óleo por massa (g) dos vegetais em estudos, conforme fórmula abaixo (FARMACOPEIA BRASILEIRA IV, 1996).

$$\% R = (V.d/m) \times 100 \quad (1)$$

Onde:

V= volume total de óleo extraído (mL)

d= densidade do óleo (g/mL)

m= massa do vegetal (g)

4.2.3- CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

As propriedades físico-químicas dos óleos essenciais

determinadas foram a densidade, solubilidade em etanol (90% v/v), índice de refração, cor e aparência.

4.2.3.1- Densidade

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

4.2.3.2- Solubilidade em etanol (90%)

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

4.2.3.3- Índice de refração

A determinação do índice de refração foi realizada com auxílio de pipeta "Pasteur" de vidro para adicionar as amostras dos óleos diretamente sobre o prisma do refratômetro, a uma temperatura de 25 °C fazendo-se então as leituras.

4.2.3.4- Cor e Aparência

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

4.2.4- ANÁLISE ESPECTROMÉTRICA VIBRACIONAL NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos no equipamento modelo IR PRESTIGE-21, operando com resolução de 8.0 cm^{-1} e intervalo analisado foi de 400 a 4000 cm^{-1} . Todas as pastilhas foram preparadas misturando-se uma quantidade de brometo de potássio (KBr) anidro com uma gota de cada óleo, essa mistura foi triturada e prensada a alta pressão com auxílio de uma prensa hidráulica, para garantir que fique translúcida, ou seja, garanta a passagem da luz.

4.2.5- ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)

Os constituintes dos óleos essenciais foram identificados por cromatografia gasosa acoplado à espectrometria de massas (CG-EM) na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas. 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 μL ;
- Coluna : Capilar HP-5MS (5% difenil, 95% dimetil polisiloxano) (Equivalente DB-5MS ou CP-Sil 8CB LB/MS), nas dimensões (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm);
- Gás de arraste : He (99,9995); 1,0 mL/min;
- Injetor : 280 °C, modo Split (1:10);
- Forno : 40 °C (5,0 min.) até 240 °C numa taxa de 4 °C .min⁻¹,

de 240 °C até 300 °C (7,5 min) numa taxa de 8 °C.min⁻¹);

$t_T = 60,0$ 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

¹Espectrômetro de massas tipo quadrupolo linear.

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

4.2.6- AMOSTRAGEM DOS CARAMUJOS

As amostras dos caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* foram capturados nos períodos chuvosos de janeiro a junho dos anos de 2009 e 2010, nas áreas com baixo saneamento no bairro Sá Viana, São Luís-Ma, com utilização de EPI's (equipamento de proteção individual).

A técnica de coleta foi realizada de acordo com 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 de cada 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.

4.2.6.1- Análise para testar positividade dos caramujos

Os caramujos 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 (lampâdas 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 estavam parasitados (positivos) eram etiquetados e separados para futura análise individual e os que não apresentaram sinais de infecção pelo trematódeo no período de 30 dias foram selecionados para o teste de atividade moluscicida.

4.2.6.2- Teste para atividade moluscicida

Para a avaliação da atividade moluscicida foi utilizada à técnica preconizada pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1983), onde dois testes foram efetuados em triplicata. No primeiro, denominado de teste piloto, preparou-se uma solução de cada óleo em estudo num volume de 500 mL na concentração de 100 mg.L⁻¹ e 0,15 mL de Tween 80(tenso ativo), onde foram colocados 10 caramujos adultos, negativos para *Schistosoma mansoni*, obtendo-se no final uma proporção de 50 mL/caramujo e alimentando-os com alface hidropônico *ad.libitum* (MALEK, 1995). Os mesmos ficaram expostos na solução por 24 h, sob temperatura ambiente, removidos da solução, lavados por duas vezes com água desclorada, colocados

em um recipiente de vidro contendo 500 mL de água desclorada, alimentando-os com alface hidropônico e observados a cada 24 h, por 4 dias para avaliar a mortalidade.

No segundo teste, denominado de concentração letal (CL), foram preparadas soluções de cada óleo num volume de 500 mL nas concentrações de 10, 25, 50 e 75 mg.L⁻¹ e 0,15 mL de Tween 80(tensoativo), utilizando-se a mesma metodologia do teste piloto.

Para o controle negativo, utilizou-se também dois testes, no primeiro colocou-se 500 mL de água desclorada e 10 caramujos em um recipiente de vidro e no segundo 10 caramujos imersos em uma solução com 0,15 mL de Tween 80 em 500 mL de água destilada, alimentando ambos com alface hidropônico e procedendo-se a análise igualmente realizada nos testes anteriores.

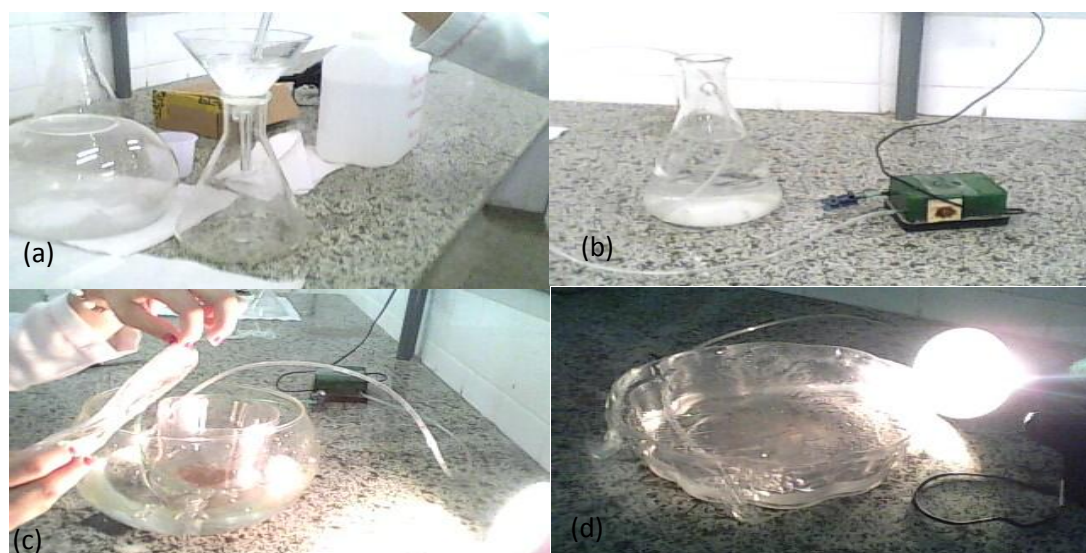
4.2.6.3- Análise dos dados estatísticos do tamanho da amostra

O programa estatístico *Bioestat 5.0* (2007) foi o utilizado para o cálculos estatísticos da amostragem de caramujos *Biomphalaria glabrata* e dos seguintes parâmetros: diferença mínima entre a média dos tratamentos igual 3, desvio padrão de 3,1, número de tratamentos igual a 6 (Controle negativo, 100, 75, 50, 25 e 10 mg.L⁻¹), poder do teste de 80%, nível de significância (α) de 5%, e adicionando mais 10% de possíveis perdas, então o tamanho amostral ficou em 30 caramujos por tratamentos, totalizando 180 animais, assim em cada tratamento deferiu-se grupos com dez caramujos.

4.2.7- CULTURA DE ARTEMIA SALINA

Os cistos de *Artemia salina* Leach foram transferidos para

um aquário contendo solução salina (60 g de sal marinho/1000 mL de água destilada) e saturação de oxigênio, obtido com auxílio de bomba de ar. O aquário foi dividido em dois compartimentos interligados, permanecendo os cistos em um dos compartimentos, deixando o segundo compartimento sob iluminação artificial de uma lâmpada de 100 W. Após 24 h, os cistos eclodiram, as larvas migraram para o compartimento iluminado, por fototropismo positivo. Estas foram transferidas para um aquário contendo solução salina e mantidas em incubação por mais 24 h, sob as mesmas condições de iluminação e oxigenação (Figura 4.1). A metodologia utilizada foi a recomendada por Meyer (1982) com modificações.



Fonte: O autor

Figura 4.1. Cultura de *Artemia salina* Leach, (a) Filtração da solução salina, (b) solução salina sobre saturação de oxigênio, (c) Aquário dividido em dois compartimentos (cistos e iluminação e (d) Exposição os cistos eclodidos sob iluminação artificial de uma lâmpada de 100 W.

4.2.7.1- Análise da toxicidade

Para a avaliação da letalidade de *Artemia salina* Leach, foi preparada uma solução salina estoque de cada óleo essencial na concentração de 10.000 mg.L⁻¹ e 0,02 mg de tween 80(tenso ativo).

Aliquotas de 5, 50 e 500 μL desta foram transferidas para recipientes e completados com solução salina já preparadas anteriormente até 5 mL, obtendo-se no final concentrações de 10, 100 e 1000 mg.L^{-1} , respectivamente. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas, onde dez larvas na fase náuplio foram transferidas para cada um dos recipientes. Para o controle do branco utilizou-se 5 mL da solução salina e para o controle negativo 5 mL de uma solução 4 mg.L^{-1} de Tween 80. Após 24 horas de exposição, realizou-se a contagem das larvas vivas, considerando-se mortas aquelas que não se movimentaram durante a observação e nem com a leve agitação do frasco.

Adotou-se o critério estabelecido por Dolabela (1997) para classificação da toxicidade dos óleos essenciais, sendo considerado produto altamente tóxico quando $\text{CL}_{50} \leq 80 \text{ mg.L}^{-1}$, moderadamente tóxico para $80 \text{ mg.L}^{-1} \leq \text{CL}_{50} \leq 250 \text{ mg.L}^{-1}$ e levemente tóxico ou atóxico quando $\text{CL}_{50} \geq 250 \text{ mg.L}^{-1}$.

4.2.8- ANÁLISE ESTATÍSTICA DA CONCENTRAÇÃO LETAL (CL_{50})

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% (CL₅₀), pois nesse ponto o número de animais sobreviventes é igual ao número de animais mortos (COLEGATE e 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:

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

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 2×10^{SE} .



CAPITULO V
RESULTADOS E DISCUSSÃO

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- 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 5.1.

Tabela 5.1. Parâmetros físico-químicos dos óleos essenciais estudados

Parâmetros Físico-químicos	Óleo essencial <i>Pimenta dióica</i> Lindl	Óleo essencial <i>Citrus limon</i> Linneo	Óleo essencial <i>zingiber officiale</i> Roscoe
Densidade (g/mL)	0,982	0,822	0,859
Índice de refração (ND 25°)	1,5185	1,4754	1,5101
Solubilidade em álcool a 90% (v/v)	1:2	1:3	1:5
Cor	Amarelo	Incolor	Amarelo
Aparência	Límpido	Límpido	Límpido
Rendimento (m/m) (%)	1,80	0,96	0,71

Investigando os componentes do óleo extraído do rizoma do gengibre, Miyazawa e Kameoka (1988) obtiveram um valor da densidade de $0,9714 \text{ g.mL}^{-1}$ e Martins (2009) de $0,822 \text{ g.mL}^{-1}$. Para o índice de refração, Tripathi, Dubey e Shukla (2008) obtiveram um valor de 1,4842 e Martins (2009) de 1,4826. No que diz respeito a solubilidade, o valor obtido por Martins (2009) foi de 1:5 (álcool 90 %).

Para os componentes do óleo extraído das folhas da *Pimenta*

dióica Lindl, Mouchrek Filho (2000), Sobrinho (2007) e Carvalho (2009), obtiveram os mesmos valores da densidade de $0,980 \text{ g.mL}^{-1}$, Diniz Junior (2008) um valor da densidade de $0,982 \text{ g.mL}^{-1}$. Para o índice de refração, Mouchrek Filho (2000) e Carvalho (2009) obtiveram os mesmos valores de 1,515, Sobrinho (2007) de 1,521 e Ribeiro (2009) de 1,525. Para a solubilidade, Mouchrek Filho (2000), Sobrinho (2007), Diniz Junior (2008) e Carvalho (2009) encontraram valores semelhantes de 1:2(álcool 70 %).

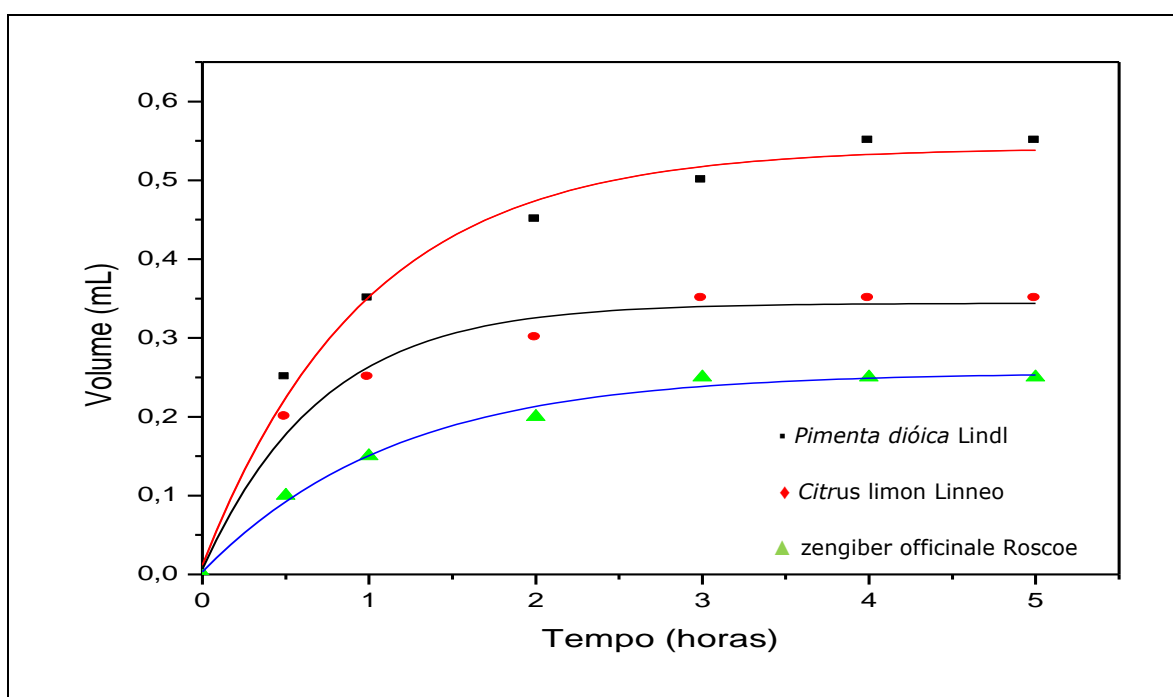
Segundo Kesterson *et al.* (1971), pesquisando os componentes do óleo extraído do *Citrus limon* Linneo encontrou como índice de refração, mínimo de 1,4738 e máximo de 1,4745, para Liberti *et al.* (1973) a densidade a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ foi de 0,875 e o índice de refração mínimo de 1,4720 e máximo de 1,4753, para Di Giacomo *et al.* (1994), a densidade a $15 \text{ }^\circ\text{C}$ foi de 0,8572 e 0,8590 e para o índice de refração a $15 \text{ }^\circ\text{C}$ o mínimo foi de 1,4734 e o máximo de 1,4765 e Oliveira *et al.* (2010), a densidade $0,85 \text{ g.mL}^{-1}$, 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.

5.2- AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE EXTRAÇÃO E RENDIMENTO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

As extrações dos óleos essenciais foram realizadas num tempo de 05 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 5.1). 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.



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 5.1. Cinética referente ao rendimento de extração dos óleos em função do tempo, com massa de 30g e temperatura de 100°C.

Os rendimentos m/m foram calculados mediante a quantidade de óleo extraído, da massa e da densidade, para a *Pimenta dioica* Lindl foi de 1,80 %, para o *zingiber officinale* Roscoe de 0,71 % e para o *Citrus limon* Linneo de 0,96 %.

Ao extrair o óleo essencial do rizoma do gengibre, Martins, André (2009), obteve um rendimento de 0,37 % para um tempo de 4 horas, Tripathi, Dubey e Shukla (2008) de 0,8 % e Maia, Bovi e Duarte (2005) num tempo de 7 horas ficou no intervalo de 0,56-0,92 %. Já para o óleo da *Pimenta* dióica Lindl, Mouchrek Filho (2000), Ribeiro (2009) e Sobrinho (2007) obtiveram rendimento respectivamente de 2,3 %, 2,5 % e 2,9 %. Os valores dos rendimentos óleos essenciais estudados apresentam-se próximo ao da literatura.

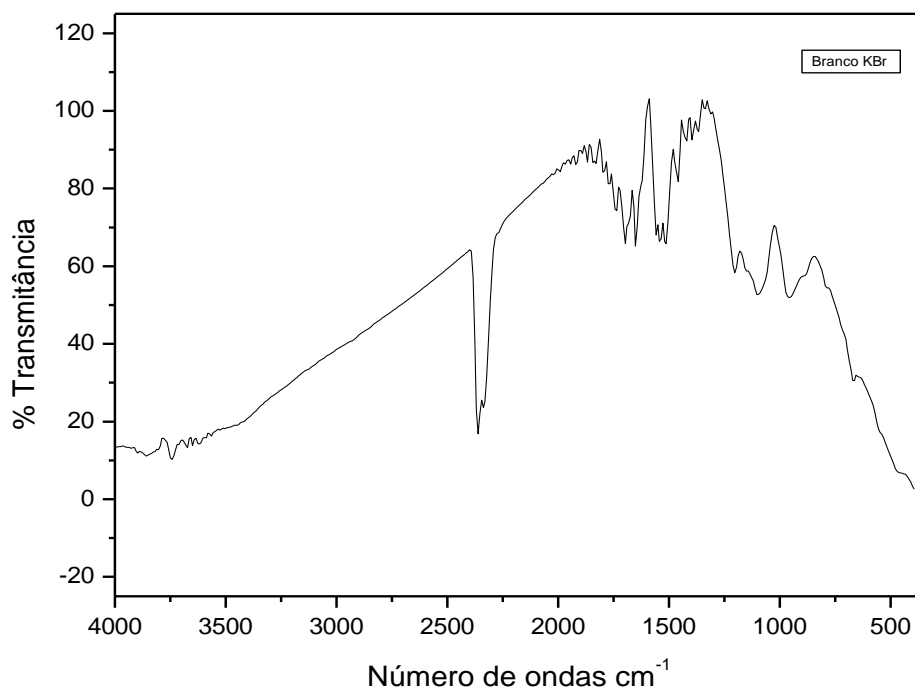
Conforme Özcan e Chalchat (2002), a variação sazonal e a localidade são fatores importantes para diferentes variedades de plantas com relação aos rendimentos de extração encontrados na literatura.

5.3- 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.

5.3.1- Branco com Brometo de potássio (KBr)

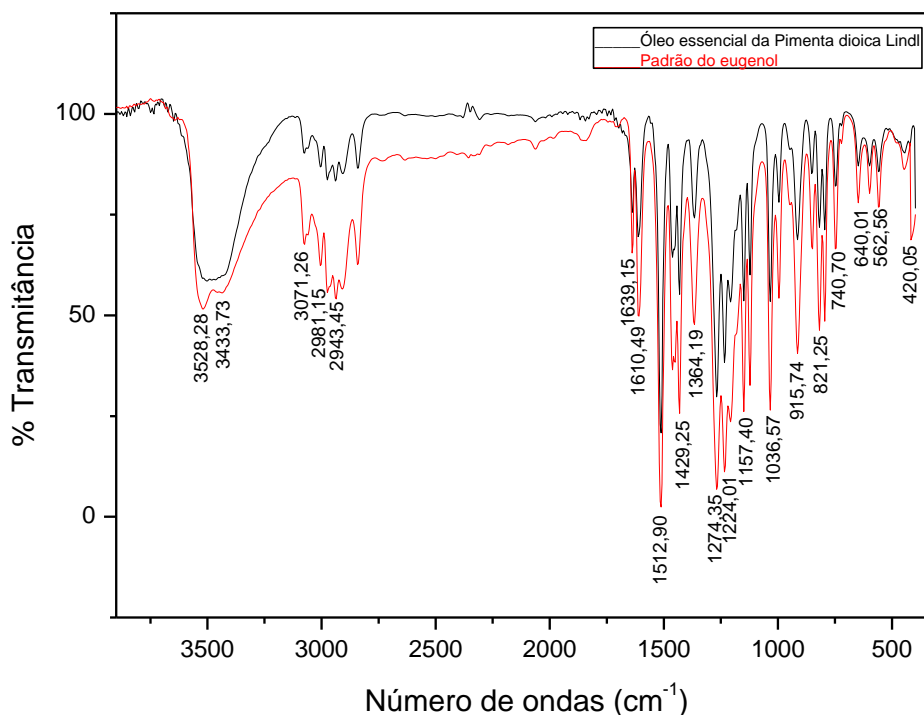
Para o branco foi utilizado o sal anidro altamente purificado de KBr por não absorver radiação infravermelha, com isso as únicas linhas espectrais a aparecer virão do analíto. O espectro do branco com KBr pode ser observado na Figura 5.2.



Fonte: Dados da pesquisa
Figura 5.2. Espectro do branco KBr.

5.3.2- *Pimenta dioica* Lindl

Os espectros do padrão de eugenol e do óleo essencial extraídos das folhas de *Pimenta dioica* Lindl na região do infravermelho podem ser visto na Figura 5.3. Comparando os espectros observa-se que existe semelhança em todas as bandas de absorção nas mesmas frequências.



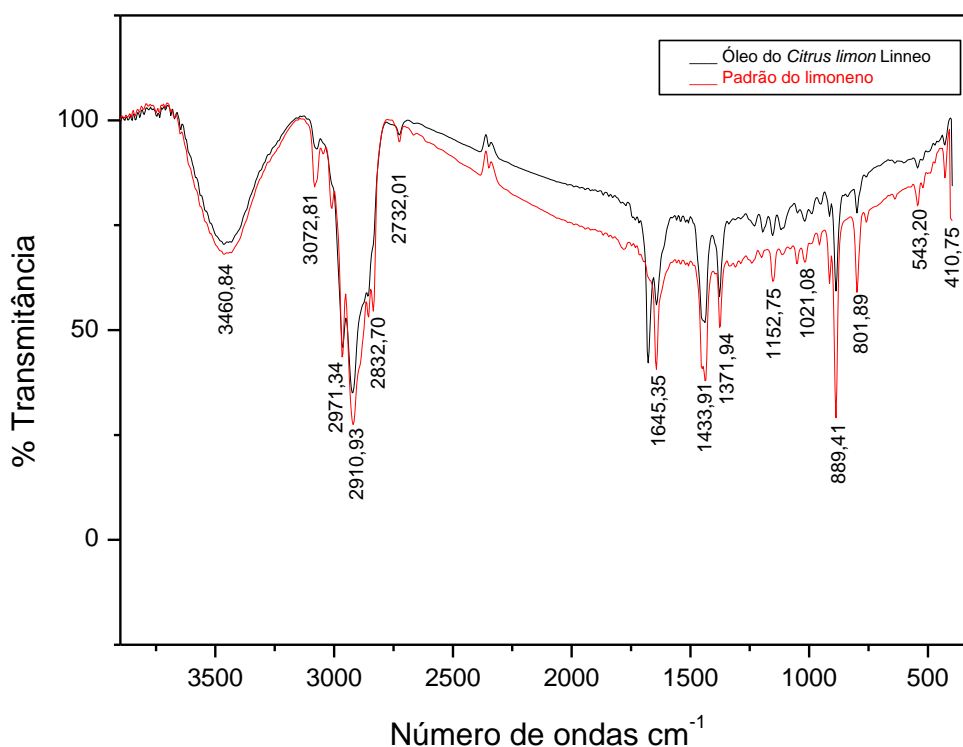
Fonte: Dados da pesquisa

Figura 5.3. Espectros na região do infravermelho do padrão de eugenol e óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl.

Pode-se observar na Figura 5.3 uma forte banda de absorção na região de 3500 cm^{-1} , correspondente ao estiramento O-H, confirmando a presença majoritária do eugenol, quando comparado ao padrão. O estiramento observado em 3071 cm^{-1} referente ao grupo $=\text{CH}-\text{H}$. As bandas na região de 2943 e 2981 cm^{-1} são atribuídas, respectivamente, à deformação axial assimétrica e simétrica do grupo CH_2 , em 1639 cm^{-1} deformação axial referente ao grupo $\text{C}=\text{C}$ do alceno, em 1610 e 1512 cm^{-1} deformação axial $\text{C}=\text{C}$ do anel aromático, o estiramento da ligação $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ é devido a banda observada em 1274 cm^{-1} referente a deformação axial do plano do grupo metoxi, em 1036 cm^{-1} banda referente ao grupo $\text{C}-\text{H}$ aromático e em 740 cm^{-1} banda é atribuída à deformação angular fora do plano referente ao grupo $\text{C}-\text{H}$ do anel aromático (SILVERSTEIN et al., 2007; PEREIRA e MAIA, 2007).

5.3.3- *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 5.4, onde a semelhança das bandas de absorção nas mesmas frequências indica a presença de limoneno, como sendo o composto majoritário do óleo essencial.



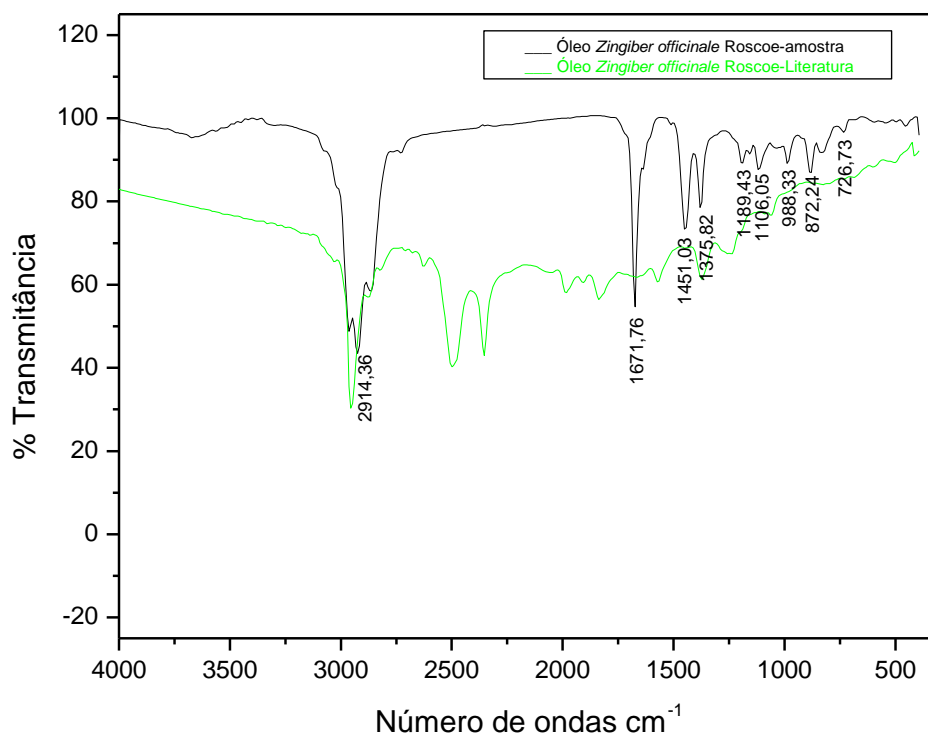
Fonte: Dados da pesquisa

Figura 5.4. Espectros na região do infravermelho do padrão do limoneno e óleo essencial do *Citrus limon* Linneo.

As bandas de absorção compreendida nas regiões de 2832 a 3460 cm^{-1} na Figura 5.4 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^{-1} (SILVERSTEIN, R.M; WEBSTER, F. X; KIEMLE, D.J. 2007).

5.3.4- *Zingiber officinale* Roscoe

Os espectros na região do infravermelho do óleo essencial extraído do rizoma do gengibre em estudo e do óleo do gengibre retirado da literatura podem ser observados na Figura 5.5.



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 5.5. Espectros na região do infravermelho do óleo essencial do *Zingiber officinale* Roscoe da literatura e do *Zingiber officinale* Roscoe em estudo.

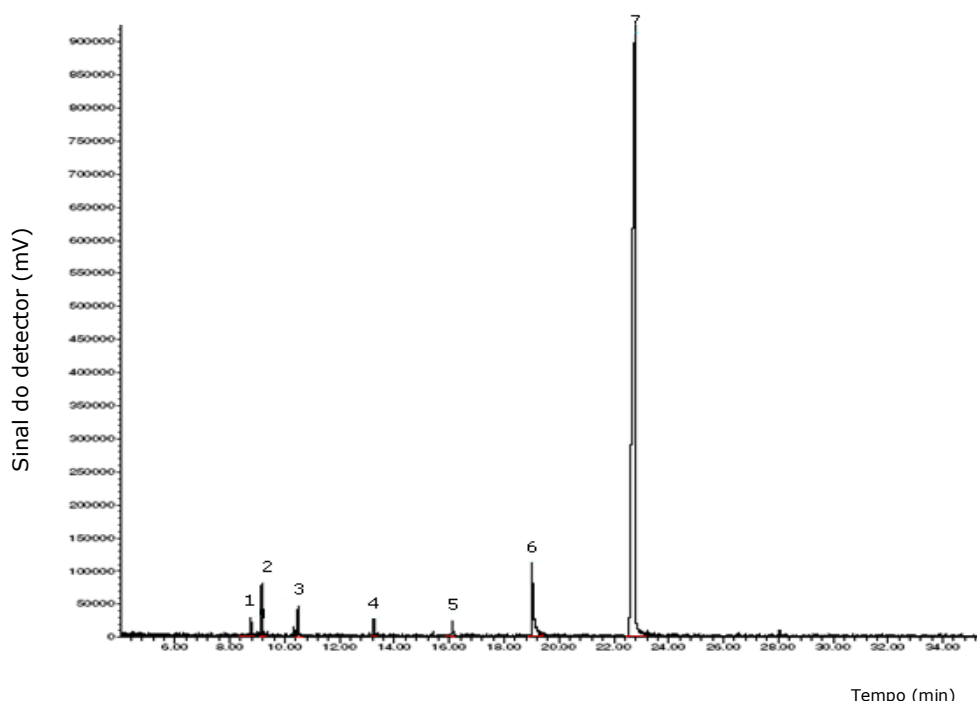
A Figura 5.5, mostra as bandas de absorção na região de 2914 cm^{-1} é atribuída a estiramento C—H fortes resultantes de vibrações de alquenos. Na região compreendida 1671 a 726 cm^{-1} é decorrente de deformação angular simétrica do plano de =C-H de alquenos (SILVERSTEIN, R.M; WEBSTER, F. X; KIEMLE, D.J. 2007).

5.4- 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.

5.4.1- Óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl

O cromatograma do óleo essencial extraído das folhas de *Pimenta dioica* Lindl obtido na análise de CG/EM pode ser observado na Figura 5.6. Os picos cromatográficos foram identificados através da comparação dos respectivos espectros de massa com os dados das espectrotecas (1) WILEY 139; (2) NIST107 e (3) NIST21.



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 5.6. Cromatograma da amostra do óleo extraído das folhas da *Pimenta dioica* Lindl, apresentando os picos selecionados e identificados através da comparação dos respectivos espectros de massa com a espectroteca NIST21.

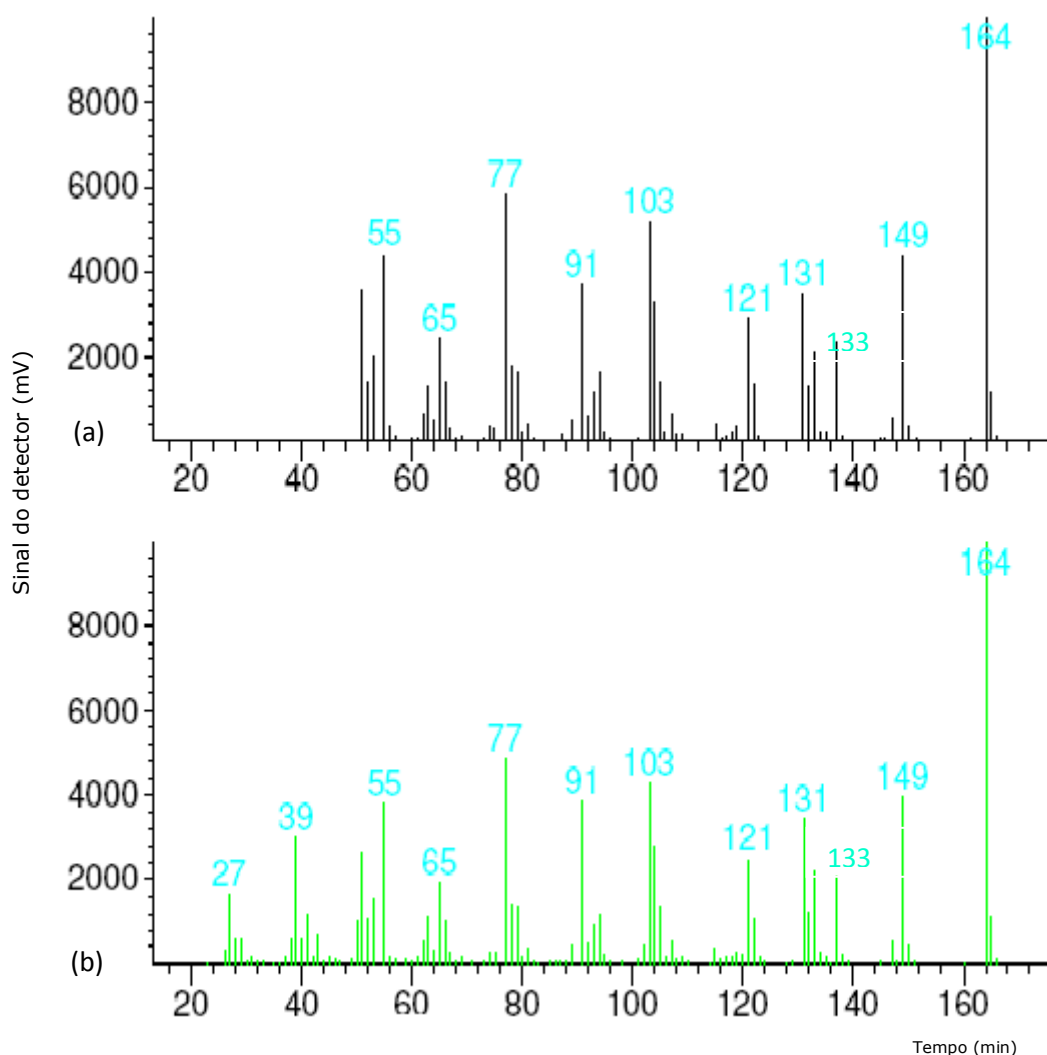
De acordo com os resultados apresentados na tabela 5.2, os compostos identificados no óleo essencial extraídos das folhas da *Pimenta dioica* Lindl estão em ordem de tempo de retenção, observa-se 07 componentes na amostra, sendo o constituinte majoritário o eugenol com 85,673 %.

Tabela 5.2. Compostos identificados na amostra do óleo essencial extraído da *Pimenta dioica* Lindl.

Pico ¹	² tr (min.)	Componentes	Teor (%)
1	8,772	Octenol	1,186
2	9,164	Mirceno	2,762
3	10,488	Limoneno	1,730
4	13,251	Linalol	0,884
5	16,122	Terpineol	0,973
6	19,026	Chavicol	6,792
7	22,755	Eugenol	85,673

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

A Figura 5.7 mostra o espectro de massas correspondente ao constituinte majoritário identificado no óleo essencial e os possíveis fragmentos.



Fonte: Dados da pesquisa

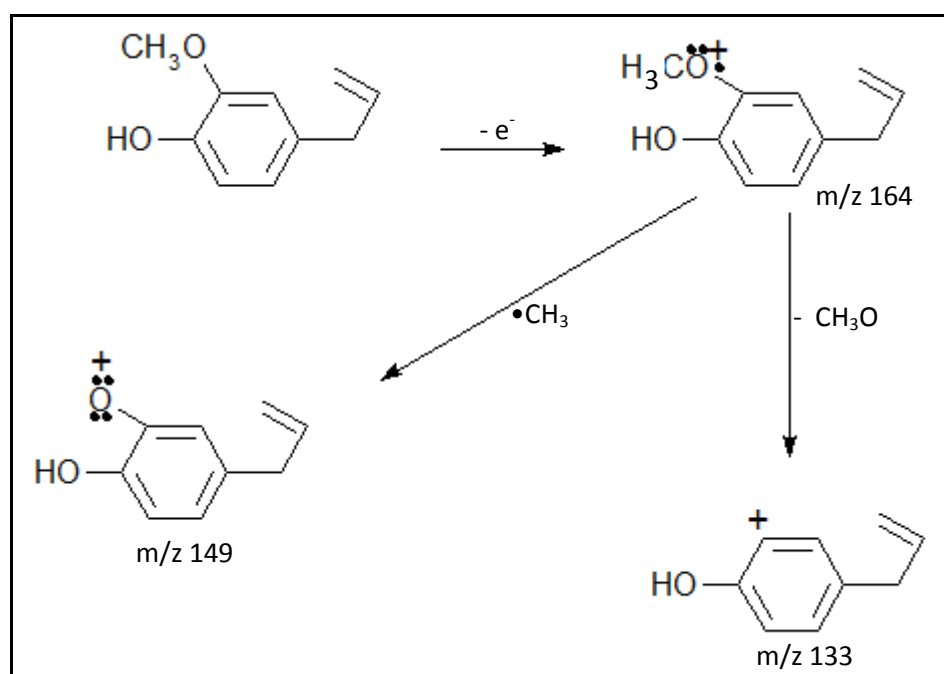
Figura 5.7. Espectros de massas: (a) Composto majoritário da amostra do Óleo essencial extraído da *Pimenta díóica* Lindl referente ao pico 7 do cromatograma da Figura 5.6 (b) Proposta de identificação através da espectroteca NIST21.

O pico intenso com m/z 164, correspondente à fórmula $C_{10}H_{12}O_2$ mostra a presença majoritária do componente eugenol no óleo, e conforme SILVERSTEIN et al. (2007) os fenóis apresentam um pico intenso correspondente ao íon molecular, o que facilita a sua identificação

Segundo SILVERSTEIN et al. (2007) a quebra de fenóis e éteres aromáticos mostram ainda picos típicos, sendo o pico m/z 149

característico da perda do radical metila (CH_3^\bullet) e os picos m/z 77 e m/z 65 são correspondentes aos íons $[\text{C}_6\text{H}_5^+]$ e $[\text{C}_5\text{H}_5^+]$, respectivamente, originados por rearranjo com a saída do grupo CO; já o fragmento com pico em m/z 133 é referente à perda do grupo OCH_3 do éter.

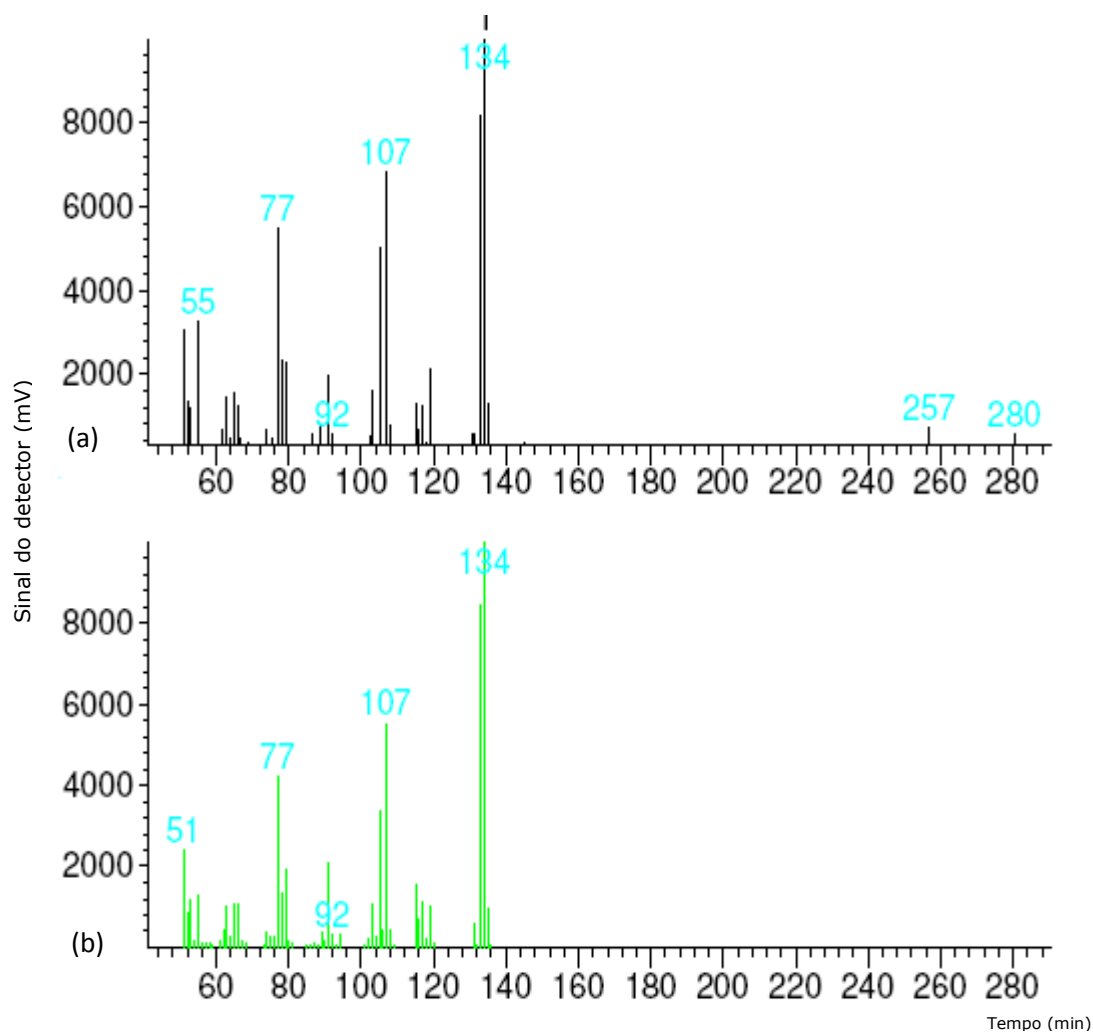
Conforme CORTEZ et al. (1998) o mecanismo de fragmentação dos principais picos característicos formados pelo eugenol são mostrados na Figura 5.8.



Fonte: Cortez (1998)

Figura 5.8. Fragmentação do eugenol.

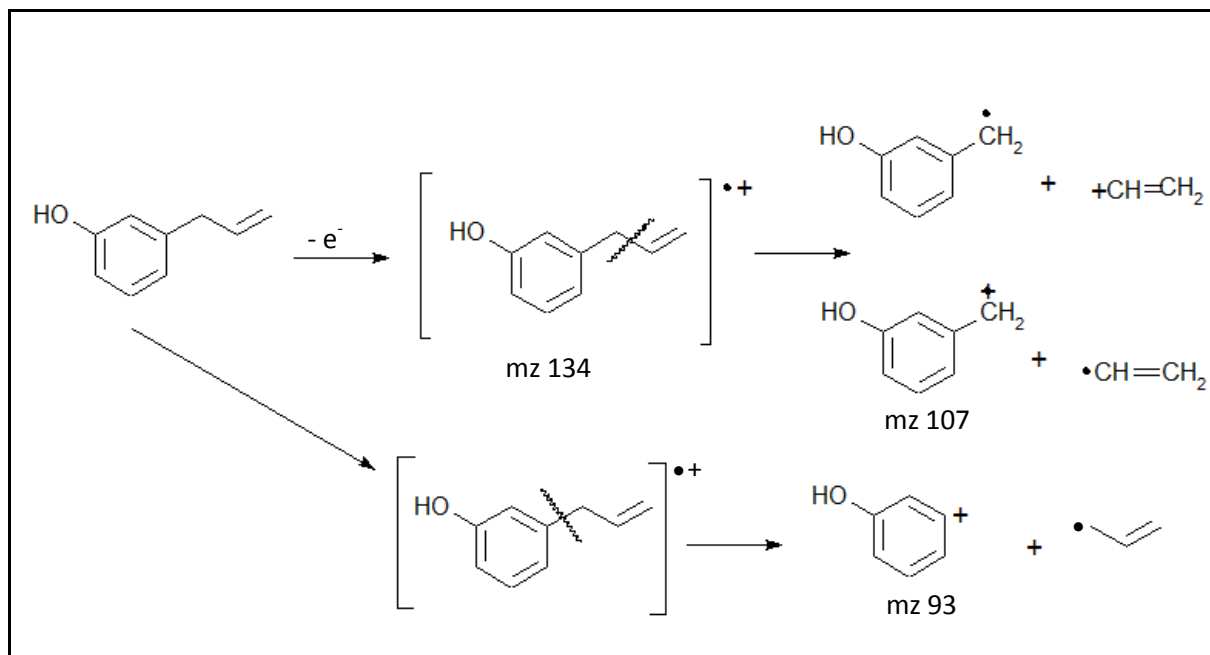
O espectro de massas observado na Figura 5.9 corresponde ao constituinte chavicol referente ao pico 6 da Figura 5.6 com os possíveis fragmentos.



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 5.9. Espectros de massas: (a) Composto da amostra do óleo essencial extraído da *Pimenta dióica* Lindl referente pico 6 do cromatograma da Figura 5.6 (b) Proposta de identificação através da espectroteca NIST21.

O mecanismo de fragmentação dos principais picos característicos formados pelo chavicol podem ser observados na Figura 5.10.

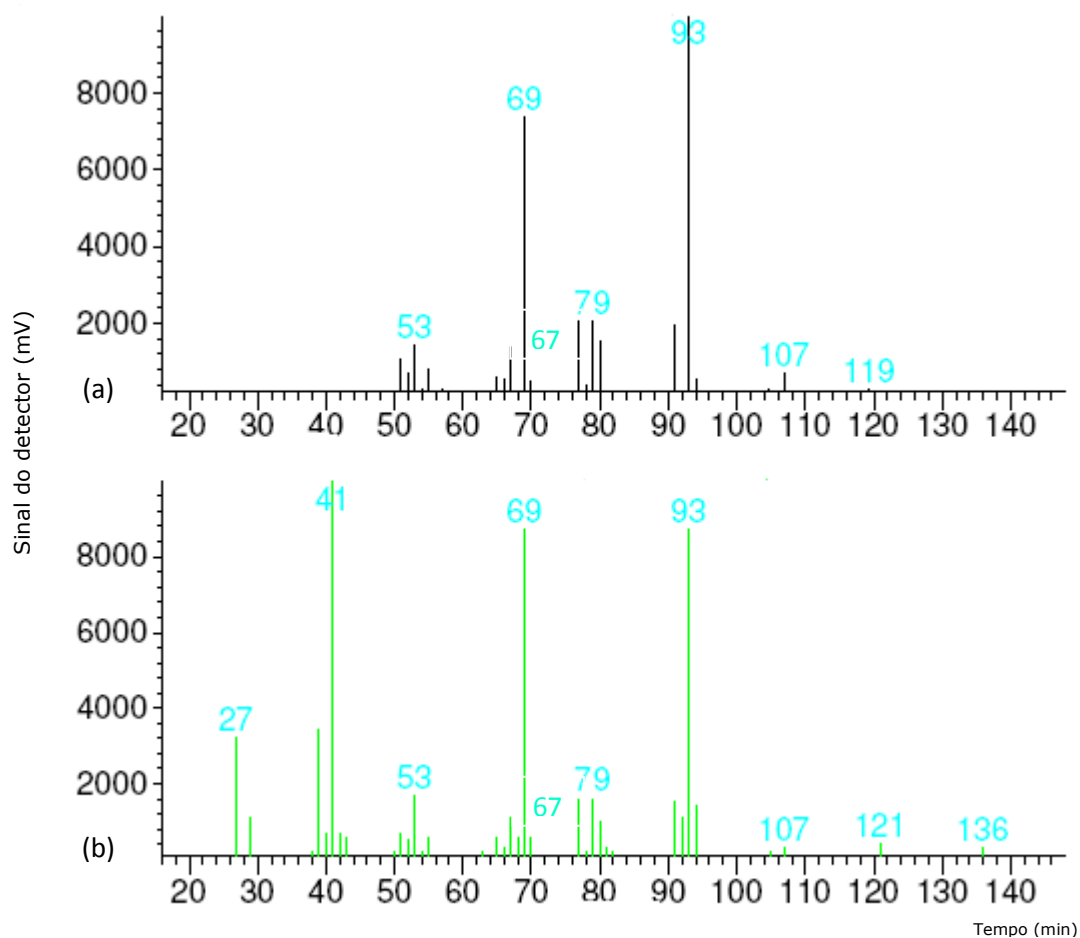


Fonte: O autor

Figura 5.10. Fragmentação do chavicol.

O pico intenso com m/z 134, correspondente à fórmula $C_9H_{10}O$ referente ao composto chavicol, segundo SILVERSTEIN et al. (2007) um pico de íon molecular intenso facilita a identificação de fenóis. Sendo o pico m/z 107 característico da perda do grupo ($-C_2H_3$), conforme SILVERSTEIN et al. (2007) é eliminado muito mais facilmente do que um átomo de hidrogênio α e os picos m/z 92 e m/z 77, são característico da perda do radical metila (CH_3^\bullet)

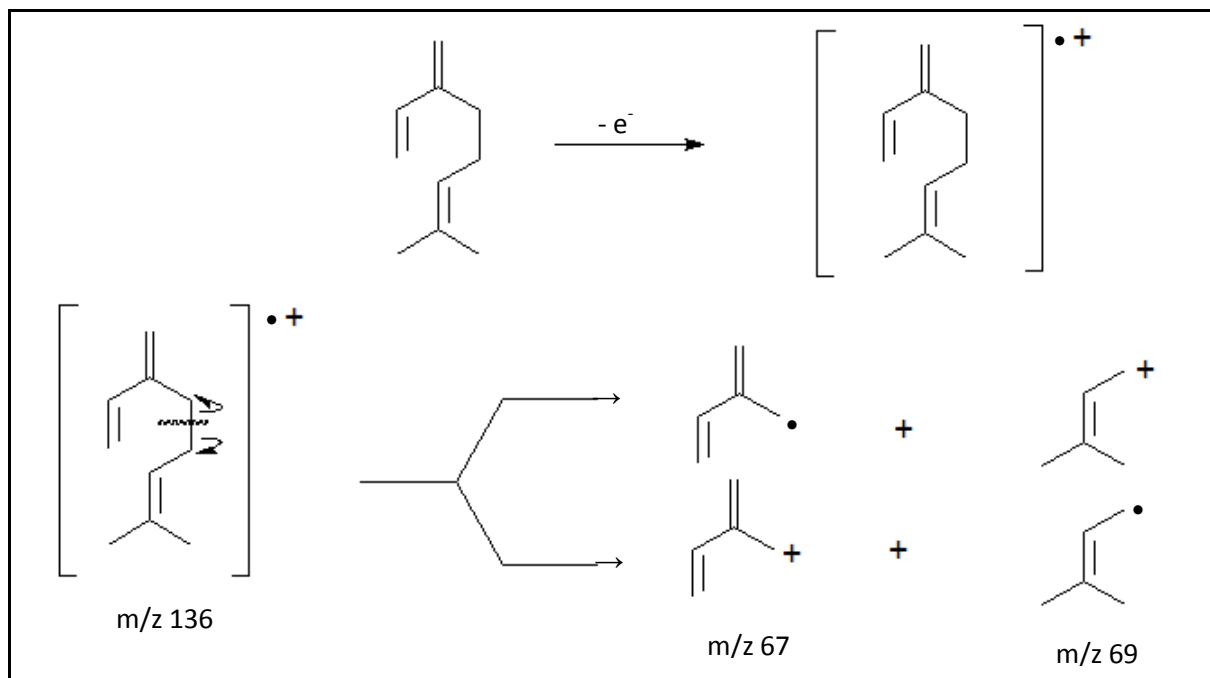
O espectro de massas do componente identificado como β -mirceno, correspondente ao pico 2 da Figura 5.6 pode ser observado na Figura 5.11.



Fonte: Dados da pesquisa

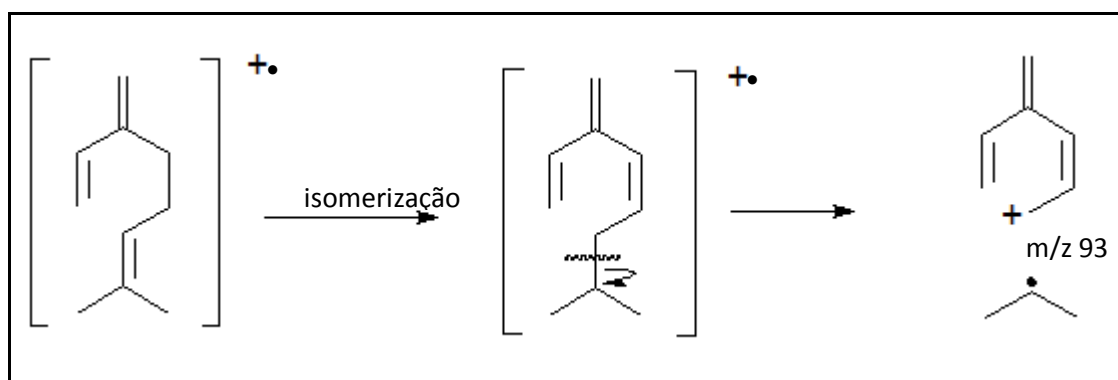
Figura 5.11. Espectros de massas: (a) Composto da amostra do óleo essencial extraído da *Pimenta dióica* Lindl referente o pico 2 do cromatograma da Figura 5.6 (b) Proposta de identificação através da espectroteca NIST21.

Os picos correspondentes a m/z 69 e m/z 67 cujas fórmulas $C_5H_9^+$ e $C_5H_7^+$, respectivamente, são resultantes de clivagem bialílica (Figura 5.12).



Fonte: O autor
Figura 5.12. Clivagem bialflica

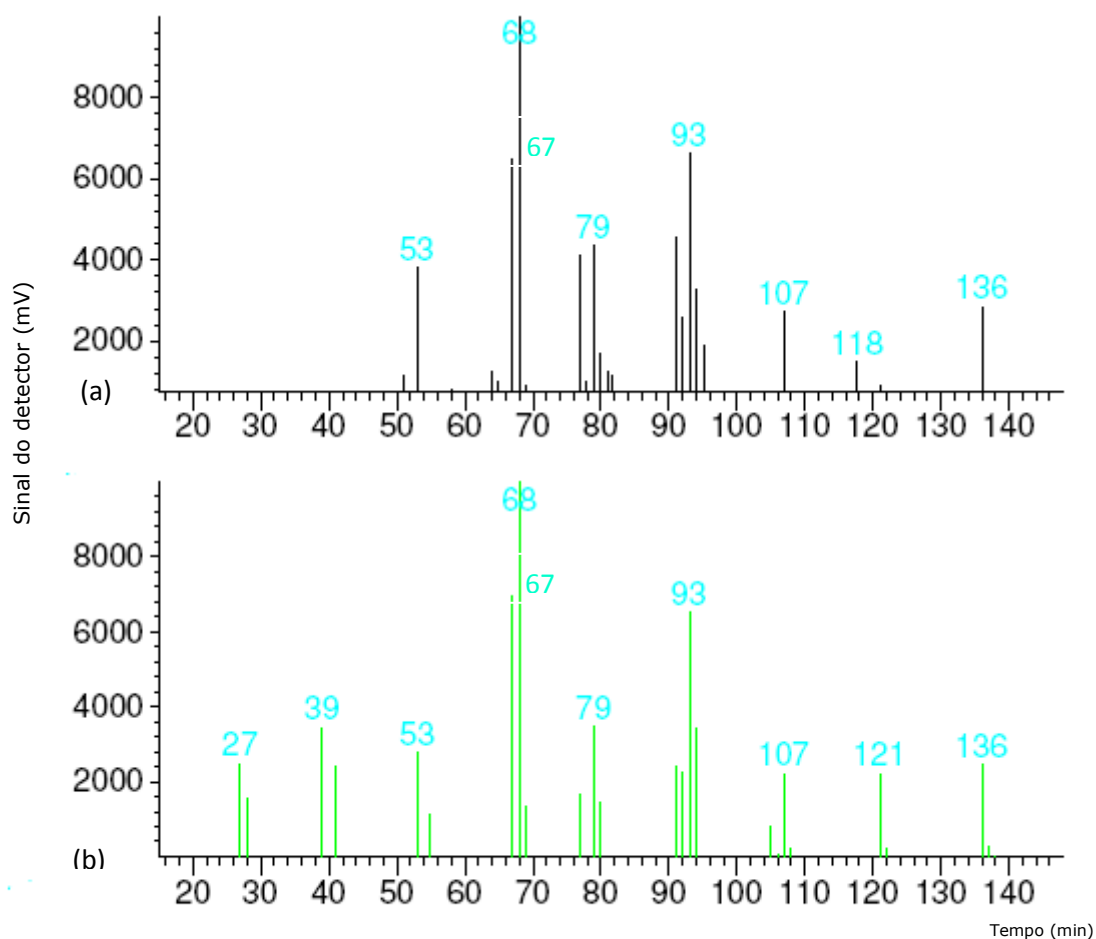
A estrutura de fórmula $C_7H_9^+$ formada por isomerização (provocada pelo aumento da conjugação) seguida por clivagem alflica é comprovada pela formação do pico em m/z 93, conforme SILVERSTEIN et al. (2007) (Figura5.13).



Fonte: O autor
Figura 5.13. Clivagem alflica

De acordo com o banco de dados da espectroteca e espectro de massa padrão constante na literatura (ADAMS, 2007), o pico 3 da

Figura 5.6 corresponde ao limoneno, $C_{10}H_{16}$, evidenciado pela presença do íon molecular m/z 136 observado no espectro de massa da Figura 5.14.

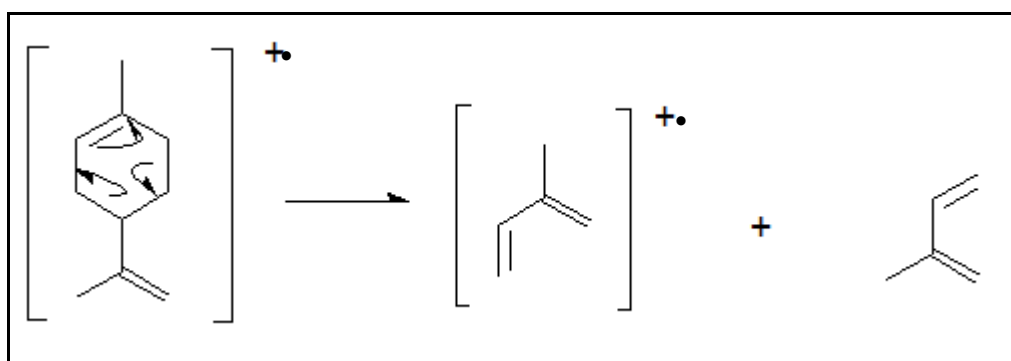


Fonte: Dados da pesquisa

Figura 5.14. Espectros de massas: (a) Composto da amostra do óleo essencial extraído da *Pimenta dióica* Lindl referente o pico 3 do cromatograma da Figura 5.6 (b) Proposta de identificação através da espectroteca NIST21.

O referido espectro mostra ainda o pico em m/z 121 que é referente à perda do grupo metila, enquanto que o pico em m/z 93 pode ser decorrente da estrutura $C_7H_9^+$ que é formada por isomerização, seguida de clivagem alílica. O aparecimento do pico em

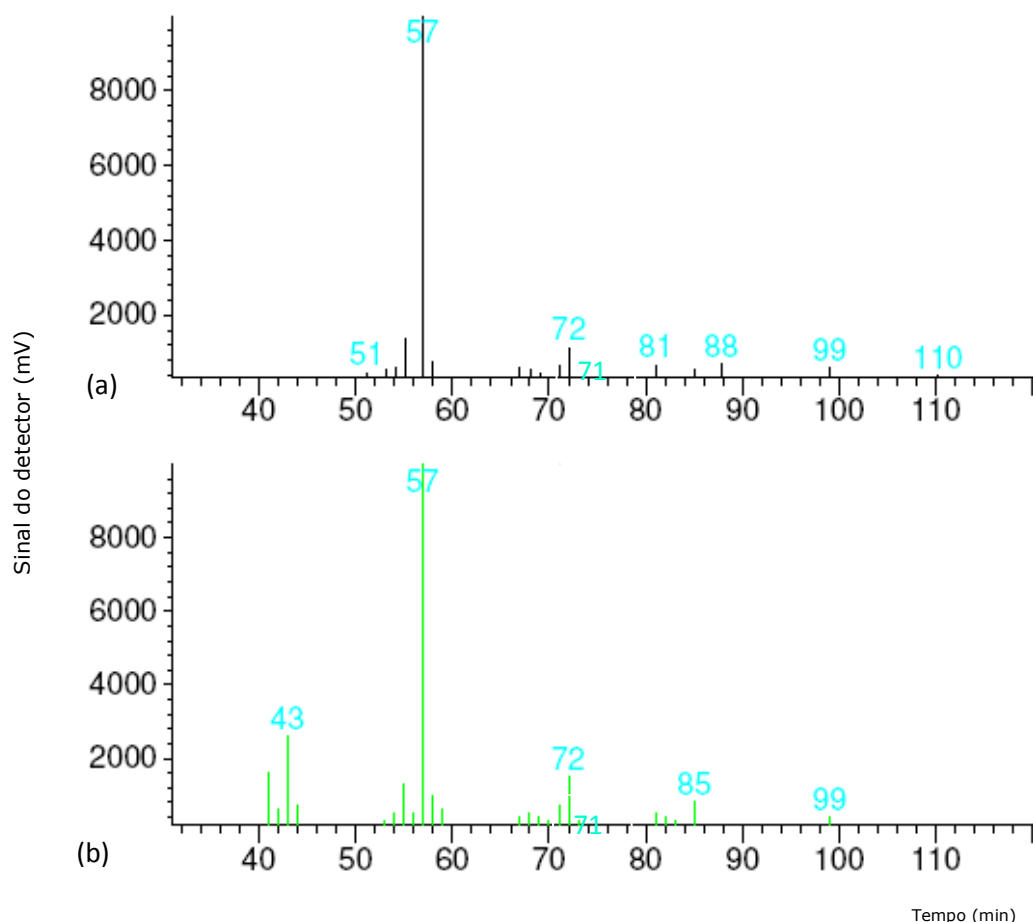
m/z 67 é atribuído ao fragmento $C_5H_7^+$ resultante de clivagem alílica, enquanto que o pico em m/z 68 ($C_5H_8^+$) pode ser decorrente da quebra das ligações carbono-carbono semelhantemente à reação *retro*-Diels-alder, o qual é bastante comum em alquenos cíclicos, sendo que resulta ainda numa molécula neutra, conforme demonstrado na Figura 5.15 (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).



Fonte: O autor

Figura 5.15. Ocorrência da reação de *retro*-Diels-Alder na fragmentação do limoneno.

A Figura 5.16 mostra o espectro de massa do pico 1, da Figura 5.6, identificado como 1-octen-3-ol de fórmula $C_8H_{16}O$ e massa molar igual a 128 g/mol, de acordo com a espectroteca NIST21 e comparado com os dados da literatura (RAMONI *et al.*, 2001; ADAMS, 2007).



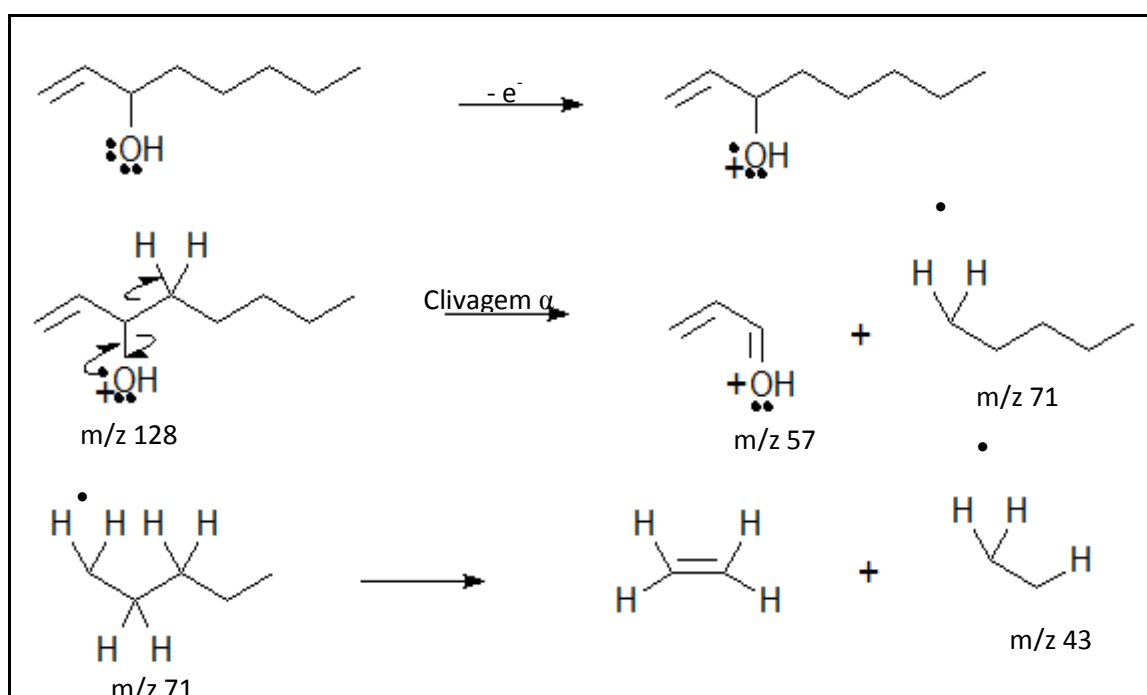
Fonte: Dados da pesquisa

Figura 5.16. Espectros de massas: (a) Composto da amostra do óleo essencial extraído da *Pimenta dióica* Lindl referente o pico 1 do cromatograma da Figura 5.6 (b) Proposta de identificação através da espectroteca NIST21.

A substância oct-1-en-3-ol é um álcool secundário, o que justifica o não aparecimento do pico correspondente ao íon molecular m/z 128, conforme previsto na literatura. No entanto, observa-se o pico característico m/z 57 do íon $[H_2C=CH-CH=HO]^+$, o qual é decorrente da quebra da ligação carbono-carbono vizinho ao átomo de oxigênio com liberação do maior grupo, ou seja, o radical $[CH_3-(CH_2)_3-H_2C]^+$. Este último por se tratar de um fragmento longo, sofre ainda fragmentação semelhantemente aos alcenos com liberação de grupo metileno, resultando no pico m/z 43.

Buhr e colaboradores (2002) comentam que durante o processo de fragmentação o 1-octen-3-ol é protonado e sofre ressonância de estabilização com perda de água originando o íon $[\text{CH}_3\text{-C}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_4\text{-CH}_3]^+$ com pico em m/z 111, que por sua vez sofre fragmentação resultando em outro íon característico em m/z 69 ($\text{MH}^+ - \text{H}_2\text{O} - \text{C}_3\text{H}_6$). Já o pico m/z 99 é atribuído à saída do grupo etil ($\text{SILVERSTEIN, et al., 2007}$).

A Figura 5.17 mostra os principais íons formados na fragmentação do 1-octen-3-ol protonado (BUHR *et al.*, 2002).

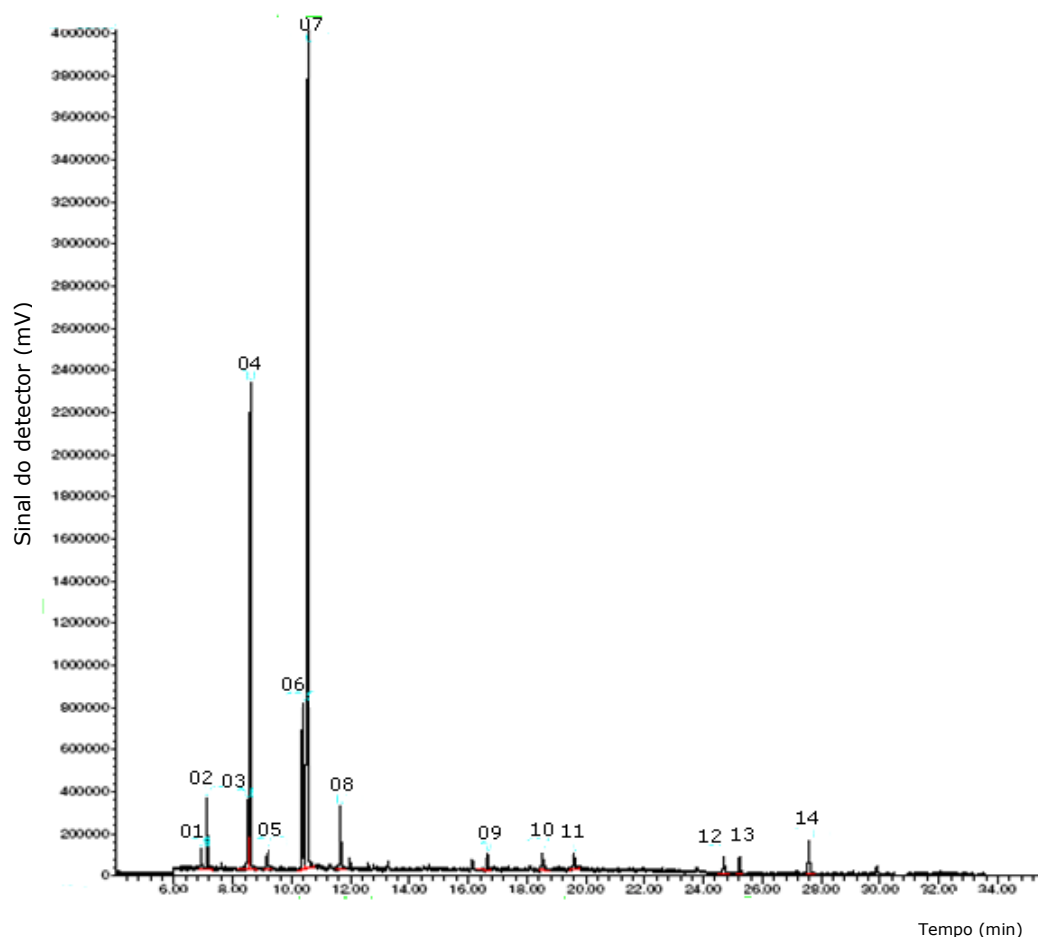


Fonte: O autor (2010)

Figura 5.17. Fragmentação do 1-octen-3-ol protonado.

5.4.2- Óleo essencial do *Citrus limon* Linneo

O cromatograma do óleo essencial extraídos das cascas de *Citrus limon* Linneo pode ser observado na Figura 5.18.



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 5.18. 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.

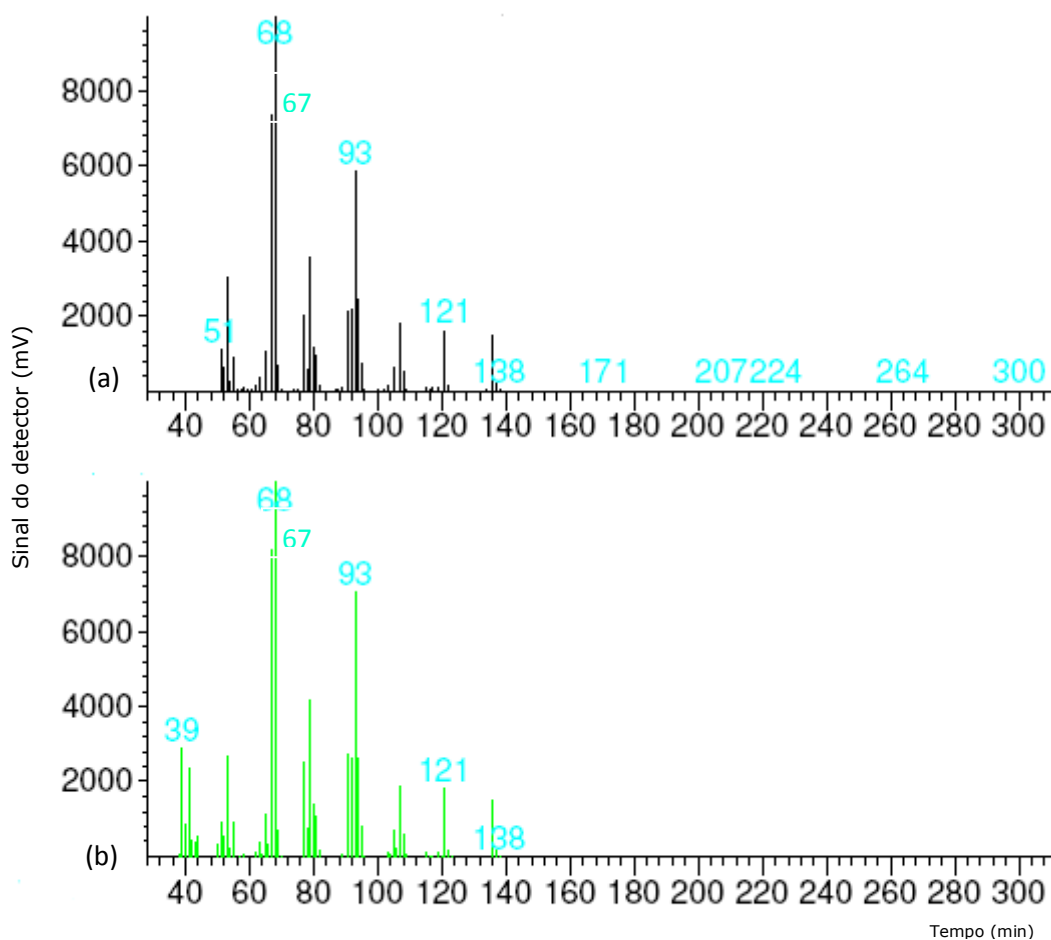
Na tabela 5.3, podemos observar os constituintes identificados no óleo essencial do *Citrus limon* Linneo em ordem de tempo de retenção, observa-se 14 componentes na amostra, sendo o constituinte majoritário o limoneno com 48,996 %.

Tabela 5.3. Compostos identificados na amostra do *Óleo Essencial* extraídos das cascas de *Citrus limon* Linneo

Pico ¹	² tr (min.)	Componentes	Teor(%)
1	6,923	Tujeno	0,880
2	7,126	α -Pino	3,041
3	8,504	Sabineno	3,255
4	8,592	β -Pino	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	β -Citral (Neral)	1,393
11	19,595	α -Citral (Geranial)	1,152
12	24,688	Nerolidol	1,207
13	25,236	Bergamoteno	1,024
14	27,586	Bisaboleno	2,056

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

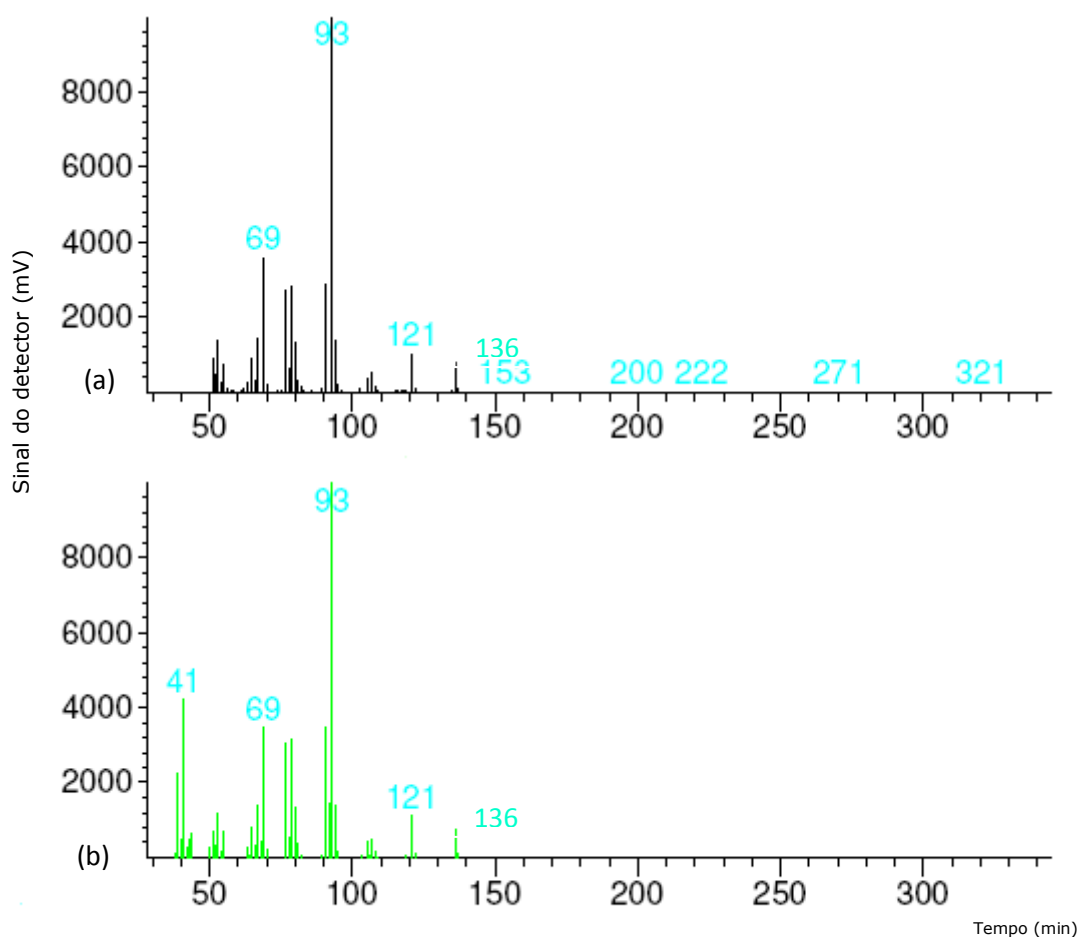
Na Figura 5.19 o espectro de massas corresponde ao constituinte majoritário identificado como limoneno no óleo essencial do *Citrus limon* Linneo e os possíveis fragmentos conforme o banco de dados da espectroteca e espectro de massa padrão constante na literatura (ADAMS, 2007). A fragmentação do limoneno já foi demonstrada na figura 5.14.



Fonte: Dados da pesquisa

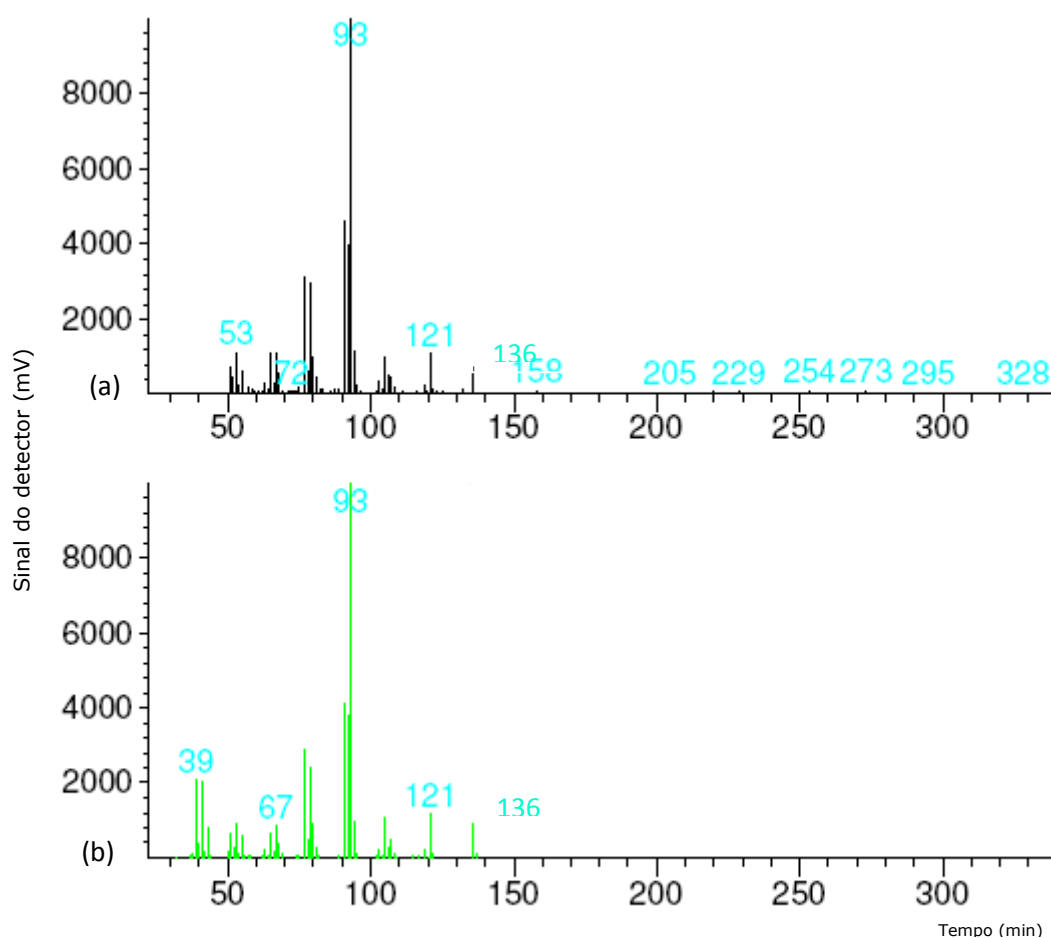
Figura 5.19. Espectros de massas: (a) Composto da amostra do óleo extraído das cascas do *Citrus limon* Linneo referente o pico 7 do cromatograma da Figura 5.18 (b) Proposta de identificação através da espectroteca NIST21.

Na Figura 5.20 e 5.21 refere-se aos espectros de massas corresponde ao constituinte identificado como β -Pineno e α -Pineno respectivamente de fórmula $C_{10}H_{16}$ e massa molecular correspondente a $136 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ segundo a espectroteca e a literatura (FEITOSA *et al.*, 2009; ADAMS, 2007).



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 5.20. Espectros de massas: (a) Composto da amostra do óleo extraído das cascas do *Citrus limon* Linneo referente o pico 4 do cromatograma da Figura 5.18 (b) Propostas de identificação através da espectroteca NIST21.

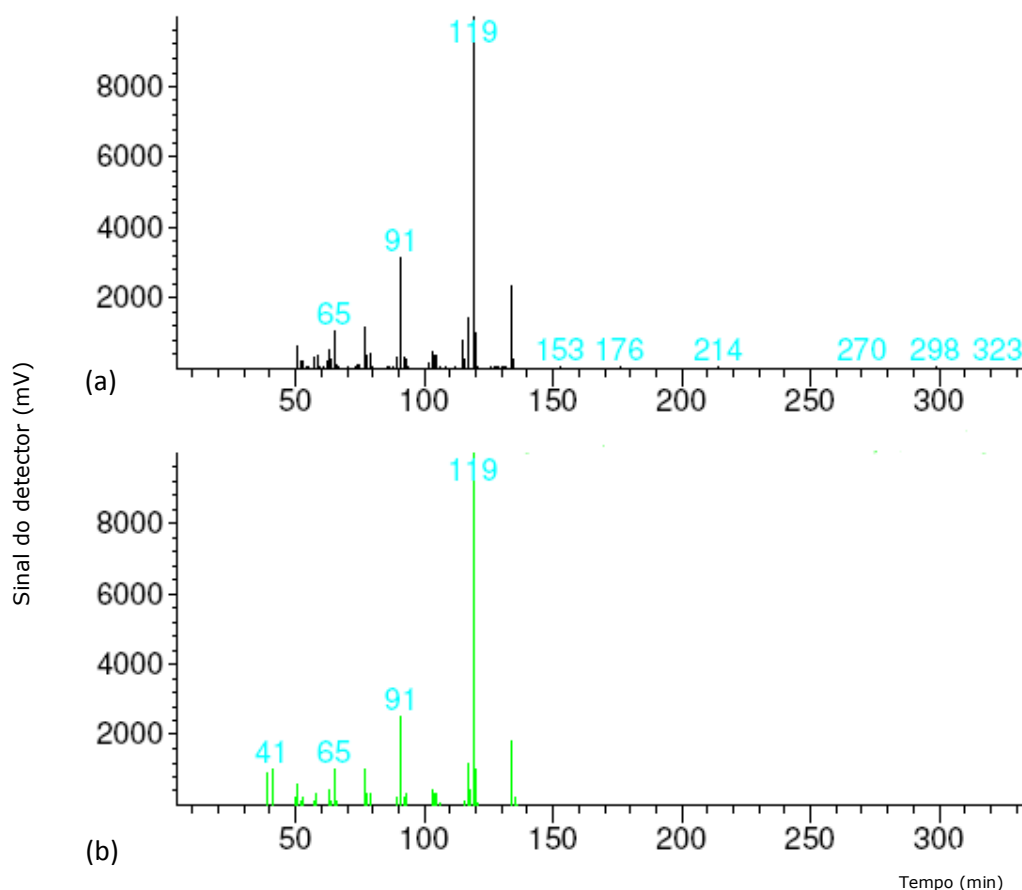


Fonte: Dados da pesquisa

Figura 5.21. Espectros de massas: (a) Composto da amostra do óleo extraído das cascas do *Citrus limon* Linneo referente o pico 2 do cromatograma da Figura 5.17 (b) Proposta de identificação através da espectroteca NIST21.

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 5.18, identificado como etil dimetil benzeno pode ser visto na Figura 5.22.



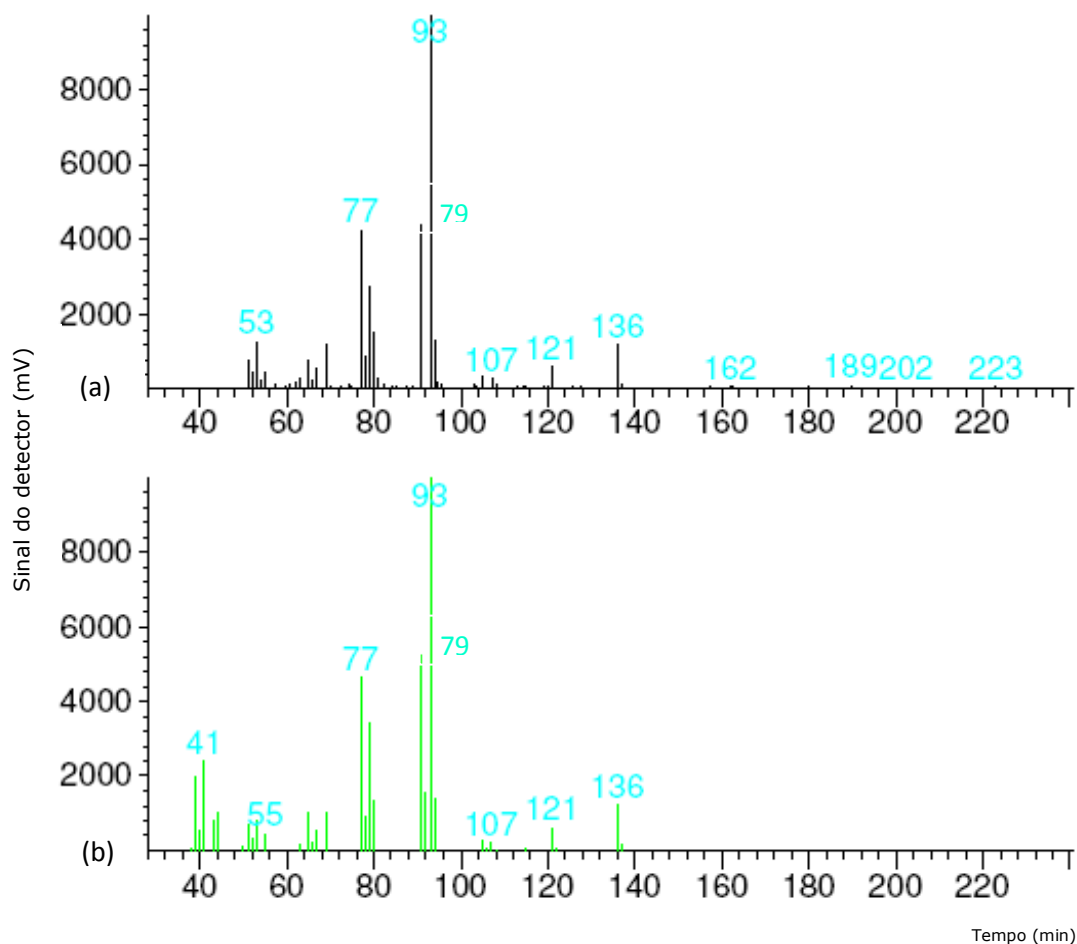
Fonte: Dados da pesquisa

Figura 5.22. Espectros de massas: (a) Composto da amostra do óleo extraído das cascas do *Citrus limon* Linneo referente o pico 6 do cromatograma da Figura 5.18 (b) Proposta de identificação através da espectroteca NIST21.

De acordo com a fragmentação do composto etil dimetil 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 5.23 o espectro de massas corresponde ao constituinte identificado como Sabineno e os possíveis fragmentos

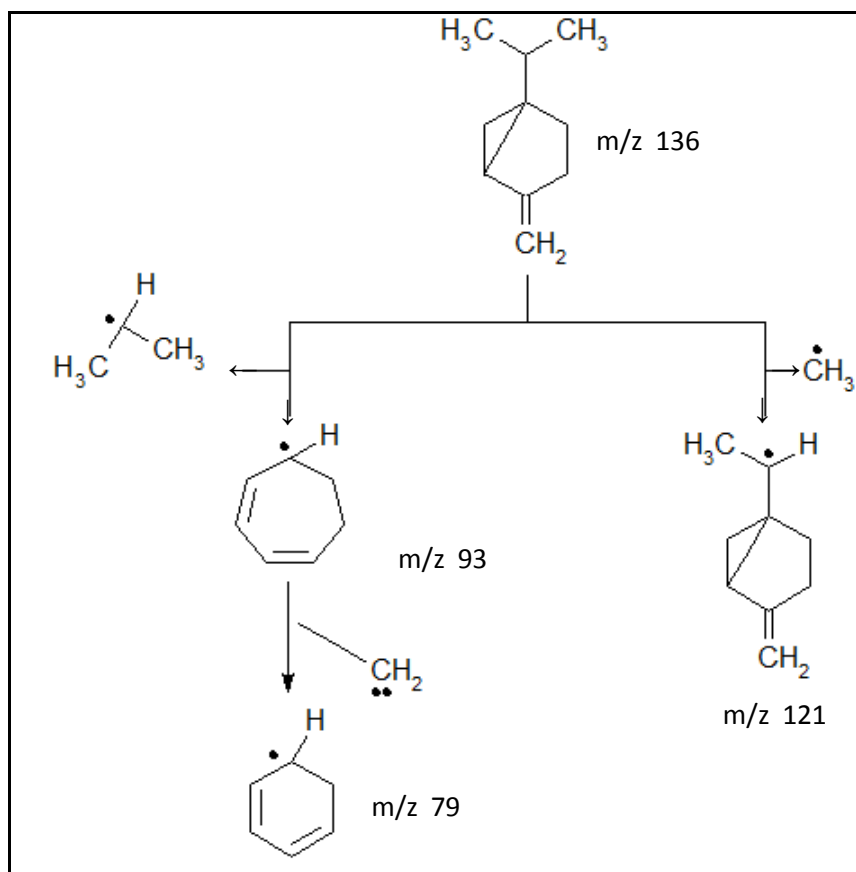


Fonte: Dados da pesquisa

Figura 5.23. Espectros de massas: (a) Composto da amostra do óleo extraído das cascas do *Citrus limon* Linneo referente o pico 3 do cromatograma da Figura 5.18 (b) Proposta de identificação através da espectroteca NIST21.

A fragmentação do sabineno pode ser observada na Figura 5.24, 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.

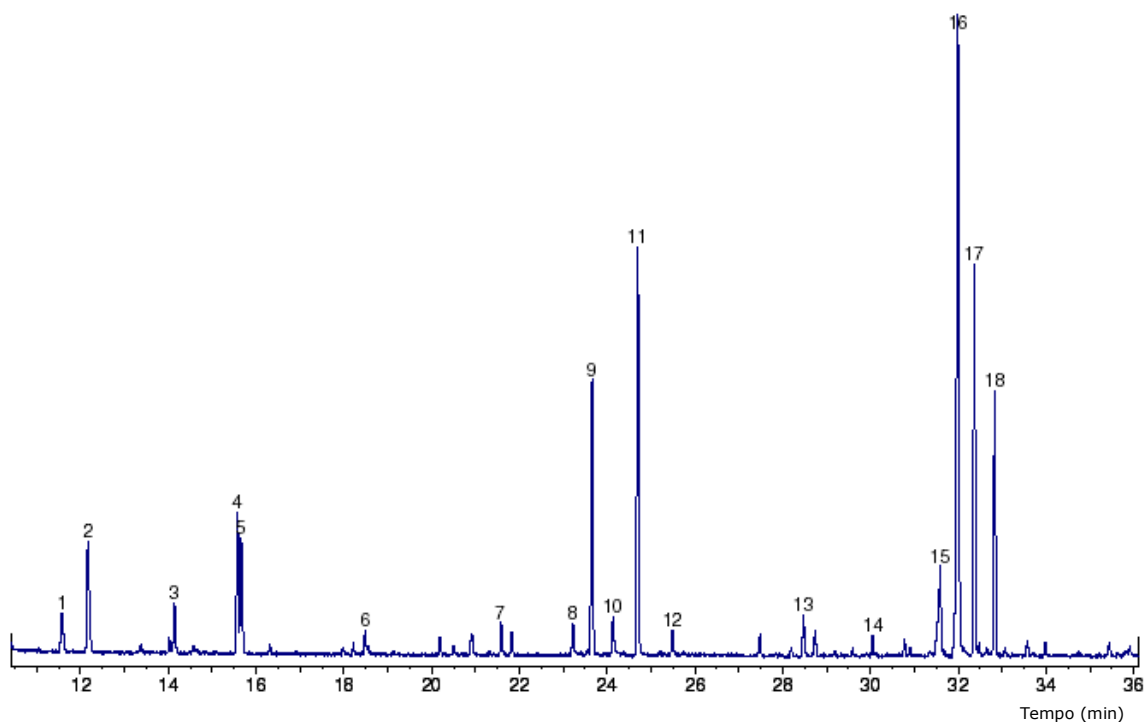


Fonte: MATA (2003)

Figura 5.24. Fragmentação do sabineno.

5.4.3- Óleo essencial do *zingiber officiale* Roscoe

Os espectros obtidos na CG/EM, a comparação com os dados da biblioteca do instrumento e a dedução dos fragmentos dos compostos voláteis no óleo essencial extraído do rizoma de *zingiber officiale* Roscoe podem ser observados na Figura 5.25.



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 5.25. Cromatograma da amostra do óleo extraído do rizoma do *Zingiber officiale* Roscoe, apresentando os picos selecionados e identificados através da Comparação dos respectivos espectros de massas com a espectroteca.

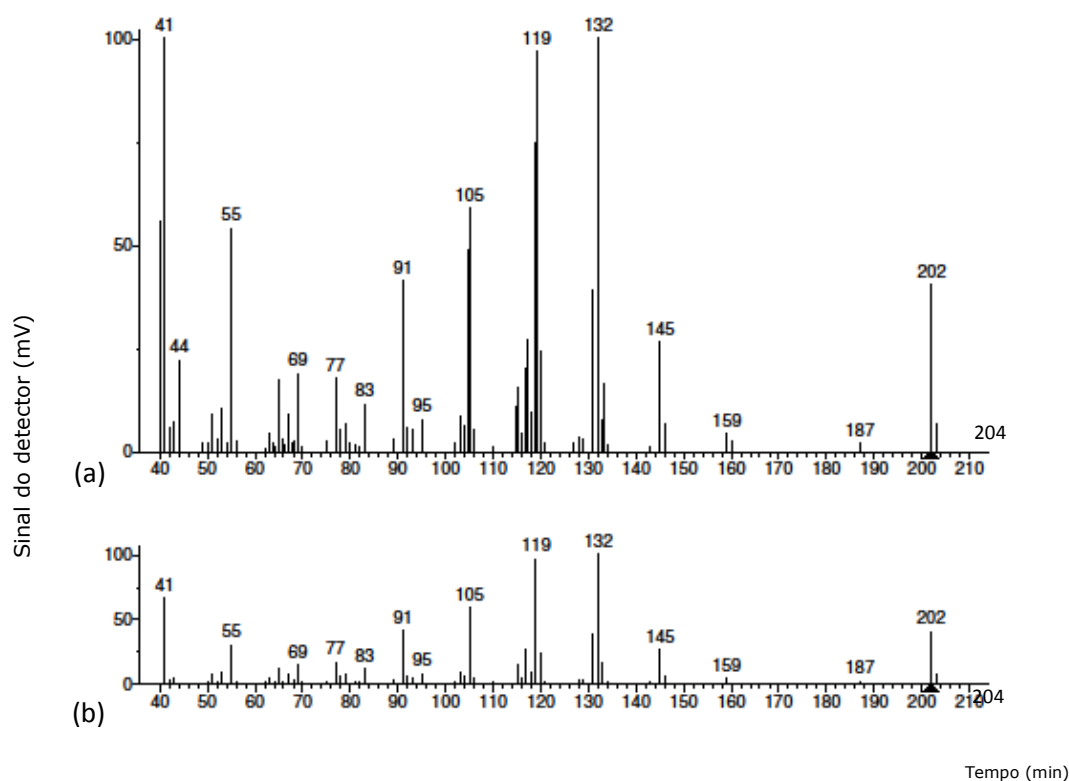
Na tabela 5.4, podemos observar os constituintes identificados no óleo essencial do *Zingiber officiale* Roscoe em ordem de tempo de retenção, observa-se 18 componentes na amostra, sendo o constituinte majoritário o α -Zingibereno com 27,14 %.

Tabela 5.4. Compostos identificados na amostra do óleo essencial extraído do rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe.

Pico ¹	² tr (min.)	Componentes	Teor(%)
1	11,52	α -Pinoeno	1,46
2	12,17	Canfeno	5,02
3	14,14	β -Mirceno	1,29
4	15,76	Sabineno	5,23
5	15,66	1,8-Cineol	4,35
6	18,48	Linalol	0,50
7	21,59	4,4-Dimetil-2-pentinal	0,80
8	23,22	terc-Dodeciltiol	0,71
9	23,65	Neral	9,64
10	24,13	Nerol	1,07
11	24,70	Geranial	14,06
12	25,48	2-Undecanona	0,63
13	28,47	Farnesol	1,27
14	30,05	1,1-Diciclopropiletileno	0,55
15	31,59	α -Curcumeno	3,33
16	31,99	α -Zingibereno	27,14
17	32,37	Nerolidol	13,51
18	32,83	β -Sesquifelandreno	9,45

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

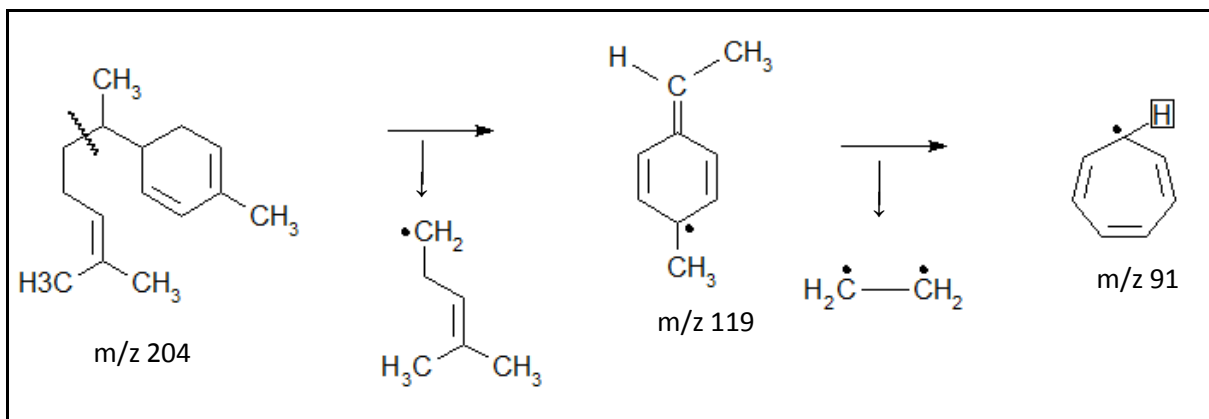
A Figura 5.26 mostra o espectro de massa referente ao componente majoritário, no qual, o íon molecular $[M^{+}]$ apresenta a relação m/z 204, confirmando a fórmula $C_{15}H_{24}$, que caracteriza o composto como α -zingibereno (ADAMS, 1995).



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 5.26. (a) Espectro de massa e possíveis fragmentos do α -zingibereno e (b) Proposta de identificação segundo a espectroteca NIST21 do programa.

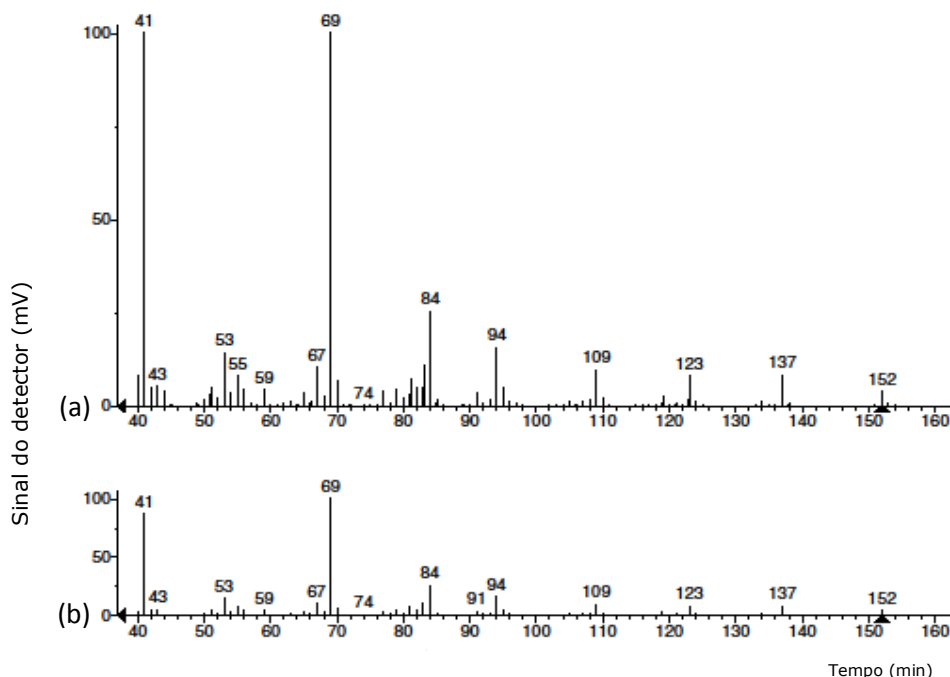
A fragmentação do α -zingibereno pode ser observada na Figura 5.27, o pico intenso em m/z 119 caracteriza a perda do grupamento hexil (C_6H_{13}) radical monovalente derivado da molécula de hexano presente na formula estrutural do zingibereno. Enquanto, o pico em m/z 91 indica a formação de um anel de benzeno com cadeia lateral alquila. O íon de massa 91 é denominado de cátion tropílio (SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2007).



Fonte: MATA (2003)

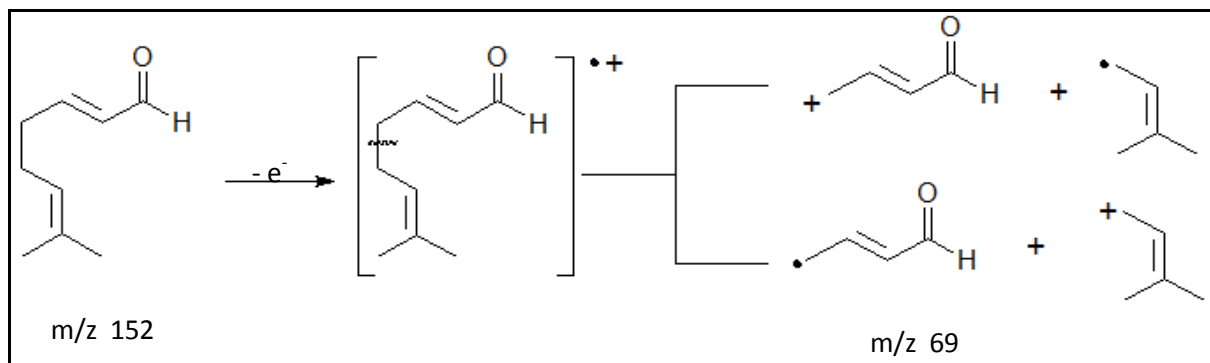
Figura 5.27. Fragmentação do α -zingibereno.

A Figura 5.28 é referente ao espectro de massas do geranial, observa-se o pico do íon molecular m/z 152, confirmando como $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}$ a fórmula do geranial e na Figura 5.29 pode ser visto a sua fragmentação.



Fonte: Dados da pesquisa

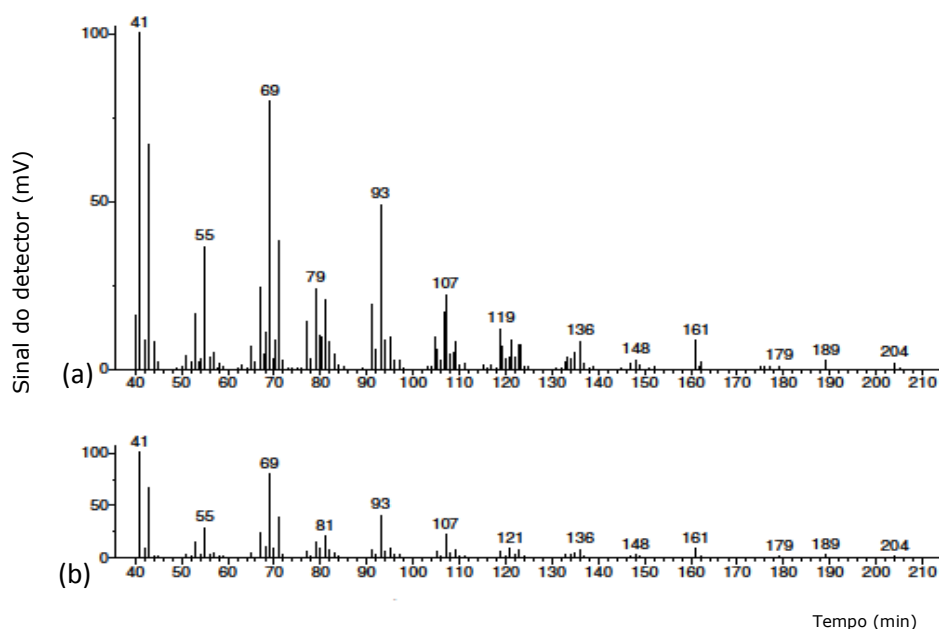
Figura 5.28. (a) Espectro de massa do geranial e (b) Proposta de Identificação segundo a espectroteca WILEY139 do programa.



Fonte: O autor (2010)

Figura 5.29. Fragmentação do geranial .

A Figura 5.30 mostra o espectro de massas referente ao nerolidol. Observa-se a ausência do pico do íon molecular m/z 222, referente a fórmula molecular $C_{15}H_{26}O$ em decorrência da instabilidade deste álcool.

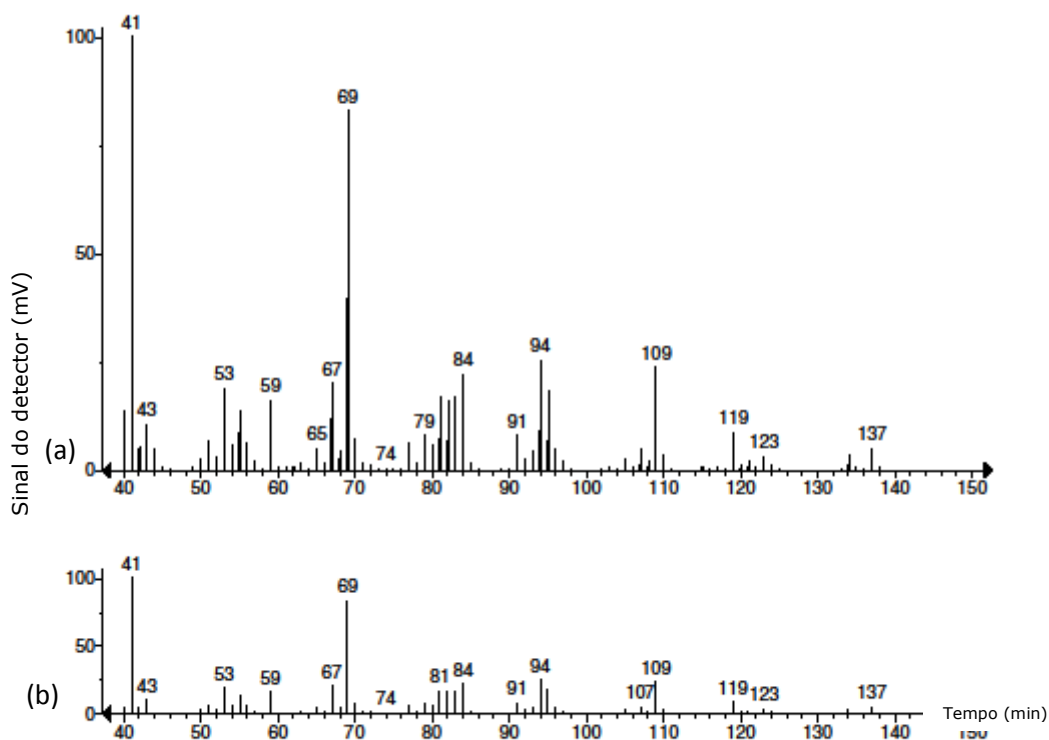


Fonte: Dados da pesquisa

Figura 5.30. (a) Espectro de massa do nerolidol e (b) Proposta de Identificação segundo a espectroteca WILEY139 do programa.

O pico m/z 204 é resultante da perda de uma molécula de H_2O .

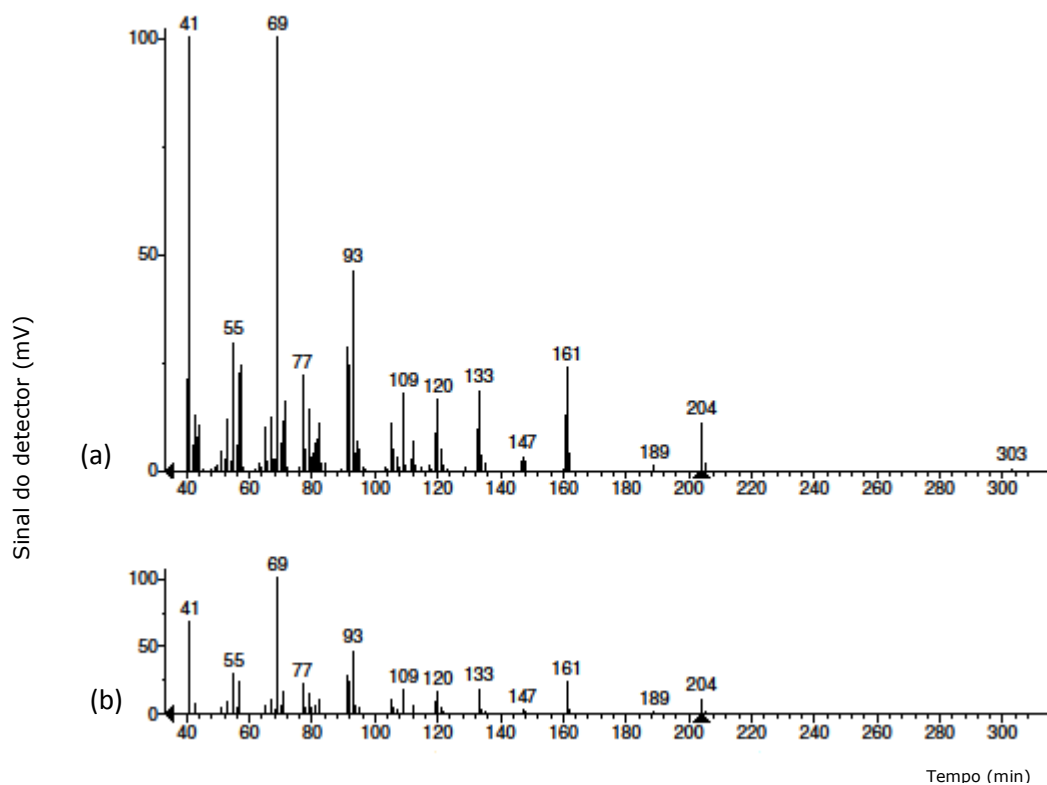
A Figura 5.31 representa o espectro de massa do neral. Percebe-se que o pico do íon molecular m/z 152, o qual não aparece no espectro por causa da sua instabilidade, corresponde à fórmula $C_{10}H_{16}O$. O pico 137 corresponde à perda de uma metila ($\cdot CH_3$).



Fonte: Dados da pesquisa

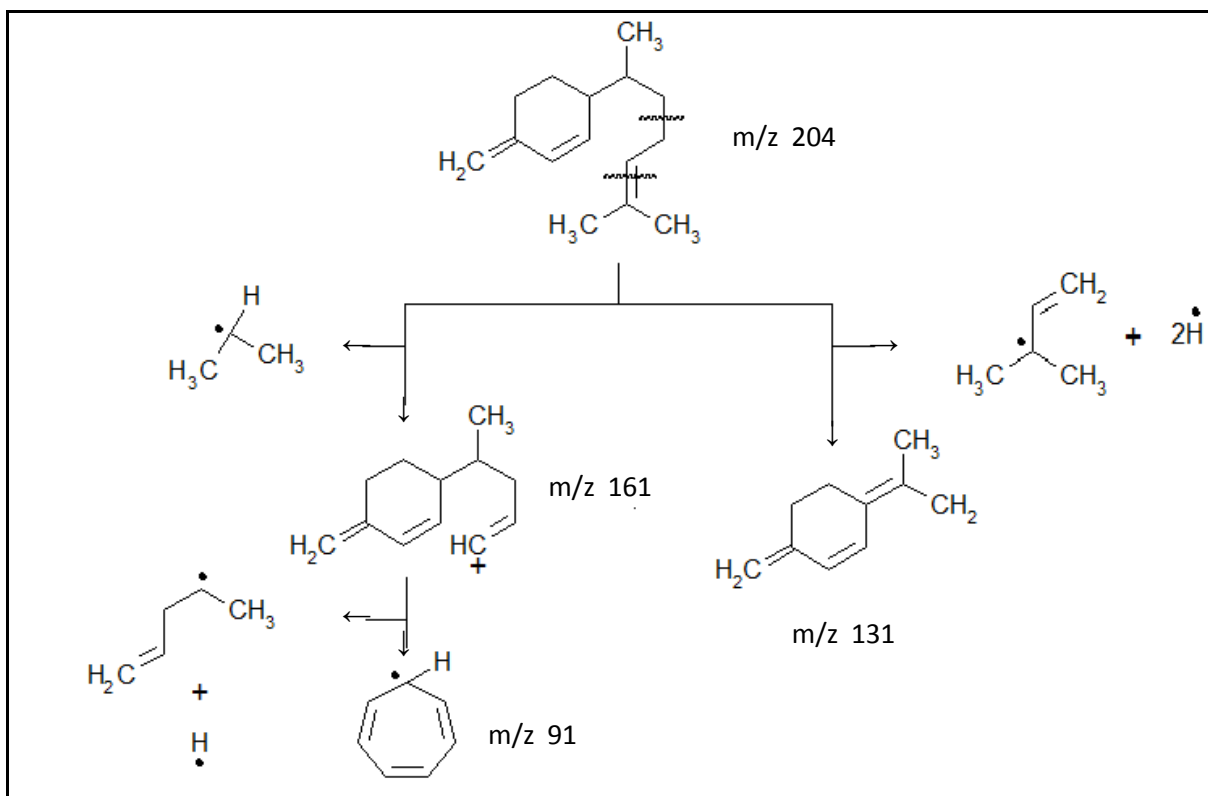
Figura 5.31. (a) Espectro de massa do neral e (b) Proposta de Identificação segundo a espectroteca NIST21 do programa.

A Figura 5.32 e a Figura 5.33 referem-se à fórmula molecular $C_{15}H_{24}$ relativa ao β -sesquifelandreno, onde pode ser observado o pico do íon molecular m/z 204 e a fragmentação respectivamente.



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 5.32. (a) Espectro de massa do β -sesquifelandreno e (b) Proposta de Identificação segundo a espectroteca NIST107 do programa.



Fonte: O autor (2010)

Figura 5.33. Fragmentação do β -sesquifelandreno.

Pesquisa realizada por CHOUDHURY et al.,(1996), RICHMOND & POMBO-VILLAR, (1997) e SHARMA et al.,(1997) em rizomas de cúrcuma constaram a presença dos mesmos compostos. Os principais compostos voláteis identificados por Chatterjee et al., (2000) na cúrcuma irradiada foram α -felandreno, *p*-cimeno, 1,8 cineol, β -cariofileno, arcurcumeno, zingibereno, β -sesquifelandreno, nerolidol, ar-turmerona, curlona e dehidrozingerona. Segundo Govindarajan, os compostos ar-curcumeno e arturmerona podem ser formados durante tratamentos térmicos, aos quais a cúrcuma é submetida, podendo o ar curcúmeno também ser formado pela conversão do zingibereno e do β -sesquifelandreno durante o armazenamento.

5.5- CAPTURA E TESTE DA POSITIVIDADE DOS CARAMUJOS

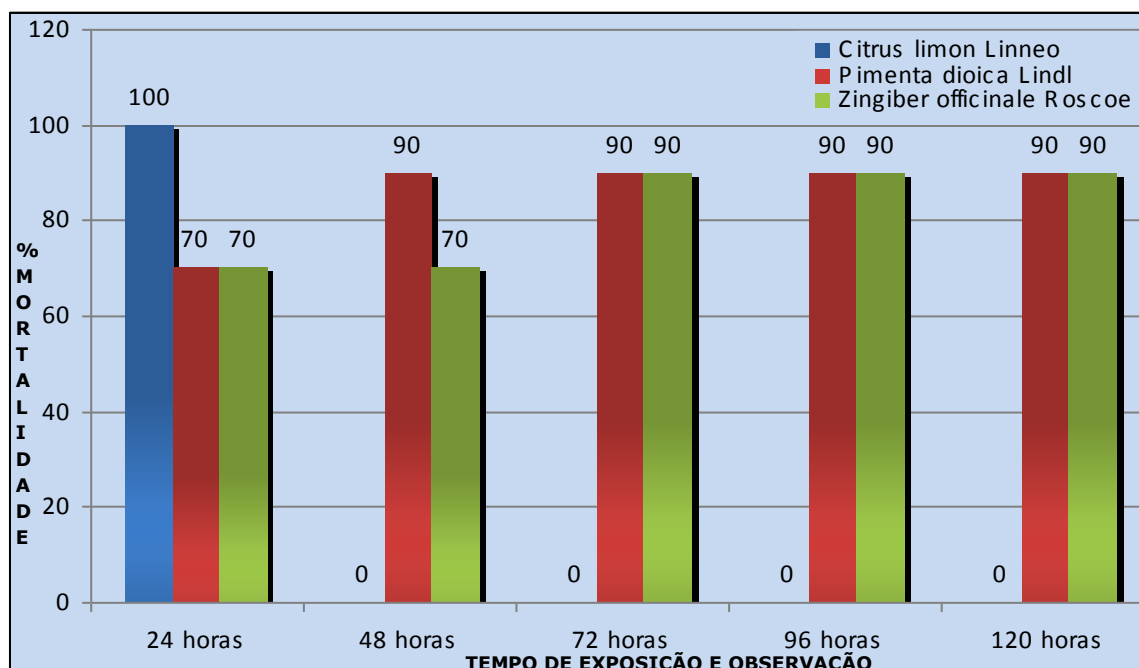
A captura dos caramujos foi realizada em períodos chuvosos por existir uma maior proliferação, onde as áreas ficam alagadas pela falta de saneamento, propiciando um excelente habitat. Os testes de positividade mostraram a presença de estágios larvais em alguns caramujos, fato muito preocupante, visto que somente um caramujo pode liberar 18 mil cercárias diariamente (NEVES, 2004).

5.6- 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).

5.6.1- Avaliação do teste piloto

Neste estudo foi realizado um teste piloto com os óleos essenciais, na concentração de 100 mg.L⁻¹. Os percentuais de mortalidade pelo tempo de exposição e observação de cada óleo podem ser observados no gráfico da Figura 5.34.



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 5.34. Percentual de mortalidade por tempo de exposição e observação para o teste piloto

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 não havia sido avaliada. Esta é a primeira vez que esses óleos 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^{-1} 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, notando-se ainda hemorragia, para o extraído das folhas de *Pimenta dioica* Lindl foi de 90% em 48 horas também havendo hemorragia e o do rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe, obteve um percentual de 90% em 72 horas, sem hemorragia.

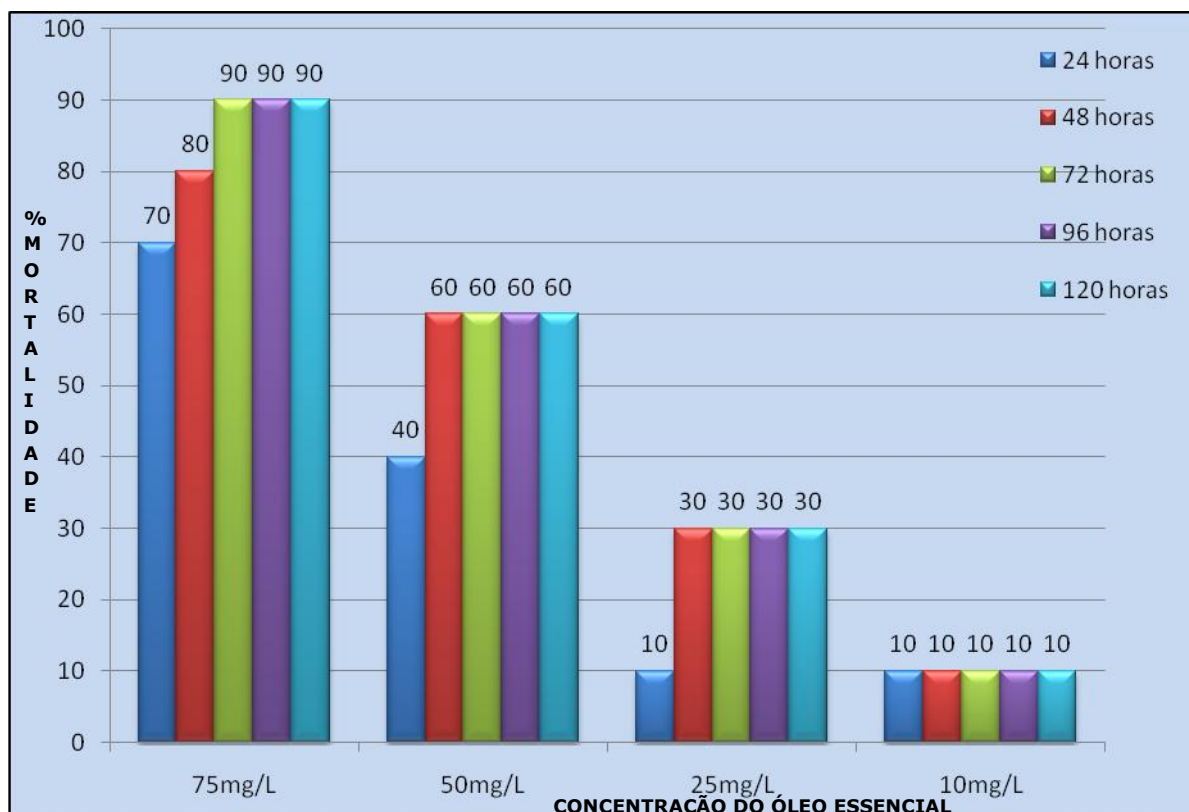
Caracterizando que os óleos possuíam componentes capazes de eliminar os caramujos adultos do gênero *Biomphalaria glabrata*.

5.6.2- Avaliação da concentração letal

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

5.6.2.1- *Pimenta dióica* Lindl

Para avaliação da concentração letal do óleo essencial extraído da folha da *Pimenta dióica* Lindl pode-se observar no gráfico da Figura 5.35 os percentuais de mortalidade pela concentração.



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 5.35. Percentual de mortalidade pelas concentrações do óleo essencial *Pimenta dióica* Lindl

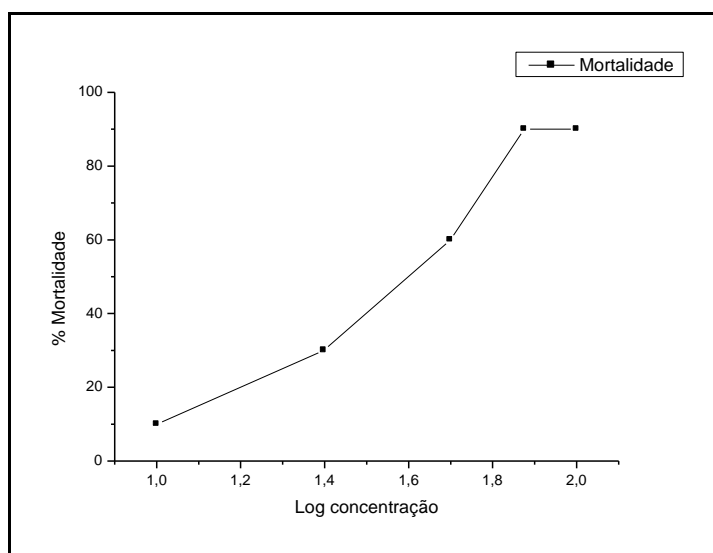
O gráfico mostra que os moluscos em 24, 48, 72, 96 e 120 horas de exposição na concentração de 75 mg.L⁻¹ obteve uma mortalidade de 70, 80, 90, 90 e 90% respectivamente, para uma concentração de 50 mg.L⁻¹ foi de 40, 60, 60, 60 e 60%, de 25 mg.L⁻¹ foi de 10, 30, 30, 30 e 30% e para 10 mg.L⁻¹ foi de 10%.

Para cada concentração os testes foram realizados em triplicata e os dados sobre o número de caramujos vivos e mortos foram encontrados através de uma média das três repetições para cada uma das cinco concentrações testadas (Tabela 5.5).

Tabela 5.5. Mortalidade dos caramujos após testes em várias concentrações do óleo essencial extraído das folhas da *Pimenta dioica* Lindl.

CONCENTRAÇÃO (mg.L ⁻¹)	LOG CONCENTRAÇÃO	MORTOS	VIVOS	ACUMUL. VIVOS	ACUMUL. MORTOS	% MORTALIDADE
100	2	9	1	1	28	90
75	1,8751	9	1	2	19	90
50	1,699	6	4	6	10	60
25	1,398	3	7	13	4	30
10	1	1	9	22	1	10

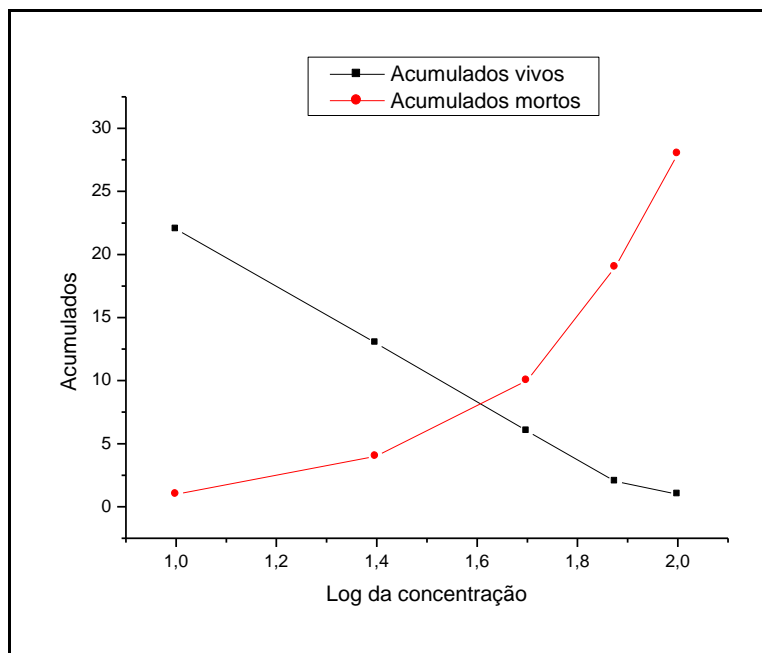
A taxa de percentagem da mortalidade dos caramujos frente ao óleo da *Pimenta dioica* Lindl. é mostrada na Figura 5.36, tornando-se constante a partir do logaritmo da concentração 1,8751 (concentração 75 mg.L⁻¹).



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 5.36. Taxa de mortalidade dos caramujos nas cinco Concentrações diferentes do óleo essencial de *Pimenta dioica* Lindl.

A Figura 5.37 mostra que a Concentração Letal 50% (CL₅₀), foi encontrada próxima ao Logaritmo da concentração 1,60; calculada através da intersecção das curvas de acumulados mortos e acumulados vivos, tendo como resultado a concentração de 39,81 mg.L⁻¹.

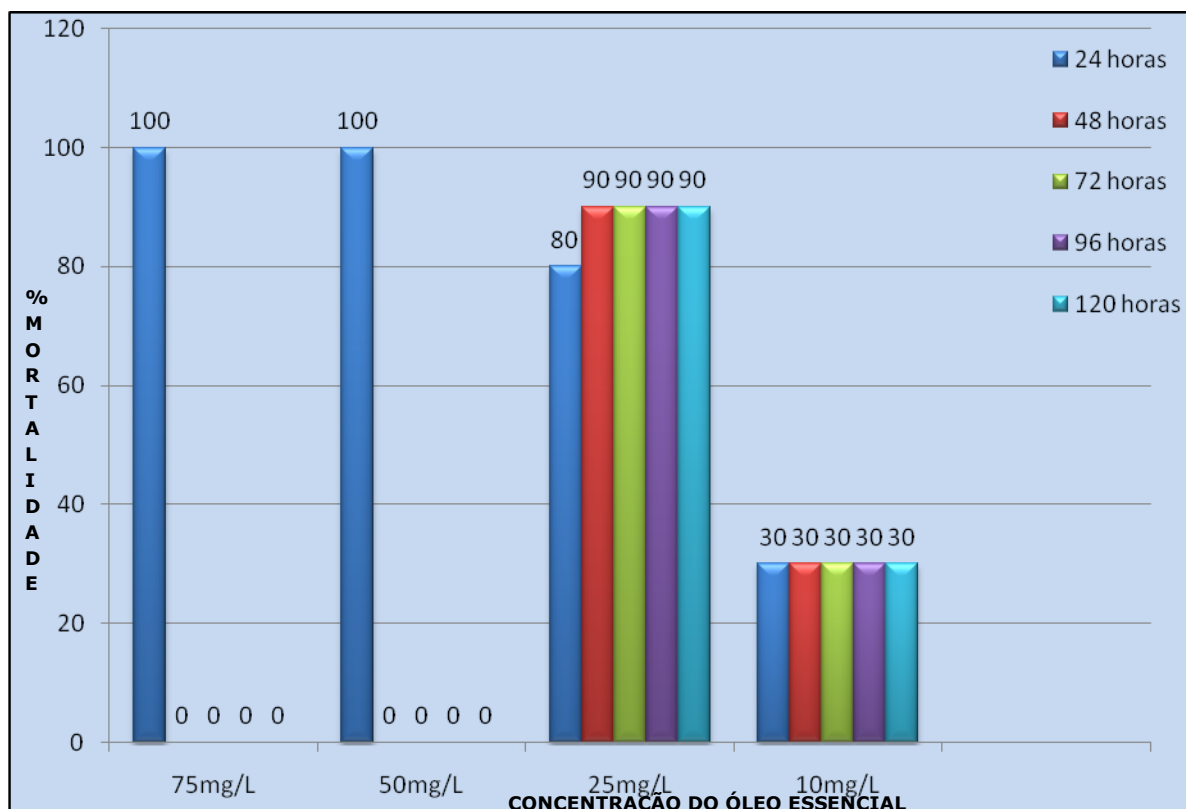


Fonte: Dados da pesquisa

Figura 5.37. Estimativa da CL_{50} do óleo essencial de *Pimenta dioica* Lindl pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de caramujos vivos e mortos em função do logaritmo da concentração aplicada.

5.6.2.2- *Citrus limon* Linneo

Para a avaliação da concentração letal do óleo essencial *Citrus limon* Linneo o gráfico da Figura 5.38 mostra os percentuais de mortalidade pela concentração.



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 5.38. Percentual de mortalidade pelas concentrações do óleo essencial *Citrus limon* Linneo.

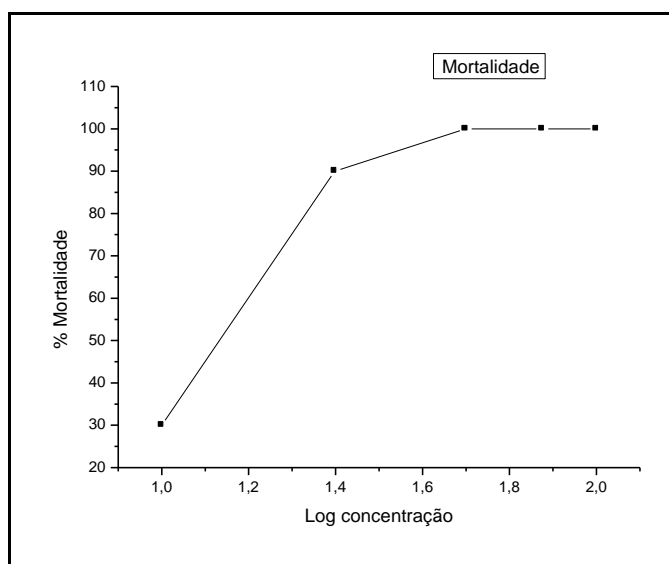
Observa-se no gráfico que houve uma mortalidade de 100% em vinte e quatro horas de exposição dos caramujos nas concentrações de 50 e 75 mg.L⁻¹; na concentração de 25 mg.L⁻¹ em 24 horas a mortalidade foi de 80%, passando para 90% em 48 horas, permanecendo até final dos teste e em 10 mg.L⁻¹ a mortalidade foi de 30%.

A tabela 5.6 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 5.6. Mortalidade dos caramujos após testes nas diferentes concentrações do óleo essencial extraído das cascas de *Citrus limon* Linneo.

CONCENTRAÇÃO (mg.L ⁻¹)	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

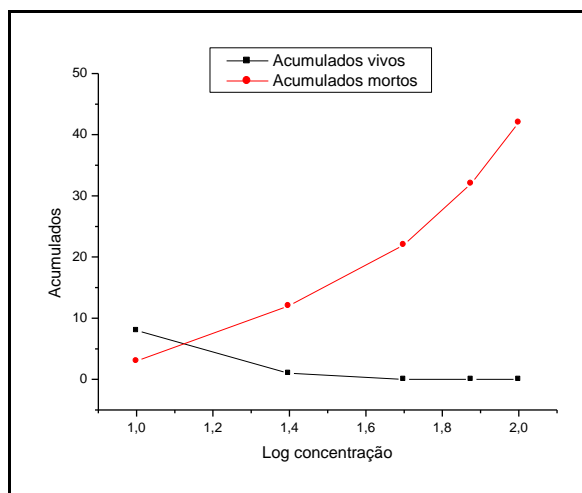
A taxa de percentagem da mortalidade dos caramujos frente ao óleo de *Citrus limon* Linneo é mostrada na Figura 5.39, mostrando-se constante a partir do logaritmo da concentração 1,699 (concentração 50 mg.L⁻¹).



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 5.39. Taxa de mortalidade dos caramujos nas cinco concentrações diferentes do óleo essencial de *Citrus limon* Linneo.

A concentração Letal 50% (CL₅₀) 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⁻¹ de acordo com gráfico da Figura 5.40.

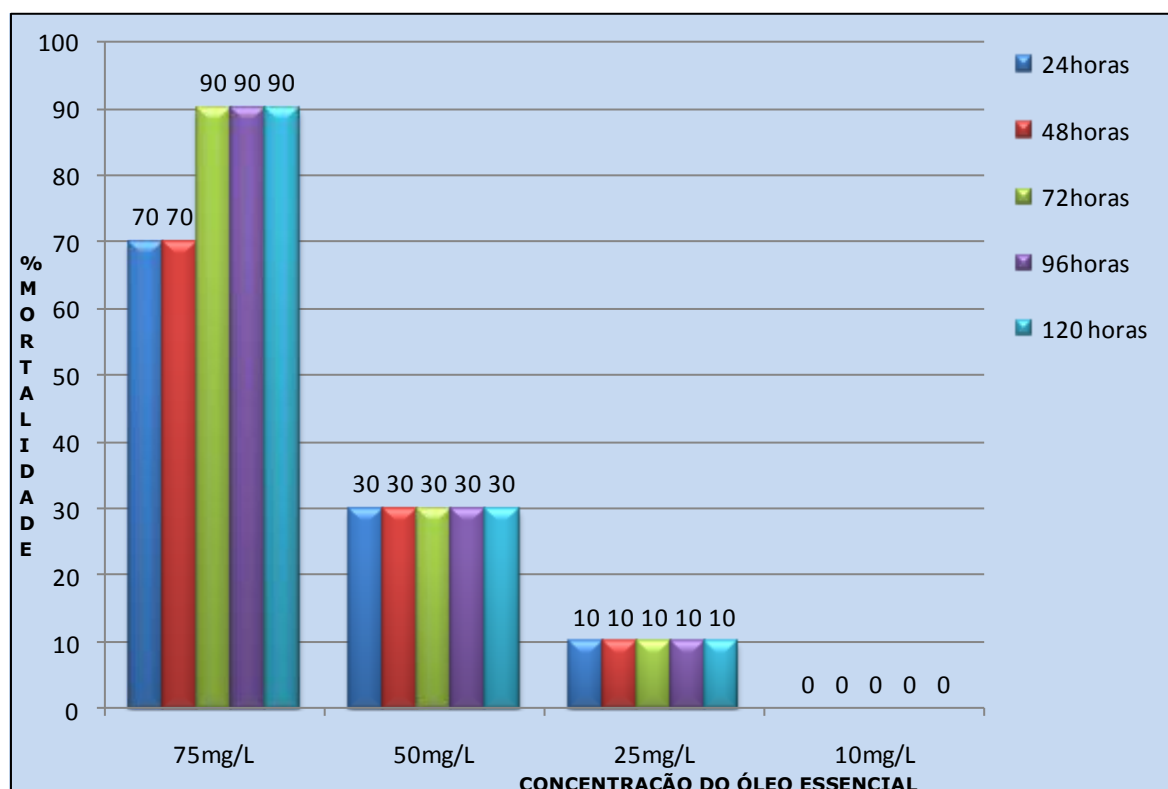


Fonte: Dados da pesquisa

Figura 5.40. 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.

5.6.2.3- *Zingiber officinale* Roscoe

Para a avaliação da concentração letal do óleo essencial *Zingiber officinale* Roscoe o gráfico da Figura 5.41 mostra os percentuais de mortalidade pela concentração.



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 5.41. Percentual de mortalidade pelas concentrações do óleo essencial *Zingiber officinale* Roscoe

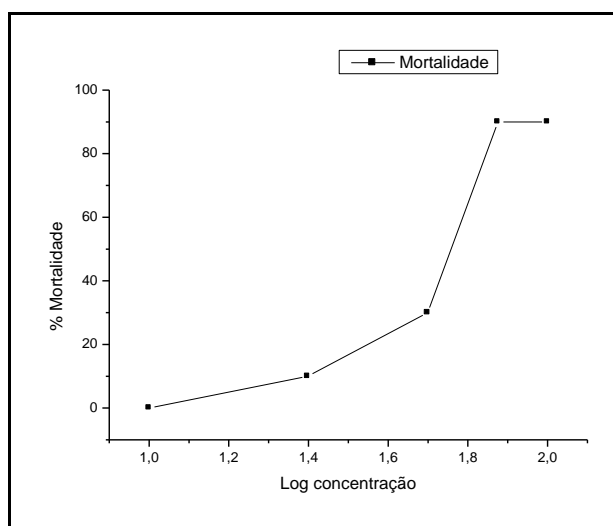
O óleo essencial extraído do rizoma do *Zingiber officinale* Roscoe na concentração de 75 mg.L⁻¹, apresentou em 24 e 48 horas uma mortalidade de 70%, passando para 90% em 72 horas permanecendo até o final do teste. Na concentração de 50 mg.L⁻¹, o índice de mortalidade foi de 30%, para a concentração de 25 mg.L⁻¹ de 10% e para 10 mg.L⁻¹ não houve mortalidade dos caramujos.

Na tabela 5.7 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 5.7. Mortalidade dos caramujos após testes nas diferentes concentrações do óleo essencial extraído das cascas de *Zingiber officinale* Roscoe.

CONCENTRAÇÃO (mg.L ⁻¹)	LOG CONCENTRAÇÃO	MORTOS	VIVOS	ACUMUL. VIVOS	ACUMUL. MORTOS	% MORTALIDADE
100	2	9	1	1	22	90
75	1,8751	9	1	2	13	90
50	1,699	3	7	9	4	30
25	1,398	1	9	18	1	10
10	1	0	10	28	0	0

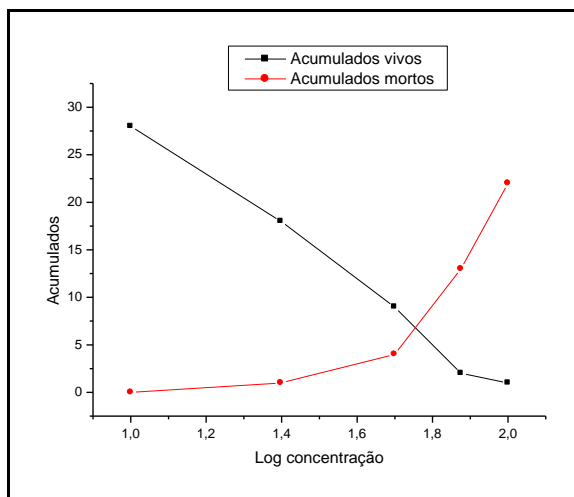
A taxa de percentagem da mortalidade dos caramujos frente ao óleo de *Zingiber officinale* Roscoe é mostrada na Figura 5.42, mostrando-se constante a partir do logaritmo da concentração 1,8751 (concentração 75 mg.L⁻¹).



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 5.42. Taxa de percentagem de mortalidade dos caramujos nas cinco concentrações diferentes do óleo essencial de *Zingiber officinale* Roscoe.

A Figura 5.43 mostra que a Concentração Letal 50% (CL₅₀), foi encontrada próxima ao logaritmo da concentração 1,75 calculada através da intersecção das curvas de acumulados mortos e acumulados vivos, tendo como resultado a concentração de 56,23 mg.L⁻¹.



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 5.43. Estimativa da CL_{50} do óleo essencial de *Zingiber officinale* Roscoe pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de caramujos vivos e mortos em função do logaritmo da concentração aplicada. A CL_{50} é o ponto de intersecção das duas curvas.

O melhor resultado, em termos de potencial moluscicida, foi obtido com o óleo essencial da casca de *Citrus limon* L., onde a concentração letal em 50% (CL_{50}) foi de $13,18 \text{ mg.L}^{-1}$, estando dentro do estabelecido pela WHO (1983), na qual indica que a planta só deva ser considerada moluscicida quando a mortalidade nas concentrações iguais ou inferiores a 20 mg.L^{-1} para extratos e 100 mg.L^{-1} para o vegetal bruto e possam ser submetidos a ensaios em campo.

Para o óleo essencial extraído das folhas de *Pimenta díocica* Lindl, onde a concentração letal (CL_{50}) foi de $39,81 \text{ mg.L}^{-1}$ e do rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe, de $56,23 \text{ mg.L}^{-1}$, indicando assim, que pode existir componentes tóxicos na substância para os caramujos, que mesmo em pequenas concentrações, podem ser isolados ou obtidos a partir de outras fontes para serem submetidos ao ensaio moluscicida (MARSTON; HOSTETTMMANN, 1985).

5.6.3- 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 5.44.



Fonte: O autor (2010)

Figura 5.44. Grupo controle do branco e do Tween 80

5.7- AVALIAÇÃO DO TESTE DE TOXICIDADE

As culturas de *Artemia salina* foram incubadas a temperatura média de aproximadamente 28 °C, sendo feita a leitura do número de mortos após 24 horas. Foram consideradas larvas mortas todas que não apresentavam qualquer movimento ativo em cerca de vinte segundos de observação.

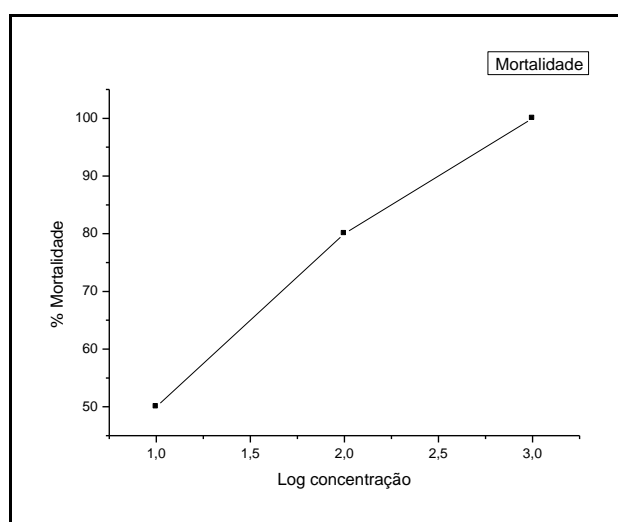
5.7.1- *Pimenta dióica* Lindl

Para o óleo essencial extraído das folhas de *Pimenta dióica* Lindl a tabela 5.8 mostra a média dos testes realizados em triplicatas.

Tabela 5.8. Mortalidade das larvas após testes nas diferentes concentrações do óleo essencial extraído das folhas de *Pimenta dióica* Lindl

CONCENTRAÇÃO (mg.L ⁻¹)	LOG CONCENTRAÇÃO	MORTOS	VIVOS	ACUMUL. VIVOS	ACUMUL. MORTOS	% MORTALIDADE
1000	3	10	0	0	23	100
100	2	8	2	2	13	80
10	1	5	5	7	5	50

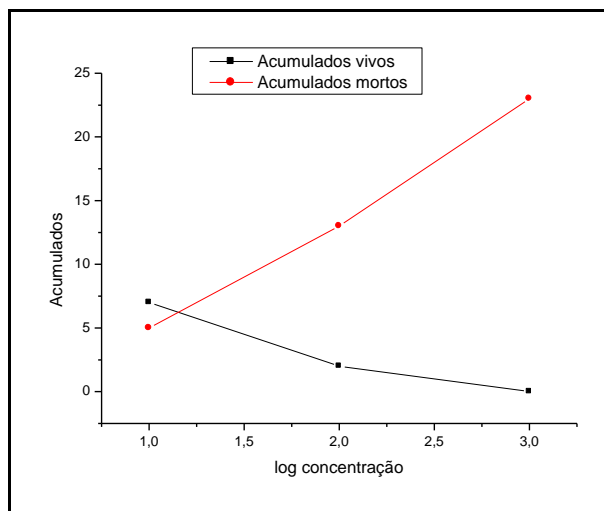
Na figura 5.45 observa-se a taxa de percentagem da mortalidade das larvas frente ao óleo versus ao logaritmo da concentração.



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 5.45. Taxa de percentagem de mortalidade das larvas nas concentrações diferentes do óleo essencial da *Pimenta dióica* Lindl.

De acordo com os resultados obtidos a Figura 5.46 mostra que a concentração Letal 50% (CL₅₀) do óleo essencial foi encontrada próxima ao logaritmo da concentração 1,15, sendo calculada através da intersecção das curvas de acumulados mortos e vivos, tendo como resultado a concentração de 14,13 mg.L⁻¹.



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 5.46. Estimativa da CL_{50} do óleo essencial da *Pimenta dióica* Lindl. pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas vivas e mortas em função do logaritmo da concentração aplicada.

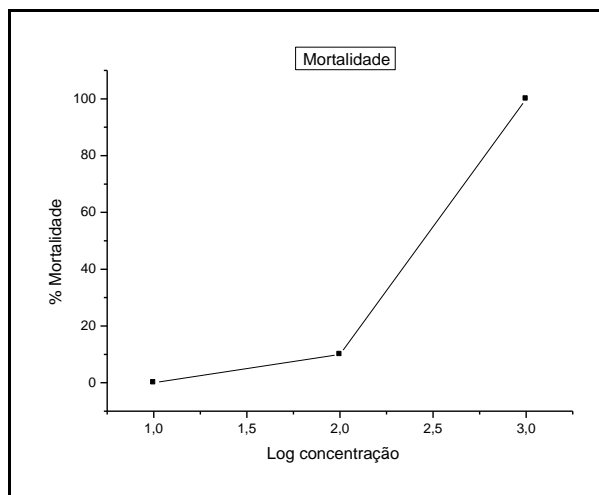
5.7.2- *Citrus limon* Linneo

Para o óleo essencial extraído das cascas de *Citrus limon* Linneo a tabela 5.9 mostra a média dos testes realizados em triplicatas.

Tabela 5.9. Mortalidade das larvas após testes nas diferentes concentrações do óleo essencial extraído das cascas de *Citrus limon* Linneo.

CONCENTRAÇÃO (mg.L ⁻¹)	LOG CONCENTRAÇÃO	MORTOS	VIVOS	ACUMUL. VIVOS	ACUMUL. MORTOS	% MORTALIDADE
1000	3	10	0	0	11	100
100	2	1	9	9	1	10
10	1	0	10	19	0	0

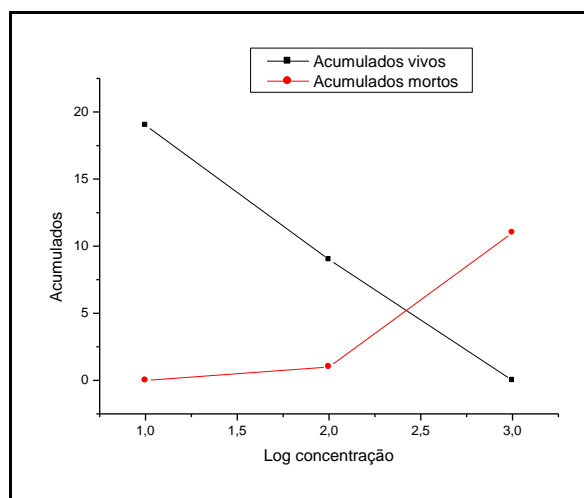
Na figura 5.47 observa-se a taxa de percentagem da mortalidade das larvas frente ao óleo.



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 5.47. Taxa de percentagem de mortalidade das larvas nas concentrações diferentes do óleo essencial de *Citrus limon* Linneo.

A Concentração Letal 50% (CL₅₀) do óleo essencial foi encontrada próxima ao Logaritmo da concentração 2,42, sendo calculada através da intersecção das curvas de acumulados mortos e vivos, tendo como resultado a concentração de 263,03 mg.L⁻¹ como mostra a Figura 5.48.



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 5.48. Estimativa da CL₅₀ do óleo essencial da *Citrus limon* Linneo pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas vivas e mortas em função do logaritmo da concentração aplicada.

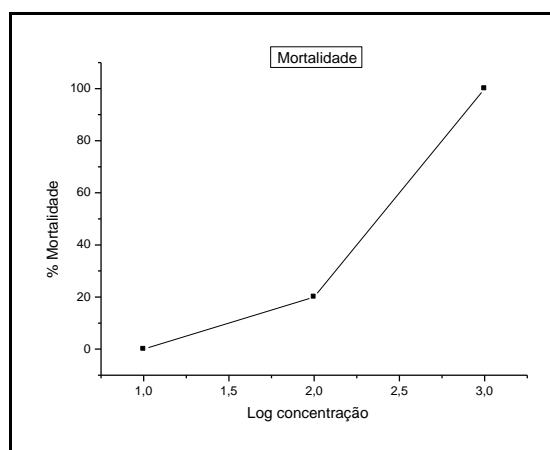
5.7.3- *zingiber officinale* Roscoe

Para o óleo essencial extraído do rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe a tabela 5.10 mostra a média dos testes realizados em triplicatas.

Tabela 5.10. Mortalidade das larvas após testes nas diferentes concentrações do óleo essencial extraído do rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe.

CONCENTRAÇÃO (mg.L ⁻¹)	LOG CONCENTRAÇÃO	MORTOS	VIVOS	ACUMUL. VIVOS	ACUMUL. MORTOS	% MORTALIDADE
1000	3	10	0	0	13	100
100	2	2	8	8	3	20
10	1	1	9	17	1	10

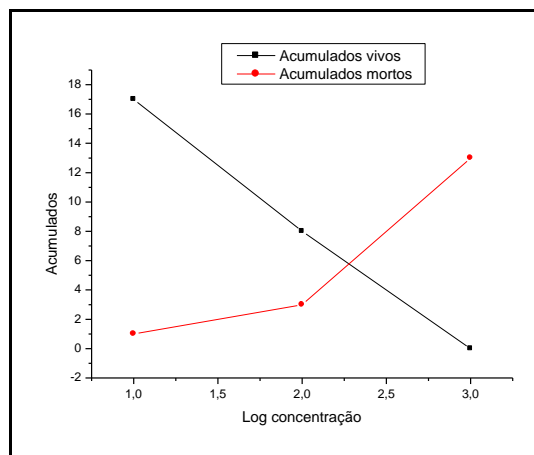
Na figura 5.49 observa-se a taxa de percentagem da mortalidade das larvas frente ao óleo.



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 5.49. Taxa de percentagem de mortalidade das larvas nas Concentrações diferentes do óleo essencial de *Zingiber officinale* Roscoe.

A Concentração Letal 50% (CL₅₀) do óleo essencial foi encontrada próxima ao Logaritmo da concentração 2,28, sendo calculada através da intersecção das curvas de acumulados mortos e vivos, tendo como resultado a concentração de 190,55 mg.L⁻¹ como mostra a Figura 5.50.



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 5.50. Estimativa da CL_{50} do óleo essencial da *Zingiber officinale* Roscoe pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas vivas e mortas em função do logaritmo da concentração aplicada. A CL_{50} é o ponto de intersecção das duas curvas.

5.7.4- Avaliação do teste controle

De acordo com os resultados obtidos verificou-se que as larvas da *Artemia salina* do grupo controle branco, somente com solução salina e controle negativo com solução salina e tween 80 não houve mortalidade, permanecendo ativas.

Conforme Dolabela (1997), a avaliação da toxicidade dos óleos essenciais nas concentrações testadas, mostrou-se levemente tóxico ou atóxico; para o extraído da casca de *Citrus limom* Linneo, para o extraído do rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe moderadamente tóxico e o extraído das folhas de *Pimenta dióica* Lindl alta toxicidade aguda, indicando a importância do ensaio de toxicidade geral e a necessidade de maiores estudos para os óleos que não obtiveram bons resultados, para comprovar a segurança contra organismos não-alvo nas regiões de ocorrência dos caramujos. Na literatura não foram encontrados estudos referentes à toxicidade de plantas deste gênero.

Por outro lado, uma baixa toxicidade pode ser considerada uma característica interessante para utilização de extratos vegetais em ambientes naturais para controle da população de caramujos. É relevante observar que a niclosamida, substância aprovada pela ANVISA-MS mostrou-se tóxica para espécies aquáticas como crustáceos do zooplâncton (OLIVEIRA-FILHO; PAUMGARTTEN, 2000).



CAPITULO VI
CONCLUSÕES

6- CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nos estudos analíticos e na avaliação da toxicidade e atividade moluscicida dos óleos essenciais extraídos da folha de *Pimenta dióica* Lindl, do rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe e casca de *Citrus limon* Linneo concluem-se que:

- O rendimento do óleo essencial extraído das folhas de *Pimenta dióica* Lindl foi de 1,80%, do rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe de 0,96% e da casca de *Citrus limon* Linneo de 0,71%, valores consideráveis para extração por hidrodestilação;
- Os parâmetros físico-químicos dos óleos essenciais estudados apresentaram valores semelhantes ao obtidos pela literatura;
- A caracterização por CG-EM permitiu identificar os componentes majoritários e minoritários dos óleos em estudos, para o extraído das folhas de *Pimenta dióica* Lindl, o componente majoritário foi o eugenol com teor de 85,673%, da casca de *Citrus limon* Linneo, o limoneno com 48,996% e do rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe, o zingibereno com 27,140%;
- A espectroscopia na região do infravermelho veio comprovar os resultados obtidos por CG-EM, mostrando os componentes majoritários dos óleos em estudos quando comparados aos seus respectivos padrões, no que diz respeito às suas absorvâncias e seus deslocamentos químicos;
- Para o teste piloto, a atividade moluscicida dos óleos apresentou uma mortalidade de 100% em 24 h para o extraído da casca de *Citrus limon* Linneo, 90% em 48 h das folhas de *Pimenta dióica* Lindl e 90% em 72 h do rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe, 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 o melhor resultado, mostrando-se, portanto, ser o mais ativo frente ao caramujo *Biomphalaria glabrata*, a concentração letal 50% (CL₅₀) foi de 13,18 mg.L⁻¹, abaixo do preconizado pela ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS); para os óleos essenciais extraídos das folhas de *Pimenta dióica* Lindl e do rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe, que obtiveram resultados da concentração letal 50% (CL₅₀) de 39,81 e 56,23 mg.L⁻¹ respectivamente, não foram considerados ativos, porém suas essências apresentaram componentes com propriedades moluscicida que podem ser testadas quando isoladas;
- O ensaio biológico com *Artemia salina* para a concentração letal 50% (CL₅₀) realizado com os óleos essenciais em estudos, mostrou que o extraído das cascas de *Citrus limon* Linneo, apresentou o melhor resultado, de 263,03 mg.L⁻¹, sendo considerado atóxico, das folhas de *Pimenta dióica* Lindl, altamente tóxico com CL₅₀ de 14,13 mg.L⁻¹ e do rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe, moderadamente tóxico com CL₅₀ de 190,55 mg.L⁻¹, segundo critérios de Dolabela (1997), indicando a importância deste ensaio.



CAPITULO VII
PERSPECTIVAS FUTURAS

7- PERSPECTIVAS FUTURAS

- Extrair os óleos essenciais das folhas de *Pimenta dióica* Lindl, da casca de *Citrus limon* Linneo e do rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe, por meio de outras técnicas de extração e verificar possíveis alterações na sua composição química e propriedades físicas;
- Determinar a perda de massa dos óleos essenciais em estudos através de análise termogravimétrica e análise térmica diferencial (TG-DTA);
- Caracterizar analiticamente os óleos essenciais por Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13;
- Isolar e testar atividade moluscicida e toxicidade dos componentes majoritários e minoritários dos óleos essenciais;
- Avaliar a atividade moluscicida e toxicidade das plantas estudadas, utilizando somente os extratos brutos;
- Avaliar a composição química dos hidrolatos dos respectivos óleos bem como a atividade moluscicida e toxicidade.



CAPITULO VIII
REFERÊNCIAS

8- 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;

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy**. 4.ed. Carol Stream, Illinois: Allured, 2007.

ADRIANA, R. MATA; DAVID, L. NELSON; ROBSON, J. C. F. AFONSO; MARIA BEATRIZ A. GLÓRIA; ROBERTO, G. JUNQUEIRA. **Identificação de compostos voláteis da cúrcuma empregando microextração por fase sólida e Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas**. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 24(1): 151-157, jan.-mar. 2004.

ALEJO, P.L.P; LARIONOVA, I.M; RODRÍGUES, G.R; FLORES, R.M. Atividade estimulante de la fracción de saponósidos triterpénicos de la *Polyscias fruticosa* (L.) Harms (aralia) y la fracción de gingeroles del *Zingiber officinale* Roscoe (gingibre). **Revista Cubana de Plantas Medicinai**s, La Habana. v.1, n.4, p.6-10, 1999.

ALLINGER, Norma L. et al. **Química Orgânica**. 2ªed. Rio de Janeiro:Guanabara dois, 1978.

ALVES, N. M. **Estudo Farmacognóstico e da Toxicidade Experimental (Aguda e Subaguda) do Extrato Etanólico da**

Casca do Guatambu (Aspidospermas subincanum Mart.).

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília. 2007.

ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, A.; ZANI, C. L. **Biological screening of Brazilian medicinal plants.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 95, p. 367-373, 2000.

AMARAL, R. S. & PORTO, M. A. S., 1994. Evolução e situação atual do controle da esquistossomose no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 27:73-90.

ANDRADE NETO, M. Volatile constituents of *Psidium pholianum* and *Psidium guyanensis*. **Journal of Essential Oils Research**, v.6, n.3, p.299-300, 1994.

ANDRADE, V; SILVA, J. Caracterización de *Klebsiella pneumoniae* productora de la -lactamasamSHV-5, em uma unidade de cuidados intensivos. **Salud Pública de México**. v.46, n.6, nov./dic. 2004.

ARAÚJO, J.M.A. **Química de Alimentos**: teoria e prática. 2.ed. Viçosa, MG: UFV, 1999.

ARAÚJO, K. C. G. M.; RESENDES, A. P. C.; SOUZA-SANTOS, R. 2007. **Spatial analysis of *Biomphalaria glabrata* foci and human cases of mansoni schistosomiasis in Porto de Galinhas.** Pernambuco State, Brazil, in the year. *Cad Saude Publica*.

ARIDOGAN, B.C; BAYDAR, H; KAYA, S; DEMIRCI, M; OZBASAR, D; MUMLU, E. **Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils.** Arch. Pharm. Res., v.25, n.6, p.860-864, 2002.

ARCHIBALD, R. G. 1933. The use of the fruit of the tree *Balanites aegyptiaca* in the control of schistosomiasis in the Sudan. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** **27**:207-210.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. **NBR 10520**: informação e documentação: citações em documentos: apresentação. Rio de Janeiro, 2002. **NBR 14724**: informação e documentação: trabalhos acadêmicos. Rio de Janeiro, 2002.

AUTOR: RAQUEL PATRO

< www.jardineiro.net/br/banco/citrus_limon.php > acesso em: 22 de jun. 2010.

BARBOSA, S. **Ervas milagrosas que enriquecem o capital estrangeiro.** Rota Brasil Oeste, 2003.

BARBOSA, C. S.; PIERI, O. S.; SILVA, C. B.; BARBOSA, F.S. **Ecoepidemiologia da esquistossomose urbana na ilha de Itamaracá.** Estado de Pernambuco. Revista de Saúde Pública, São Paulo 34: 4, 2000.

BERNALE, J. V. **Planta Medicinales amazônicas: Realidade y perspectiva.** Lima: TCA, 1984.

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

BUDZIKIEWICZ, H.; DJERSSAI, C.; WILLIAMS, D.H. **Struture elucidation of natural products by mass spectrometry.** II: Steroids, Terpenoids, Sugars and Miscellaneous class. Amsterdam: Holden-Day, 1964. 306p.

BUHR, K.; RUTH, S. V.; DELAHUNTY, C. **Analysis of volatile flavour compounds by proton transfer reaction-mass spectrometry: fragmentation patterns and discrimination between isobaric and isomeric compounds.** *Int. J. Mass Spectrom.*, **221: 1, 2002.**

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

CÁCERES, A.: **Plantas de Uso Medicinal en Guatemala.** 1ª ed. Editorial Universitaria: San Carlos de Guatemala. 61,67,167,236,283,325,328, 1996.

CALIXTO, J. B.; SANTOS, A.R.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. **A**

review of the plants of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. *Med Res Rev* 1998; 18(4):225-58.

CALIXTO, J.B., ZANINI, J.C., CRUZ Jr, A.B., YUNES, R.A. **Extract and compounds obtained from *Mandevilla velutina* inhibit Arachidonic Acid induce ear oedema im mice, but not rat stomach contraction.** *Prostaglandins* , v.41, n.15, p.515-526, 1991.

CÂMARA, E. Sem proteção, indústria perde mercado para estrangeiros. **Jornal Vida Integral.** Disponível em: <<http://www.vidaintegral.com.br/complem/fitoterapicos.php>> Acesso em 4. dez. 2009.

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

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.

CAVALCANTE, Márcia Ferreira; OLIVEIRA, Márcia Cristina Campos de; VELANDIA, Javier Rincon; ECHEVARRIA, Áurea. **Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* leach.** *Quimica Nova*, vol.23, No. 1. São Paulo, 2001.

CAVICCHIOLI, M. **Análise de óleos essenciais de frutas cítricas**

por cromatografia gasosa de alta resolução (colunas capilares). São Carlos, 1986. 38p. Monografia (Curso de Graduação) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

CHAAR, J. S. **Estudos analíticos e modificação química por acetilação do linalol contido no óleo essencial da espécie *Aniba duckei* Kostermans.** São Carlos, 2000, 150p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

CHATTERJEE, S.; VARIYAR, P. S.; GHOLAP, A. S.; PADWAL-DESAI, S. R.; BONGIRWAR, D. R. **Effect of gamma-irradiation on the volatile oil constituents of turmeric (*Curcuma longa*).** Food Research International. v. 33, p. 103-106, 2000.

CHENG S-S. **Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae.** *Biores. Techol.*, v.32, n. 89, p. 99-102, 2003.

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

CHOUDHURY, S.N.; GHOSH, A. C.; SAIKIA, M.; CHOUDHURY, M.; LECLERCQ, P.A. **Volatile constituents of the aerial and underground parts of *Curcuma aromatica* Salisb. from India.** *Journal Essential Oil Research*, v. 8, p. 633-638, 1996.

CLAY, J.W. *et al.*, **Selected species and strategies to enhance income generation from Amazonian Forest.** Roma:FAO, 1993.

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

COSTA, O. A. **Plantas hipoglicemiantes brasileiras. Lendra.** v.5, n.6. p. 95-103, dez. 1975.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Volume III. Ministério da Agricultura. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro, 1984.

CORRÊA, A. D.; BATISTA, R. S.; QUINTAS, L. E. M. **Plantas Medicinais: do cultivo à terapêutica.** 2. Ed. Petrópolis: Atheneu, 1998.

CORTEZ, D. A. G.; CORTEZ, L. E. R.; PESSINI, G. L.; DORO, D. L.; NAKAMURA, C. V. **Análise do óleo essencial da alfavaca *Ocimum gratissimum* L. (LABIATAE).** *Arq. Ciênc. Saúde*, **2(2):125**, 1998.

COUTO, J. L. A. **Esquistossomose mansoni em duas mesorregiões do Estado de Alagoas.** Apoio da Fundação Nacional de Saúde (Programa de Controle da Esquistossomose). Departamento de Patologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL. Recebido para publicação em 26/02/2004 . Aceito em 18/3/2005

CRAVEIRO, A.A. et al. **Óleos Essenciais de Plantas do Nordeste.** **Fortaleza:** EUFC, 1981. 210p.

DAVIS, P. **Aromaterapia.** São Paulo: Martins Fontes, 1996.

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

ESSAWI, T; SROUR, M. **Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity.** Journal of Ethnopharmacology, Clare. v.70, n.3, p.343-349, June 2000.

EZZAT SM 2001. **In vitro inhibition of *Candida albicans* growth by plant extracts and essential oils.** *World J Microb Biot* 17: 757-759

FARMACOPEIA BRASILEIRA IV-PARTE 1. 4ª Ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1996, 1320p.

FAJARDO, G. et al. **Comparative study of the oil and supercritical CO₂ extract of Mexican pimento (*Pimenta dioica* Merrill).** J. Essent. Oil Res., v.9. n.2, p. 181-185, 1997.

FEITOSA, E. M. A.; ARRIAGA, A. M. C.; SANTIAGO, G. M. P.; LEMOS, T. L. G.; OLIVEIRA, C. F.; VASCONCELOS, J. N.; LIMA, J. Q.; MALCHER, G. T.; NASCIMENTO, R. F.; BRAZ-FILHO, R. **Chemical composition and larvicidal activity of rollinia leptopetala (Annonaceae).** *J. Braz. Chem. Soc.*, 20(2): S1, 2009.

FERREIRA, R. R.; DAMY, S. B.; REIS, A. M.; TOLOSA, E. M. C. **Isolamento de *Proteus* de lavado tráqueo-bronquial de camundongos.** Controle de Contaminação, julho 2008.

FERREIRA LA, LIMA FL, ANJOS MR, COSTA JML 1998. **Forma tumoral encefálica esquistossomótica: apresentação de um caso tratado cirurgicamente.** *Rev Soc Bras Med Trop* 31: 89-93.

FERREIRA, C. (2001). **Material de apoio às aulas de Ecotoxicologia da licenciatura de Engenharia do Ambiente.** FCMA, Universidade de Algarve.Faro.

FORBES, V. E.; FORBES, T. L. **Ecotoxicology in theory and practice.** Londres: Chapman and Hall, 1994. 247 p.

(Fonte: – Wladimir Lobato Paraense – Comitê de Doenças Tropicais (TDR) – Organização Mundial de Saúde (OMS) – **Doenças infecciosas e parasitárias**, Ricardo Veronesi, editora Guanabara – Dicionário de termos técnicos de medicina e saúde, Luís Rey, editora Guanabara- Koogan – Enciclopédia Barsa).

FUH, M.R. et al. **Preparative-scale supercritical-fluid extraction of essential oils from *Syzygium aromaticum* (Clove bud).** *Int-Lab.*, p. 26, 1996.

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

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.77-80, Jul-Dez/2001.

GOVINDARAJAN, V.S. **Turmeric – chemistry, technology and quality.** CRC Critical Reviews in Food Science Nutrition, v. 12, p. 199-301, 1980.

GUENTHER, E. **The Essential Oils. Individual essential oils of the plant families Gramineae, Lauraceae, Burseraceae, Myrtaceae, Umbelliferae and Geraniaceae.** New York: D. Van Nostrand, 1950.

HAMMR, K.A; CARSON, C.F; RILEY, T.V. **Antimicrobial activity of essential oils and other plants extracts.** Journal of Applied Microbiology. v.86, p.985-990, 1999.

JURBERG, P.; VASCONCELLOS, M. C.; MENDES, N. M. **Plantas Empregadas como moluscicidas: Uma visão crítica.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1989; 84 (supl.I): 76-83.

KALIL FILHO, A. N. et al. **Embrapa**, Manaus, 2000.

KATZER, G. **Allspice (*Pimenta dioica* [L.] Mer.).** Disponível em: <http://www-ang.kfunigraz.ac.at/~katzer/eugl/pime-dio.html> Acesso em: 17 mar. 2009.

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

Kloos H & Mcculloch FS. **Plant Molluscicides: a review.** Wld Hlth Org.; 1981.

KOLLMANNBERGER, H.; NITZ, S. **The flavour-composition of supercritical gas extracts: 2. Allpice (*Pimenta dioica*).** Chemie

Mikrobiologie Technologie der Lebensmittel, p.116-126, 1993.

LANÇAS, F.M. **Cromatografia Gasosa**. São Carlos: Suprema, 1993, 254p.

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.

LEMOS, T.L.G.et al. **Antimicrobial ativity of essential oils of Brazilian plants**. *Phytotherapy Research*, 1990, v.4, p. 82-84.

LOPEZ, A.B; CAPÓ, J.T; GONZÁLEZ, Y.C. **Actividad analgésica y antipirética de un extracto fluido de *Pimenta dioica* L. y evaluación de su toxicidad aguda oral**. *Rev. Cubana Farm.* v.32, n.3, p.198-203, 1998.

LOPES, W. B.; MORONI, F. T.; BRANDEBURGO, M. I. H.; HAMAGUCHI, A. **Desenvolvimento de um método alternativo ao uso de animais de laboratório para avaliação da toxicidade de extratos vegetais**. *Rev. on-line da PROPP*, Uberlândia, v. 1, 2002.

LUNA, J. S.; SANTOS, A. F.; LIMA, M. R. F.; OMENA, M. C.; MENDONÇA, F. A. C.; BIEBER, L. W.; SANT'ANA, A. E. G. **A Study of the Larvicidal and Molluscicidal Activities of Some Medicinal Plants From Northeast Brazil**. *Journ. Ethnopharm.*, v. 97, n. 2, p. 199-206, 2006.

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

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.

MAIA, N.B.; BOVI, O.A.; DUARTE, F.R. **Obtenção e análise do óleo essencial do gengibre: efeito de secagem e processamento.** *Bragantia*, Campinas, v.50, n. 6, p. 1332-1344, Dec.2005.

MACRAE, W. D.; Hudson, J. B.; Towers, G. H. N.; *J. of Ethnopharm.* 1988, 22, 143.

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

MARINHO, Silvio Carvalho. **Estudo químico, avaliação eletroquímica e atividade larvicida do óleo essencial das folhas da *Pimenta dioica* Lindl frente *Aedes aegypti* (linnaeus, 1762),** Tese de doutorado-Universidade federal da Paraíba/Pb, 2010.

MARSTON, A.; HOSTETTMMANN, K. **Plant molluscicides.** *Phytochemistry*. v. 24, n. 4, p. 639-52, 1985.

MARTINS, ANDRÉ GUSTAVO LIMA DE ALMEIDA. **Atividade antibacteriana dos óleos essenciais do manjeriço (*Oncimum basilicum* Linnaeus) e do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) frente a linhagens de *Escherchia coli* enteropatogênicas isoladas de hortaliças.** João

Pessoa. 2009, 176f. Tese (Doutorado em Química)-UFPB/CT.

MARTINS, A.P.; SALGUEIRO, L.; GONÇALVES, A.; CUNHA, P.; VILA, R.; CAMIGUERAL, S.; MAZZONI, V.; TOMI, F.; CASANOVA, J. **Essential oil composition and antimicrobial activity of three Zingiberaceae from S. Tomé e Príncipe.** *Planta Med.* v,67, p.580-584, 2001.

MCLAUGHLIN, J. L.; Chang, C-J.; Smith, D. L.; **In *Studies in Natural Products Chemistry, Vol. 9, Ed. Atta-ur-Rahman, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam 1991, p. 383-409.***

MCLAUGHLIN, J. L.; SAIZARBITORI, T. C.; ANDERSON, J. E.; 1995. **Tres bioensayos simples para químicos de productos naturales.** *Rev Soc Venez Quim 18:* 13-18.

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

MENDES, N. M. **Ensaio preliminar do *Guaiacum officinale L.* como moluscicida.** *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo,* Dez 1993, vol.35, no.6, p.509-513. ISSN 0036-4665.

MERCK 13, 7664. **Informe técnico do fabricante.**

MERCK. **Microbiology manual 2000.** Darmstadt, Alemanha: Merck KGaA, 1996.

MEYER, BN; Ferrigni, NR; Putnam, JE; Jacobsen, LB; Nichols, DE; Mclaughlin, JL. **Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents.** *Planta Medic.*, v. 45, p. 31-34, 1982.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde
Departamento de Vigilância Epidemiológica Esplanada dos Ministérios,
bloco G Edifício Sede, 1.º andar, sala 134 CEP: 70058-900, Brasília –
DF *E-mail:* svcs@saude.gov.br *Home page:* www.saude.gov.br/svs
Impresso no Brasil / *Printed in Brazil.* © 1995

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

MIYAZAWA, M.; KAMEOKA, H. **Volatile flavor components of Zingiberis Rhizoma (*Zingiber officinale* Roscoe).** *Agriculture and Biological Chemistry*, v. 52, n. 11, p. 2961-2963, 1998.

MONTEIRO, Odair dos Santos. **Estudos analíticos do eugenol contido no óleo essencial extraído dos frutos da espécie *Pimenta dioica* e sua aplicação como agente bactericida.** São Luís, 2004. 98p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão.

MONTEIRO, O.S. **Caracterização do óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl e sua aplicação como atrativo de abelhas *Euglossina*.** João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, 2008. Tese de doutorado, 148p.

MOUCHREK FILHO, V. E. **Introdução à Química de Óleos Essenciais**. São Luís, 2001. 72p. Apostila.

MORGAN, R. **Enciclopédia das Ervas e Plantas Medicinais**. São Paulo: Hemus, 1994.

MOUCHREK FILHO, Victor Elias. **Estudos Analíticos e modificações químicas por metilação e acetilação do eugenol contido no óleo essencial extraído das folhas da espécie *Pimenta dioica* Lindl.** São Carlos. 2000, 124f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos, São Carlos/SP, 2000.

NASCIMENTO, Adenilde Ribeiro. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais frente a bactérias isoladas de sururu (*Mytella falcata*)**. Lavras. 2004, 91f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG, 2004.

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

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

OJASTI, J; Jiménez, E G; Otahola, E S; Román, L B G. **Informe sobre las Especies Exóticas en Venezuela, Caracas**. Ministerio del Ambiente y de los Recursos Naturales, 2001.

OLIVEIRA, R. W. S., **Caracterização Química e Atividade**

Antibacteriana do óleo essencial extraído da casca do limão (*Citrus limon* Linneo) frente à *Enterococcus* E *Escherichia coli*. 62^a Reunião Anual da SBPC,2010.

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

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

PAULINI E. **Estado atual do conhecimento sobre moluscidas.** *Rev. Bras. Malariologia e Doenças Tropicais*. 1965; 4(15):355-62.

PARRY, J.W. **Spices.** *New York: Chemical*,1969. v.II. p.7-11.

PEREIRA, M.L; BASTOS, E.M.A.F; MONTEIRO, E.P; AMÂNCIO, G.C.S; SERRANO, A.M. **Antibiotic activity of Brazilian green própolis against bactéria from human clinical etiology.** *In: CONGRESS APIMANDIA '99, 36, 1999. Vancouver. Anais... Vancouver, 1999. p.225.*

PINHEIRO, L. CORTEZ, D.A.G.; VIDOTTI, G.J.; YOUNG, M.C.M.; FERREIRA, A.G. 2003. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade moluscida de *Kielmeyera variabilis* MART.** *Química Nova* 26: 157-160.

PURSEGLOVE, J.W. **Tropical crops.** *Dicotyledons. Longman, 1960. p. 408-414.*

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

RALPH, L.S. ***Identificação sistemática de compostos orgânicos. Manual de Laboratório.*** 6.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1983, p. 367-378.

RAMONI, R.; VINCENT, F.; GROLLI, S.; CONTI, V.; MALOSSEI, C.; BOYERI, F. O.-D.; MEILLOURI, P. N.-L.; SPINELLI, S.; CABBILLAU, C.; TEGONI, M. **The insect attractant 1-octen-3-ol is the natural ligand of bovine odorant-binding protein.** *J. Biological Chem.*, 276(10): 7150, 2001.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent end-points. *Amer. J. Hyg.*, **27**:493-7, 1938.

REY L. **Parasitologia.** 3ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.; 2001.

RIBEIRO, J. D. **Estudo analítico e avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial da espécie *Pimenta dioica Lindl.*** João Pessoa, 2009. 93f. : il. Orientadores: Victor Elias Mouchrek Filho, Antônio Gouveia de Souza Tese (Doutorado) – UFPB/CCEN.1.

RICHMOND, R.; POMBO-VILLAR, E. **Gas chromatography mass spectrometry coupled with pseudo-sadtler retention indices,**

for the identification of components in the essential oil of *Curcuma longa* L. Journal of Chromatography A, v. 760, p. 303-308, 1997.

ROBLES, C. et al. **Essential Oil Composition of *Cistus Albidus* Leaves.** Phytochemistry, v.48, n.8, p. 1343-1345, 1998.

RUIZ, A. L. T. G.; MAGALHÃES, E. G.; MAGALHÃES, A. F.; FARIA, A.D.; AMARAL, M. C. E.; SERRANO, D.R.; ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M.; MAGALHÃES, L. A. **Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (Cyperaceae).** Rev. Bras. Farmacogn., v. 15, n. 2, 2005.

SAHPAZ, S.; Boris, Ch.; Loieau, P. M.; Cortes, D; Hacquemiller, R.; Laurens A.; Cavé, A.; ***Planta Medica***. 1994, 60, 538.

SANTOS, A. F.; AZEVEDO, D. P. L.; MATA, R. C. S.; MENDONÇA, D. I. M. D.; SANT'ANA, A. G. **The lethality of *Euphorbia conspicua* to adults of *Biomphalaria glabrata*, cercaria of *Schistosoma mansoni* and larvae of *Artemia salina*.** ***Bioresource Technology***. v. 98, p. 135–139, 2007.

SALVAT, A; ANTONNACI, L; FORTUNATO, R.H; SUAREZ, E.Y; GODOY, H.M. **Screening of some plants from Northern Argentina for their antimicrobial activity.** Letters in Applied Microbiology, Oxford, v.32, n.5, p.293-297, May 2001.

SHARMA, R.K.; MISRA, B.P.; SARMA, T.C.; BORDOLOI, A.K.;

PATHAK, M.G.; LECLERCQ, P.A. **Essential oils of *Curcuma longa* L. from Bhutan.** Journal Essential Oil Research, v. 9, p. 589-592, 1997.

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 *Biomphalaria glabrata*.** Rev. bras. farmacogn. v. 19, n. 4, 2009.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos.** 7ª ed. Rio de Janeiro: LTC - Livros Técnicos e Científicos Editora, 2007.

SIMÕES, C. M. O. SPITZER, V. Óleos Voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. P. C; MENTZ, L. A.; PETROVIK, P. R. (orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Porto Alegre: UFSC, p. 467-495, 2004.

SMITHERS,S.R.& TERRY. **The imunoly of Schistosomiasis. In: Souza, Nêuton da S. Visão Parasitológica da cepa humana de schistosoma mansoni em roedor silvestre.** 1992. Monografia(Graduação em Farmácia)- Universidade Federal do Maranhão, São Luis.

SOBRINHO, João Reis Salgado. **Estudo analítico do óleo essencial extraído das folhas da espécie Pimenta dioica Lindl. e sua aplicação como agente bactericida.** (Mestrado em Química Analítica). Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2007.

SOUZA, C. P.; RIBEIRO, P. R. B.; GUIMARÃES, C. T.; JANNOTTI-

PASSOS, L. K. & SOUZA, M. A., 1996. **Esquistossomose: a expansão de** *Biomphalaria straminea* **em Belo Horizonte, Minas Gerais.** Cadernos de Saúde Pública,12:541-544.

SOARES, A.C. **Se bem não fizer, mal também não fará.** Revista Eletrônica de Ciências. n.12, out. 2002.

SRINIVASAN, D; NATHAN, S; SURESH, T; PERUMALSAMY, P.L. **Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine.** Journal of Ethnopharmacology. n.74, p.217-220, 2001.

TELES, Rogério de Mesquita. **Estudo analítico do linalol contido no óleo essencial extraído de galhos da espécie *Aniba duckei* Kostermans e sua aplicação como agente bactericida.** São Luís. 2003, 99f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís/MA, 2003.

TEIXEIRA, Z. da S., ALMEIDA, M.S.B., RASSY, M.E. de C., ALVES, E.T. **Plantas medicinais mais conhecidas na comunidade de previnciaría e a realidade quanto a seu uso.** Belém: Escola de Enfermagem Magalhães Barata, 1986.

TRIPATHI, P.; DUBEY, N. K.; SHUKLA, A. K. **Use of the essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of grey mould of grapes caused by *Botrytis cinerea*.** World Journal of Microbiology, v. 24, n.1, p. 39-46, 2008.

VEKIARI SA, Protopapadakis EE, Papadopoulou P, Papanicolaou D,

Panou C, Vamvakias M 2002. **Composition and seasonal variation of the essential oil from leaves and peel of a Cretan lemon variety.** *J Agric Food Chem* 50: 147-153.

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

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

WITCHELL, J.K; CARTES, W.E. **Modeling antimicrobial activity of Clorox using an agar-diffusion test: a new twist on an old experiment.** *Bioscene.* v.26, n.3., Aug. 2000.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Report of the Scientific working Group on Plant Molluscicide & Guidelines for evaluation of plant molluscicides.** Geneva: TDR/SC 4-SWE (4)/83.3, 1983.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **WHO Policy perspectives on medicines: medicina tradicional – necesidades crecientes y potencial.** geneva, 2002. 6p.

WORWOOD, S. **Aromaterapia: Um guia de A a Z para o uso terapêutico dos óleos essenciais.** São Paulo: Best Seller, 1995.