



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

EDILENE CARVALHO GOMES RIBEIRO

**MOLUSCICIDA A PARTIR DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Hyptis pectinata* E DE
MONOTERPENOS IDENTIFICADOS EM ESPÉCIES AROMÁTICAS
NATIVAS DA AMAZÔNIA**

SÃO LUÍS

2021

EDILENE CARVALHO GOMES RIBEIRO

**MOLUSCICIDA A PARTIR DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Hyptis pectinata* E DE
MONOTERPENOS IDENTIFICADOS EM ESPÉCIES AROMÁTICAS
NATIVAS DA AMAZÔNIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia / UFMA, para obtenção do título de doutora em Biotecnologia.

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

SÃO LUÍS

2021

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

Ribeiro, Edilene Carvalho Gomes.

Moluscicida a partir do óleo essencial de *Hyptis pectinata* e de monoterpenos identificados em espécies aromáticas nativas da Amazônia / Edilene Carvalho Gomes Ribeiro. - 2021.

99 f.

Orientador(a): Denise Fernandes Coutinho.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Biotecnologia - Renorbio/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2021.

1. Esquistossomose. 2. *Hyptis pectinata*. 3. Pineno.
4. Timol. I. Coutinho, Denise Fernandes. II. Título.

EDILENE CARVALHO GOMES RIBEIRO

**MOLUSCICIDA A PARTIR DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Hyptis pectinata* E DE
MONOTERPENOS IDENTIFICADOS EM ESPÉCIES AROMÁTICAS
NATIVAS DA AMAZÔNIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia / UFMA, para
obtenção do título de doutora em
Biotecnologia.

Aprovada em 25/05/2021.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Denise Fernandes Coutinho
Universidade Federal do Maranhão
Orientadora

Profa. Dra. Joicy Cortez de Sá Sousa
Universidade CEUMA

Profa. Dra. Marilene Oliveira da Rocha Borges
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Wellyson da Cunha Araújo Firmo
Universidade CEUMA

Prof. Dra. Wolia Costa Gomes
Universidade CEUMA

São Luís - MA

2021

Dedico

A Minha Família

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as bênçãos.

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

A todos os professores da Renorbio por contribuírem em minha formação.

Ao professor Dr. Odair Monteiro (Laboratório de óleos essenciais - UFMA) pela contribuição na coleta da espécie estudada e extração do óleo essencial.

Ao professor Dr. José Guilherme Soares Maia (Laboratório de óleos essenciais - UFPA) pela contribuição com a análise química do óleo essencial.

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

A professora Dra. Alexandra Martins Santos Soares (Laboratório Bioquímica vegetal - UFMA) pela contribuição com os testes da acetilcolinesterase em caramujos.

Aos amigos do Laboratório de Farmacognosia, pela companhia e ajuda.

A secretaria e coordenação da Renorbio pelo suporte administrativo prestado.

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

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

Obrigada!

RESUMO

A pesquisa por agentes biologicamente ativos oriundos de espécies vegetais tem possibilitado a descoberta de substâncias de extrema importância no controle de várias enfermidades. Diante da diversidade de substâncias bioativas presentes em óleos essenciais de espécies vegetais, bem como do cenário epidemiológico da esquistossomose, doença negligenciada de alto impacto social e econômico no mundo, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito moluscicida do óleo essencial (OE) de *Hyptis pectinata* (sambacaitá) e dos monoterpenos cânfora, 1,8-cineol, α -pineno e timol, contra caramujos *Biomphalaria glabrata*. O OE foi extraído de folhas de *H. pectinata* por hidrodestilação. A análise da composição química do óleo essencial foi realizada por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama e espectrometria de massa. Os monoterpenos foram avaliados individualmente quanto ao potencial moluscicida. Os ensaios moluscicida, tanto do OE quanto dos monoterpenos, foram realizados conforme metodologia padrão da Organização Mundial da Saúde. A toxicidade a organismos não-alvo foi avaliada em peixes da espécie *Danio rerio*, conforme metodologia da Associação Brasileira de Normas Técnicas. O OE de *H. pectinata* apresentou rendimento de 1,5% e foram identificados 21 compostos. A atividade moluscicida exibida pelo OE contra *B. glabrata* foi significativa com CL_{90} 63,02 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Em relação aos monoterpenos, o cânfora e 1,8-cineol não induziram mortalidade dos caramujos. O timol e α -pineno foram ativos contra *B. glabrata*, induzindo mortalidade em padrões dependentes de concentração com CL_{90} 7,11 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 10,34 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. Foi examinado o efeito do timol e α -pineno sobre a inibição da atividade de acetilcolinesterase (AChE) de *B. glabrata*. Essa atividade foi determinada conforme método de Ellman. Os resultados mostraram que o timol e α -pineno são inibidores da AChE de *B. glabrata*, porém em concentrações superiores às utilizadas no teste moluscicida. O OE de *H. pectinata* e os monoterpenos timol e α -pineno apresentaram baixa toxicidade em peixes *D. rerio* comparado ao moluscicida comercial niclosamida. O conhecimento da toxicidade do óleo de *H. pectinata* e dos monoterpenos timol e α -pineno contra *B. glabrata* contribui para seu potencial uso em formulações moluscicidas e alternativas no controle da esquistossomose.

Palavras- chave: Esquistossomose. *Hyptis pectinata*. Timol. α -pineno.

ABSTRACT

The search for biologically active agents from plant species has enabled the discovery of extremely important substances in the control of various diseases. In view of the diversity of bioactive substances present in essential oils, as well as the epidemiological scenario of schistosomiasis, a neglected disease with a high social and economic impact in the world, this work aims to evaluate the molluscicidal activity of the essential oil (EO) of *Hyptis pectinata* (sambacaitá) and the monoterpenes camphor, 1,8-cineole, α -pinene and thymol, against *Biomphalaria glabrata* snails. The EO was extracted from the leaves of *H. pectinata* by hydrodistillation. The chemical composition analysis of essential oil was carried out by gas chromatography with flame ionization detector and mass spectrometry. The camphor, 1,8-cineole, α -pinene and thymol monoterpenes were evaluated individually for the molluscicidal potential. Molluscicide tests, both for EO and monoterpenes, were performed according to the standard methodology of the World Health Organization. Toxicity to non-target organisms was evaluated in fish of the species *Danio rerio*, according to the methodology of the Brazilian Association of Technical Standards. The *H. pectinata* showed a 1.5% yield and 21 compounds were identified. The molluscicidal activity exhibited by the EO against *B. glabrata* was significant with LC_{90} 63.02 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Regarding monoterpenes, camphor and 1,8-cineole did not induce snail mortality. Thymol and α -pinene were active against *B. glabrata*, causing mortality in concentration-dependent and LC_{90} 7.11 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and 10.34 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. The effect of thymol and α -pinene on inhibition of acetylcholinesterase (AChE) activity of *B. glabrata* was examined. This activity was determined according to the Ellman method. The results showed that thymol and α -pinene are inhibitors of AChE of *B. glabrata*, but at higher concentrations than those used in the molluscicide test. The *H. pectinata* oil and the monoterpenes thymol and α -pinene, showed low toxicity for *D. rerio* fish compared to the commercial molluscicide niclosamide. The knowledge of the toxicity of *H. pectinata* oil and of the monoterpenes thymol and α -pinene against *B. glabrata* contributes to its potential use in molluscicidal and alternative formulations in the control of schistosomiasis.

Keywords: Schistosomiasis. *Hyptis pectinata*. Thymol. α -pinene.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Referencial teórico

Figura 1. Mapa da Amazônia Legal Brasileira.....	17
Figura 2. <i>Hyptis pectinata</i> (L.) Point.	19
Figura 3. Esquema das rotas biossintéticas dos metabólitos secundários.	23
Figura 4. Representações da molécula de isopreno	24
Figura 5. Fatores que influenciam o acúmulo de metabólitos secundários na planta.....	25
Figura 6. Ciclo evolutivo do parasito <i>Schistosoma mansoni</i>	28
Figura 7. Característica conquiliológica do gênero <i>Biomphalaria</i>	29

Capítulo I

Figure 1. Mortality rate (%) of wild snails of <i>Biomphalaria glabrata</i> after 24 hours of exposure to the <i>Hyptis pectinata</i> essential oil at different concentrations ($\mu\text{g.mL}^{-1}$).	56
--	----

Capítulo II

Figure 1. Chemical structure of the monoterpenes used in the study. (1) camphor, (2) thymol, (3) α -pinene, and (4) 1,8-cineole	75
Figure 2. Snail mortality indicated by hemolymph extravasation (A), cephalopod mass retraction, and shell discoloration (B).....	80
Figure 3. Mortality rate (%) of wild <i>Biomphalaria glabrata</i> snails after a 24-hour exposure to the monoterpenes thymol (A) and α -pinene (B) at different concentrations ($\mu\text{g.mL}^{-1}$).	82
Figure 4. Inhibitory effect of the monoterpenes thymol (A) and α -pinene (B) at different concentrations (mg.mL^{-1}) on acetylcholinesterase from extracts of <i>Biomphalaria glabrata</i>	83

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Table 1. Chemical characterization of the <i>Hyptis pectinata</i> essential oil.....	54
Table 2. Estimated values of LC ₅₀ and LC ₉₀ for the <i>Hyptis pectinata</i> essential oil against <i>Biomphalaria glabrata</i> snails after 24 hours of exposure.....	56
Table 3. Toxicity of the <i>Hyptis pectinata</i> essential oil on the fish <i>Danio rerio</i>	57

Capítulo II

Table 1. Molluscicide activity of the monoterpenes camphor, thymol, α -pinene, and 1,8-cineole at a concentration of 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ against <i>Biomphalaria glabrata</i> evaluated during the exposure period (24 h) and recovery phase (up to 72 h after treatment).....	80
Table 2. Estimated values of LC ₅₀ and LC ₉₀ of the monoterpenes thymol and α -pinene against <i>Biomphalaria glabrata</i> snails after 24 hours of exposure.....	81
Table 3. Toxicity of thymol and α -pinene monoterpenes to <i>Danio rerio</i> fish.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS / SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AChE	Acetilcolinesterase
CG	Cromatografia em fase gasosa
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
CI ₅₀	Concentração inibitória 50% da atividade de acetilcolinesterase
CL ₅₀	Concentração letal que induz mortalidade de 50% dos indivíduos
CL ₉₀	Concentração letal que induz mortalidade de 90% dos indivíduos
CLs	Concentrações letais
CuSO ₄	Sulfato de cobre
DMSO	Dimetilsulfóxido
IK	Índice de retenção de Kovats
OE	Óleo Essencial
OMS	Organização Mundial de Saúde
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
3 REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1 Plantas aromáticas da Amazônia	16
3.2 <i>Hyptis pectinata</i> (L.) Poit (Lamiaceae)	18
3.3 Óleos Essenciais.....	20
3.3.1 Obtenção de óleos essenciais	21
3.3.2 Composição química e aplicação dos óleos essenciais	22
3.4 Esquistossomose Mansônica	26
3.4.1 Ciclo biológico do parasito <i>Schistosoma mansoni</i>	26
3.4.2 Caramujos do gênero <i>Biomphalaria</i>	29
3.5 Estratégias de controle da esquistossomose	30
3.5.1 Moluscidas	31
REFERÊNCIAS	35
CAPÍTULO 1. Chemical characterization and molluscicidal activity of the <i>Hyptis pectinata</i> (L.) Poit. essential oil against <i>Biomphalaria glabrata</i> (Say,1818).....	46
CAPÍTULO 2. Molluscicidal activity of monoterpenes and their effect on inhibition of acetylcholinesterase activity on <i>Biomphalaria glabrata</i> , an intermediate host of <i>Schistosoma mansoni</i>	71
CONCLUSÃO.....	98

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença negligenciada de grande importância no contexto da saúde pública global, que atinge milhões de pessoas por ano (WHO, 2017). Essa doença prevalece em condições de pobreza, contribui para a manutenção do quadro de desigualdade social, representando forte entrave ao desenvolvimento dos países, portanto, demanda ações estratégicas para sua eliminação (OLIVEIRA, 2018).

No Brasil, a transmissão da esquistossomose ocorre em todas as regiões, as áreas endêmicas e focais abrangem 19 Unidades Federadas, e as maiores taxas de incidência ou prevalência são registradas nas regiões Nordeste e Sudeste. Segundo o Ministério da Saúde cerca de 25 milhões de brasileiros vivem em áreas sob o risco de contrair a doença (BRASIL, 2019). O Maranhão apresenta índices consideráveis desta doença, com distribuição endêmica em 20 dos seus 217 municípios e 29 municípios apresentam focos isolados (CANTANHEDE, 2014).

O parasito responsável por essa afecção, *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907), além do homem, necessita de hospedeiro intermediário para completar seu ciclo vital, sendo representado por caramujos de água doce do gênero *Biomphalaria*, especialmente os da espécie *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), em decorrência de sua extensa distribuição geográfica e eficiência na transmissão do parasito (SCHOLTE et al., 2012). Caramujos *Biomphalaria* são decisivos no ciclo de transmissão da esquistossomose, desta forma, o controle da população malacológica com aplicação de moluscidas é um método eficiente e recomendado nos programas de controle integrado da esquistossomose, pois interrompe a transmissão do parasito (PEREIRA FILHO et al., 2014; WHO, 2017).

Muitas substâncias sintéticas com efeito moluscida já foram testadas para controlar a fauna planorbídica, no entanto, até o composto niclosamida, único produto moluscida aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), apresenta efeito tóxico para animais coabitantes, além disso, caramujos *Biomphalaria* tem desenvolvido resistência a esse produto (BRAZ FILHO, 2010).

Nesse contexto, substâncias presentes em vegetais têm sido estudadas como alternativas para obtenção de um produto moluscida biodegradável e com baixa toxicidade a organismos não-alvo, que possam ser utilizados no controle de caramujos.

Entre as plantas testadas no Brasil com potencial atividade moluscicida, destacam-se as da família Lamiaceae (SANTOS et al., 2012). A família Lamiaceae está entre as cinco principais famílias de plantas aromáticas que predominam na região amazônica, sendo consideradas fontes apropriadas para a produção de óleo essencial (MAIA; ANDRADE, 2009). O óleo essencial (OE) das folhas da espécie *Hyptis pectinata* (Lamiaceae) é considerado promissor para várias atividades biológicas e contém diversas substâncias bioativas, incluindo compostos antimicrobianos, inseticida e larvicida (NASCIMENTO et al., 2008; RAYMUNDO et al., 2011; SILVA et al., 2008). No entanto as propriedades moluscicida deste óleo ainda não foram descritas.

Os óleos essenciais são misturas de substâncias, principalmente monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides. Alguns terpenos atuam como inibidores da atividade enzimática de acetilcolinesterase (AChE) de invertebrados (JANKOWSKA et al., 2017). A AChE desempenha papel vital na manutenção do funcionamento fisiológico de moluscos (TEIXEIRA et al., 2012) e tem sido o principal alvo de moluscicidas organofosforados e carbamatos, podendo ser usado como um potente biomarcador de toxicidade em moluscos (HE et al., 2017; MA et al., 2014).

As diversas atividades biológicas dos OEs geralmente são atribuídas aos compostos terpênicos que estão presentes em maior quantidade nos óleos, contudo, a ação desses compostos isoladamente é pouco investigada (GUIMARÃES et al., 2019).

Neste estudo, avaliamos quatro monoterpenos (timol, α -pineno, 1,8-cineol, cânfora), identificados como compostos majoritários de OEs de plantas nativas da Amazônia, que demonstraram alto potencial moluscicida em estudo anterior conduzido por nosso grupo de pesquisa (RIBEIRO, 2016). Portanto, esses monoterpenos podem estar relacionados à ação moluscicida e devem ser investigados individualmente.

Considerando a diversidade de substâncias bioativas presentes em OEs bem como o cenário epidemiológico da esquistossomose, justifica-se a investigação de novas substâncias com propriedades moluscicida como alternativa para o controle da esquistossomose.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a atividade moluscicida do óleo essencial de *Hyptis pectinata* e dos monoterpenos cânfora, 1,8-cineol, α -pineno e timol, contra caramujos *Biomphalaria glabrata*.

2.2 Específicos

Caracterizar a composição química do óleo essencial das folhas de *H. pectinata*;

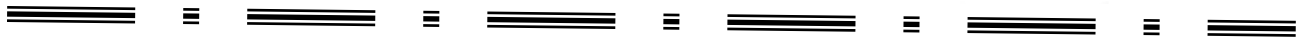
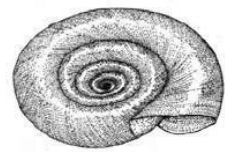
Determinar as concentrações letais (CL₅₀ e CL₉₀) do óleo essencial de *H. pectinata* sobre *B. glabrata*;

Determinar as concentrações letais (CL₅₀ e CL₉₀) dos monoterpenos cânfora, 1,8-cineol, α -pineno e timol sobre *B. glabrata*;

Avaliar a ação dos monoterpenos sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase em *B. glabrata*;

Verificar a toxicidade aguda do óleo essencial de *H. pectinata* e dos monoterpenos em organismos não-alvo.

Referencial Teórico



3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Plantas aromáticas da Amazônia

A Amazônia apresenta uma expressiva fração da diversidade mundial de plantas, animais e microrganismos. Estima-se a existência de quarenta mil espécies de plantas vasculares, das quais, trinta mil são endêmicas na região amazônica (FORZZA, 2010). Nesta região, há registros de duas mil espécies medicinais usadas pela população local como medicamentos, além de cerca de 1.250 espécies de plantas aromáticas (MAIA; ANDRADE, 2009).

Plantas aromáticas são espécies vegetais que possuem aroma capaz de sensibilizar o olfato, geralmente de forma agradável, cujos princípios ativos são constituídos, total ou majoritariamente, por essências (CORREA JÚNIOR et al., 2014). As plantas aromáticas são usadas desde tempos imemoriais pelos índios e fazem parte do cotidiano amazônico, independente do estrato social, religião ou grupo étnico. Foram apropriadas pelos brancos e seus descendentes caboclos e ribeirinhos, urbanos, classe média ou alta, que as utilizam na alimentação, na medicina, na cosmética natural, na perfumaria e nos rituais da aromaterapia amazônica (BARATA, 2012). Embora o conhecimento do poder de plantas aromáticas seja milenar, somente nos últimos anos tem havido um interesse maior por parte de farmácias de manipulação, indústrias alimentícia e de medicamentos, e em vários ramos da biotecnologia, constituindo um mercado altamente promissor (SALES, 2015).

As principais famílias de plantas aromáticas que predominam na região amazônica são (em ordem decrescente): Piperaceae, Asteraceae, Myrtaceae, Lamiaceae, Annonaceae, Lauraceae, Euphorbiaceae, Verbenaceae, Scrophulariaceae e Anacardiaceae (MAIA; ANDRADE, 2009). A Amazônia é rica em espécies aromáticas, contudo diversos recursos naturais se perdem a cada quilômetro quadrado de floresta destruída. Estima-se que o desmatamento tenha devastado até o ano de 2020 cerca de 438.006 km² de floresta e a principal consequência do desflorestamento na Amazônia é a perda de biodiversidade (INPE, 2020).

A Floresta Amazônica abrange quatro milhões de quilômetros quadrados (km²) no território brasileiro e se estende a nove estados do país (Figura 1).

Figura 1. Mapa da Amazônia Legal Brasileira



Fonte: Imazon (2015).

O Estado do Maranhão (oeste do meridiano 44°) foi incorporado à Amazônia brasileira pela Lei 1.806, de 06 de janeiro de 1953, e representa um dos estados que mais desmataram a floresta. Atualmente, a Amazônia Maranhense apresenta menos de 25% de sua vegetação original (INPE, 2021).

No Maranhão, a região amazônica propriamente dita é compreendida pelas regiões a oeste do paralelo 44 ° e detém 26% do bioma amazônico (MARLÚCIA; OLIVEIRA, 2011). Aparece no cenário nacional como uma das áreas de maior

diversidade vegetal, contudo quanto menor a quantidade de informações sobre os recursos existentes e possíveis formas de utilização sustentável, mais difícil é conscientizar a população da necessidade de sua conservação. Muito ainda tem que se investir no conhecimento da sua flora, pois poucas espécies têm sido descritas quanto às suas características morfológicas, composição química e atividades biológicas (MUNIZ, 2006; MARLÚCIA; OLIVEIRA, 2011).

3.2 Família botânica Lamiaceae e espécie *Hyptis pectinata* (L.) Poit

A família botânica Lamiaceae apresenta grande relevância na região amazônica, sendo constituída por plantas herbáceas a arbustivas, caracterizadas por apresentar caule e ramos tetragonares, flores zigomorfas, bilabiadas, e ovário com estilete ginobásico (BASÍLIO et al., 2006).

Esta família de plantas aromáticas compreende aproximadamente 258 gêneros e 7193 espécies, com ocorrência desde regiões tropicais até áreas de clima temperado (APG, 2017). No Brasil, existe cerca de 30 gêneros e 496 espécies nativas, sendo muitas destas endêmicas ao nordeste e região amazônica (HARLEY, 2012).

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

No Brasil, o gênero *Hyptis* abrange o maior número de representantes de Lamiaceae, com 69,5% de espécies endêmicas, apresentando grande variabilidade de metabólitos secundários, em especial os óleos essenciais, que conferem as principais características organolépticas do vegetal e têm grande valor junto a diversas comunidades devido as suas propriedades terapêuticas (HARLEY, 2012). Espécies desse gênero são tradicionalmente utilizadas no tratamento de infecções gastrointestinais, infecções da pele, câimbras e dores em geral (PINTO et al., 2010). Para esse gênero, já tem comprovada as atividades antibacteriana, fungicida, citotóxica, anti-inflamatória, anti-HIV e inseticida (COCK et al., 2019; FALCÃO et al., 2003; SARTORATTO et al., 2004).

Dentre as espécies pertencentes ao gênero *Hyptis*, destacamos a espécie *Hyptis pectinata* (L.) (Figura 2), que é uma planta nativa, não endêmica e encontra-se distribuída predominantemente no norte do Brasil com destaque a região amazônica (HARLEY, 2012). *H. pectinata*, popularmente conhecido como "canudinho" e "sambacaitá", é um arbusto aromático muito cultivado no Norte e Nordeste brasileiro, possui folhas aromáticas e com linhas cruzadas, flores pequenas agrupadas em inflorescências, hermafroditas, pentâmeras e zigomorfas (BISPO et al., 2001; FALCÃO et al., 2016).

Figura 2. *Hyptis pectinata* (L.) Poit



Fonte: Tropicos.org. Missouri Botanical Garden.

Esta espécie é amplamente utilizada na medicina tradicional para tratamento de distúrbios gastrointestinais, rinfaringite, congestão nasal, infecções cutâneas, febre, cólicas, inflamação e infecções causadas por bactérias e fungos (BISPO et al., 2001; FALCÃO et al., 2003; RAYMUNDO et al., 2011), também tem sido utilizada em enxaguatórios bucais prevenindo doenças da cavidade oral, como a cárie dentária e dor orofacial (NASCIMENTO et al., 2008; PAIXÃO et al., 2013). Estudos farmacológicos com *H. pectinata* comprovaram ainda atividades hemostáticas, anti-edematogênica e regeneração hepática em ratos (BASÍLIO et al., 2006).

A composição do óleo essencial de *H. pectinata* é bastante variável com predominância de sesquiterpenos. Os principais compostos já identificados no óleo

essencial desta espécie são calamusenone, β -cariofileno, óxido de cariofileno, D-germacreno e timol (SANTOS et al, 2008; TCHOUMBOUGNANG et al., 2005). O óleo essencial de *H. pectinata*, já demonstrou potencial antibacteriano considerável contra bactérias Gram-positivas de elevada patogenicidade e potencial antifúngico em linhagens de *Candida albicans* (NASCIMENTO et al. 2008; SANTOS et al., 2008). Outras atividades comprovadas para este óleo essencial foram o efeito antinoceptivo e anti-inflamatório (RAYMUNDO et al., 2011).

3.3 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais (OEs) são produtos abundantes em plantas aromáticas, às quais conferem odor e sabor característicos. A designação de “óleo” é devido a algumas características físico-químicas como, por exemplo, a de serem geralmente líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente, no entanto, é importante ressaltar que os OEs não possuem ácidos graxos sendo quimicamente diferentes da composição glicéridica dos óleos fixos. Sua principal característica é a volatilidade, que os diferenciam dos óleos de composição graxa, cujos componentes presentes são fixos e apresentam pontos de ebulição elevados (FIGUEIREDO et al., 2017).

Os OEs estão presentes em um grande número de plantas, sendo compostos por substâncias do metabolismo secundário, que não estão diretamente relacionados com o processo de crescimento, desenvolvimento e reprodução dos vegetais (GARCÍA; CARRIL, 2011). Por tempo foram considerados “desperdício fisiológico” ou produtos de desintoxicação, tal como se dizia dos produtos do metabolismo secundário. Entretanto, com os avanços científicos, são atribuídas aos OEs várias funções ecológicas necessárias à sobrevivência do vegetal em seu ecossistema, como a inibição da germinação de sementes (alelopatia), proteção contra calor ou frio, predadores, atração de polinizadores ou para repelir insetos (MIRANDA et al., 2016).

Os OEs são produzidos e armazenados em estruturas secretoras especializadas, tais como tricomas glandulares, canais oleíferos, células ou bolsas secretoras, que podem estar em vários órgãos dos vegetais. Assim, dependendo da espécie vegetal, os OEs podem estar presentes nas folhas, flores, ramos/caules, frutos, sementes ou raízes de diversas espécies (BUSATO et al., 2014).

3.3.1 Obtenção de óleos essenciais

Os OEs podem ser extraídos por diversos métodos, que variam conforme sua localização na planta e com a proposta de utilização do mesmo (SILVEIRA, 2012).

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

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

2. **Arraste por vapor d'água:** método mais utilizado para a extração de OEs a nível mundial, onde é possível obter óleos de diversas partes do vegetal. Neste processo o vapor d'água atravessa os tecidos da biomassa, levando consigo o óleo contido no interior de suas glândulas. O óleo vaporiza-se com o choque térmico, sendo “arrastado pelo vapor” até atingir o condensador, onde a mistura formada de óleo e hidrolato, resfria-se e volta à fase líquida. A separação do óleo e hidrolato ocorre por diferenças de polaridade e densidade. Neste método, a planta é colocada sobre uma placa perfurada de modo a evitar o contato direto com o solvente em ebulição (VALENTIM et al., 2018).

3. **Hidrodestilação:** método mais utilizado em escala laboratorial. O material vegetal a ser destilado fica em contato direto com a água, e quando esta entra em ebulição, o vapor força a abertura da parede celular e ocorre a evaporação do óleo que está entre as células da planta. O vapor, que consiste na mistura de óleo e água, passa por um condensador, e quando se resfria, forma uma mistura heterogênea de duas fases, que são separados devido à diferença de polaridade e densidade entre a água e o óleo. Nessa extração, é comum utilizar o aparelho tipo Clevenger (BUSATO et al., 2014).

4. **Extração por solventes orgânicos:** método em que os OEs são extraídos por meio de solventes apolares, como hexano, benzeno, tolueno, dentre outros que preservem melhor a integridade dos compostos presentes. A extração por solvente dá origem a dois produtos: o concreto, que é o produto da primeira fase, resultante da

extração com os solventes apolares; e o absoluto, obtido a partir do concreto, após ser submetido a outro tipo de solvente, desta vez polar, como o etanol (SIMÕES, 2010).

5. Prensagem: método empregado exclusivamente para extrair óleo das cascas de frutos cítricos, que apresenta seus OEs em bolsas no pericarpo. O pericarpo é prensado por uma prensa hidráulica, e a camada que contém o óleo essencial é, então, coletada e, posteriormente, separa-se o óleo da emulsão formada com água através de decantação, centrifugação ou destilação fracionada (BUSATO et al., 2014).

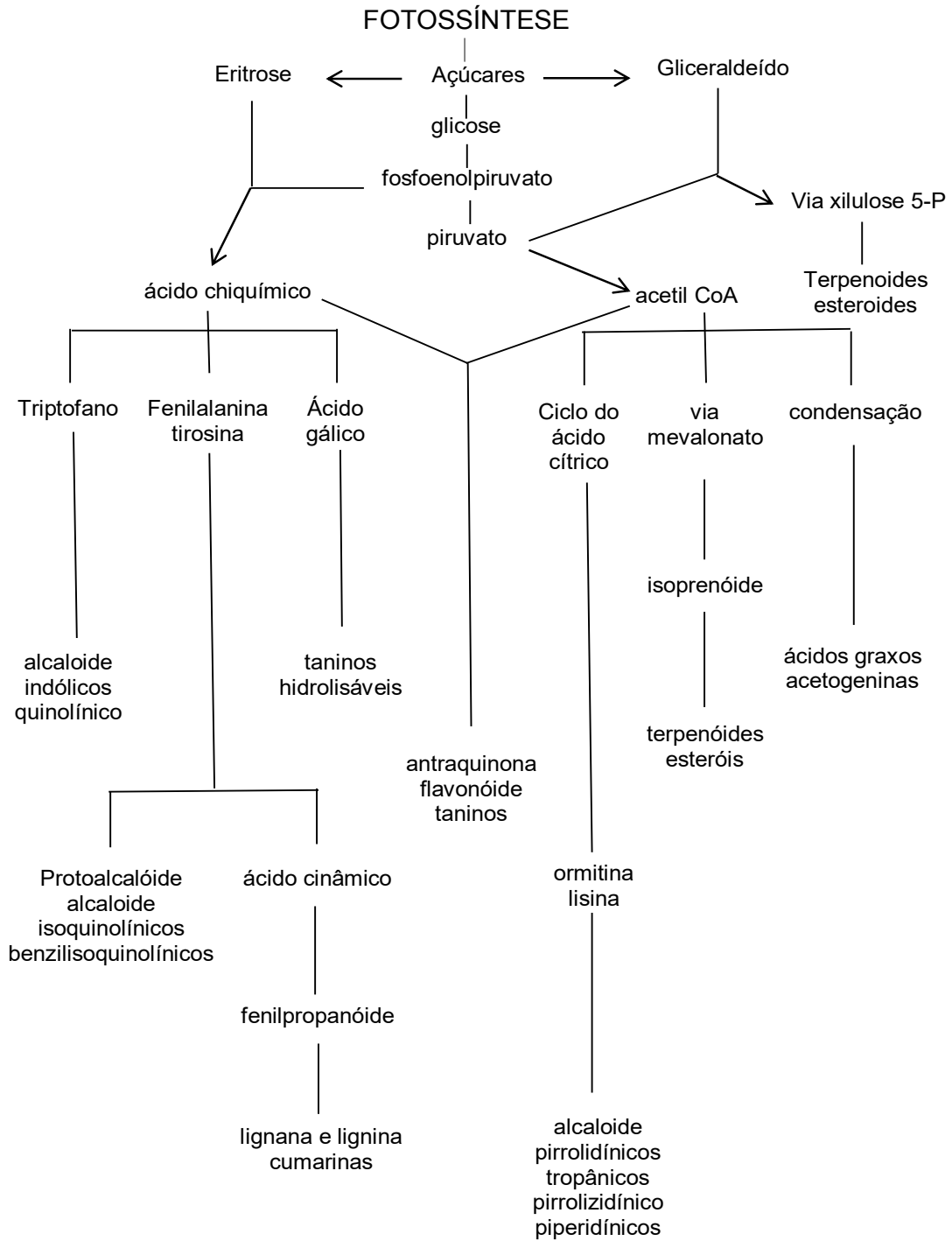
6. Extração por CO₂ supercrítico: método que permite recuperar os aromas naturais de vários tipos e não somente óleo essencial, de um modo bastante eficiente. É o método ideal para extração industrial de OEs. Nenhum traço de solvente permanece no produto obtido, tornando-o mais puro do que aqueles obtidos por outros métodos. Para tal extração, o CO₂ é primeiramente liquefeito através de compressão e, em seguida, aquecido a uma temperatura superior a 31 °C. Nessa temperatura, o CO₂ atinge um quarto estado, no qual sua viscosidade é análoga à de um gás, mas sua capacidade de dissolução é elevada como a de um líquido, extraíndo o óleo com perfeição. Uma vez efetuada a extração, o CO₂ retorna ao estado gasoso, resultando na sua total eliminação (MSAADA et al., 2012)

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

3.3.2 Composição química e aplicação dos óleos essenciais

Do ponto de vista químico, OEs são misturas complexas, formadas por compostos orgânicos, que podem variar em número entre dezenas ou centenas de substâncias voláteis. Essas substâncias pertencem principalmente à classe dos terpenos que derivam da via do ácido mevalônico ou da rota da xilulose-5-P; e à classe dos fenilpropanoides, produtos obtidos pela via chiquimato (SIMÕES, 2010). A origem destes metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose formada através da fotossíntese (Figura 3).

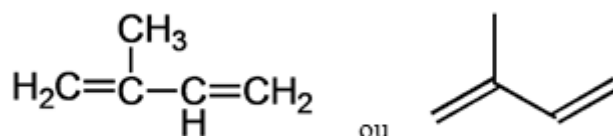
Figura 3. Esquema das rotas biossintéticas dos metabólitos secundários



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

Os terpenos são, geralmente, os constituintes mais importantes dos OEs. Estes compostos são constituídos por unidades contendo cinco átomos de carbono, denominadas unidades isoprênicas (Figura 4). A “regra do isopreno” permite classificá-los de acordo com o número de unidades isoprênicas que os formam, sendo assim, os terpenos podem ser considerados usualmente como produtos resultantes da ligação de várias unidades de isopreno (FONTES; ALÇADA, 2008).

Figura 4. Representações da molécula de isopreno



Fonte: Fontes e Alçada (2008).

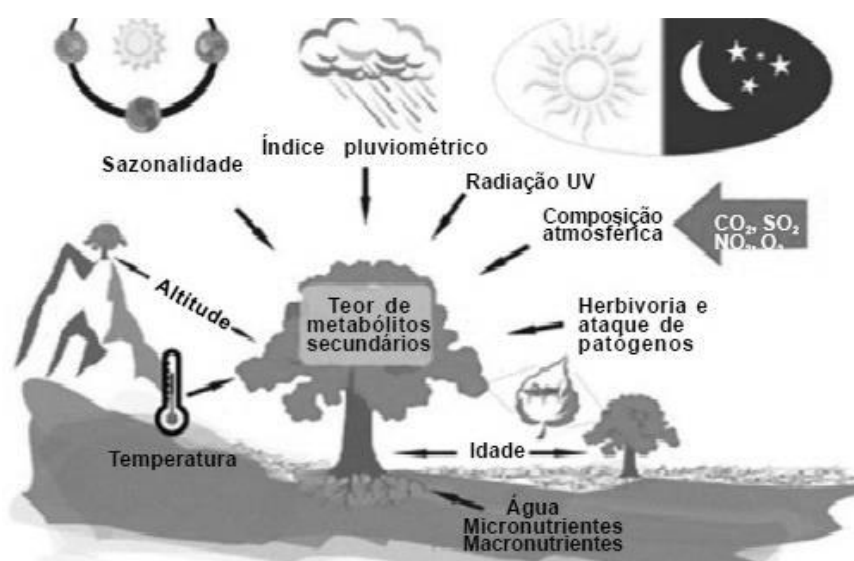
Os terpenos mais simples são os hemiterpenos, formados apenas uma unidade de isopreno, sendo bastante instáveis e difíceis de serem isolados de produtos de plantas. Os monoterpenos são constituídos por duas unidades de isopreno (C10); sesquiterpenos por três (C15); diterpenos, por quatro unidades (C20); triterpenos por seis (C30) e os tetraterpenos por oito (C40) unidades isoprênicas. Existem ainda os politerpenos formados por mais de oito unidades de isopreno (BUCHANAN et al., 2000).

Os terpenos podem apresentar diversas funções orgânicas, tais como álcoois, cetonas, aldeídos, ésteres, fenóis e hidrocarbonetos (SIMÕES, 2010). Dentre os compostos terpênicos, os mais frequentes nos OEs são os monoterpenos e sesquiterpenos (SILVA et al., 2009).

É importante ressaltar que a composição química do OE pode variar consideravelmente de espécie para espécie. Os fatores responsáveis por essa variabilidade têm natureza diversa, classificados como intrínsecos, que dependem da genética e fisiologia da planta, ou extrínsecos, como as condições ambientais e de colheita (CUNHA, 2012; SIMÕES, 2010). Portanto, os OEs, assim como quaisquer metabólitos secundários, representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante (Figura 5), sendo assim, sua síntese e proporções no vegetal são frequentemente afetadas pelas condições ambientais (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Apesar dos compostos químicos presentes nos OEs apresentarem-se em diferentes concentrações, sempre há predominância de uma a três substâncias, designados de majoritários, que caracterizaram a essência da espécie vegetal (BAKKALI et al., 2008). Os constituintes dos OEs, geralmente são identificados por técnicas cromatográficas e espectrais (ADAMS, 2007). Essa identificação é importante para a compreensão e previsão dos efeitos biológicos dos OEs (COELHO, 2009).

Figura 5. Fatores que influenciam o acúmulo de metabólitos secundários na planta.



Fonte: Gobbo-Neto e Lopes (2007).

Os OEs são empregados como matérias-primas na indústria de química fina, para aplicação direta em produtos como perfumes, fragrâncias e cosméticos, nas indústrias de medicamentos (fitofármacos) solicitados pelos seus efeitos sobre o sistema digestivo e aparelho respiratório, pela atividade analgésica e anti-inflamatória, além de ser empregado na horticultura como inseticidas, fungicidas, bactericidas e larvicidas (BIZZO et al., 2009; COELHO, 2009; GNATTA et al., 2011).

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

A literatura apresenta vários relatos sobre atividade biológica de OEs, decorrente da grande variedade e diversidade de suas composições químicas, a exemplo de atividade antioxidante (MIRANDA et al., 2016), antisséptica (CUNHA; ROQUE, 2013), larvicida (SANTANA et al., 2015), moluscicida (PEREIRA et al., 2020), antibacteriana (MILLEZI et al., 2014), anti-inflamatória (DE ARAÚJO et al., 2015), antifúngica, antiviral (MOHAMMADI et al., 2014) e ação anticarcinogênica (ZU et al., 2010), demonstrando grande potencial dos OEs para diversas atividades biológicas.

3.4 Esquistossomose Mansônica

De acordo com os dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), a esquistossomose é uma doença milenar que afeta cerca de duzentos milhões de indivíduos distribuídos em mais de 74 países entre os continentes da Ásia, América e África. A forma mansônica é endêmica em 54 países, sendo a mais disseminada no mundo (BRASIL, 2014). É uma doença parasitária de veiculação hídrica, causada pelo helminto *Schistosoma mansoni* e caracterizada como uma das enfermidades negligenciadas de maior importância avaliada pela OMS (WHO, 2012).

Dentre os países da América, o Brasil é o que possui a maior área endêmica da esquistossomose mansônica, sendo considerada grave problema de saúde pública no país, uma vez que comete cerca de seis milhões de pessoas, com número expressivo de formas graves e óbitos (BRASIL, 2014). A doença é popularmente conhecida como barriga d'água e foi introduzida no Brasil no século XVII com a chegada de escravos africanos infectados, trazidos pela Colônia Portuguesa para o trabalho na lavoura canavieira da região nordeste do país (KATZ; ALMEIDA, 2003). Essa atividade utilizava grande aporte hídrico que somada às péssimas condições socioambientais e à existência dos hospedeiros intermediários da esquistossomose, criou as condições favoráveis para o estabelecimento e transmissão da doença no país (SILVEIRA, 1989).

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

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

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

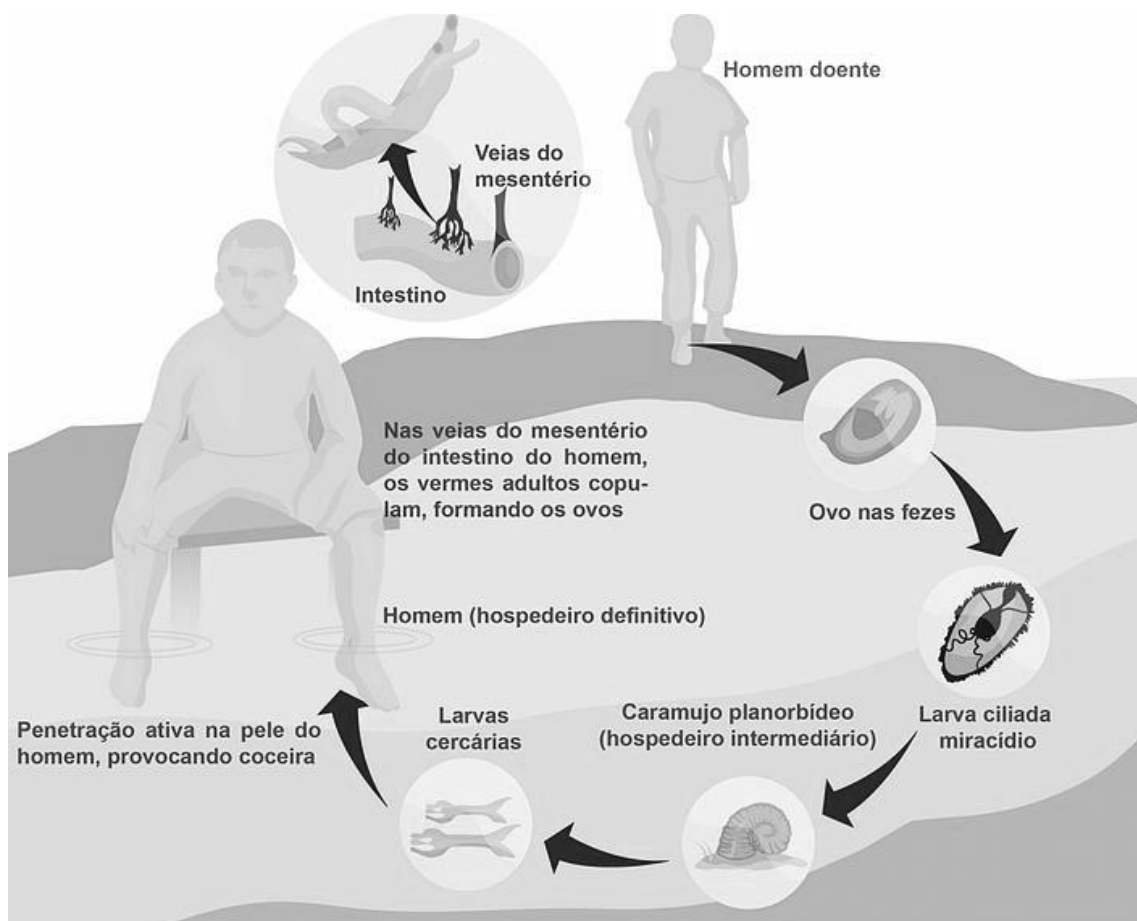
3.4.1 Ciclo biológico do parasito *Schistosoma mansoni*

O agente etiológico da esquistossomose mansônica é o trematódeo digenético *S. mansoni*, que infecta o ser humano e, eventualmente, outros animais vertebrados (SILVA-SOUZA; VASCONCELOS, 2005). Parte do ciclo de transmissão da enfermidade ocorre em águas doces. Os ovos de *S. mansoni* são eliminados nas fezes do hospedeiro definitivo infectado (homem ou outros vertebrados suscetíveis) e quando em contato com a água, eclodem, liberando larva ciliada denominada de miracídio, que nada ativamente em busca do hospedeiro intermediário (caramujos do gênero *Biomphalaria*) para penetrá-lo (NEVES, 2010). Após quatro semanas o caramujo desenvolve a forma infectante, a cercária, que é liberada por influência da luz solar e temperatura da água, estando pronta para infectar o hospedeiro definitivo. A transmissão ocorre quando as formas larvais liberadas pelos caramujos de água doce penetram na pele humana durante o contato com água infestada, reiniciando assim, o ciclo biológico (Figura 6).

O processo de penetração da cercária na pele humana dura normalmente de dois a 15 minutos e produz uma irritação de intensidade variável de indivíduo para indivíduo (urticária e pápulo-eritematoso). Uma vez nos tecidos do hospedeiro definitivo, as cercárias se transformam em esquistossômulos, caem na corrente sanguínea e/ou linfática, atingem a circulação venosa, vão ao coração e aos pulmões permanecendo algum tempo, podendo causar alterações mórbidas; posteriormente retornam ao coração, de onde são lançados através das artérias aos pontos mais diversos do organismo.

O fígado é o órgão preferencial de localização do parasito, onde se diferenciam sexualmente e crescem se alimentando de sangue. Ainda imaturos, migram para a veia porta e mesentéricas, onde completam sua evolução. Após acasalamento, os vermes adultos migram para as vênulas da submucosa intestinal, onde acontecerão as posturas dos ovos, podendo eliminar até 300 ovos por dia, dos quais cerca da metade é eliminada nas fezes do hospedeiro definitivo. Os ovos que não conseguem alcançar a luz intestinal por ficarem retidos nos tecidos, preferencialmente fígado e intestinos, são os responsáveis pela formação de granulomas que, no fígado, podem impedir, total ou parcialmente, a passagem do sangue, e juntamente com a fibrose periportal ocasionam as manifestações das formas mais graves da doença (LENZI, 2008).

Figura 6. Ciclo evolutivo do parasito *Schistosoma mansoni*



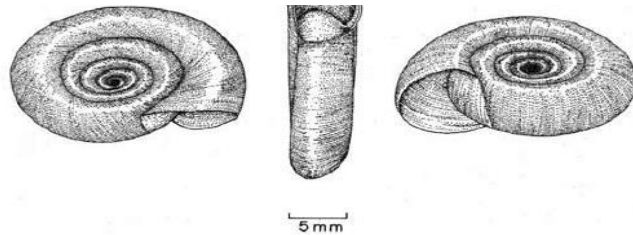
Fonte: Beduka (2019).

3.4.2 Caramujos do gênero *Biomphalaria*

Os moluscos hospedeiros intermediários do parasito *S. mansoni* são descritos como pertencentes ao filo Mollusca, classe Gastropoda, Subclasse Pulmonata, Ordem Basommatophora, Família Planorbidae e Gênero *Biomphalaria*, e constituem um elo imprescindível na transmissão da esquistossomose (REY, 2008).

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

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



Fonte: Brasil (2008)

A cor natural da concha de moluscos *Biomphalaria* é amarelo-palha, mas se modifica quando em contato com substâncias corantes dissolvidas na água dos criadouros, como o óxido de ferro, que confere às conchas coloração escura, passando por vários tons de marrom até o negro (BRASIL, 2008). Em relação ao tamanho da concha, é variável de acordo com a espécie de *Biomphalaria*, contudo, segundo Paraense (1955), os caramujos que se desenvolvem em ambientes lânticos são maiores do que os de ambientes lóticos, em decorrência da grande quantidade de alimento.

No Brasil há ocorrência de dez espécies do gênero *Biomphalaria* e uma subespécie, diferenciadas em relação à infecção por *S. mansoni* (BRASIL, 2014). Destas, três espécies foram encontradas naturalmente infectadas pelo *S. mansoni*: *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) e *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) e duas são hospedeiras potenciais: *Biomphalaria amazonica*

(Paraense, 1966) e *Biomphalaria peregrina* (Orbigny, 1835). As demais espécies: *Biomphalaria intermedia* (Paraense 1962), *Biomphalaria kuhniana* (Clessin, 1883), *Biomphalaria schrammi* (Crosse, 1864), *Biomphalaria oligoza* (Paraense, 1975); *Biomphalaria occidentalis* (Paraense, 1981) e a sub-espécie *Biomphalaria tenagophila guaibensis* (Paraense, 1984) não são hospedeiras naturais (BARBOSA et al., 2012).

Das três espécies de *Biomphalaria* transmissoras de *S. mansoni* no Brasil, *B. glabrata* se destaca como a mais importante, por se mostrar altamente suscetível em decorrência da compatibilidade entre parasito-hospedeiro, e por sua distribuição geográfica em cerca de dezesseis estados do país e Distrito Federal (BRAGA, 2012). As espécies *B. glabrata* e *B. straminea* têm área de ocorrência preferencialmente na região Nordeste e no Estado de Minas Gerais, enquanto *B. tenagophila* ocupa principalmente, as regiões Sudeste e Sul (CARVALHO; CALDEIRA, 2004).

O habitat natural dos moluscos *Biomphalaria* são coleções de água doce parada ou com pouca correnteza (fluxo inferior a 30 cm/s), podendo ocorrer em lagoas, pântanos, remansos de rios, margem de reservatório ou coleções artificiais, vivem preferencialmente em águas rasas e próximo às margens (BARBOSA et al., 2012).

3.5 Estratégias de controle da esquistossomose

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

Em 2011, o Brasil passa a ser signatário da Resolução WHA65-21 da OMS que propõe a eliminação da transmissão da esquistossomose, uma vez que a expansão do número de indivíduos acometidos por esta doença no país ainda era preocupante. A partir de então, o programa brasileiro de controle da esquistossomose passa a ter como objetivo principal a eliminação da doença, com a redução do número de casos a níveis aceitáveis (menores que 5%) nas áreas de elevada e de baixa endemicidade, o objetivo é a interrupção da transmissão, o que significa a não existência de casos (BRASIL, 2014).

O controle da população malacológica é um métodos efetivo para o domínio da transmissão da esquistossomose, pois interrompe o ciclo de vida do parasito e impede que o ser humano adquira esquistossomose (BARBOSA et al., 2012). Este controle abrange três métodos: o físico, biológico e o químico (WHO, 1993).

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

Método Biológico: envolve a introdução de organismos com ação predadora, competidora, parasitária ou patogênica sobre os moluscos hospedeiros, reduzindo assim a população de caramujos (SOUZA; LIMA, 1997). O molusco *Pomacea haustorium* (Reeve, 1856), por exemplo, já demonstrou competição por espaço físico com *B. glabrata* quando introduzido em ambiente natural, substituindo significativamente populações desta espécie (MILWARD-DE-ANDRADE; CARVALHO, 1979). Porém, em alguns locais, espécies de *Pomacea* e *Biomphalaria* coexistiram por até dez anos sem alterações das densidades populacionais dos planorbídeos (BRASIL, 2014). Estudo em caráter experimental tem sido realizado para avaliar a eficácia do método, porém a execução deste método não é muito viável, pois pode causar sérios problemas ambientais, ainda mais quando se trata de introdução de espécies exóticas que podem reduzir ou eliminar outras espécies nativas (BRASIL, 2008).

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

3.5.1 Moluscidas

Segundo a OMS, moluscidas são substâncias utilizadas para eliminação de moluscos que vivem em jardins, lavouras e campos, assim como as utilizadas para controlar caramujos vetores de parasitos importantes em saúde pública (WHO, 1991).

A aplicação de moluscicidas em criadouros naturais dos caramujos hospedeiros de *S. mansoni* é uma prática recomendada pela OMS (WHO, 2008). Os moluscicidas podem ser classificados em sintéticos e naturais. Diversas substâncias sintéticas foram testadas em larga escala com ação moluscicida, mas poucas merecem destaque. Podemos citar o sulfato de cobre, pentaclorofenato de sódio (conhecido como pó-da-china), carbonato de cobre, Gramaxone, hidróxido de cálcio, *N*-trítilmorfolina e Niclosamida (NEVES, 2010; STURROCK, 1995). Entretanto, resultados insatisfatórios quanto à sua toxicidade em relação aos moluscos e/ou por afetarem a fauna e a flora locais levaram ao desuso dessas substâncias (REY, 2008).

O único moluscicida sintético indicado nas campanhas de controle da esquistossomose foi a Niclosamida, comercialmente conhecido como Bayluscide®. É um produto de alta eficiência contra todos os estágios de desenvolvimento dos moluscos *Biomphalaria* (MATA et al., 2011). Entretanto, apresenta alta toxicidade para animais coabitantes e plantas submersas, causando impactos negativos no meio ambiente, além de possuir alto custo operacional (LOPES et al., 2011; MOREIRA et al., 2010). Atualmente, a Niclosamida está fora de uso no Brasil e em outros países (RUIZ et al., 2005; SILVA FILHO et al., 2009), sendo recomendado somente em situações especiais que requerem uma drástica e rápida redução da transmissão (BARBOSA et al., 2012).

A preocupação com o desenvolvimento de resistência dos caramujos à Niclosamida, a baixa seletividade apresentada e a procura por substâncias biodegradáveis têm incentivado a pesquisa de moluscicidas de origem vegetal como medida de controle alternativo à proliferação dos caramujos (LEYTON et al. 2005). Dessa forma, plantas de fácil propagação, ciclo evolutivo curto e de baixa ou nenhuma toxicidade aos não-alvo, vêm sendo estudadas (LUNA et al. 2005).

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

No Brasil, os primeiros estudos com moluscicidas naturais foi demonstrado pela atividade de extratos aquosos de *Sejania* sp. (cipó-timbó) e de frutos de *Sapindus saponária* L. (saboneteira) sobre caramujos *B. glabrata* (PINTO; ALMEIDA, 1944). A partir de então, a maioria dos estudos relativos à avaliação de moluscicida naturais tem sido voltada para ensaios utilizando extratos vegetais (CANTANHEDE et al., 2010).

Estudos de revisão vêm sendo publicados, permitindo uma visualização do perfil moluscicida de diversas famílias, gêneros, espécies vegetais e classes de metabólitos com maior potencial para serem usados no controle de caramujos, evitando a transmissão da esquistossomose. Cantanhede et al. (2010) relataram atividade moluscicida de extratos de 38 espécies vegetais distribuídas em 24 gêneros e 17 famílias botânicas, demonstrando mortalidade de 50 a 90% de caramujos *Biomphalaria*.

Alves (2013) evidenciou que 259 extratos de plantas, 16 frações e 66 compostos isolados foram testados em *B. glabrata*, dos quais 60% dos extratos vegetais e 75% das frações estudadas demonstraram toxicidade contra *B. glabrata*. As amostras foram obtidas de 200 espécies, distribuídas em 62 famílias, apresentando alto potencial para serem utilizadas como moluscicida. O estudo verificou ainda que os compostos naturais isolados que apresentaram ação sobre estes moluscos foram saponinas (44,7%), diterpenos (37,3%), alcaloides (2,9%), cromenos (2,9%), monoterpenos (2,9%), proteínas (2,9%), cumarinas (1,4%), sesquiterpenos (1,4%) e taninos (1,4%).

Recentemente, Pereira et al. (2020) revisaram dados de artigos originais e revelaram que óleos essenciais obtidos de 46 espécies de plantas aromáticas foram testadas para atividade moluscicida contra caramujos *Biomphalaria* onde mais de 80% dos óleos voláteis estudados foram ativos aos moluscos de acordo com os critérios da OMS, e a maioria dos óleos eram provenientes de plantas pertencentes às famílias Rutaceae, Lamiaceae e Pinaceae. Cerca de 37% das espécies avaliadas foram obtidas no Brasil e 88% dessas plantas foram coletadas no Nordeste do país, região com alta prevalência de esquistossomose.

Os princípios ativos dos vegetais com atividade moluscicida estão relacionados principalmente a produtos do seu metabolismo secundário. Os mais destacados são as saponinas, os taninos e derivados terpênicos dos óleos essenciais, como os monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides (MATOS-ROCHA et al., 2013; SOLÓRZANO-SANTOS; MIRANDA-NOVALES, 2012). Outras classes também

foram relatadas, como os esteroides e acetogeninas, que provavelmente ocasionam uma inflamação no caramujo (CHIFUNDERA et al., 1993; LUNA et al., 2006).

Embora moluscidas naturais sejam biodegradáveis, em determinadas concentrações, os derivados vegetais podem revelar riscos. Nesse contexto, é necessário realizar testes de toxicidade das plantas que demonstram atividade moluscida (LUNA et al., 2005; SANTOS et al., 2007).

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

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**, Allured, Carol Stream, Ill, USA, 4th edition, 2007.
- AFN Agência Fiocruz de Notícias. Boletim Agência Fiocruz de Notícias. **Doenças Negligenciadas**. Fundação Oswaldo Cruz – Ministério da Saúde, 2013. Disponível em <https://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7as-negligenciadas>
- ALVES, L. P. L. **Atividade moluscicida em *Biomphalaria glabrata* Say: revisão e avaliação do látex de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (Euphorbiaceae)**. 2013. 116 p. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2013.
- APG IV: **Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants**. The Catalogue of Life Partnership. Occurrence dataset, 2017. <https://doi.org/10.15468/fzuaam> accessed via GBIF.org.
- ARCHIBALD, R. G. The use of the fruit of the tree *Balanites aegyptiaca* in the control of schistosomiasis in the Sudan. **T Roy Soc Trop Med H**, v. 27, p. 207-210, 1933.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446–475, 2008. doi:10.1016/j.fct.2007.09.106
- BARATA, L. E. S. A economia verde: Amazônia. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 3, p. 31-35, 2012. <https://dx.doi.org/10.21800/S0009-67252012000300011>
- BARBOSA, C. S.; GOMES, E. C. S.; NETO, O. B. L. **Manual prático para o diagnóstico e controle da esquistossomose**. Recife: Editora Universitária, v. 2, n. 1, p. 126, 2012.
- BARBOSA, F. S. **Tópicos em malacologia médica**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1995.
- BARRETO, M. L. *et al.* Sucessos e fracassos no controle de doenças infecciosas no Brasil: o contexto social e ambiental, políticas, intervenções e necessidades de pesquisa. **The Lancet**, p. 47-60, 2011.
- BASÍLIO, I. J. L. D. *et al.* Estudo farmacobotânico comparativo das folhas de *Hyptis pectinata* (L.) Poit. E *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae). **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 25, n. 4, p. 518-525, 2006.
- BIASI, L. A.; DESCHAMPS, C. **Plantas aromáticas: do cultivo à produção de óleo essencial**. Curitiba: Layer Studio Gráfico e Editora Ltda, 2009.

- BISPO, M. D. *et al.* Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. **Journal of ethnopharmacology**, v. 76, n. 1, p. 81-86, 2001.
- BIZZO, H. R. HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588–594, 2009. doi:10.1590/s0100-40422009000300005
- BRAGA, L. B. ***Biomphalaria tenagophila* guaibensis (Mollusca: Planorbidae): avaliação da suscetibilidade a *Schistosoma mansoni* e do status de subespécie**. 2012. 70p. Dissertação (Mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: diretrizes técnicas**. Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE). 2. ed. Brasília, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Vigilância da esquistossomose mansoni: diretrizes técnicas**. 4. ed. Brasília, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de vigilância em Doenças Transmissíveis. **Campanha Nacional de Hanseníase, Verminoses, Tracoma e Esquistossomose 2016: Informe Técnico**. 23p. Brasília, 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Sistema nacional de vigilância em saúde - Relatório de situação - Maranhão / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde**. – 5. ed. – Brasília, 2011.
- BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Quím. Nova**, São Paulo , v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000100040&lng=en&nrm=iso>. access on 08 Jan 2021. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000100040>.
- BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville, Maryland: American Society Plant Physiologists, USA, p. 1251- 1268, 2000.
- BUSATO, N. V. *et al.* Estratégias de modelagem da extração de óleos essenciais por hidrodestilação e destilação a vapor. **Ciência Rural**, v. 44, n. 9, p. 1574–1582, 2014. doi:10.1590/0103-8478cr20121330
- CANTANHEDE, S. P. D. Atividade moluscicida de plantas: uma alternativa profilática. **Rev. bras. farmacogn.**, v. 20, n. 2, p. 282-288, 2010. DOI 10.1590/S0102-695X2010000200024

CANTANHEDE, S. P. D. *et al.* Freshwater gastropods of the Baixada Maranhense Microregion, an endemic area for schistosomiasis in the State of Maranhão, Brazil: I - qualitative study. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 47, n. 1, p. 79-85, Jan-Feb, 2014. DOI 10.1590/0037-8682-0194-2013

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

CAVALINI, M. *et al.* SERVIÇO DE INFORMAÇÕES SOBRE PLANTAS MEDICINAIS E MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS. **Revista Eletrônica de Extensão**, v. 2, 2005.

CHIFUNDERA, K.; BALUKU, B.; MASHIMANGO, B. Phytochemical Screening and Molluscicidal Potency of Some Zairean Medicinal Plants. **Pharmacol. Res.**, v. 28, n. 4, p. 333–340, 1993. DOI 10.1006/phrs.1993.1135

COCK, I. E. *et al.* A review of the traditional use of southern African medicinal plants for the treatment of malaria. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 245, 2019. doi:10.1016/j.jep.2019.112176

COELHO, M. G. **Óleos essenciais para aromaterapia**. 2009 123p. Dissertação, Escola de Ciências - Universidade do Minho, Braga, 2009.

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

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

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

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

DA SILVA, B. M. *et al.* Toxicidade aguda dos herbicidas Diuron e Hexazinona À *Danio rerio*. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 20, 2010. doi:10.5380/pes.v20i1.20472

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

DE ARAÚJO, S. S. *et al.* Prospecção de patentes biotecnológicas com óleo essencial em microemulsão como agente anti-inflamatório. **Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 5, n. 2, p. 2058-2065, 2015.

FALCÃO, D. Q. *et al.* Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 84, n. 3, p. 69-74, 2003.

FALCÃO, R. E. A. *et al.* Evaluation of the orofacial antinociceptive profile of the ethyl acetate fraction and its major constituent, rosmarinic acid, from the leaves of *Hyptis pectinata* on rodents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 2, p. 203-208, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.07.029>

FIGUEIREDO, A. C.; LUIS, G. P.; BARROSO, J. G. Voláteis e Óleos Essenciais Parte I/II. **Ciência & Investigação**, n. 25, p. 14- 17, 2017.

FIORAVANTI, C. A maior diversidade de plantas do mundo. **Revista Pesquisa Fapesp**, v. 241, p. 42 – 47, 2016. Disponível em: https://revistapesquisa.fapesp.br/wp-content/uploads/2016/03/042-047_Botanica_241.pdf. Acesso em 06 jan. 2021

FONTES, R.; ALÇADA, N. **A bioquímica e a química orgânica**, 2008. Available from http://bioquimica.med.up.pt/ensino/fcnaup/quimicaorganica/1011/pdf/Bioquimica_e_Quimica_Organica.pdf

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

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

GNATTA, J. R. *et al.* O uso da aromaterapia na melhora da autoestima. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 45, n. 5, p. 1113-1120, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0080-62342011000500012>

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007. doi:10.1590/s0100-40422007000200026

GUIMARÃES, A. C. *et al.* Antibacterial activity of terpenes and terpenoids present in essential oils. **Molecules**, v. 24, p. 2471, 2019. doi:10.3390/molecules24132471

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

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

HE, P. *et al.* Molluscicidal activity and mechanism of toxicity of a novel salicylanilide ester derivative against *Biomphalaria* species. **Parasit Vectors**, v. 10, p. 383, 2017. doi:10.1186/s13071-017-2313-3

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

INPE (2020) Projeto PRODES - **Monitoramento do Desmatamento na Amazônia Legal por Satélite**. Disponível em: <http://terrabrasilis.dpi.inpe.br/app/dashboard/deforestation/biomes/legal_amazon/increments>. Acesso em: 10 jan.2021.

JANKOWSKA, M. *et al.* Molecular *Targets* for components of essential oils in the insect nervous system — A Review. **Molecules**, v. 23, 2017. doi:10.3390/molecules23010034

JONES, R. Let Sleeping Zebrafish Lie: A New Model for Sleep Studies. **PLoS Biology**, v. 5, n. 10, p. 281, 2007. doi:10.1371/journal.pbio.0050281

KATZ, N.; ALMEIDA, K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. **Cienc. Cult.**, São Paulo, v. 55, n. 1, p. 38-43, Jan. 2003 . Available from <http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252003000100024&lng=en&nrm=iso>. access on 8 Jan. 2021.

LENZI, H. L. **Migração e desenvolvimento de *Schistosoma mansoni* no hospedeiro definitivo**. In: Carvalho O. S, Coelho P. M. Z, Lenzi H. L. *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008.

LEYTON, V. Atividade moluscicida de princípios ativos de folhas de *Lycopersicon esculentum* (Solanales, Solanaceae) em *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Planorbidae). Iheringia. **Série Zoologia**, v. 95, n. 2, p. 213-216, 2005. DOI 10.1590/S0073-47212005000200012

LIMA, R. K. *et al.* Família Lamiaceae: Importantes Óleos Essenciais com Ação Biológica e Antioxidante. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 3, n. 3, p. 14-24, 2013. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/78/77>>. Acesso em: 07 jan. 2021.

LISBOA, A. C. C. D. *et al.* Antinociceptive effect of *Hyptis pectinata* leaves extracts. **Fitoterapia**, v. 77, n.6, p. 439–442, 2006. doi:10.1016/j.fitote.2006.06.001

LIU, H. W.; NAKANISHI, K. The structures of balanitins, potent molluscicides isolated from *Balanites aegyptiaca*. **Tetrahedron**, v. 38, n. 4, p. 513–519, 1982. DOI 10.1016/0040-4020(82)80095-1

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

LUNA, J. D. S. *et al.* A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **J Ethnopharmacol**, v. 97, n. 2, p. 199–206, 2005. DOI 10.1016/j.jep.2004.10.004

- LUNA, J. D. S. *et al.* Acetogenins in *Annona muricata* L. (annonaceae) leaves are potent molluscicides. **Nat Prod J.**, v. 20, n. 3, p. 253–257, 2006. doi:10.1080/14786410500161445
- MA, J. *et al.* Biochemical responses to the toxicity of the biocide abamectin on the freshwater snail *Physa acuta*. **Ecotoxicol Environ Safety**, v. 101, p. 31–35, 2014. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.12.009
- MAIA, J. G. S.; ANDRADE, E. H. A. Database of the Amazon aromatic plants and their essential oils. **Química Nova**, n. 32, n.3, p. 595–622, 2009. doi:10.1590/s0100-40422009000300006
- MARLÚCIA, B. M.; OLIVEIRA, T. G. **Amazônia Maranhense: Diversidade e Conservação**. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi. 328 p.: il, 2011. ISBN: 978-85-61377-52-6
- MATA, R. C. S. *et al.* Molluscicidal Activity of Compounds Isolated from *Euphorbia conspicua* N. E. Br. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 22, n. 10, p. 1880–1887, 2011. DOI 10.1590/s0103-50532011001000008
- MATOS–ROCHA, T. J. *et al.* Estudo do efeito moluscicida de espécies vegetais em embriões e caramujos adultos de *Biomphalaria glabrata* SAY, 1818 (GASTROPODA, PLANORBIDAE). **Rev Patol Trop**, v. 42, n. 2, p. 230-239, 2013. DOI 10.5216/rpt.v42i2.25524
- MILLEZI, A. F. *et al.* Caracterização química e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 1, p. 18–24, 2014. doi:10.1590/s1516-05722014000100003
- MILWARD-DE-ANDRADE, R.; CARVALHO, O. S. Colonização de *Pomacea haustum* (Reeve, 1856) em localidade com esquistossomose mansoni: Baldim, MG (Brasil). (Prosobranchia, Píliidae). **Rev Saúde Pública**, v. 13, n. 2, p. 92–107, 1979. DOI 10.1590/s0034-89101979000200005
- MIRANDA, C. A. S. F. *et al.* Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p. 213-220, 2016. <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20160025>
- MOREIRA, C. P. S.; ZANI, C. L.; ALVES, T. M. A. Atividade moluscicida do látex de *Synadenium carinatum* Boiss. (Euphorbiaceae) sobre *Biomphalaria glabrata* e isolamento do constituinte majoritário. **Rev Eletrônica Farm**, v. 8, n 3, p. 16-27, 2010. DOI 10.5216/ref.v7i3.12892
- MSAADA, K. *et al.* Comparison of Different Extraction Methods for the Determination of Essential oils and Related Compounds from Coriander (*Coriandrum sativum* L.). **Acta Chimica Slovenica**, v. 59, n. 4, 2012.

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

NAKAGOME, F. K. *et al.* Toxicidade aguda de alguns herbicidas e inseticidas utilizados em lavouras de arroz irrigado sobre o peixe *Danio rerio*. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 17, p. 117-22, 2007. doi:10.5380/pes.v17i0.9186

NASCIMENTO, P. *et al.* *Hyptis pectinata* essential oil: chemical composition and anti-*Streptococcus mutans* activity. **Oral Diseases**, v. 14, p. 485–489, 2008. doi:10.1111/j.1601-0825.2007.01405.x

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

OLIVEIRA, R. G. Sentidos das Doenças Negligenciadas na agenda da Saúde Global: o lugar de populações e territórios. **Ciêñ Saúde Colet.**, v. 23, n. 7, p. 2291–2302, 2018. DOI 10.1590/1413-81232018237.09042018

OLIVEIRA, S. M.; JOSÉ, V. L. A. **Processo de extração de óleos essenciais.** Instituto de tecnologia do Paraná. Dossiê técnico, 2007.

OLIVEIRA-FILHO, E. C. *et al.* Comparative toxicity of *Euphorbia milii* latex and synthetic molluscicides to *Biomphalaria glabrata* embryos. **Chemosphere**, v. 81, p. 218–227, 2010. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.06.038

PAIXÃO, M. S. *et al.* *Hyptis pectinata*: Redox Protection and Orofacial Antinociception. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 9, p. 1328–1333, 2013. doi:10.1002/ptr.4869

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

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

PEREIRA FILHO, A. A. *et al.* Evaluation of the Molluscicidal Potential of Hydroalcoholic Extracts of *Jatropha gossypifolia* Linnaeus, 1753 on *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Rev Inst Med Trop**, v. 56, n. 6, p. 505–510, 2014. DOI 10.1590/s0036-46652014000600009

PEREIRA, L. P. L. A. *et al.* Essential oils as molluscicidal agents against schistosomiasis transmitting snails. **Acta Tropica**, v. 209, 105489, 2020. doi 10.1016/j.actatropica.2020.105489

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

- PINTO, J. E. B. P. et al. Teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marruboides* Epl., Lamiaceae em função da sazonalidade. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.32, n.3, 2010. doi:10.4025/actasciagron.v32i3.3415
- RAPADO, L. N. et al. Schistosomiasis Control Using Piplartine against *Biomphalaria glabrata* at Different Developmental Stages. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 6, p.2251, 2013. doi:10.1371/journal.pntd.0002251
- RAYMUNDO, L. J. R. P. et al. Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the *Hyptis pectinata* (L.) Poit essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, 725–732, 2011. doi:10.1016/j.jep.2011.01.027
- REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- RIBEIRO, E. C. G. **Atividade moluscicida de óleos essenciais de plantas aromáticas da região Amazônica Maranhense**. 2016. 90p. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2016.
- RUIZ, A. L. T. G. et al. Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (Cyperaceae). **Rev. bras. farmacogn.**, v. 15, n. 2, p. 98-102, 2005. DOI 10.1590/S0102-695X2005000200005
- SALES, H. J. S. P. Lavandula L. - aplicação da cultura in vitro à produção de óleos essenciais e seu potencial económico em Portugal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 992-999, 2015. https://doi.org/10.1590/1983-084X/14_101
- SANTANA, H. et al. Essential oils of leaves of Piper species display larvicidal activity against the dengue vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 2015. doi:10.1590/1983-084x/13_052
- SANTOS, A. et al. The lethality of *Euphorbia conspicua* to adults of *Biomphalaria glabrata*, cercaria of *Schistosoma mansoni* and larvae of *Artemia salina*. **Bioresour. Technol.**, v. 98, n. 1, p. 135–139, 2007. DOI 10.1016/j.biortech.2005.11.020
- SANTOS, A. M.; MELO, A. C. F. L. Prevalência da esquistossomose num povoado do Município de Tutóia, Estado do Maranhão. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44, n. 1, p. 97-99, 2011. DOI 10.1590/S0037-86822011000100021
- SANTOS, E. A. et al. Bioactivity evaluation of plant extracts used in indigenous medicine against the snail, *Biomphalaria glabrata*, and the larvae of *Aedes aegypti*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-9, 2012.
- SANTOS, P. O. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hyptis pectinata* (L.) Poit. **Química Nova**, v. 31, p. 1648–1652, 2008. doi:10.1590/s0100-40422008000700009

SARTORATTO, A. *et al.* Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 275–280, 2004. doi:10.1590/s1517-83822004000300001

SCHERER, R. *et al.* Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 442-449, 2009. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722009000400013>

SCHOLTE, R. G. C. *et al.* Spatial distribution of *Biomphalaria* spp., the intermediate host snails of *Schistosoma mansoni*, in Brazil. **Geospat Health**, v. 6, n. 95, 2012. DOI 10.4081/gh.2012.127

SILVA FILHO, C. R. M. *et al.* Avaliação da bioatividade dos extratos de cúrcuma (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae) em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata*. **Rev. bras. farmacogn.**, v. 19, n. 4, p. 919-923, 2009. DOI 10.1590/S0102-695X2009000600022

SILVA, C. B. *et al.* Composição química e atividade alelopática do óleo volátil de *Hydrocotyle bonariensis* Lam (Araliaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 9, 2009. doi:10.1590/s0100-40422009000900026

SILVA-SOUZA, N.; VASCONCELOS, S. D. Histopathology of *Holochilus brasiliensis* (Rodentia: Cricetidae) infected with *Schistosoma mansoni* (Schistosomatida: Schistosomatidae). **Rev Patol Trop**, v. 34, n.2, p. 145-50, 2005. DOI 10.5216/rpt.v34i2.1920

SILVEIRA, A. C. Controle da esquistossomose no Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 84, p. 91-104, 1989.

SILVEIRA, J. Levantamento e análise de métodos de extração de óleos essenciais. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 15, p. 212, 2012.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 6ª ed. UFSC: Florianópolis, pp. 1104, 2010.

SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 136–141, 2012. DOI 10.1016/j.copbio.2011.08.005

SOUZA, C. P.; LIMA, L. C. **Moluscos de interesse parasitológico do Brasil**. 2. ed. Belo Horizonte: FIOCRUZ/CPqRR, 1997.

STURROCK, R. F. Current concepts of snail control. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 90, n. 2, p. 241-48, 1995.

TCHOUMBOUGNANG, F. *et al.* Aromatic plants of tropical Central Africa. XLVIII. Comparative study of the essential oils of four *Hyptis* species from Cameroon: *H.*

lanceolata Poit., *H. pectinata* (L.) Poit., *H. spicigera* Lam. And *H. suaveolens* Poit. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 20, p. 340–343, 2005. doi:10.1002/ffj.1441

TEIXEIRA, T. *et al.* Assessment of molluscicidal activity of essential oils from five Azorean plants against *Radix peregra* (Müller, 1774). **Chemosphere**, v. 87, p. 1–6, 2012. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.11.027

VALENTIM, J. A. *et al.* Extração de Óleos Essenciais por Arraste a Vapor: Um Kit Experimental para o Ensino de Química. **Quím. Nova Esc.**, v. 40, n. 4, p. 297-301, 2018. <http://dx.doi.org/10.21577/0104-8899.20160131>

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

WHO - World Health Organization. **Integrating Neglected Tropical Diseases in Global Health and Development**. Fourth WHO report on neglected tropical diseases. Geneva: WHO, 2017.

WHO - World Health Organization. **Research priorities for Helminth infections**. Technical report on the TDR disease reference group on Helminth infections, in: World Health Organization, Technical Report Reference Series 972. World Health Organization. Geneva: 2012.

WHO - World Health Organization. **Safe use of pesticides**. Geneva: WHO, 1991. 29 p.

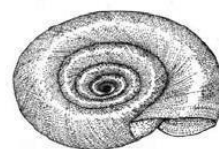
WHO - World Health Organization. **The control of schistosomiasis**: second report of the WHO Expert Committee. Geneva: WHO, 1993.

WOLFFENBÜTTEL, A. N. **Base da química dos óleos essenciais e aromaterapia – abordagem técnica e científica**. São Paulo. Roca, 2011.

ZAPPI, D C. *et al.* Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro , v. 66, n. 4, p. 1085-1113, 2015.

ZU, Y. Activities of Ten Essential Oils towards *Propionibacterium acnes* and PC-3, A-549 and MCF-7 Cancer Cells. **Molecules**, v. 15, n. 5, p. 3200–3210, 2010. doi:10.3390/molecules15053200

Capítulo I



Chemical characterization and molluscicidal activity of the *Hyptis pectinata* (L.)

Poit. essential oil against *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818).

1 **Chemical characterization and molluscicidal activity of the *Hyptis pectinata* (L.)**
2 **Poit. essential oil against *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818).**

3

4 **Abstract**

5 Many biological properties have been attributed to the *Hyptis pectinata* (L.) Poit.
6 essential oil. However, the molluscicidal properties and toxicity on non-target
7 organisms remain unclear. In this study, the *H. pectinata* essential oil was chemically
8 characterized and the molluscicidal potential of this essential oil and its major
9 compound against the snail *Biomphalaria glabrata*, intermediate host of *Schistosoma*
10 *mansoni*, were evaluated. The essential oil was extracted from *H. pectinata* leaves by
11 the hydrodistillation method. The chemical composition analysis of essential oil was
12 carried out by gas chromatography with flame ionization detector and mass
13 spectrometry. Molluscicidal activity was evaluated using the immersion method. The
14 essential oil showed a yield of 1.57% and 21 compounds were identified, all belonging
15 to the class of sesquiterpenes. The β -caryophyllene, α -cadinol, and t-muurolol were the
16 main constituents. The *H. pectinata* essential oil demonstrated effective molluscicidal
17 activity against *B. glabrata*, inducing mortality in a concentration-dependent pattern and
18 exhibiting lethal effect at concentrations compatible with the dose recommended by the
19 World Health Organization - WHO (LC₉₀ of 63.02 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and LC₅₀ of 40.31 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).
20 However, the major compound β -caryophyllene did not induce the mortality of the snail
21 *B. glabrata*. The *H. pectinata* essential oil demonstrated low toxicity to the non-target
22 organism when compared to molluscicide niclosamide. Knowledge of the toxicity of *H.*
23 *pectinata* essential oil against snail *B. glabrata* contributes to its potential use in
24 molluscicidal formulations, being an alternative in the control of snail vectors of *S.*
25 *mansoni*, which is a crucial action in the fight against schistosomiasis.

26

27 **Keywords:** Schistosomiasis. β -caryophyllene. *Hyptis pectinata*. Toxicity.

28

29 **Highlights**

30

31 The *H. pectinata* essential oil is highly toxic against adult *B. glabrata*.

32

33 The *H. pectinata* essential oil promoted *B. glabrata* mortality at a lethal concentration
34 recommended by the WHO (LC₅₀ of 40.31 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and LC₉₀ of 63.02 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

35

36 The toxicity of the *H. pectinata* essential oil for snails is concentration-dependent.

37

38 The sesquiterpene β -caryophyllene did not induce *B. glabrata* mortality.

39

40 *H. pectinata* presented low toxicity to non-target organisms compared to niclosamide.

41

42 The *H. pectinata* essential oil is a potential molluscicide.

43

44 **1. Introduction**

45

46 Schistosomiasis is the second most common parasitic disease in the world,
47 generating important socioeconomic impacts. This infection is caused by trematode
48 worms of the genus *Schistosoma*, affecting approximately 240 million people
49 worldwide (Vos et al. 2012; WHO, 2019).

50 Snails of the species *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Planorbidae) act as the
51 main intermediate host of *Schistosoma mansoni*, having wide geographical distribution,
52 high infection rates, and efficiency in parasite transmission, releasing hundreds of larval
53 forms that penetrate human skin. Therefore, these snails are decisive in the disease
54 transmission cycle (Paraense, 2008; Scholte et al. 2012).

55 Due to the high incidence of schistosomiasis and the absence of vaccines for its
56 control, combating vector snails with the application of molluscicides is an efficient
57 method to control this disease for interrupting parasite transmission and consequently
58 preventing disease recurrence (WHO, 2017). The only molluscicide commercially
59 recommended by the WHO consists of niclosamide. However, due to the cases of
60 resistance to the use of this compound, the search for new molluscicides has been
61 intensifying (Braz Filho, 2010). Natural products are promising for the discovery of
62 active compounds, being an alternative for the development of effective molluscicides
63 in the combat against snail vectors of schistosomiasis (Rapado et al. 2014).

64 Essential oils, products abundant in aromatic plants, have been widely studied
65 for their variety of biological activities proven by scientific studies (De Veras et al.
66 2019; Thanigaivel et al. 2019; Zabka et al. 2014). Essential oils are mixtures of
67 substances, mainly plant-synthesized monoterpenes, sesquiterpenes, and
68 phenylpropanoids that may represent potential molluscicidal action with bioactive
69 compounds against the snail *B. glabrata* (Araújo et al. 2019; Gomes et al. 2019). The
70 molluscicidal action of essential oils has generally been attributed to the most prevalent
71 terpenic compounds. However, the molluscicidal properties of these compounds alone
72 are poorly investigated.

73 The essential oil from leaves of the species *Hyptis pectinata* (Lamiaceae) is
74 considered promising for several biological activities and contains several bioactive

75 substances, including antimicrobial, insecticidal, and larvicidal compounds (Silva et al.
76 2008; Raymundo et al. 2011; Nascimento et al. 2008). However the molluscicidal
77 properties of this oil have not yet been described. In this context, this study determines
78 the chemical composition of the *H. pectinata* essential oil and evaluates its
79 molluscicidal activity against the snail *B. glabrata*, besides evaluating the molluscicidal
80 effect of the compound present in the greatest quantity in the oil and verifying the
81 toxicity of the essential oil on non-target organisms. This is the first report on the
82 molluscicidal activity of the *H. pectinata* essential oil to control vectors involved in
83 schistosomiasis transmission.

84

85 **2. Material and methods**

86

87 **2.1 Plant material**

88

89 Leaves of the species *H. pectinata* were collected from adult specimens in the Source of
90 the Parnaíba River National Park, Alto Parnaíba, Maranhão State, Brazil (10°2'2" S;
91 45°58'3" W). The sample was identified by a specialist from the João Murça Pires
92 Herbarium of the Emílio Goeldi Museum, municipality of Belém, Pará State, Brazil,
93 and a voucher specimen was deposited for identification. The collection was conducted
94 with the consent of the Biodiversity Authorization and Information System (No. 28007-
95 2), meeting the requirements of the Ministry of Environment of Brazil (Normative
96 Instruction No. 154, updated by Normative Instruction No. 3).

97

98 **2.2 Distillation of the essential oil**

99

100 Leaves of the collected material were dried in open air and powdered in a cutting
101 mill, from which a powder classified as coarse was obtained (Brazilian Pharmacopeia,
102 2019). In order to obtain the essential oil, 500g of the powdered material was used and
103 subjected to hydrodistillation using a Clevenger-type apparatus for approximately three
104 hours. After extraction, the oil was dried over anhydrous sodium sulfate (Na_2SO_4) and
105 stored in amber glass ampoules, which were sealed and maintained in a refrigerated
106 environment (Coutinho, 2007).

107

108 **2.3 Chemical analysis of the essential oil**

109

110 The essential oil sample was analyzed by gas chromatography using a DSQ-II
111 GC-MS instrument (Thermo Fisher Scientific, Austin, TX, USA) equipped with a
112 fused-silica column (DB-5ms; i.d. 30m x 0.25 mm; film thickness 0.25 μm). The
113 following analysis conditions were used: injector temperature of 250 $^\circ\text{C}$; initial
114 temperature of 60 $^\circ\text{C}$ increased up to 240 $^\circ\text{C}$ at 3 $^\circ\text{C}/\text{min}$; Helium as carrier gas adjusted
115 at a flow rate of 36.5 cm^3/s (1.0 mL/min); splitless injection (1 μL of the sample diluted
116 in hexane); and split ratio of 20:1. The mass spectrometer was operating in the EI mode
117 (70 eV and 0.84 scan/sec from 40 to 550 m/z). Retention indices were calculated for all
118 volatile constituents using homologous series of *n*-alkanes (C8 - C32, Sigma-Aldrich).

119 Quantitative data on volatile constituents were obtained by integrating the peak
120 area using GC-FID without correction factors and operated under the same conditions
121 as GC-MS except for the carrier gas, with hydrogen produced by a Packard hydrogen
122 generator being used instead. Individual compounds were identified by comparing their
123 Kovats retention indices (KI) and mass spectra (molecular mass and fragmentation

124 pattern) with those of authentic compounds previously analyzed and stored in the data
125 system of the libraries of Adams (2007) and NIST (2011).

126

127 **2.4 Snails**

128

129 Wild snails of the species *B. glabrata* (diameter 13 ± 1.2 mm; total weight 0.43
130 ± 0.1 g) were collected in the municipality of São Luís ($2^\circ 33' 35.1''$ S; $44^\circ 18' 05.3''$
131 W), Maranhão State, Brazil. The snails were maintained at 25 ± 1 °C in glass aquaria
132 containing dechlorinated water and fed with fresh lettuce (*Lactuca sativa* L.). For four
133 weeks, the mollusks were isolated in glass flasks containing dechlorinated water and
134 examined for possible infection by *S. mansoni* through photo-stimulation (Smithers and
135 Terry, 1974). Uninfected snails with intact shells were selected for the molluscicidal
136 test.

137

138 **2.5 Molluscicidal activity test**

139

140 The molluscicidal bioassay was conducted using a solution of the *H. pectinata*
141 essential oil prepared instantly at a concentration of $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The oil was dissolved
142 in 0.1% DMSO, diluted in dechlorinated water, and subjected to mechanical stirring.
143 The test was performed by immersion, according to the standard methodology by the
144 WHO (1965). In summary, groups of ten snails were exposed to the *H. pectinata*
145 solution in glass aquaria (17x13 cm) for 24 hours at 25 ± 1 °C and 50 mL solution/snail
146 ratio. At the end of the exposure period (24h), the surviving snails were washed in
147 running water to remove the test solution and transferred to new aquaria containing an
148 identical volume of dechlorinated water for a recovery phase of up to 72 hours.

149 Simultaneously, the negative control group was exposed to dechlorinated water with
150 0.1% DMSO while the positive control group was exposed to $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ copper sulfate
151 (100% lethal concentration for the snail *B. glabrata* according to Reddy et al., 2004).

152 Tests were performed in triplicate and in two independent experiments.
153 Mortality was evaluated during the exposure period and the recovery phase. The snails
154 were considered dead according to the following parameters: absence of muscle
155 contraction, shell discoloration, cephalopodal mass retraction, and hemolymph leakage.
156 After molluscicidal activity against *B. glabrata* with a single dose ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) was
157 confirmed, the essential oil was evaluated at lower concentrations (15, 25, 35, 50, 75, 85
158 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) to determine the values of lethal concentrations necessary to kill 50% (LC_{50})
159 and 90% (LC_{90}) of snails.

160 The compound identified in greatest quantity in the *H. pectinata* essential oil
161 was also individually evaluated for its molluscicidal potential against *B. glabrata*. This
162 compound was purchased commercially from Sigma-Aldrich (São Paulo, Brazil). The
163 molluscicidal assay was conducted under the same conditions aforementioned.

164

165 **2.6 Test for acute toxicity on non-target organism**

166

167 Fishes of the species *Danio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) were obtained from a
168 commercial fish farm, acclimatized in the laboratory, and maintained in an aquarium
169 under constant aeration and partial water change every 48 hours. Healthy adult fish (3.0
170 ± 0.5 cm and 0.25 ± 0.5 g) were selected for the test. The test was conducted by static
171 method without water replacement, as standardized by the Brazilian Association of
172 Technical Standards (2011). Groups of four organisms were exposed to the solution of

173 the *H. pectinata* at concentrations of 5, 10, 15, 20, and 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The experiment
174 lasted 48 hours. Every 24 hours, the number of dead animals was determined.

175 The following was measured: pH (7.5), dissolved oxygen ($7.65 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), and
176 temperature ($24.4 \text{ }^\circ\text{C}$). The negative control (water with 0.1% DMSO) and the positive
177 control (CuSO_4 at $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, reference substance according to Bichara et al., 2013),
178 were included in the assay. The entire assay was performed in quadruplicate ($n=16$
179 organisms for each concentration of *H. pectinata* and control groups).

180 This experiment was developed as approved by the Ethics Committee on Animal
181 Use of the Federal University of Maranhão (Registration: 34.15).

182

183 **2.7 Statistical analysis**

184

185 The values of lethal concentrations (LC_{50} and LC_{90}) of molluscicide and acute
186 toxicity bioassays for fish and its lower and upper confidence limits were calculated by
187 probit linear regression analysis (SPSS[®] software, version 13.0). The data were
188 presented as mean of LCs \pm standard deviations. Mortality rates (%) of snails by
189 concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) to the essential oil were submitted to analysis of variance
190 (ANOVA) followed by Tukey ($p < 0.05$).

191

192 **3. Results**

193

194 **3.1 Chemical characterization**

195

196 The distillation of the *H. pectinata* essential oil yielded 1.57%. The chemical
197 characterization of the sample is shown in Table 1.

198 Twenty-one compounds have been identified in the *H. pectinata* oil. The
 199 chromatographic profile of the *H. pectinata* oil presented only mixtures of constituents
 200 of the class of sesquiterpenes, among which β -caryophyllene (15.79%), α -cadinol
 201 (13.75%), and t-muurolol (10.28%) were the main constituents in the oil. The amount of
 202 oxygenated constituents identified was 49.47%, while the amount of hydrocarbons was
 203 43.88%. The general identification obtained for the constituents of the *H. pectinata*
 204 essential oil was 93.35%.

205

206 **Table 1** Chemical characterization of the essential oil from *Hyptis pectinata* leaves

Compound ^a	RI calc. ^b	RI lit. ^c	Content (%) ^d
			<i>Hyptis pectinata</i>
α -copaene	1376	1374	1.59
β -bourbonene	1384	1384	2.14
β -elemene	1392	1391	1.40
β -caryophyllene	1418	1418	15.79
α -Santalene	1420	1420	1.78
α -bergamotene	1432	1430	1.04
allo-aromadendrene	1460	1458	8.44
germacrene D	1480	1480	1.42
α -amorphene	1485	1506	1.42
δ -Amorphene	1512	1511	3.77
γ -cadinene	1513	1513	2.15
trans-calamenene	1529	1529	2.01
trans- α -bisabolene	1549	1549	2.97

spathulenol	1575	1577	6.0
caryophyllene oxide	1581	1582	1.5
globulol	1585	1583	1.73
humulene epoxide II	1607	1606	2.48
1,6-humulenedien-3-ol	1621	1619	9.27
t-muurolol	1644	1642	10.28
α -cadinol	1652	1653	13.75
trans-farnesol	1728	1714	2.42
Classes of compounds			
Sesquiterpenes hydrocarbons			43.88
Oxygen-containing sesquiterpenes			49.47
Total of identified content %			93.35

207 The main compounds identified with content above 10% are highlighted in bold

208 ^a Compounds listed in order of column elution elution DB-5MS

209 ^b Retention index determined in DB-5ms column using a homologous series of alkanes
210 C8 – C32.

211 ^c Retention index of the library (Adams, 2007; NIST 2011).

212 ^d Calculated from relative areas of peaks in chromatograms based on three or more
213 injections

214

215 **3.2 Molluscicidal Activity**

216

217 The *H. pectinata* essential oil proved to be highly toxic to *B. glabrata* in a single
218 dose (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), causing 100% snail mortality in the first hours of the exposure
219 period. After molluscicidal activity with a single dose was confirmed, the essential oil
220 was evaluated at lower concentrations and LC_{50} and LC_{90} were determined (Table 2).

221

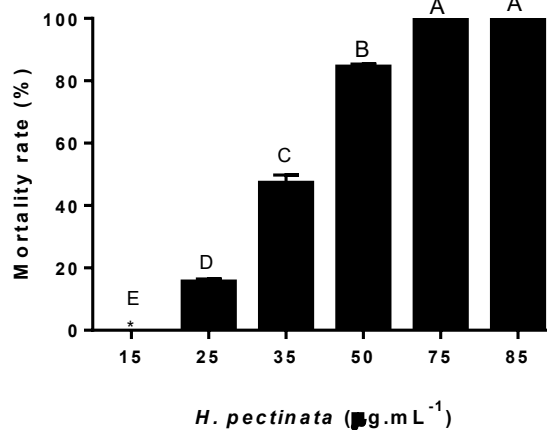
222 **Table 2** Estimated values of LC₅₀ and LC₉₀ for the *Hyptis pectinata* essential oil against
223 *Biomphalaria glabrata* snails after 24 hours of exposure

Essential oil	Adults snails	
	LC ₅₀	LC ₉₀
<i>H. pectinata</i>	40.31 ± 0.29	63.02 ± 0.27
(95% CI)	(39.59– 41.03)	(62.32– 63.71)

224 Values of LC₅₀, LC₉₀ and 95% confidence limits (CI) are expressed as µg.mL⁻¹ of
225 essential oil required to cause the death of snails.

226

227 The *H. pectinata* essential oil induced snail mortality in all concentrations
228 evaluated except for 15 µg.mL⁻¹ (Fig. 1). Snail mortality was positively correlated with
229 concentration levels, being dose-dependent. The mortality rate remained constant from
230 the concentration of 75 µg.mL⁻¹ (Fig. 1).



231

232 **Fig. 1** Mortality rate (%) of wild snails of *Biomphalaria glabrata* after 24 hours of
233 exposure to the *Hyptis pectinata* essential oil at different concentrations (µg.mL⁻¹).

234 The results are presented as mean ± standard deviation. The asterisk (*) indicates zero
235 values. p < 0.05. Different letters indicate significant differences between concentrations

236

237 During the exposure of snails to the *H. pectinata* essential oil, it was possible to
238 observe hemolymph leakage followed by seclusion of the cephalopodal mass into their
239 shells without presenting response to the touch stimulus. At lower concentrations, snails
240 presented mucus secretion, escape behavior (by moving to the edges of the aquarium),
241 and differences in behavior during the recovery phase, such as decreased motor and
242 feeding capacity. No mortality or behavioral changes were observed in snails in the
243 negative control group.

244 Since the sesquiterpene β -caryophyllene was the compound present in the
245 greatest quantity in the *H. pectinata* oil, it was also evaluated for molluscicidal activity
246 to verify its effect on snail mortality. The results showed that β -caryophyllene did not
247 induce snail mortality at a concentration of $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and did not cause any
248 impairment of motor and feeding activities. Therefore, this sesquiterpene was
249 considered inactive on *B. glabrata*, since it did not cause snail mortality at the
250 maximum dose recommended by the WHO in the period of 72 hours after exposure.

251

252 **3.3 Acute toxicity on non-target organism**

253

254 In this study, fishes of the species *D. rerio* were used to evaluate the degree of
255 toxicity of the *H. pectinata* essential oil on non-target species for molluscicidal activity.
256 The acute toxicity value of *H. pectinata* for the fish *D. rerio* in 48 hours of exposure
257 was $43.02 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The LC_{50} obtained was compared to the toxic effect of the lethal
258 concentration (50%) recorded in the literature for the commercial molluscicide
259 niclosamide on the same species evaluated (Table 3).

260

261 **Table 3** Toxicity of the *Hyptis pectinata* essential oil on the fish *Danio rerio*

Treatment	Acute toxicity on <i>D. rerio</i>	
	LC ₅₀ (95% CI)	Toxicity classification
<i>H. pectinata</i>	43.02 ± 0.53 (41.68–44.36)	Category 3
Niclosamide	0.12 (0.10–0.19) ^a	Category 1

262 The data are presented as LC₅₀ (in µg.mL⁻¹) with the respective 95% confidence limit.
263 Lethal concentrations obtained after 48 hours of exposure.
264 Toxicity classification: Category 1 - acute toxicity ≤ 1.00 µg.mL⁻¹; Category 2 - acute
265 toxicity > 1.00 and ≤ 10.0 µg.mL⁻¹; Category 3- acute toxicity > 10.0 and < 100 µg.mL⁻¹
266 (Wallau and Santos, 2013). ^a LC₅₀ obtained in the literature (Rapado et al, 2013.
267 doi:10.1371/journal.pntd.0002251.t004)

268

269 Discussion

270

271 Chemical characterization

272

273 Essential oils are complex natural mixtures of lipophilic substances
274 characterized by the presence of one to three major components in relatively high
275 concentrations compared to the other components present in the oil (Teixeira et al.,
276 2014), being formed mainly by secondary metabolites of the classes of monoterpenes,
277 sesquiterpenes, and phenylpropanoids (Simões et al., 2010).

278 It was possible to group the terpenic compounds present in the *H. pectinata*
279 essential oil into the two following main chemical classes: sesquiterpene hydrocarbons
280 and oxygenated sesquiterpenes, since compounds of other classes were not identified
281 (Table 1). Thus, the sample of *Hyptis pectinata* oil was characterized by containing only
282 mixtures of sesquiterpenes, with β-caryophyllene (15.79%) as the major compound and
283 with high levels of α-cadinol (13.75%) and t-muurolol (10.28%).

284 The high content of sesquiterpenes in the *H. pectinata* essential oil is reported in
285 the literature (Tchoumboungang et al., 2005; Santos et al., 2008). However, the *H.*
286 *pectinata* essential oil showed variability in chemotypes when compared to data
287 reported in the literature. Tchoumboungang et al. (2005), for example, reported that
288 germacrene D (28%) and β -caryophyllene (22.1%) were the main components of the
289 essential oil from fresh leaves of *H. pectinata* in the humid region of West Cameroon -
290 Central Africa. Santos et al. (2008) identified calamusenone (24.64%) as the main
291 component in cultivars from Sergipe State, Brazil, with the occurrence of this
292 compound in the genus *Hyptis* being described for the first time.

293 The chemical variation found in the composition of the oil evaluated in this
294 study regarding the major compounds, compound types, and relative quantities, in
295 general, are attributable to the influence of environmental conditions, physiological
296 changes, and intra-species genetic variability or to others factors, such as the method of
297 extraction of the essential oil, the type of material used in the extraction (fresh or dry),
298 and the geographic location (Marlúcia, 2011). Secondary metabolites represent a
299 chemical interface between plants and the environment that can influence enzymatic
300 activities in certain species and consequently interfere with the biosynthesis of terpenes
301 present in essential oils (Teixeira et al., 2014).

302 It is important to note that all differences in oil profiles must be considered when
303 proposing any type of correlation between the chemical composition and biological
304 activity of the oils (Morais, 2009). Therefore, the application of essential oils aimed to
305 biological activity must be preceded by the study and analysis of their chemical
306 composition, which is essential to estimate the chemical compounds responsible for
307 biological activity and understand their active compounds, allowing researchers to

308 direct their use for various purposes, such as product development for specific
309 applications.

310

311 **Molluscicidal activity**

312

313 The *H. pectinata* essential oil demonstrated effective molluscicidal activity
314 against *B. glabrata* with LC₅₀ of 40.31 µg.mL⁻¹ and LC₉₀ of 63.02 µg.mL⁻¹. According
315 to the WHO guidelines (1983), a plant with molluscicidal properties has the potential
316 for use in the field if promoting snail mortality of 90% (LC₉₀) in concentrations of up to
317 100 µg.mL⁻¹. Thus, the essential oil of this species was considered a promising
318 molluscicide to control the spread of snail vectors according to the World Health
319 Organization standards.

320 The molluscicidal action of the *H. pectinata* essential oil recorded in this study is
321 related to the sesquiterpene compounds, since compounds of other classes were not
322 identified in this oil. However, the sesquiterpene β-caryophyllene, present in the
323 greatest quantity in the oil, did not induce snail mortality at the maximum concentration
324 of 100 µg.mL⁻¹ when evaluated separately. This suggests that the molluscicidal activity
325 of the *H. pectinata* essential oil is not related to the isolated action of the major
326 compound, but to the synergism of all its compounds acting together or associated with
327 other compounds not tested in this study, which even at small concentrations can be
328 active. It is important to note that most of the sesquiterpenes present in essential oils
329 have their biological activity more intensified when combined due to synergistic action
330 (Santos et al., 2008).

331 The molluscicidal effect of the *H. pectinata* essential oil on *B. glabrata* observed
332 in the first hours of the exposure period was probably related to the rapid absorption of

333 the oil by the tegument of the snails. Cornwell and Barry (1994) mentioned that the
334 sesquiterpenes present in essential oils are promoters of cutaneous penetration, being
335 capable of penetrating tissues quickly. In addition, the lipophilic character of essential
336 oils may increase cell membrane permeability due to the affinity with lipid-rich tissues
337 (Bakkali et al., 2008; Lahlou, 2004).

338 Changes in snail behavior observed during a molluscicidal test suggested a
339 reaction of these mollusks against an aggressive agent, being considered a defense
340 mechanism of the animal. Mucus secretion on the shell opening, for example, can be
341 understood as a way to block contact with the toxic solution (Teixeira et al., 2012).
342 Although information on the molluscicidal action of essential oils is limited, it is
343 possible that essential oils act against mollusks and insects similarly. Botanical
344 insecticides, including essential oils, act on the cholinergic system, GABA system,
345 mitochondrial system, and the octopaminergic system, besides as AChE inhibitors
346 (Isman; Machial, 2006; Rattan, 2010).

347 Conventional organophosphate and carbamate molluscicides, for example,
348 strongly inhibit AChE activity in mollusk hemolymph (Rorke et al., 1974). Action
349 mechanisms of other synthetic molluscicides were associated to the loss of low
350 molecular weight substances such as potassium and calcium ions, besides inhibiting
351 important enzymes for the cell membrane, such as ATPase, or a possible electrostatic
352 interaction with the phospholipids present in the cytoplasmic membrane, causing cell
353 membrane rupture (Chen et al., 2019; Kaehn, 2010; Melo et al., 2018).

354 It is plausible that the *H. pectinata* essential oil acts similarly regarding the
355 destabilization and rupture of the cell membrane of the tegument of *B. glabrata*, which
356 would justify the presence of dispersed hemolymph in the solution of the molluscicidal
357 test. The molluscicidal action of the *H. pectinata* essential oil can also be the result of

358 different action mechanisms affecting more than one system. According to López and
359 Pascual-Villalobos (2010), the terpenes present in essential oils can operate in different
360 metabolic pathways. Thus, the elucidation of the action modes of essential oils against
361 vector snails should be investigated in future research.

362

363 **Acute toxicity on non-target organism**

364

365 The toxicity test on the fish *Danio rerio* was conducted so that the *H. pectinata*
366 essential oil could be used safely in the control of schistosomiasis-transmitting snails in
367 natural environments by estimating its risks to species not targeted by the molluscicidal
368 action. The tropical species *D. rerio* is widely used as a good ecotoxicity indicator
369 (ABNT, 2011) and the genetic similarity of 70% to humans also allows toxicity studies
370 with this animal model (Magalhães et al., 2017).

371 The acute toxicity value (LC_{50}) of the *H. pectinata* essential oil for the fish *D.*
372 *rerio* in 48 hours of exposure was $43.02 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The acute toxicity of *H. pectinata* for
373 the fish *D. rerio* was considered of a lesser toxic category compared to the toxicity of
374 the commercial synthetic molluscicide niclosamide. Rapado et al. (2013) evaluated the
375 toxic effect of the molluscicide niclosamide on the fish *D. rerio* and observed high
376 toxicity with LC_{50} of $0.12 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. According to the Globally Harmonized System, the
377 *H. pectinata* essential oil is classified as a category 3 toxin for *D. rerio*, being
378 substantially less toxic than the reference molluscicide niclosamide, classified as a
379 category 1 toxin (Table 3).

380 In addition to the use of the *H. pectinata* essential oil for snail control in natural
381 environments, it is also possible to use this oil in artificial breeders of intermediate hosts
382 of schistosomiasis, such as ditches, open sewers, and other types of water puddles that

383 frequently occur in areas of schistosomiasis prevalence, where there is no sanitary
384 infrastructure and poor social and environmental conditions. In these environments,
385 other cohabiting species are rarely found.

386

387 **Conclusion**

388

389 In this study, we reported for the first time the molluscicidal activity of the *H.*
390 *pectinata* essential oil and described its chemical composition. In conclusion, the *H.*
391 *pectinata* essential oil was characterized by containing only mixtures of sesquiterpene
392 compounds and demonstrated potential for use in the control of schistosomiasis-
393 transmitting snails, being biologically active against the snail *B. glabrata* in
394 concentrations compatible with the concentration recommended by the WHO. In
395 addition, considering the limitations of niclosamide, the essential oil investigated in this
396 study is a promising molluscicide derived from botanical sources, presenting less toxic
397 potential against non-target organisms compared to niclosamide. Further studies on the
398 toxicity of this oil on embryos and newborns of *B. glabrata* will be conducted using as
399 basis the lethal concentrations obtained in this study in order to verify if the essential oil
400 acts in all life stages of the snail.

401

402 **Conflicts of interest**

403

404 The authors declare that they have no known competing financial interests or
405 personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this
406 paper.

407

408 **Acknowledgements**

409

410 This study was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de
411 Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

412 The authors are grateful to the Fundação de Amparo à Pesquisa e ao
413 Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) for financial
414 support.

415

416

417

418

419

420

421

422

423

424

425

426

427

428

429

430

431

432 **Referencias**

- 433 ABNT, Associação Brasileira de Normas Técnicas (2011) Ecotoxicologia aquática:
434 Toxicidade aguda – método de ensaio com peixes. NBR 15088: 2011. Brasil.
- 435 Adams RP (2007) Identification of Essential Oil Components by Gas
436 Chromatography/Mass Spectrometry, Allured, Carol Stream, Ill,USA, 4th edition.
- 437 Araújo FP, Albuquerque RDDG, Rangel LS, Caldas GR, Tietbohl LAC, Santos MG,
438 Ricci-Júnior E, Thiengo S, Fernandez MA, Santos JAA, Faria RX, Rocha L (2019)
439 Nanoemulsion containing essential oil from *Xylopia ochrantha* Mart. produces
440 molluscicidal effects against different species of *Biomphalaria* (Schistosoma hosts).
441 Mem I Oswaldo Cruz 114: 1–8. doi:10.1590/0074-02760180489
- 442 Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M (2008). Biological effects of essential
443 oils – A review. Food and Chemical Toxicology 46: 446–
444 475. doi:10.1016/j.fct.2007.09.106
- 445 Bichara D, Calcaterra NB, Arranz S, Armas P, Simonetta SH (2013) Set-up of an
446 infrared fast behavioral assay using zebrafish (*Danio rerio*) larvae, and its application in
447 compound biotoxicity screening. J Appl Toxicol 34: 214–219. doi:10.1002/jat.2856
- 448 Braz Filho, R. (2010). Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país
449 emergente. Química Nova, 33(1), 229-239. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000100040>
- 451 Chen Z, Wang W, Yao J, Li S, Zhang X, Hu H, Liu X, Luo B, Xu H, Duan L
452 (2019) Toxicity of a molluscicide candidate PPU07 against *Oncomelania hupensis*
453 (Gredler, 1881) and local fish in field evaluation. Chemosphere 222: 56–61.
454 doi:10.1016/j.chemosphere.2019.01.102
- 455 Cornwell PA, Barry BW (1994) Sesquiterpene components of volatile oils as skin
456 penetration enhancers for the hydrophilic permeant 5-fluorouracil. J Pharm Pharmacol.
457 46: 261-9. doi:10.1111/j.2042-7158.1994.tb03791.x
- 458 Coutinho DF, Dias CS, Barbosa-Filho JM, Agra MF, Martins RM, Silva TMS, Craveiro
459 AA (2007) Composition and Molluscicidal Activity of the Essential Oil from the Stem
460 Bark of *Ocotea bracteosa* (Meisn.) Mez. Journal of Essential Oil Research 19: 482–484.
461 doi:10.1080/10412905.2007.9699958
- 462 De Veras BO, Oliveira MBM, Silva FGO, Santos YQ, Oliveira JRS, Menezes VLL,
463 Silva JRGA, Navarro DMDAF, Oliveira Farias JCR, Santos JA, Gorchach-Lira K (2019)
464 Chemical composition and evaluation of the antinociceptive, antioxidant and
465 antimicrobial effects of essential oil from *Hymenaea cangaceira* (Pinto, Mansano &
466 Azevedo) native to Brazil: A natural medicine. J Ethnopharmacol 247: 112265. doi:
467 10.1016/j.jep.2019.112265
- 468 Farmacopeia Brasileira (2019) 6ª ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária -
469 ANVISA, Brasília, pp 873

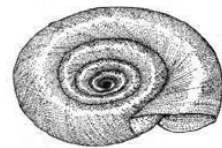
- 470 Gomes PRB, Reis JB, Fernandes RP, Mouchrek Filho VE, Souza AG, Fontenele MA,
471 Silva JC (2019) Toxicidad y actividad molusccidal del aceite esencial *Pimenta dioica*
472 contra el caracol *Biomphalaria glabrata*. Rev Peru Biol 26: 101-108. doi:
473 10.15381/rpb.v26i1.15913
- 474 Guimarães AC, Meireles LM, Lemos MF, Guimarães MCC, Endringer DC, Fronza M,
475 Scherer R (2019) Antibacterial activity of terpenes and terpenoids present in essential
476 oils. Molecules 24: 2471. doi:10.3390/molecules24132471
- 477 Instrução Normativa Nº 154 (2007). Ministério do Meio Ambiente. Brasil. Institui o
478 Sistema de a de Autorização e Informação em Biodiversidade – Sisbio.
- 479 Isman MB, Machial CM (2006) Pesticides based on plant essential oils: from traditional
480 practice to commercialization. In: Rai M, Carpinella MC (eds) Naturally occurring
481 bioactive compounds. Elsevier, New York, pp 29–44
- 482 Kaehn K (2010) Polihexanide: a safe and highly effective biocide. Skin Pharmacol.
483 Physiol 23: 7–16. doi:10.1159/000318237
- 484 Lahlou M (2004) Essential oils and fragrance compounds: bioactivity and mechanisms
485 of action. Flavour Frag J 19: 159–165. doi:10.1002/ffj.1288
- 486 Magalhães FEA, Sousa CÁP, Santos SAAR, Menezes RB, Batista FLA, Abreu ÂO,
487 Campos AR (2017) Adult Zebrafish (*Danio rerio*): An Alternative Behavioral Model of
488 Formalin-Induced Nociception. Zebrafish 14: 422–429. doi:10.1089/zeb.2017.1436
- 489 Marlúcia BM (2011) Amazônia Maranhense: Diversidade e Conservação. Belém:
490 Museu Paraense Emílio Goeldi, 2011.328 p.: il.
- 491 Melo AO, Santos DB, Silva LD, Rocha TL, Bezerra JCB (2018) Molluscicidal activity
492 of polyhexamethylene biguanide hydrochloride on the early-life stages and adults of the
493 *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). Chemosphere 216: 365-371.
494 doi:10.1016/j.chemosphere.2018.10.035
- 495 Morais LAS. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos
496 essenciais. Hort. bras., v. 27, n. 2, p. 4050- 4063, 2009.
- 497 Nascimento P, Alviano W, Nascimento A, Santos P, Arrigoni-Blank MJR, Trindade R
498 (2008). *Hyptis pectinata* essential oil: chemical composition and anti-*Streptococcus*
499 *mutans* activity. Oral Diseases 14: 485–489. doi:10.1111/j.1601-0825.2007.01405.x
- 500 NIST (2011) Mass Spectral Library (NIST/EPA/NIH), National Institute of Standards
501 and Technology, Gaithersburg, Md, USA.
- 502 Paraense WL (2008) Histórico do gênero *Biomphalaria*, morfologia e sistemática
503 morfológica, in: Carvalho, O.S., Coelho, P.M.Z., Lenzi, H.L. (Eds.), *Schistosoma*
504 *mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar, Rio de Janeiro, pp. 284-308.

- 505 Rapado L, Freitas G, Polpo A, Rojas-Cardozo M, Rincón J, Scotti M, Yamaguchi L.
 506 (2014). A Benzoic Acid Derivative and Flavokawains from *Piper* species as
 507 Schistosomiasis Vector Controls. *Molecules* 19: 5205–5218.
 508 doi:10.3390/molecules19045205
- 509 Rapado LN, Pinheiro AS, Lopes POMV, Fokoue HH, Scotti MT, Marques JV,
 510 Yamaguchi LF (2013) Schistosomiasis Control Using Piplartine against *Biomphalaria*
 511 *glabrata* at Different Developmental Stages. *PLoS Neglect Trop D* 7: 2251.
 512 doi:10.1371/journal.pntd.0002251
- 513 Rattan RS (2010) Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant
 514 origin. *Crop Prot* 29:913–920. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.05.008>
- 515 Raymundo LJRP, Guilhon CC, Alviano DS, Matheus ME, Antonioli AR, Cavalcanti
 516 SCH, Fernandes PD (2011) Characterisation of the anti-inflammatory and
 517 antinociceptive activities of the *Hyptis pectinata* (L.) Poit essential oil. *Journal of*
 518 *Ethnopharmacology* 134: 725–732. doi:10.1016/j.jep.2011.01.027
- 519 Reddy A, Ponder EL, Fried B (2004) Effects of copper sulfate toxicity on cercariae and
 520 metacercariae of *Echinostoma caproni* and *Echinostoma trivolvis* and on the survival of
 521 *Biomphalaria glabrata* snails. *J Parasitol* 90: 1332–1337. doi:10.1645/ge-321r
- 522 Rorke MA, Gardner DR, Greenhalch R (1974) Lethality and behavioural symptoms
 523 produced by some organophosphorous compounds in the snail (*Helix aspersa*). *Bull*
 524 *Environ Contam Toxicol* 11:417–424. <https://doi.org/10.1007/BF01685297>
- 525 Salama MM, Taher EE, El-Bahy MM (2012). Molluscicidal and Mosquitocidal
 526 Activities of the Essential oils of *Thymus capitatus* Hoff. et Link. and *Marrubium*
 527 *vulgare* L. *Ver Insti Med Trop São Paulo* 54: 281–286. doi:10.1590/s0036-
 528 46652012000500008
- 529 Santos PO, Costa MJC, Alves JAB, Nascimento PFC, Melo DLFM, Barbosa Jr AM,
 530 Nascimento MPF (2008). Chemical composition and antimicrobial activity of the
 531 essential oil of *Hyptis pectinata* (L.) Poit. *Química Nova* 31: 1648–
 532 1652. doi:10.1590/s0100-40422008000700009
- 533 Scholte RGC, Carvalho OS, Malone JB, Utzinger J, Vounatsou P (2012) Spatial
 534 distribution of *Biomphalaria* spp., the intermediate host snails of *Schistosoma mansoni*,
 535 in Brazil. *Geospatial Health* 6: 95. doi:10.4081/gh.2012.127
- 536 Silva WJ, Dória GAA, Maia RT, Nunes RS, Carvalho GA, Blank AF, Cavalcanti SCH
 537 (2008) Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally
 538 safe insecticides. *Bioresource Technology* 99: 3251–
 539 3255. doi:10.1016/j.biortech.2007.05.064
- 540 Simões CMO (2010) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, 6ª ed. UFSC,
 541 Florianópolis, pp 1104

- 542 Smithers SR, Terry RJ (1974) Immunology of schistosomiasis. Bull World Health
543 Organ 51: 553–595
- 544 Tchoumboungang F, Zollo PHA, Boyom FF, Nyegue MA, Bessière JM, Menut C
545 (2005) Aromatic plants of tropical Central Africa. XLVIII. Comparative study of the
546 essential oils of four *Hyptis* species from Cameroon: *H. lanceolata* Poit., *H.*
547 *pectinata*(L.) Poit., *H. spicigera* Lam. And *H. suaveolens* Poit. Flavour and Fragrance
548 Journal 20: 340–343. doi:10.1002/ffj.1441
- 549 Teixeira JPF, Marques MOM, Pio RM (2014) Caracterização dos óleos essenciais em
550 frutos de nove genótipos de tangerina. Citrus Research & Technology 35: 1-10
- 551 Teixeira T, Rosa JS, Rainha N, Baptista J, Rodrigues A (2012) Assessment of
552 molluscicidal activity of essential oils from five Azorean plants against *Radix peregra*
553 (Müller, 1774). Chemosphere 87: 1–6. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.11.027
- 554 Thanigaivel A, Chanthini KM, Karthi S, Vasantha-Srinivasan P, Ponsankar A, Sivanesh
555 H, Stanley-Raja V, Shyam-Sundar N, Narayanan KR, Senthil-Nathan S (2019) Toxic
556 effect of essential oil and its compounds isolated from *Sphaeranthus amaranthoides*
557 Burm. f. against dengue mosquito vector *Aedes aegypti* Linn. Pestic Biochem Physiol
558 160: 163-170. doi: 10.1016/j.pestbp.2019.08.006
- 559 Vos T, Flaxman AD, Naghavi M, Lozano R, Michaud C, Ezzati M, et al. (2012) Years
560 lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990–2010:
561 A systematic analysis for the global burden of disease study. The Lancet 380: 2163–
562 96. doi:10.1016/s0140-6736(12)61729-2
- 563 Wallau WM, Santos JÁ (2013) O sistema globalmente harmonizado de classificação e
564 rotulagem de produtos químicos (GHS): uma introdução para sua aplicação em
565 laboratórios de ensino e pesquisa acadêmica. Quim Nova 36: 607-617.
566 <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422013000400021>
- 567 WHO, World Health Organization (1965) Memoranda: molluscicide screening and
568 evaluation. Bull World Health Organ 33: 567–576
- 569 WHO, World Health Organization (1983) Report of the Scientific working Group on
570 Plant Molluscicide & Guidelines for evaluation of plant molluscicides. Geneva:
571 TDR/SC 4-SWE (4)/83.3
- 572 WHO, World Health Organization (2012) Research priorities for Helminth infections.
573 Technical report on the TDR disease reference group on Helminth infections, in: World
574 Health Organization, Technical Report Reference Series 972. World Health
575 Organization, Geneva 79
- 576 WHO, World Health Organization (2017) Field use of molluscicide in schistosomiasis
577 control programmes: na operational manual for programme managers. Geneva: World
578 Health Organization
579 <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254641/9789241511995-eng.pdf>

- 580 WHO, World Health Organization (2019) Schistosomiasis.
581 <https://www.who.int/schistosomiasis/disease/en/>
- 582 Zabka M, Pavela R, Prokinova E (2014) Antifungal activity and chemical composition
583 of twenty essential oils against significant indoor and outdoor toxigenic and
584 aeroallergenic fungi. *Chemosphere* 112: 443–448.

Capítulo II



Molluscicidal activity of monoterpenes and their effect on inhibition of acetylcholinesterase activity on *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host of *Schistosoma mansoni*

1 **Molluscicidal activity of monoterpenes and their effect on inhibition of**
2 **acetylcholinesterase activity on *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host of**
3 ***Schistosoma mansoni***

4

5 **Abstract**

6 The molluscicidal action of essential oils have been attributed to the most prevalent
7 terpenic compounds, however, the molluscicidal properties, mode of action and toxicity
8 to non-target organisms of these compounds alone remain unclear. In this study, the
9 molluscicidal potential of four monoterpenes (camphor, thymol, α -pinene and 1,8-
10 cineole) was analyzed against snails *Biomphalaria glabrata*, intermediate host of
11 *Schistosoma mansoni*. Each monoterpene was evaluated by the immersion test and the
12 monoterpenes considered active against *B. glabrata* were analyzed as inhibitors of the
13 enzymatic activity of acetylcholinesterase (AChE) extracted from snails. In addition,
14 acute toxicity to non-target organisms was assessed against *Danio rerio* fish. The results
15 showed that camphor and 1,8-cineole monoterpenes did not induce snail mortality. The
16 thymol and α -pinene monoterpenes were active against *B. glabrata*, inducing mortality
17 in concentration-dependent patterns and exhibiting a lethal effect in concentrations
18 compatible with that recommended by the World Health Organization (CL₉₀ of 7.11 and
19 CL₉₀ 10.34 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively). Thymol and α -pinene inhibited the AChE of *B.*
20 *glabrata* in concentrations higher than those used in the molluscicide test. These
21 monoterpenes showed low toxicity to non-target organisms when compared to the
22 commercial molluscicide niclosamide. The knowledge about the monoterpenes toxicity
23 against *B. glabrata* contributes to its potential use in molluscicidal formulations and
24 alternatives in the control of snails that host intermediate *S. mansoni*, a crucial action in
25 the prevention and transmission of schistosomiasis, a neglected tropical disease.

26 **Keywords:** Schistosomiasis. Molluscicide. AChE. Thymol. α -pinene.

27

28 **Highlights**

29

30 Camphor and 1,8-cineole did not induce the mortality of adult *B. glabrata* snails.

31

32 Thymol and α -pinene are toxic to *B. glabrata* in concentration recommended by WHO.

33

34 Thymol and α -pinene toxicity to snails is concentration-dependent.

35

36 Thymol and α -pinene are inhibitors of acetylcholinesterase of *B. glabrata* snails.

37

38 Low toxicity of thymol and α -pinene to non-target organisms compared to niclosamide.

39

40 Thymol and α -pinene monoterpenes are potentially molluscicidal.

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51 **1 Introduction**

52

53 Schistosomiasis, a parasitic disease caused by trematode worms of the genus
54 *Schistosoma*, is the most important helminth infection in humans. It affects millions of
55 people worldwide. The morbidity and mortality rates are high (WHO, 2019). In Brazil,
56 schistosomiasis is considered an expanding endemic. It is directly related to extremely
57 precarious socioenvironmental and socioeconomic conditions (Brasil, 2010; Matos-
58 Rocha et al. 2017). The snail *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Planorbidae) is the
59 main intermediate host of *Schistosoma mansoni* in Brazil. This is mainly due to its high
60 ecological plasticity, high infection rates, and efficiency in the transmission of the
61 parasite. It is thus paramount for the disease transmission cycle (Scholte et al. 2012).

62 Since the 1960s, the compound niclosamide is the only commercially available
63 molluscicide recommended by the WHO. However, it is extremely toxic to fish and
64 other aquatic animals, which limits its application in occurrence areas due to
65 environment damage (EPA, 1999; Chen et al. 2019). Therefore, it is necessary to
66 develop new effective and low toxicity molluscicides for non-target organisms.

67 Essential oils (EOs) are products present in plants. They have been widely
68 studied due to their diverse biological activities, highlighting their antibacterial,
69 antifungal, and insecticidal actions, and their scientifically proven efficacy (De Veras et
70 al. 2019; Thanigaivel et al. 2019; Zabka et al. 2014). Such products may represent a
71 potential source of molluscicide agents, since several EOs have demonstrated activity
72 against snails, which are vectors of schistosomiasis (Araújo et al. 2019; Gomes et al.
73 2019; Salama et al. 2012; Sousa et al. 2017). The action of EOs, in the broad spectrum
74 of biological properties reported by hundreds of studies, has been attributed to the most
75 prevalent compounds in EOs, mainly monoterpenes and sesquiterpenes. However, there

76 are few studies analyzing the action of these compounds in isolation (Guimarães et al.
77 2019).

78 Terpenes are the main constituents of EOs. They act mainly as inhibitors of the
79 enzymatic activity of acetylcholinesterase (AChE) in invertebrates (De Groot e Schmidt
80 2016; Jankowska et al. 2017). The AChE plays a vital role in maintaining the
81 physiological functioning of mollusks (Kumar et al. 2009; Teixeira et al. 2012). It has
82 been the main target of organophosphate molluscicide and carbamates and can be used
83 as a potent biomarker of mollusk toxicity (He et al. 2017; Ma et al. 2014).

84 In a previous study conducted by our research group, we demonstrated the
85 molluscicide activity of four EOs extracted from plants native to the Amazon region of
86 Maranhão, Brazil. The LC₉₀ of these oils ranged from 27.41 to 182.33 µg·mL⁻¹. We
87 highlighted terpenic compounds present at greater quantity in the essential oils of the
88 species evaluated, namely *Eugenia punicifolia* (α-pinene 58.65%), *Hyptis dilatata*
89 (camphor 37.98%), *Lippia gracilis* (thymol 57.94%) and *Lippia acutidens* (1.8 –Cineole
90 26%) (Ribeiro, 2016). The main chemical components identified - thymol, α-pinene,
91 1,8-cineole, camphor - belong to the class of monoterpenes.

92 Based on these findings, we conducted the present study because the
93 monoterpenes selected here are mainly present in EOs considered active against snails,
94 which are vectors of schistosomiasis. Therefore, these monoterpenes may be related to a
95 molluscicide effect and should be investigated in isolation. In addition, to understand
96 the nature of toxicity, that is, the molluscicide mode of action of monoterpenes, and
97 considering that the inhibition of the enzyme AChE can be an important mechanism of
98 action for toxic actions against vectors, we evaluated the effects of these monoterpenes
99 on the activity of AChE extracted from *B. glabrata* snails, which are vectors of
100 schistosomiasis.

101 We also emphasize that, although monoterpenes are possible alternative
102 products to control schistosomiasis, there are also challenges in predicting the impacts
103 on non-target organisms. In this context, the objective of this work is to evaluate the
104 toxic action of the monoterpenes camphor, thymol, α -pinene, and 1,8-cineole on *B.*
105 *glabrata*. We also evaluate the possible mechanism of action of active monoterpenes
106 through AChE enzymatic activity in soft tissues of snails, and then determine the
107 toxicity of these monoterpenes to non-target organisms.

108 After reviewing the current literature, we found no studies on the molluscicide
109 activity of these monoterpenes against *B. glabrata* that detail LC₅₀ and LC₉₀. This is
110 also the first study to evaluate the effects of monoterpenes on AChE enzymes extracted
111 from *B. glabrata*.

112

113 2 Materials and methods

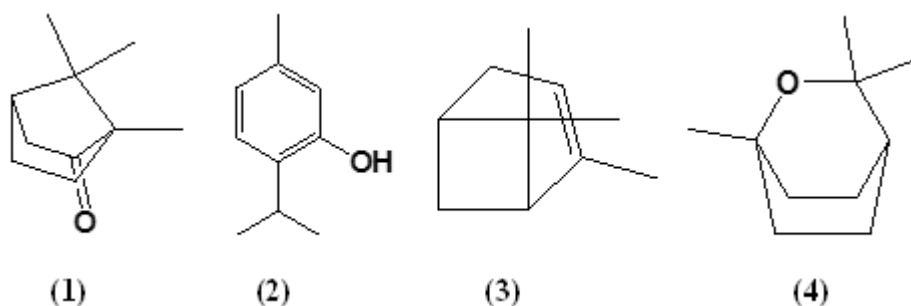
114

115 2.1 Monoterpenes

116 Four monoterpenes were evaluated: camphor, thymol, α -pinene, and 1,8-cineole.

117 All were acquired commercially from Sigma-Aldrich (São Paulo, Brazil) (**Fig. 1**).

118



119

120 **Fig. 1** Chemical structure of the monoterpenes used in the study. (1) camphor, (2)
121 thymol, (3) α -pinene, and (4) 1,8-cineole

122

123 **2.2 Collection, maintenance, and selection of snails**

124 Wild snails of the species *B. glabrata* were collected in the city of São Luís (- 2°
125 33' 35.1"S; - 44° 18' 05.3" W), state of Maranhão, Brazil. The snails were kept at 25 ± 1
126 °C in glass aquariums containing dechlorinated water and fed with lettuce (*Lactuca*
127 *sativa* L.) *in natura*. For four weeks, the mollusks were examined as for infection by *S.*
128 *mansoni* by photo-stimulation, as Smithers and Terry (1974) described. Among
129 uninfected snails, adults with intact shells were selected for the molluscicide assay
130 (diameter 13 ± 1.2 mm; weight 0.43 ± 0.1 g).

131

132 **2.3 Molluscicide activity assay**

133 The molluscicide bioassay was carried out using an aqueous solution of each
134 monoterpene (camphor, thymol, α -pinene, and 1,8-cineole) prepared on the spot at a
135 concentration of 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, dissolved in 0.1% DMSO, and subjected to mechanical
136 stirring (400 rpm). The assay was performed according to the WHO standard
137 methodology. In summary, groups of ten wild snails were exposed to monoterpene
138 solutions (500 mL) for 24 hours at 25 ± 1 °C. At the end of the exposure period (24 h),
139 the surviving snails were washed in running water to remove the monoterpene solution
140 and transferred to new aquariums containing an identical volume of dechlorinated water
141 for a recovery phase of up to 72 hours.

142 The negative control group was exposed to dechlorinated water with 0.1%
143 DMSO, and the positive control group was exposed to 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of copper sulfate
144 (lethal concentration for 100% of dead *B. glabrata* snails according to Reddy et al.,
145 2004). This stage was simultaneous to and performed in a similar way as the treatments.
146 The tests were carried out in triplicate and in two independent experiments.

147 Mortality was assessed during the exposure period and the recovery phase. The
148 animals were considered dead according to the following parameters: absence of muscle
149 contraction, shell discoloration, retraction of cephalopod mass, and hemolymph
150 extravasation. The monoterpenes that showed activity against *B. glabrata* in this single-
151 dose test were evaluated at lower concentrations to determine the values of lethal
152 concentration (LC₅₀ and LC₉₀). The test was carried out under the same conditions as
153 described above.

154

155 **2.4 AChE extraction**

156 The protein extract, source of AChE, was obtained from snails of *B. glabrata*, as
157 described by Bianco et al. (2014), with changes. The animals were frozen for 24 hours.
158 Then, the shells were carefully removed and the soft tissues (head, foot and visceral
159 mass) were immediately washed with distilled water, placed on filter paper to drain the
160 extra and heavy fluids. The tissues were macerated (1:10 m/v) in mortar and pestle for 5
161 min in 20 mM Tris / HCl buffer, pH 7.5, with 0.5 mM EDTA. The procedure was
162 performed in an ice bath. The extracts were centrifuged at 11000 x g for 20 min at 4 °C.
163 The supernatant was named extract containing acetylcholinesterase. The protein
164 concentration was determined (Bradford, 1976).

165

166 **2.5 AChE activity**

167 The AChE activity was determined according to the method of Ellman
168 (1961), with acetylthiocholine iodide (ATCI) (Sigma Aldrich) as a substrate. The
169 reaction solution consisted of 50 µL of supernatant containing acetylcholinesterase (0.6
170 mg.mL⁻¹ protein) solubilized in 475 µL 100 mM sodium phosphate buffer, pH 8.0; 475
171 µL 0.2 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (Sigma Aldrich) and 0.75 mM

172 acetylthiocholine iodide. The absorbance (412 nm) was recorded every 5 min.
173 Percentage of inhibition was calculated by comparing the rate of enzymatic hydrolysis
174 of ATCI for the samples to that of the blank (phosphate buffer, DTNB and ATCI). All
175 determinations were carried out in triplicate.

176

177 **2.6 Inhibition of AChE**

178 The monoterpenes thymol and α -pinene were individually diluted in ethanol-PA
179 at a concentration of 20 mg·mL⁻¹. From the stock solution, diluted solutions were
180 prepared in 100 mM sodium phosphate buffer, pH 8.0. The terpenes were tested at six
181 final concentrations: 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 mg·mL⁻¹. The inhibitory activity of
182 AChE was assessed by mixing 50 μ L of supernatant containing acetylcholinesterase,
183 475 μ L of terpene solution and 475 μ L of the reaction solution described above. In the
184 negative control, the terpenes were replaced by the phosphate buffer.

185 The percentage of enzyme inhibition was calculated by comparison with the
186 negative control. The data were transformed into Log (X), normalized, and non-linear
187 regression (GraphPad Prism 7.0, GraphPad Inc., San Diego, CA, USA) to calculate IC₅₀
188 (Concentration to inhibit 50% of acetylcholinesterase activity).

189

190 **2.7 Acute toxicity on a non-target organism assay**

191 Fish of the species *Danio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) were obtained from a
192 commercial fish farm. They were acclimatized in laboratory and kept in an aquarium
193 under constant aeration and partial water change every 48 hours. Healthy adult fish (3.0
194 \pm 0.5 cm and 0.25 \pm 0.5 g) were selected for the assay.

195 The assay was performed by the static method, without water replacement,
196 standardized following the Brazilian Association of Technical Standards (2011). Groups

197 of four organisms were exposed to aqueous solutions of monoterpenes (2-30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
198 dissolved in 0.1% DMSO. The experiment lasted 48 hours. Every 24 hours, the number
199 of dead animals was determined. The following was measured: pH (7.75), dissolved
200 oxygen (7.58 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), and temperature (24.1 $^{\circ}\text{C}$). The negative control (water with
201 0.1% DMSO) and the positive control (CuSO_4 at 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, reference substance
202 according to Bichara et al., 2013), were included simultaneously in the assay. The entire
203 assay was performed in quadruplicate (n=16 organisms for each concentration of
204 monoterpene and control groups). Experiment was developed as approved by the Ethics
205 Committee on Animal Use of the Federal University of Maranhão (Registration: 34.15).

206

207 **2.8 Statistical analysis**

208 The values of lethal concentrations ($\text{LC}_{50, 90}$) of molluscicide and acute toxicity
209 bioassays for fish and its lower and upper confidence limits were calculated by probit
210 linear regression analysis (SPSS[®] software, version 13.0). The data were presented as
211 mean of LCs of each monoterpene \pm standard deviations and compared by ANOVA
212 followed by Tukey post-test. The p-value < 0.05 was considered statistically significant.

213

214 **3 Results**

215

216 **3.1 Molluscicide activity**

217 Table 1 shows the molluscicide activity of the monoterpenes camphor, thymol,
218 α -pinene, and 1,8-cineole against *B. glabrata* snails in a single dose (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). The
219 results show that of the four compounds evaluated only thymol and α -pinene were
220 active against *B. glabrata*. They had a considerable molluscicide activity (100%

221 mortality in the first hours of exposure), with hemolymph extravasation, mass
222 cephalopod retraction, and shell discoloration (**Fig. 2**).

223

224 **Table 1** Molluscicide activity of the monoterpenes camphor, thymol, α -pinene, and 1,8-
225 cineole at a concentration of $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ against *Biomphalaria glabrata* evaluated
226 during the exposure period (24 h) and recovery phase (up to 72 h after treatment)

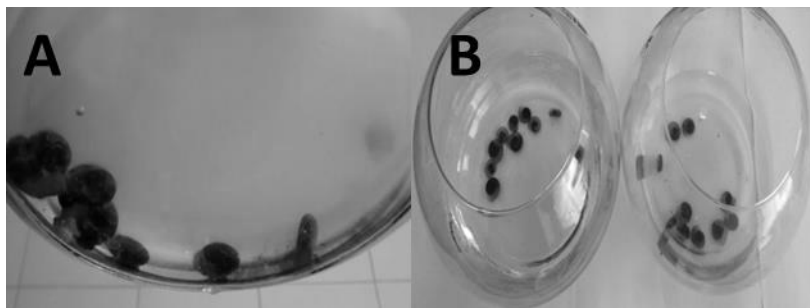
Treatment	N ⁿ	Mortality (%)	
		Exposure (24 h)	Recovery (48-72 h)
Camphor	30	0.0 ± 0.00^b	0.0 ± 0.00^b
Thymol	30	100.0 ± 0.00^a	100.0 ± 0.00^a
α -pinene	30	100.0 ± 0.00^a	100.0 ± 0.00^a
1,8-cineole	30	0.0 ± 0.00^b	0.0 ± 0.00^b
Copper sulfate	30	97.5 ± 2.4^a	100.0 ± 0.00^a
Negative control	30	0.0 ± 0.00^b	0.0 ± 0.00^b

227 ⁿ Number of wild snails used in the test.

228 Values with the same lowercase letters indicate no statistically significant differences

229

230



231

232 **Fig. 2** Snail mortality indicated by hemolymph extravasation (A), cephalopod mass
233 retraction, and shell discoloration (B)

234

235 The compounds camphor and 1,8-cineole did not induce toxic symptoms to
236 snails, nor was there impairment of their motor and eating activities. These terpenes
237 were, therefore, inactive against *B. glabrata* since they did not cause mortality of snails

238 up to 72 hours after exposure. The treatment with copper sulfate at 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (positive
 239 control) resulted in 100% mortality. There was no mortality in the negative control,
 240 indicating that the bioassay was carried out under suitable conditions for snail survival.

241 Because they demonstrated molluscicide action in the initial single-dose test
 242 (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), we evaluated thymol and α -pinene at lower concentrations in order to
 243 determine their respective lethal concentrations necessary to kill 50 (LC₅₀) and 90%
 244 (LC₉₀) of snails. Table 2 shows the values of LC₅₀ and LC₉₀ of thymol and α -pinene.
 245 Based on the non-overlapping of 95% confidence limits, there were significant
 246 differences between the values of lethal concentrations of the compounds. Thymol had a
 247 lower LC_{50,90} compared to that of α -pinene.

248

249 **Table 2** Estimated values of LC₅₀ and LC₉₀ of the monoterpenes thymol and α -pinene
 250 against *Biomphalaria glabrata* snails after 24 hours of exposure

251

Monoterpene	LC ₅₀ (95% CI)	LC ₉₀ (95% CI)
Thymol	4.953 ± 0.1361 (4.615 – 5.292) ^a	7.117 ± 0.1692 (6.696 – 7.537) ^b
α -pinene	7.023 ± 0.1762 (6.586 – 7.461) ^b	10.43 ± 0.2307 (9.857 – 11) ^c

252 Values of LC₅₀, LC₉₀ and 95% confidence limits (CI) are expressed as $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of
 253 terpene required to cause the death of snails. LC values followed by different letters
 254 indicate significant differences between concentrations

255

256 The mortality of snails treated with thymol and α -pinene was positively
 257 correlated with concentration levels (**Fig. 3**). The compounds induced mortality of
 258 snails at all concentrations tested, except for the 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Mortality was dose-
 259 dependent with thymol and α -pinene concentrations above 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (**Fig. 3**). From the
 260 concentration of 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (**Fig. 3 A**) and 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (**Fig. 3 B**) for thymol and α -
 261 pinene, respectively, the mortality rate remained constant.

262

263

264

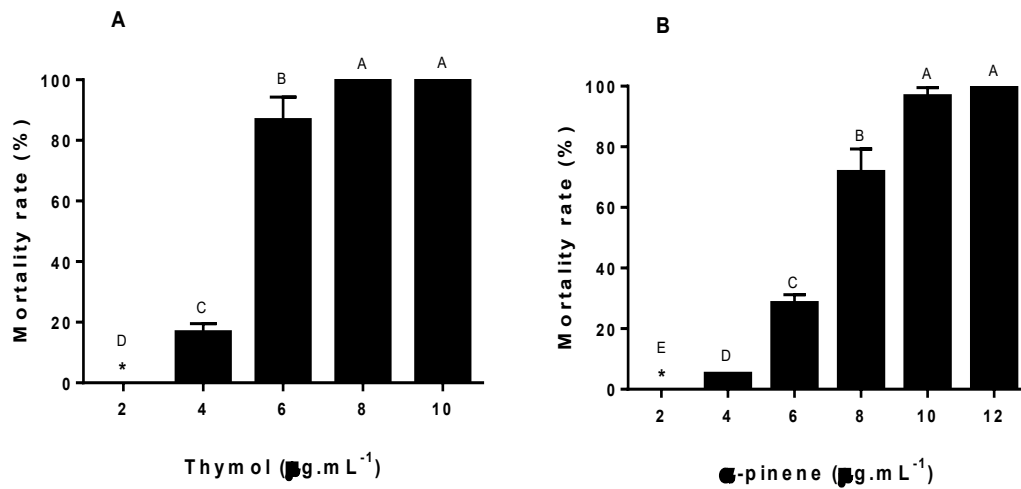
265

266

267

268

269



270 **Fig. 3** Mortality rate (%) of wild *Biomphalaria glabrata* snails after a 24-hour exposure
271 to the monoterpenes thymol (A) and α -pinene (B) at different concentrations ($\mu\text{g.mL}^{-1}$).
272 The results are presented as mean \pm standard deviation. The asterisk (*) indicates zero
273 values. $p < 0.05$. Different letters indicate significant differences between
274 concentrations.

275

276 The exposure of snails to the monoterpenes thymol and α -pinene continued to
277 induce hemolymph extravasation followed by seclusion in shells at the highest
278 concentrations. Mortality occurred even during the exposure period (24 h). At lower
279 concentrations, there was mucus secretion and an escape behavior of snails, which
280 moved to the edges of the aquarium. We observed a slower behavior of these snails
281 during the recovery period. We observed no mortality or behavioral changes in snails in
282 the negative control group.

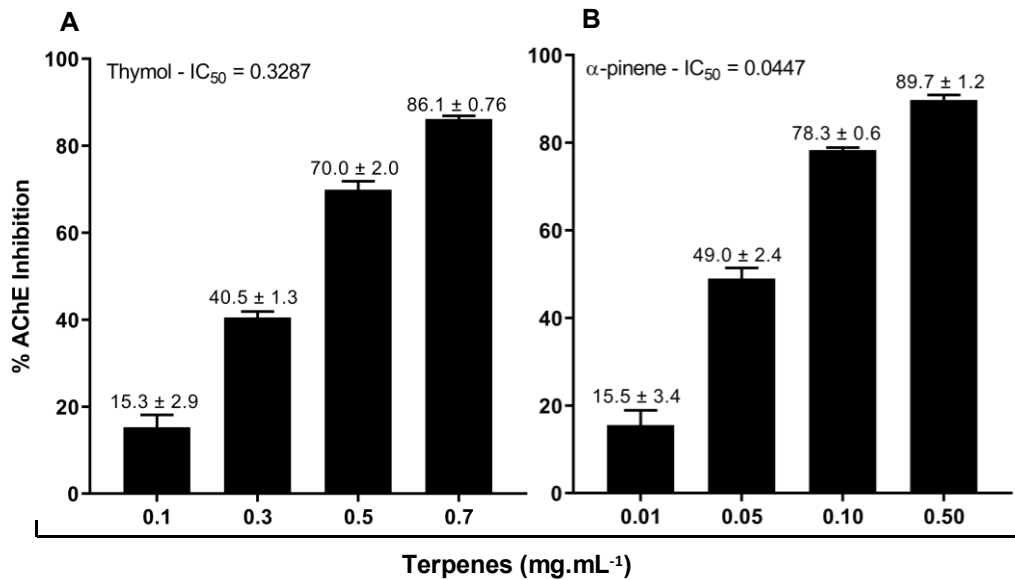
283

284 3.2 Inhibition of AChE activity

285 This assay was carried out to verify the effects of thymol and α -pinene
286 monoterpenes as inhibitors of AChE of *B. glabrata*, an enzyme essential for the
287 physiological functioning of mollusks. The thymol and α -pinene inhibited the AChE of

288 snails and had a significant difference compared to the control treatment. Enzyme
289 inhibition by monoterpenes was dose-dependent. The IC_{50} of the compounds was 0.32
290 $mg.mL^{-1}$ and 0.04 $mg.mL^{-1}$ for thymol and α -pinene, respectively (**Fig. 4**).

291



292

293 **Fig. 4** Inhibitory effect of the monoterpenes thymol (A) and α -pinene (B) at different
294 concentrations ($mg.mL^{-1}$) on acetylcholinesterase from extracts of *Biomphalaria*
295 *glabrata*.

296 The results are presented as mean \pm standard deviation. IC_{50} : inhibitory concentration of
297 50% of AChE activity. The inhibition of AChE with DMSO 0.1% did not inhibit the
298 enzyme (2.69% \pm 3.03 inhibition of *B. glabrata* AChE), not differing from the control
299 with 2% alcohol (final concentration used in the AChE assay), which presented 2.85 \pm
300 0.85% inhibition of the mentioned enzyme.

301

302 3.3 Acute toxicity on a non-target organism

303 The acute toxicity of thymol and α -pinene monoterpenes at 48 hours of exposure
304 to *D. rerio* fish were 5.2 $\mu g.mL^{-1}$ and 14.45 $\mu g.mL^{-1}$, respectively (Table 3).

305

306

307 **Table 3** Toxicity of thymol and α -pinene monoterpenes to *Danio rerio* fish

Monoterpene	LC ₅₀ (95% CI)	Toxicity classification
Thymol	5.2 ± 0.3606 (4.304 – 6.096) a	Category 2
α -pinene	14.45 ± 0.386 (11.1 - 17.89) b	Category 3

308 Data are presented as LC₅₀ (in $\mu\text{g.mL}^{-1}$) with 95% confidence limits. Lethal
 309 concentrations obtained after 48 hours of exposure. LC₅₀ mean values followed by
 310 different letters indicate significant differences between concentrations. Toxicity
 311 classification: Category 1 - acute toxicity $\leq 1.00 \mu\text{g.mL}^{-1}$; Category. 2 - acute toxicity $>$
 312 1.00 and $\leq 10.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$; Category 3- acute toxicity > 10.0 and $< 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Wallau
 313 and Santos, 2013)

314

315 The results showed that thymol is more toxic to fish than α -pinene. In addition,
 316 thymol toxicity in relation to fish and snails did not differ significantly. There were also
 317 some abnormalities during the exposure of *D. rerio* to thymol, such as irregular
 318 swimming, slightly extended abdomen, and fish immobile stature. α -pinene did not
 319 present toxicity to *D. rerio* fish at the LC₅₀ of molluscicide (*B. glabrata*). In the
 320 negative control group, there were no behavioral changes during the test period, nor was
 321 there mortality.

322

323 **4 Discussion**

324

325 **4.1 Molluscicide activity**

326 The monoterpenes camphor, thymol, α -pinene, and 1,8-cineole are major
 327 constituents of many essential oils. The molluscicide effect of these monoterpenes on *B.*
 328 *glabrata* observed in the first hours of exposure is probably related to a rapid absorption
 329 of the active portion of these compounds by the snail integument. Lee et al. (2003)

330 explained that monoterpenes can penetrate tissues quickly, interfering with
331 physiological functions because they are volatile and lipophilic.

332 Although the monoterpene thymol had a lower $LC_{50,90}$ than that of α -pinene,
333 both compounds were considered efficient because they induced significant mortality of
334 *B. glabrata* (90%) at concentrations of $10.43 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (α -pinene) and $7.11 \mu\text{g.mL}^{-1}$
335 (thymol). This is in accordance with the molluscicide concentration value recommended
336 by the WHO, which establishes that isolated compounds with molluscicide properties
337 will only have potential for use in the field if they promote a mortality of 90% of snails
338 at concentrations lower than or equal to $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (WHO, 1983).

339 The values of LC_{90} for the *B. glabrata* snail obtained in this study were lower
340 than those obtained in other studies that evaluated the molluscicide activity of essential
341 oils against *B. glabrata* in which the monoterpene α -pinene or thymol were the major
342 constituents, such as those of *Syzygium cumini* (L.) essential oil (LC_{90} : $191 \mu\text{g.mL}^{-1}$), of
343 *Eugenia punicifolia* (HBK) DC (LC_{90} : $170.13 \mu\text{g.mL}^{-1}$), and of *Lippia gracilis* Schauer
344 (LC_{90} : $82.8 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Dias et al. 2013; Ribeiro 2016; Teles et al. 2010).

345 The results obtained here confirm that the monoterpenes α -pinene and thymol
346 have a LC_{90} for *B. glabrata* significantly lower than those reported in the studies
347 mentioned, and that the isolated effect of these monoterpenes is more potent than when
348 contained in an essential oil. It is possible that the interaction of α -pinene and thymol
349 with other terpenes present in EOs exert an antagonistic effect by reducing the activity
350 of these compounds, which otherwise was more active when used separately, according
351 to our results.

352 Radwan et al. (2008) reported that thymol has activity against *B. alexandrina* in
353 Egypt (LC_{90} : $13.92 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Therefore, this compound shows efficacy for other
354 species of mollusks. Lahlou (2004) described the activity of the compound α -pinene

355 against the mollusk *Bulinus truncatus*; its action is efficient (LC₅₀: 0.49 µg.mL⁻¹).
356 Through the results obtained in this study, we can state that the compounds α-pinene
357 and thymol act as molluscicides against *B. glabrata* snails. We may reasonably propose
358 that they can be responsible for or contribute in large part to the molluscicide activity of
359 the essential oils that contain them.

360 The changes in the behavior of snails observed in the molluscicide test can be
361 considered a defense mechanism of the animal. The secretion of mucus at shell opening,
362 for example, can be understood as a way to block the entrance of the compound
363 (Teixeira et al., 2012). It could be also related to a dysfunctional neurotransmission
364 caused by decreased AChE after immersion in monoterpenes, which would contribute
365 to excessive secretory activity and a low speed of snails (He et al. 2017). Since the
366 physiological dysfunction caused by changes in important enzymes could be involved
367 with the toxicity of terpenes against snails, we evaluated the inhibition of AChE of
368 snails.

369

370 **4.2 Inhibition of AChE activity**

371 The decrease in AChE activity causes acetylcholine accumulation in nerve
372 synapses. Thus, the postsynaptic membrane is in a state of permanent stimulation,
373 which in turn causes paralysis, ataxia, and loss of coordination capacity of the
374 neuromuscular system, ultimately resulting in death of snails (Shukla et al. 2006).
375 AChE, a crucial enzyme for snails, has been reported to suffer the action of several
376 molluscicide components of plant origin, such as allicin (*Allium sativum*), acetogenin
377 (*Annona squamosa*), and azadirachtin (*Azadirachta indica*), which are effective to kill
378 snails (Rao et al. 2003; Shukla et al. 2006; Singh e Singh 1996).

379 We report here that the monoterpenes thymol and α -pinene are inhibitors of
380 AChE of *B. glabrata*, but at relatively high concentrations (IC_{50} : 0.32 mg.mL⁻¹/ IC_{50} :
381 0.044 mg.mL⁻¹) compared to the lethal concentrations determined in the molluscicide
382 assay (LC_{50} : 4,953 μ g.mL⁻¹/ LC_{50} : 7,023 μ g.mL⁻¹). In addition, we observed a
383 significant AChE inhibition from 0.1 mg.mL⁻¹ of thymol and 0.01 mg.mL⁻¹ of α -pinene.

384 The results indicate that AChE inhibition is not the main mechanism of action of
385 these monoterpenes to trigger toxic activity to snails, since AChE inhibition requires
386 high concentrations of these monoterpenes, while toxic symptoms to snails were visible
387 at low concentrations. Thus, the molluscicide effect of terpenes is not directly correlated
388 with inhibition of AChE of these snails since the concentrations do not overlap and are
389 considerably different. In this sense, the results obtained do not support the initial
390 hypothesis that the molluscicide activity of these monoterpenes could have a direct
391 relation with the inhibition of AChE of snails.

392 The mechanism of action of monoterpenes on mollusks has not yet been
393 explained. In general studies, some authors have shown the decomposition of
394 cytoplasmic membranes and organelles exposed to monoterpenes. Xia et al. (1999), for
395 example, observed loss of fungal cell membrane integrity and changes in its function
396 when exposed to α -pinene. Park et al. (2009) suggested that the mechanism of action of
397 terpenes at a cellular level is related to the destabilization and lysis of cell membranes,
398 in addition to abnormalities in the structure of mitochondria, causing cell death. Despite
399 these findings, it is not known how terpenes damage cell membranes.

400 Mechanisms of action of some molluscicide agents have been associated with
401 the loss of low molecular weight substances, such as potassium ions, calcium, and
402 inhibition of important enzymes for the cell membrane, such as ATPase, or a possible
403 electrostatic interaction with phospholipids present in the cytoplasmic membrane, also

404 causing its break (Kaehn, 2010; Melo et al. 2018). Taking these studies into account, we
405 suggest that the mechanism of action of the monoterpenes evaluated here – thymol and
406 α -pinene – act in a similar way by involving the destabilization and disruption of the
407 membrane of integument cells of *B. glabrata* snails, which could justify the presence of
408 dispersed hemolymph in the molluscicide test solution.

409 The behavior of snails exposed to the monoterpenes thymol and α -pinene, such
410 as shell confinement, release of hemolymph and mucus secretion, further suggests that
411 the molluscicide action of monoterpenes may be the result of different mechanisms of
412 action that affect more than one system. According to López and Pascual-Villalobos
413 (2010), monoterpenes can operate in different metabolic pathways. Therefore, further
414 studies are needed to understand the mode of action of terpenes on snails and their
415 effects on energy metabolism, metabolism of calcium, and membrane integrity.

416

417 **4.3 Acute toxicity to a non-target organism**

418 Toxicity to non-target organisms is an important test so that the evaluated
419 monoterpenes can be used safely for the control of mollusks transmitting
420 schistosomiasis in natural environments, and to assess risks to non-target species of
421 molluscicide activity. *Danio rerio* fish, a tropical species, commonly known zebrafish,
422 is a model organism in aquatic ecotoxicology tests (ABNT, 2011). It is used to evaluate
423 the toxic effects of industrial effluents, insecticides, herbicides, and vegetable latex (Da
424 Silva et al. 2010; Holanda, 2012; Nakagome et al. 2007; Oliveira-Filho et al. 2010). It is
425 considered a good indicator of environmental toxicity. In addition, its sensitivity to
426 drugs and rapid metabolism share a 70% genetic similarity to humans, which makes
427 toxicity studies using this animal model productive (Magalhães et al. 2017).

428 According to the results of toxicity to the non-target organism, thymol, at a
429 molluscicide concentration, showed a toxic potential to affect other species that can
430 cohabit areas where snails occur. Molluscicides are generally toxic to other aquatic
431 species. For this reason, their use should be restricted to situations of control and focal
432 elimination. A careful surveillance of non-target organisms should be performed (WHO,
433 2012). The α -pinene has an estimated LC_{50} of $14.45 \mu\text{g.mL}^{-1}$ for fish. This concentration
434 is two times higher than the LC_{50} determined for adults of *B. glabrata* ($7.023 \mu\text{g.mL}^{-1}$).
435 In this sense, α -pinene can be used to control the spread of schistosomiasis without great
436 risks to the environment at molluscicide concentrations.

437 Rapado et al. (2013) evaluated the toxic effects of the commercial synthetic
438 molluscicide Bayluscide (niclosamide) on *D. rerio* fish and demonstrated a high
439 toxicity, with a LC_{50} of $0.12 \mu\text{g.mL}^{-1}$. According to the Global Harmonization System,
440 thymol is classified as a category 2 toxin (LC_{50} $5.2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and α -pinene is a category
441 3 toxin (LC_{50} $14.45 \mu\text{g.mL}^{-1}$) for *D. rerio*. These monoterpenes are therefore
442 substantially less toxic than the reference molluscicide niclosamide (category 1) (LC_{50}
443 $0.12 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Although thymol and α -pinene have not yet been tested in the field, the
444 laboratory results offer excellent prospects for their effective application as a
445 molluscicide, allowing the interruption of the schistosomiasis transmission cycle. We
446 also observed that application of α -pinene in natural environments is unlikely to cause
447 damage to organisms that cohabit areas with vector mollusks.

448

449 **5 Conclusion**

450

451 The present study evaluated the molluscicide effect of four monoterpenes
452 (camphor, thymol, α -pinene, and 1,8-cineole) against *B. glabrata* snails. Thymol and α -

453 pinene are active against snails and show a lethal effect at concentrations compatible
454 with the concentration recommended by the WHO. We determined that thymol and α -
455 pinene are inhibitors of AChE of snails. However, it is unlikely that this be the
456 mechanism of action responsible for the molluscicide effect of monoterpenes at the
457 concentrations evaluated in molluscicide tests. Further studies on the toxicity of these
458 terpenes on the mass of eggs (embryos) and newborns of *B. glabrata* should be carried
459 out considering the lethal concentrations to adult snails obtained in this study in order to
460 verify whether these terpenes act in all snail life stages and to determine the effects of
461 application in the field.

462

463 **Conflicts of interest**

464

465 The authors declare that they have no known competing financial interests or
466 personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this
467 paper.

468

469 **Acknowledgements**

470

471 This study was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de
472 Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

473 The authors are grateful to the Scientific and Technological Research and
474 Development Support Foundation of Maranhão (FAPEMA): to the IECT Biotechnology
475 and Universal grants, and FINEP (Brazilian Innovation Agency).

476

477

478 **References**

479

480 ABNT, Associação Brasileira de Normas Técnicas (2011) Ecotoxicologia aquática:
481 Toxicidade aguda – método de ensaio com peixes. NBR 15088: 2011. Rio de Janeiro,
482 Brasil

483 Araújo FP, Albuquerque RDDG, Rangel LS, Caldas GR, Tietbohl LAC, Santos MG,
484 Ricci-Júnior E, Thiengo S, Fernandez MA, Santos JAA, Faria RX, Rocha L (2019)
485 Nanoemulsion containing essential oil from *Xylopiya ochrantha* Mart. produces
486 molluscicidal effects against different species of *Biomphalaria* (Schistosoma hosts).
487 Mem I Oswaldo Cruz 114: 1–8. doi:10.1590/0074-02760180489

488 Bianco K, Otero S, Balazote OA, Nahabedian D, Kristoff G (2014) Resistance in
489 cholinesterase activity after an acute and subchronic exposure to azinphos-methyl in the
490 freshwater gastropod *Biomphalaria straminea*. Ecotoxicol Environ Safety 109: 85–92.
491 doi:10.1016/j.ecoenv.2014.07.038

492 Bichara D, Calcaterra NB, Arranz S, Armas P, Simonetta SH (2013) Set-up of an
493 infrared fast behavioral assay using zebrafish (*Danio rerio*) larvae, and its application in
494 compound biotoxicity screening. J Appl Toxicol 34: 214–219. doi:10.1002/jat.2856

495 Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
496 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:
497 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3

498 Brasil (2010) Impactos na saúde e no sistema único de saúde decorrentes de agravos
499 relacionados a um saneamento ambiental inadequado. Brasília: Fundação Nacional de
500 Saúde.[http://www.funasa.gov.br/site/wp](http://www.funasa.gov.br/site/wp-content/files_mf/estudosPesquisas_ImpactosSaude.pdf)
501 [content/files_mf/estudosPesquisas_ImpactosSaude.pdf](http://www.funasa.gov.br/site/wp-content/files_mf/estudosPesquisas_ImpactosSaude.pdf). Accessed 8 september 2019

502 Chen Z, Wang W, Yao J, Li S, Zhang X, Hu H, Liu X, Luo B, Xu H, Duan L
503 (2019) Toxicity of a molluscicide candidate PPU07 against *Oncomelania hupensis*
504 (Gredler, 1881) and local fish in field evaluation. Chemosphere 222: 56–61.
505 doi:10.1016/j.chemosphere.2019.01.102

506 Da Silva BM, Ravanelli MAC, Paschoalato CFPR (2010) Toxicidade aguda dos
507 herbicidas diuron e hexazinona à *Danio rerio*. Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e
508 Meio Ambiente 20: 17-28. doi:10.5380/pes.v20i1.20472

509 De Groot AC, Schmidt E (2016) Essential Oils, Part III: Chemical Composition.
510 Dermatitis 27: 161–169. doi:10.1097/der.0000000000000193

511 De Veras BO, Oliveira MBM, Silva FGO, Santos YQ, Oliveira JRS, Menezes VLL,
512 Silva JRGA, Navarro DMDAF, Oliveira Farias JCR, Santos JA, Gorlach-Lira K (2019)
513 Chemical composition and evaluation of the antinociceptive, antioxidant and
514 antimicrobial effects of essential oil from *Hymenaea cangaceira* (Pinto, Mansano &
515 Azevedo) native to Brazil: A natural medicine. J Ethnopharmacol 247: 112265. doi:
516 10.1016/j.jep.2019.112265

517 Dias CN, Rodrigues KAF, Carvalho FAA, Carneiro SMP, Maia JGS, Andrade EHA,
518 Moraes DFC (2013) Molluscicidal and leishmanicidal activity of the leaf essential oil of
519 *Syzygium cumini* (L.) Skeels from Brazil. Chem Biodivers 10: 1133–
520 1141. doi:10.1002/cbdv.201200292

521 Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM (1961) A new and rapid
522 colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol 7: 88–
523 95. doi:10.1016/0006-2952(61)90145-9

524 EPA, United States Environmental Protection Agency (1999). Niclosamide pesticide
525 reregistration. Washington (DC), EPA-738-F99-013.
526 <https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/2455fact.pdf>. Accessed 18
527 september 2019

528 Essawy AE, Abdelmeguid NE, Radwan MA, Hamed SS, Hegazy AE (2009)
529 Neuropathological effect of carbamate molluscicides on the land snail, *Eobania*
530 *vermiculata*. Cell Biol Toxicol 25: 275–90. doi:10.1007/s10565-008-9077-7

531 Gomes PRB, Reis JB, Fernandes RP, Mouchrek Filho VE, Souza AG, Fontenele MA,
532 Silva JC (2019) Toxicidad y actividad molusccidal del aceite esencial *Pimenta dioica*

533 contra el caracol *Biomphalaria glabrata*. Rev Peru Biol 26: 101-108. doi:
534 10.15381/rpb.v26i1.15913

535 Guimarães AC, Meireles LM, Lemos MF, Guimarães MCC, Endringer DC, Fronza M,
536 Scherer R (2019) Antibacterial activity of terpenes and terpenoids present in essential
537 oils. Molecules 24: 2471. doi:10.3390/molecules24132471

538 He P, Wang W, Sanogo B, Zeng X, Sun X, Lv Z, Yuan D, Duan L, Wu Z (2017)
539 Molluscicidal activity and mechanism of toxicity of a novel salicylanilide ester
540 derivative against *Biomphalaria* species. Parasit Vectors 10: 383. doi:10.1186/s13071-
541 017-2313-3

542 Holanda JN, Maciel AP, Santos RL (2012) Avaliação ecotoxicológica da água de
543 lavagem da purificação de biodiesel de soja metílico utilizando *Danio rerio* como
544 organismo-teste. Boletim do Laboratório de Hidrobiologia 25: 13-20.

545 Jankowska M, Rogalska J, Wyszowska J, Stankiewicz M (2017) Molecular *Targets* for
546 components of essential oils in the insect nervous system—A Review. Molecules 23:
547 34. doi:10.3390/molecules23010034

548 Kaehn K (2010) Polihexanide: a safe and highly effective biocide. Skin Pharmacol.
549 Physiol 23: 7–16. doi:10.1159/000318237

550 Kumar P, Singh VK, Singh DK (2009) Kinetics of enzyme inhibition by active
551 molluscicidal agents ferulic acid, umbelliferone, eugenol and limonene in the nervous
552 tissue of snail *Lymnaea acuminata*. Phytother Res 23: 172–177. doi:10.1002/ptr.2578

553 Lahlou M (2004) Essential oils and fragrance compounds: bioactivity and mechanisms
554 of action. Flavour Frag J 19: 159–165. doi:10.1002/ffj.1288

555 Lee S, Peterson CJ, Coats JR (2003) Fumigation toxicity of monoterpenoids to several
556 stored product insects. J Stored Prod Res 39: 77–85. doi:10.1016/s0022-
557 474x(02)00020-6

558 López MD, Pascual-Villalobos MJ (2010) Mode of inhibition of acetylcholinesterase by
559 monoterpenoids and implications for pest control. *Ind Crop Prod* 31: 284–288.
560 doi:10.1016/j.indcrop.2009.11.005

561 Ma J, Zhou C, Li Y, Li X (2014) Biochemical responses to the toxicity of the biocide
562 abamectin on the freshwater snail *Physa acuta*. *Ecotoxicol Environ Safety* 101: 31–35.
563 doi:10.1016/j.ecoenv.2013.12.009

564 Magalhães FEA, Sousa CÁPB, Santos SAAR, Menezes RB, Batista FLA, Abreu ÂO,
565 Campos AR (2017) Adult Zebrafish (*Danio rerio*): An Alternative Behavioral Model of
566 Formalin-Induced Nociception. *Zebrafish* 14: 422–429. doi:10.1089/zeb.2017.1436

567 Matos-Rocha TJ, Lima MCA, Silva AL, Oliveira JF, Gouveia ALA, Silva VBR,
568 Almeida AS, Brayner FA, Cardoso PR, Pitta-Galdino MD, Pitta ID, Rêgo MJ, Alves
569 LC, Pitta MG (2017) Synthesis and biological evaluation of novel imidazolidine
570 derivatives as candidates to schistosomicidal agents. *Rev Inst Med Trop Sp.*
571 59. doi:10.1590/s1678-9946201759008

572 Melo AO, Santos DB, Silva LD, Rocha TL, Bezerra JCB (2018) Molluscicidal activity
573 of polyhexamethylene biguanide hydrochloride on the early-life stages and adults of the
574 *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *Chemosphere* 216: 365-371.
575 doi:10.1016/j.chemosphere.2018.10.035

576 Nakagome FK, Noldin JA, Resgalla JrC (2007) Toxicidade aguda de alguns herbicidas
577 e inseticidas utilizados em lavouras de arroz irrigado sobre o peixe *Danio rerio*.
578 *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente* 17: 117-22.
579 doi:10.5380/pes.v17i0.9186

580 Oliveira-Filho EC, Geraldino BR, Coelho DR, De-Carvalho RR, Paumgarten FJR
581 (2010) Comparative toxicity of *Euphorbia milii* latex and synthetic molluscicides to
582 *Biomphalaria glabrata* embryos. *Chemosphere* 81: 218–227.
583 doi:10.1016/j.chemosphere.2010.06.038

- 584 Park MJ, Gwak KS, Yang I, Kim KW, Jeung EB, Chang JW, Choi IG (2009) Effect of
585 citral, eugenol, nerolidol and α -terpineol on the ultrastructural changes of *Trichophyton*
586 *mentagrophytes*. *Fitoterapia* 80: 290–296. doi:10.1016/j.fitote.2009.03.007
- 587 Radwan MA, El-Zemity SR, Mohamed SA, Sherby SM (2008) Potential of some
588 monoterpenoids and their new N-methyl carbamate derivatives against Schistosomiasis
589 snail vector, *Biomphalaria alexandrina*. *Ecotox Environ Safe* 71: 889–894.
590 doi:10.1016/j.ecoenv.2007.07.002
- 591 Rao IG, Singh A, Singh VK, Singh DK (2003) Effect of single and binary combinations
592 of plant-derived molluscicides on different enzyme activities in the nervous tissue of
593 *Achatina fulica*. *J Appl Toxicol* 23: 19–22. doi:10.1002/jat.874
- 594 Rapado LN, Pinheiro AS, Lopes POMV, Fokoue HH, Scotti MT, Marques JV,
595 Yamaguchi LF (2013) Schistosomiasis Control Using Piplartine against *Biomphalaria*
596 *glabrata* at Different Developmental Stages. *PLoS Neglect Trop D* 7: 2251.
597 doi:10.1371/journal.pntd.0002251
- 598 Reddy A, Ponder EL, Fried B (2004) Effects of copper sulfate toxicity on cercariae and
599 metacercariae of *Echinostoma caproni* and *Echinostoma trivolvis* and on the survival of
600 *Biomphalaria glabrata* snails. *J Parasitol* 90: 1332–1337. doi:10.1645/ge-321r
- 601 Ribeiro ECG (2016) Atividade moluscicida de óleos essenciais de plantas aromáticas da
602 região Amazônica Maranhense. Dissertação, Universidade Federal do Maranhão
- 603 Salama MM, Taher EE, El-Bahy MM (2012). Molluscicidal and Mosquitocidal
604 Activities of the Essential oils of *Thymus capitatus* Hoff. et Link. and *Marrubium*
605 *vulgare* L. *Ver Insti Med Trop São Paulo* 54: 281–286. doi:10.1590/s0036-
606 46652012000500008
- 607 Scholte RGC, Carvalho OS, Malone JB, Utzinger J, Vounatsou P (2012) Spatial
608 distribution of *Biomphalaria* spp., the intermediate host snails of *Schistosoma mansoni*,
609 in Brazil. *Geospatial Health* 6: 95. doi:10.4081/gh.2012.127
- 610 Shukla S, Singh VK, Singh DK (2006) The effect of single, binary, and tertiary
611 combination of few plant derived molluscicides alone or in combination with synergist

612 on different enzymes in the nervous tissues of the freshwater snail *Lymnaea (Radix)*
613 *acuminata* (Lamark). Pestic Biochem Phy. 85(3), 167–173.
614 doi:10.1016/j.pestbp.2006.01.003

615 Sim JXF, Khazandi M, Chan WY, Trott DJ, Deo P (2019) Antimicrobial activity of
616 thyme oil, oregano oil, thymol and carvacrol against sensitive and resistant microbial
617 isolates from dogs with otitis externa. Vet Dermatol. doi: 10.1111/vde.12794

618 Singh VK, Singh DK (1996) Enzyme Inhibition by Allicin, the Molluscicidal Agent of
619 *Allium sativum* L. (Garlic). Phytother Res 10: 383–386. doi:10.1002/(sici)1099-
620 1573(199608)10:5<383::aid-ptr855>3.0.co;2-9

621 Smithers SR, Terry RJ (1974) Immunology of schistosomiasis. Bull World Health
622 Organ 51: 553–595

623 Sousa RMOF, Rosa JS, Cunha AC, Fernandes-Ferreira M (2017) Molluscicidal activity
624 of four Apiaceae essential oils against the freshwater snail *Radix peregra*. J Pest Sc. 90:
625 971-984. doi: 10.1007/s10340-017-0842-3

626 Teixeira T, Rosa JS, Rainha N, Baptista J, Rodrigues A (2012) Assessment of
627 molluscicidal activity of essential oils from five Azorean plants against *Radix peregra*
628 (Müller, 1774). Chemosphere 87: 1–6. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.11.027

629 Teles TV, Bonfim RR, Alves PB, Blank AF, Jesus HCR, Quintans-Júnior LJ, Serafini
630 MR, Bonjardim LR, Araújo AAS (2010) Composition and evaluation of the lethality of
631 *Lippia gracilis* essential oil to adults of *Biomphalaria glabrata* and larvae of *Artemia*
632 *salina*. Afr. J. Biotechnol 9: 8800-8804. doi.org/10.5897/AJB10.113

633 Thanigaivel A, Chanthini KM, Karthi S, Vasantha-Srinivasan P, Ponsankar A, Sivanesh
634 H, Stanley-Raja V, Shyam-Sundar N, Narayanan KR, Senthil-Nathan S (2019) Toxic
635 effect of essential oil and its compounds isolated from *Sphaeranthus amaranthoides*
636 Burm. f. against dengue mosquito vector *Aedes aegypti* Linn. Pestic Biochem Physiol
637 160: 163-170. doi: 10.1016/j.pestbp.2019.08.006

638 Wallau WM, Santos JÁ (2013) O sistema globalmente harmonizado de classificação e
639 rotulagem de produtos químicos (GHS): uma introdução para sua aplicação em

640 laboratórios de ensino e pesquisa acadêmica. *Quim Nova* 36: 607-617.
641 <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422013000400021>

642 WHO, World Health Organization (1965) Memoranda: molluscicide screening and
643 evaluation. *Bull World Health Organ* 33: 567–576

644 WHO, World Health Organization (1983) Report of the Scientific working Group on
645 Plant Molluscicide & Guidelines for evaluation of plant molluscicides. Geneva:
646 TDR/SC 4-SWE (4)/83.3

647 WHO, World Health Organization (2012) Research priorities for Helminth infections.
648 Technical report on the TDR disease reference group on Helminth infections, in: World
649 Health Organization, Technical Report Reference Series 972. World Health
650 Organization, Geneva 79

651 WHO, World Health Organization (2017) Field use of molluscicide in schistosomiasis
652 control programmes: na operational manual for programme managers. Geneva: World
653 Health Organization
654 <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254641/9789241511995-eng.pdf>,
655 accessed 18 September 2019

656 WHO, World Health Organization (2019) Schistosomiasis.
657 <https://www.who.int/schistosomiasis/disease/en/>

658 Xia Z, Mao X, Luo Y (1999) Study on antifungal mechanism of alpha-pinene. *Hunan yi*
659 *ke da xue xue bao*= *Hunan yike daxue xuebao*= *Bulletin of Hunan Medical*
660 *University* 24: 507-509

661 Zabka M, Pavela R, Prokinova E (2014) Antifungal activity and chemical composition
662 of twenty essential oils against significant indoor and outdoor toxigenic and
663 aeroallergenic fungi. *Chemosphere* 112: 443–448.
664 doi:10.1016/j.chemosphere.2014.05.014

CONCLUSÃO

➤ Neste estudo, reportamos o efeito moluscicida do óleo essencial da espécie vegetal *Hyptis pectinata* e dos monoterpenos timol e α -pineno sobre moluscos *Biomphalaria glabrata*, apresentando concentrações letais em conformidade às determinadas pela Organização Mundial de Saúde.

➤ O sesquiterpeno β - cariofileno e os monoterpenos 1,8 cineol e cânfora foram considerados inativos a *B. glabrata* nas concentrações avaliadas.

➤ A atividade moluscicida do óleo essencial está associada a compostos sesquiterpenicos presentes (efeito sinérgico).

➤ Timol e α -pineno são inibidores da AChE de *B. glabrata* em concentração superiores às concentrações moluscicida.

➤ O óleo essencial de *H. pectinata* e os monoterpenos apresentaram baixa toxicidade a organismos não alvo quando comparados ao moluscicida niclosamida.

➤ Nossos dados reforçam a importância de produtos vegetais como fonte de compostos bioativos para o desenvolvimento de produtos moluscicida que possam ser utilizados em estratégias de gerenciamento da esquistossomose.

