

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

JONAS BATISTA REIS

ESTUDO ANALÍTICO, AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE
MOLUSCICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL *Cinnamomum zeylanicum* Blume
(CANELA) FRENTE AO CARAMUJO *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818)

SÃO LUÍS – MA
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

JONAS BATISTA REIS

**ESTUDO ANALÍTICO, AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE
MOLUSCICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL *Cinnamomum zeylanicum* Blume
(CANELA) FRENTE AO CARAMUJO *Biomphalaria glabrata*. (Say, 1818)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
programa de Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal do Maranhão como
parte dos requisitos exigidos para a obtenção
do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek
Filho

SÃO LUÍS – MA
2012

JONAS BATISTA REIS

**ESTUDO ANALÍTICO, AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE
MOLUSCICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL *Cinnamomum zeylanicum* Blume
(CANELA) FRENTE AO CARAMUJO *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818)**

Aprovada em: _____ / _____ / _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho (orientador)
Departamento de Tecnologia Química - UFMA

Prof. Dr. Cícero Wellington Brito Bezerra
Departamento de Tecnologia Química - UFMA

Prof. Dr. José Guilherme Soares Maia
Departamento de Tecnologia Química - UFPA

Reis, Jonas Batista.

Estudo analítico, avaliação da toxicidade e atividade moluscicida do óleo essencial *Cinnamomum Zeylanicum* Blume (canela) frente ao caramujo *biomphalaria glabrata* (Say, 1818) / Jonas Batista Reis. – São Luís, 2011

84 fls.

Impresso por computador (fotocópia).

Orientador: Victor Elias Mouchrek Filho.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós – Graduação em Química, 2011.

1. Óleo essencial 2. *Cinnamomum zeylanicum* Blume 3. Canela 4. Toxicidade 5. Moluscicida I. Título

CDU 633.832:543

A Deus, pela saúde, amor e misericórdia e por ter me ensinado o caminho da verdade.

Dedico, em especial, a uma pessoa maravilhosa que nos momentos de dificuldades esteve sempre pronta a me ajudar; a pessoa que pela qual tenho grande admiração e muito amor, minha mãe, dona Leny B. Reis. Eu a amo muito.

Aos meus irmãos Leonardo e Ricardo, eles são a melhor ponte com o meu passado e possivelmente os que sempre vão me apoiar no futuro.

A minha família e em especial, minha outra mãe, minha tia Maria das Neves (*in memoriam*) que Deus a guarde, obrigado por tudo.

A minha namorada Thiessa, obrigado pelo carinho, amor, compreensão e dedicação.
Amo-te

A toda a Família de Thiessa, em Especial seu Chico e dona Hilda, pelo apoio. Muito obrigado.

“Quando você é duro consigo mesmo, a vida é fácil para você, mas quando você é fácil para consigo mesmo, a vida é dura para você”.

(Zig Ziglar)

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre nos momentos difíceis ter me dado forças para superar e dar prosseguimento na vida.

A mulher da minha vida, a mulher pela qual serei sempre grato, a minha amável mãe, dona Leny Batista Reis. Sem você ,meu amor, eu não seria nada, obrigado por me fazer entender o sentido da vida. Amo-lhe muito.

Aos irmãos, tias, primas, namorada, cunhados, obrigado por tudo.

Ao meu grande irmão, Valdez Diniz Junior, pode não ser de sangue, porém de coração, fica aqui meu imenso carinho.

Aos meus sogros, dona Hilda e seu Chico, por me acolherem de uma forma que eu nunca terei como pagar, fica aqui meu sincero respeito, carinho e admiração. Vocês são prova de que na vida existem pessoas dignas de tudo de bom.

A dona Doninha e seu Lupercínio por tudo que têm feito por mim.

Existem pessoas que surgem na sua vida e quando você se dar conta elas já fazem parte do seu dia-a-dia, fica aqui minha sincera admiração por Karlene, Naty e Maya, exemplos de amizade, companheirismo e principalmente trabalho em grupo. Saibam que vocês moram no meu coração.

Ao Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho, pelos ensinamentos que tanto contribuíram para minha formação e para o desenvolvimento deste trabalho, deixo aqui meu reconhecimento e admiração a um profissional de sucesso.

Ao Prof. Dr. Cícero Wellington Brito Bezerra por tudo que me ensinou e pela sua sincera humildade e paciência.

Agradeço, a todos os amigos e ex-companheiros de trabalho do Núcleo de Biodiesel: Ulisses, Ângela, Antônio Carlos, Cássio, prof. Celcione, profª Joselene, Ciro, Débora, Djavania, Luzenir, Hilton, Jéssica, Kedma, Marcelle, Mauro, Milena, Natália, Rógenes, Rosane, Sandro, Sergio, Sergiane, Sinara, Silmara, obrigado pelo convívio, apoio, amizade e companheirismo.

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

Aos professores e colegas do Pavilhão, em especial aos Prof. Dr. Nestor Everton Mendes Filho, Profa Dra. Adenilde Ribeiro Nascimento e Prof. Dr. André

Gustavo Lima de Almeida Martins, pelo estimado apoio, ajuda neste trabalho e pela amizade dedicada.

A todos os amigos e colegas da graduação: Ana Paula, Júnior gordo, Alexandre, Israel, Liana, Josilene, Paulo Henrique, Paulo César, Joacy, Roberto, Francisco de Lucas, Marcos, Max Dhionny, Fernando, Heloana, Virgínia, Felipe, Paulo irmão pelo agradável convívio.

A todos do time de química Fernando, Fernandes, Leandro, Marcelo, Paulo, Aquiles, Max, César, Marcos, Hélio, Andreson e em especial a um grande irmão que eu ganhei durante essa jornada, meu rei Francisco (Adebayor - O Rei da Área), grande exemplo de vida para todos nós, obrigado à todos pelo convívio e paciência.

A banca examinadora pela sua contribuição no término desse trabalho.

Aos meus amigos de trabalho, Hercivaldo, Markony, Ronalva, Gilberto, Marcos Aurélio, Nonato e em especial ao grande Emídio, fica aqui meu agradecimento.

A CAPES pela bolsa.

Aos professores, funcionários, servidores e serventes da UFMA, pelo agradável convívio.

Ao pessoal do lanche, Lívia, Emerson, João, Coqueiro, por tantas vezes terem aturado minhas bagunças.

RESUMO

A utilização de plantas para fins medicinais é uma prática antiga. Dentre várias espécies de plantas que contém óleo essencial na sua composição e que podem vir a ser utilizadas no combate a várias doenças destaca-se o óleo essencial extraído das folhas da canela. O óleo da canela pode ser utilizado no combate da esquistossomose, doença endêmica que afeta áreas com saneamento básico precário. Nesta pesquisa, o óleo essencial foi extraído das folhas da canela (*Cinnamomum zeylanicum Blume*) por meio de hidrodestilação, sua ação moluscicida foi avaliada frente ao caramujo *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). O percentual de óleo nas folhas em média foi de 1,3 mL no intervalo de tempo variando de 1 a 5 horas, logo após o extraído, passou por caracterizações físico-químicas. As quantificações dos seus componentes foram feitas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). As análises cromatográficas mostraram que o óleo possui 82,67% de eugenol (constituente majoritário), no tempo de retenção de 22,63 min; e 2,47% de Humuleno (componente minoritário), no tempo de retenção de 25,74 min. O óleo de canela foi testado quanto à toxicidade e como agente moluscicida, calculando-se a concentração letal (CL₅₀). O óleo estudado, extraído da folha da canela quanto a toxicidade foi considerado moderadamente tóxico apresentando CL₅₀ de 162,1 mg.L⁻¹ ± 2,80, com um intervalo de confiança a 95%.

Para o teste piloto, a atividade moluscicida do óleo apresentou uma mortalidade de 100% em 72 h, indicando a presença de componentes tóxicos nos óleos frente ao caramujo. A atividade moluscicida do óleo essencial extraído das folhas da canela obteve resultado referente à concentração letal 50% (CL₅₀) de 18,62 mg.L⁻¹ ± 2,18, com um intervalo de confiança a 95%. , abaixo do preconizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS); mostrando que este óleo é ativo frente ao caramujo *Biomphalaria glabrata*.

PALAVRAS-CHAVE: óleo essencial, *Cinnamomum zeylanicum Blume*, Canela, toxicidade e moluscicida.

ABSTRACT

The use of plants for medicinal purposes is an ancient practice. Among various species of plants containing essential oils in its composition and that may be used to fight various diseases highlight the essential oil extracted from the leaves of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum Blume*). The cinnamon oil can be used to prevention of schistosomiasis, an endemic disease that affects areas with poor basic sanitation. In this study, the essential oil was extracted from the leaves of cinnamon by hydrodistillation and its molluscicidal action has been assessed against the snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). The percentage of oil in the leaves was an average of 1.3 mL in the time interval ranging from 1 to 5 hours, after extraction the physico-chemical properties of oil were determined. The measurements of oil components were made by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The chromatographic analysis showed that oil has 82.67% of eugenol (major constituent), at retention time 22,63 min and 2.47% of humulene (minor component), at retention time 25.74 min. The cinnamon oil has been tested for toxicity and molluscicidal agent, calculating the lethal concentration (LC₅₀). As for toxicity, the oil extracted from cinnamon leaf was considered moderately toxic LC₅₀ = 162.1 mg.L⁻¹ ± 2,80, with a confidence interval 95%. For the pilot test, the molluscicide activity of the oil presented a mortality of 100% in 72 h indicating the presence of toxic compounds in the oils against the snail indicating the presence of toxic compounds in the oils against the snail. The molluscicide activity of essential oil extracted from the leaves of cinnamon obtained results relative to the 50% lethal concentration LC₅₀ of 18.62 mg L⁻¹ ± 2,18, with a confidence interval 95%, lower the level recommended by the World Health Organization (WHO), showing that this oil is active against the snail *Biomphalaria glabrata*.

Keywords: Essential oil, *Cinnamomum zeylanicum Blume*, Cinnamon, Toxicity., Molluscicide.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características físicas do óleo essencial extraído das folhas da espécie <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume.....	55
Tabela 2 – Rendimentos da extração do óleo de canela	56
Tabela 3 – Compostos identificados na amostra do óleo essencial extraído da canela	59
Tabela 4 – Mortalidade das larvas após testes nas diferentes concentrações do óleo essencial extraído das folhas da canela.....	62
Tabela 5 – Avaliação da mortalidade do teste controle para as larvas da artemia salina.....	64
Tabela 6 – Mortalidade dos caramujos após testes em várias concentrações do óleo essencial extraído das folhas da canela.....	68
Tabela 7 – Avaliação da mortalidade do teste controle para os caramujos na Figura 22.	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume	23
Figura 2 – Fórmula estrutural do eugenol.....	31
Figura 3 – Espécies hospedeiras intermediárias <i>B. Glabrata</i> (a), <i>B.straminea</i> (b) e <i>B. Tenagophila</i> (c)	35
Figura 4 – Caramujos da espécie <i>Biomphalaria glabrata</i>	36
Figura 5 – Ciclo evolutivo	37
Figura 6 – Os ovos (a) e o miracídio (b).....	38
Figura 7 – Cercária da <i>S.mansoni</i>	38
Figura 8 – Fórmula estrutural da niclosamida	40
Figura 9 – Sistema Extrator de Clevenger.....	44
Figura 10 – Coleta de caramujos com concha metálica.....	48
Figura 11 – Cinética referente à extração do óleo essencial da canela em função do tempo, com massa de 30g e temperatura de 100°C.	56
Figura 12 – Íon-cromatograma da amostra do óleo das folhas da <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume (Canela), apresentando os picos selecionados e identificados através da comparação dos respectivos espectros de massas com a espectroteca	58
Figura 13 – Espectros de massas: composto majoritário (eugenol) da amostra referente ao pico 2 do cromatograma (a) e proposta de identificação através da espectroteca NIST02 (b).	60
Figura 14 – Fragmentação do eugenol.....	61
Figura 15 – Taxa de percentagem de mortalidade das larvas,nas diferentes concentrações do óleo essencial da canela.	62
Figura 16 – Estimativa da CL ₅₀ do óleo essencial da canela pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de Larvas vivas e mortas em função do logaritmo da concentração aplicada. A CL ₅₀ é o ponto de intersecção das duas curvas.....	63
Figura 17 – Percentual de mortalidade dos caramujos por tempo de exposição e observação para o teste piloto	65
Figura 18 – Percentual de mortalidade pelas concentrações do óleo essencial extraído da canela.....	66
Figura 19 – Percentual de mortalidade pelo tempo do óleo essencial da canela	67
Figura 20 – Taxa de mortalidade dos caramujos nas cinco concentrações diferentes do óleo essencial da canela.	68
Figura 21 – Estimativa da CL ₅₀ do óleo essencial da canela pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de caramujos vivos e mortos em função do logaritmo da concentração aplicada.....	69
Figura 22 – Grupo controle do branco e do Tween 80	70

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	– Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASTM	– American Society for Testing and Materials
AMDIS	– Automated mass spectral deconvolution mass & identification system
CG	– Cromatografia Gasosa
CLAE	– Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CG-EM	– Cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas
CL ₅₀	– Concentração letal 50%
EPI	– Equipamento de proteção individual
EM	– Espectrometria de Massas
FUNASA	– Fundação Nacional da Saúde
FID	– Detector de Ionização de Chamas
F.M.	– Fórmula Molecular
IE	– Impacto de elétrons
IUPAC	– International Union of Pure and Applied Chemistry
IV	– Infravermelho
LACOM	– Laboratório de combustíveis e materiais
mL	– mililitro
mV	– milivolts
m/z	– Relação carga-massa
M+	– Íon Molecular
ND _{25°}	– Índice de Refração a 25°C
NIBA	– Núcleo de imunologia básica
OMS	– Organização Mundial de Saúde
RMN	– Ressonância magnética nuclear
T _r	– Tempo de retenção

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	19
2.1 Geral	19
2.2 Específicos	19
3 REVISÃO DA LITERATURA	21
3.1 Noções gerais sobre plantas medicinais	21
3.2 Aspectos gerais sobre a canela (<i>Cinnamomum zeylanicum</i> blume)	23
3.3 Óleos essenciais	24
3.4 Extração do óleo.....	26
3.4.1 Extração por enfloração	26
3.4.2 Extração por prensagem	27
3.4.3 Extração com solventes orgânicos	27
3.4.4 Extração por fluido supercrítico	27
3.4.5 Extração com arraste por vapor d'água.....	27
3.5 Análises dos componentes dos óleos essenciais	28
3.5.1 Cromatografia gasosa (CG)	28
3.5.2 Cromatografia gasosa/espectrometria de massas (CG-EM)	29
3.6 A importância dos óleos essenciais nas plantas medicinais.....	30
3.7 Óleo essencial da canela	31
3.7.1 Aplicabilidade industrial	33
3.8 Toxicidade.....	33
3.9 Esquistossomose.....	34
3.9.1 Ciclo evolutivo	37
3.9.2 Atividade moluscicida	39
4 METODOLOGIA	43
4.1 Reagentes e Materiais.....	43
4.2 Métodos.....	43
4.2.1 Coleta das folhas de canela	43
4.2.2 Extração dos óleos essenciais	44
4.2.3 Caracterização física dos óleos essenciais	45
4.2.3.1 Densidade	45
4.2.3.2 Solubilidade em etanol (90%).....	45
4.2.3.3 Índice de refração.....	46
4.2.3.4 Cor.....	46
4.2.3.5 Aparência	46
4.2.4 Análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).....	46
4.2.5 Amostragem dos caramujos	47
4.2.5.1 Coleta dos caramujos.....	47
4.2.5.2 Análise para testar positividade dos caramujos	48
4.2.5.3 Armazenamento dos caramujos após teste da positividade.....	49
4.2.6 Atividade moluscicida	49
4.2.6.1 Método da Organização Mundial de Saúde (OMS).....	49
4.2.6.2 Cultura de <i>Artemia salina</i>	50

4.2.6.3 <i>Análise da toxicidade</i>	51
4.2.7 <i>Análise estatística da concentração letal (CL₅₀)</i>	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	54
5.1 <i>Avaliação das características físico-químicas do óleo essencial de canela</i>	54
5.2 <i>Avaliação da cinética de extração e rendimento dos óleos essenciais</i>	55
5.3 <i>Avaliação das características químicas do óleo essenciais obtida por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)</i>	57
5.4 <i>Avaliação do teste de toxicidade</i>	62
5.5 <i>Avaliação do teste controle</i>	64
5.6 <i>Captura e teste da positividade dos caramujos</i>	64
5.7 <i>Avaliação da atividade moluscicida</i>	65
5.8 <i>Avaliação do teste piloto</i>	65
5.9 <i>Avaliação da concentração letal</i>	66
5.10 <i>Avaliação do teste controle</i>	70
6 CONCLUSÃO	72
7 PERSPECTIVAS FUTURAS	74
REFERÊNCIAS	76

Capítulo 1



Introdução

1 INTRODUÇÃO

O estudo das plantas surgiu juntamente com as civilizações antigas. Como precursores teve Hipócrates, ilustre médico grego; Cho-Chinkei, pai da medicina chinesa e Galeno, pai da farmácia, que de forma empírica indicavam o uso de plantas medicinais para fins terapêuticos. No Brasil, este tipo de terapia teve sua origem na cultura indígena utilizando como fins terapêuticos diversas espécies, tais como: guaraná e jaborandi. Durante a colonização, sofreu influências de outros povos, os quais trouxeram de seus países plantas exóticas para o tratamento de doenças endêmicas (camomila, malva, boldo, etc.) (SERAFIN, 2006; SANTOS e Souza, 2008).

O advento da revolução industrial fez com que a utilização de plantas medicinais diminuísse em função do desenvolvimento de drogas sintéticas. Porém, a preocupação do homem moderno em busca de uma vida saudável fez com que a procura por elas voltasse a crescer (Apud Nascimento, 2004).

O mercado mundial de fitoterápicos tem uma receita anual de aproximadamente 22 bilhões de dólares. Estima-se que cerca de 80% da população dos países em desenvolvimento fez e/ou faz uso de algum tipo de erva, com a finalidade de aliviar alguma sintomatologia (RATES, 2001; SIMÕES e SCHENKEL, 2002). Entretanto, percebe-se que o Brasil tem uma fraca atuação no mercado de fitoterápicos, mesmo quando comparado a outros países menos desenvolvidos (CECHINEL e YUNES, 1998).

No Brasil, a venda de todos os medicamentos incluindo os sintéticos e não-sintéticos gera uma renda anual de aproximadamente 9 bilhões de reais. A classe dos não-sintéticos correspondem a uma renda 500 milhões de reais, mesmo tendo um crescimento de 8-10% anual fica muito abaixo dos lucros obtidos a partir dos sintéticos (Moraes et al., 2010).

O Brasil é considerado o país com a maior diversidade genética vegetal, apresentando uma extensa e diversificada flora, que representa aproximadamente um terço das espécies de plantas conhecidas no mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado de 350-550.000. Isto demonstra o potencial que o país tem e faz surgir assim a necessidade de estudos científicos melhor elaborados. Apesar de todo esse potencial o campo fitoterápico no Brasil é

praticamente inexplorado (SIMÕES e SCHENKEL; 2002; OLIVEIRA e BRAGA, 2003).

Nos últimos 30 anos, a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2011) vem se empenhando no sentido de incentivar os estudos com extratos de plantas consideradas medicinais (senso comum). A partir de 1978, segundo Soares (2010), a instituição passou a aconselhar a comunidade científica a intensificar e divulgar os estudos com plantas fitoterápicas.

Entre os produtos obtidos de plantas, encontram-se os óleos essenciais de algumas espécies de plantas aromáticas, os quais já são largamente utilizados na indústria para a produção de sabonetes, perfumes e outros produtos de higiene pessoal. Estudos sobre a avaliação das atividades inseticida, bactericida e fungicida e moluscicida dos óleos essenciais de algumas espécies de plantas têm mostrado resultados interessantes, em várias pesquisas pelo mundo todo, e em especial em alguns grupos de pesquisa aqui no Brasil (LEMOS et al., 1990).

A esquistossomose tem como transmissor o trematóide *Schistosoma mansoni*, sendo uma importante doença endêmica no Brasil e em muitos países tropicais. O ciclo de vida desse parasita envolve um hospedeiro intermediário representado no Brasil por caramujos do gênero *Biomphalaria* (ALVES et al., 2000).

Para o controle da esquistossomose, além dos tratamentos das pessoas infectadas, é preciso que se faça um controle da população de caramujos, como forma de redução do risco de transmissão da doença.

A utilização de óleos vegetais como atividade moluscicida no tratamento da esquistossomose data da década de 1930, quando foi sugerido o plantio de *Balanites aegyptiaca* L. (*Balanitaceae*), uma árvore típica do deserto, nas margens dos focos de transmissão, no Sudão. Seus frutos, ao caírem das árvores, inibiam a densidade populacional de caramujos (ARCHIBALD, 1933).

No intuito de obter um controle das populações de caramujos, várias substâncias foram empregadas ao longo dos anos, sendo a niclosamida a única substância aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária e a única disponível comercialmente (MS, 1995), entretanto esse produto apresenta alto custo, biodegradação lenta, toxicidade para o meio ambiente e ainda pode levar os caramujos a certa resistência. Esse fato foi predominante para que os cientistas

estudassem substâncias oriundas de vegetais que pudesse contribuir na eliminação dos caramujos com mais eficiência. (KLOOS e McCULLOUGH, 1980).

Algumas plantas são conhecidas da comunidade científica e alguns estudos realizados com os óleos essenciais extraídos de algumas espécies têm mostrado resultados interessantes como, por exemplo: a canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume.) tem várias finalidades, sendo utilizada na agricultura, para controle de nematóides, fungicida, moluscicida, na arborização urbana, nas indústrias de cosméticos, na culinária e na medicina popular (PEREIRA et al., 2004)

Com o intuito de verificar as potencialidades de utilização do óleo de canela no controle da população de caramujos, como combate a proliferação da esquistossomose, o presente trabalho caracteriza quimicamente, avalia a toxicidade e a atividade moluscicida do óleo essencial extraído da canela.

Capítulo 2



Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Caracterizar quimicamente, avaliar a toxicidade e testar atividade moluscicida do óleo de canela extraído das folhas (*Cinnamomum zeylanicum* Blume.) frente ao caramujo *Biomphalaria glabrata*.

2.2 Específicos

- Extrair quantitativamente o óleo essencial das folhas da canela;
- Caracterizar a amostra estudada por processo físico-químico, e quantificar os componentes do óleo por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas;
- Avaliar a toxicidade do óleo de canela, material analisado frente à *Artemia salina*, visando determinar a segurança desses óleos e suas potencialidades para outras atividades;
- Avaliar a atividade moluscicida da amostra frente aos caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*, para utilização no controle da esquistossomose, utilizando o método preconizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS);
- Verificar e avaliar a concentração letal (CL₅₀) do óleo de canela na mortalidade dos caramujos (*Biomphalaria glabrata*)

Capítulo 3



*Revisão de
Literatura*

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Noções gerais sobre plantas medicinais

Desde os primórdios da civilização, o homem utiliza plantas para a cura de doenças, para o controle de insetos e para a conservação de corpos, ou seja, embalsamento, descobertas que ocorreram por acaso e que estão sendo comprovadas pela ciência. Em toda a parte da planta podem ser encontrados princípios ativos importantes, sintetizados pelo metabolismo secundário das plantas e que dão origem a uma série de classes de compostos conhecidas como alcalóides, flavonóides, cumarinas, saponinas, óleos essenciais, entre outras. Uma das classes mais importante é a dos óleos essenciais, que são compostos voláteis e, quando liberados pelas plantas, agem como princípios ativos que vão de encontro a invasores e, assim, atuam na proteção contra microrganismos, herbívoros etc. (LIMA, 2006; FREIRE, 2008).

Segundo Simões e colaboradores. (1999) até o século XIX os recursos terapêuticos eram constituídos predominantemente por plantas e seus extratos vegetais. De acordo com os referidos autores, as plantas medicinais e seus extratos constituíam a maior parte dos medicamentos que, naquele momento, pouco se diferenciavam dos remédios utilizados na medicina popular. Dessa forma, os recursos começaram a ser estudados com os instrumentos científicos da época e paulatinamente surge a tendência de utilização das substâncias ativas isoladas, os chamados “princípios ativos”.

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

De acordo com Barbosa (2010), dados da OMS informam que em 2003 os medicamentos derivados de vegetais representaram uma constância de 25% de todas as prescrições médicas nos Estados Unidos, e este percentual torna-se mais significativo na demonstração da importância das plantas medicinais e, também, como estímulo à sua investigação.

A respeito desse mercado que vem emergindo acentuadamente, é interessante ressaltar que as empresas do setor fitoterápico olham para as plantas de forma diferenciada, levando em conta o conceito da OMS, que preconiza o uso de todos os princípios ativos das plantas de forma integral. Câmara (2010) diz que este é o grande diferencial entre o fitofármaco (princípio ativo isolado) e o fitoterápico (princípios ativos integrais).

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

No Brasil, a utilização de plantas medicinais, para o tratamento de enfermidades, está relacionada às culturas indígena, negra e dos imigrantes europeus. Por muito tempo, tal procedimento representou a principal forma de cura, especialmente entre a população rural. Entretanto, com o processo de urbanização e o desenvolvimento da indústria química, os alopáticos sintéticos passaram a predominar na terapia moderna.

Atualmente, observa-se uma crescente redescoberta do valor das plantas medicinais em decorrência não só de certos efeitos colaterais imprevistos de muitos remédios sintéticos (alópatas), embora o uso incorreto dos remédios naturais também possa causá-los, como também do seu elevado preço, visto que está atrelado a poderosos interesses capitalistas internacionais.

3.2 Aspectos gerais sobre a canela (*Cinnamomum zeylanicum blume*)

A caneleira (Figura 1) é uma árvore originária do Ceilão, da Birmânia e da Índia e conhecida há mais de 2500 anos a.C. pelos chineses. Seu gênero, "*cinnamomum*", segundo referências, é derivado da palavra indonésia "kayu manis", que significa "madeira doce". Mais tarde, recebeu o nome hebreu "quinnamon", que evoluiu para o grego "kinnamon".

A canela é uma árvore de ciclo perene que atinge até 8 a 9 metros de altura. O tronco alcança cerca de 35 cm de diâmetro. As folhas são coriáceas, lanceoladas, com nervuras na base, brilhantes e lisas na parte superior e verde-clara, e finamente reticulada na parte inferior. As flores são de coloração amarela ou esverdeada, numerosas e bem pequenas, agrupadas em cachos ramificados (BALMÉ, 1978; SCHIPER, 1999). Essa árvore requer cerca de 1.300 mm de chuva por ano e temperatura média anual superior a 21°C.



Figura 1 – *Cinnamomum zeylanicum* Blume.

O gênero *Cinnamomum* (*Lauraceae*) é constituído por aproximadamente 350 espécies, muitas das quais são produtoras de óleo essencial. O valor comercial dos óleos de *Cinnamomum* depende da espécie e da parte da planta utilizada (FAO, 1995). Os óleos essenciais mais importantes no mercado mundial são os obtidos de *C. verum* ("*cinnamomum bark oil*" e "*cinnamomum leaf oil*"), *C. cassia* ("*cassia oil*") e

C. camphora ("sassafras oil" e "ho leaf oil"). *Cinnamomum zeylanicum* Blume (*Cinnamomum verum*), conhecida como "canela-da-índia" e "canela-do-ceilão" é originária de algumas regiões da Índia e do Ceilão. A parte interna da casca do tronco e dos ramos constitui a canela do comércio, com vasto uso mundial na perfumaria e na culinária, devido suas propriedades aromáticas e condimentares além de ser, popularmente, utilizada como estimulante, tônica, carminativa e antiespasmódica. A canela e o seu óleo essencial são empregados como corretivos do odor e do sabor na preparação de alguns medicamentos (LIMA et al., 2005).

De acordo com a literatura, *Cinnamomum zeylanicum blume* apresenta como composição química as seguintes substâncias: ácido cinâmico, açúcares, aldeído benzênico, aldeído cinâmico, aldeído cumínico, benzoato de benzila, cimeno, cineol, eugenol, felandreno, linalol, metilacetona, mucilagem, oxalato de cálcio, pineno, resina, tanino e vanilina. As partes da plantas mais utilizadas são: óleo essencial e casca desidratada. *Cinnamomum zeylanicum* apresenta como propriedades medicinais: adstringente, afrodisíaca, anti-séptica, carminativa, digestiva, estimulante, sedativa, tônica e vasodilatadora (BALMÉ, 1978; SCHIPER, 1999).

Praticamente se utiliza a parte aérea do vegetal como um todo. As folhas são utilizadas para a extração de óleos essenciais, mas a parte mais valorizada é realmente a casca dos ramos. No comércio encontra-se a canela em pó, rasurada e em cascas enroladas em si mesmas e medindo cerca de 20 a 25 cm de comprimento (MORSBACH e colaboradores, 1997).

3.3 Óleos essenciais

A International Standart Organization (ISO), definiu-se como óleos essenciais, produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste de vapor d'água, bem como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos (Rutácea). De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Também podem ser chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências. Eles são assim chamados por serem: geralmente de aparência oleosa e líquidos, voláteis; geralmente possuem aroma

agradável; solúveis em solventes apolares, como o éter. Em água, eles apresentam solubilidade limitada, mas o suficiente para aromatizar suas soluções aquosas, que nesse caso são denominadas hidrolatos.

A constituição química dos óleos essenciais é muito complexa, chegando alguns a centenas de compostos com funções orgânicas diferentes: hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, éteres e fenóis, (Monteiro, 2008).

Os óleos essenciais apresentam as mais diversas ações farmacológicas, conforme algumas genéricas:

➤ ação eupéptica (digestiva): condimentos como orégano, manjeriço, sálvia, tomilho, etc.;

➤ hiperemizante local: óleo de menta, que é rico em mentol; a cânfora como princípio ativo isolado.;

➤ antisséptica: óleo essencial de cravo, devido ao eugenol; óleo essencial de eucalipto, devido à grande quantidade de cineol.

➤ Óleos essenciais são líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente, de fácil volatilidade e aroma agradável, e normalmente são também chamados de essências. São geralmente incolores ou ligeiramente amarelados, sendo raros os óleos essenciais azuis e, normalmente, apresentam o sabor geralmente acre (ácido) e picante. Quimicamente, os óleos essenciais são constituídos principalmente de compostos terpênicos. Os óleos essenciais podem estar armazenados em certos órgãos vegetais, nas flores (laranjeira, bergamoteira), folhas (capim-limão, eucalipto, louro) ou ainda nas cascas dos ramos (canela), madeiras (sândalo, pau-rosa), raízes (vetiver), rizomas (gengibre), frutos (anis-estrelado, funcho, erva-doce) ou sementes (noz moscada) (SIMÕES et al., 2003).

É interessante notar que os óleos essenciais diferem-se quimicamente dos óleos fixos e dos minerais. Os primeiros são misturas de terpenos e compostos oxigenados, juntos com outros tipos de compostos orgânicos. Já os óleos fixos são ésteres da glicerina com ácidos graxos de cadeias longas. Enquanto que os últimos óleos citados são parafinas líquidos misturados a outros hidrocarbonetos de peso molecular elevado (WILLIANS, 1996).

Devido à baixa solubilidade dos óleos essenciais em água, há necessidade de se utilizar um tensoativo hidrofílico, geralmente solúveis ou dispersíveis em água, que são empregados para se obter uma emulsão do tipo óleo

em água (O/A). Neste trabalho será utilizado o TWEEN 80 como dispersante ou solubilizante dos óleos, a serem estudados, tem como nome químico, monooleato Sorbitan Etoxilado, cuja fórmula molecular $C_{64}H_{124}O_{26}$, de peso molecular 1310,0 e densidade 1,06-1,09 g/mL, devido à característica hidrofílica da cadeia de polioxietileno faz da linha TWEEN, tensoativos hidrofílicos, geralmente solúveis ou dispersíveis em água e empregados para obter emulsões do tipo óleo em água (O/A), como dispersantes ou solubilizantes de óleos (MERCK, 1996).

Entre os óleos essenciais comercializados no mundo, os provenientes de especiarias representam um nicho de mercado crescente. Dentre esses óleos, merecem destaque aqueles ricos em eugenol, pois apresentam um elevado valor de mercado.

3.4 Extração do óleo

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

3.4.1 Extração por enfloração

A enfloração é um método que já foi bastante utilizado, mas atualmente é empregado apenas por algumas indústrias de perfumes, no caso de algumas plantas com baixo teor de óleo de alto valor comercial. É empregada para extrair óleo essencial de pétalas de flores onde as pétalas são depositadas, a temperatura ambiente, sobre uma camada de gordura, durante certo tempo. Em seguida, estas pétalas esgotadas são substituídas por novas até a saturação total, quando a gordura é tratada com álcool. Para se obter o óleo essencial, o álcool é destilado a baixa temperatura e o produto assim obtido possuem alto valor comercial (WILLIAMS, 1996).

3.4.2 Extração por prensagem

Na prensagem os pericarpos de frutos cítricos são prensados e a camada que contém o óleo essencial é, então, separada. Posteriormente, o óleo essencial é separado da emulsão formada com a água por decantação, centrifugação ou destilação fracionada (SIMÕES, 1999).

3.4.3 Extração com solventes orgânicos

A extração de óleos essenciais com solventes orgânicos envolve o uso de compostos como o éter etílico, éter de petróleo ou diclorometano que, entretanto, extraem outros compostos lipofílicos, além do óleo essencial. Por isso, os produtos obtidos assim raramente possuem valor comercial (SIMÕES, 1999).

3.4.4 Extração por fluido supercrítico

Pela extração por fluido supercrítico consegue-se recuperar os aromas naturais de vários tipos não somente óleo essencial, de modo bastante eficiente e, atualmente, é um dos métodos de escolha para extração industrial de óleos essenciais. Nenhum traço de solvente permanece no produto obtido, tornando-o mais puro do que aqueles obtidos por outros métodos. Para tal extração, o CO₂ é primeiramente liquefeito por compressão e, em seguida, aquecido a uma temperatura superior a 31 °C. Nessa temperatura, o CO₂ atinge um quarto estado, no qual sua viscosidade é análoga a de um gás, mas sua capacidade de dissolução é elevada como a de um líquido. Uma vez efetuada a extração, faz-se o CO₂ retornar ao estado gasoso, resultando na sua total eliminação (SIMÕES, 1999).

3.4.5 Extração com arraste por vapor d'água

A extração por arraste por vapor d'água é um dos métodos mais simples e mais utilizados. Na indústria de óleos essenciais existem três tipos de extrações,

distinguidas pela forma como se estabelece o contato entre a amostra e a água, na fase líquida ou de vapor; a primeira é chamada de hidrodestilação, onde a amostra fica imersa na água contida numa caldeira; a segunda de destilação pela água e vapor, onde uma rede colocada na parte inferior de uma caldeira mais alta separa a água da amostra e a terceira de destilação pelo vapor de água, onde a amostra é colocada em uma caldeira e o vapor de água ali injetado provém de um gerador próprio, independente (WILLIANS, 1996).

A indústria utiliza, de preferência, o vapor d'água por ser reduzido o contato com a água, relativamente aos métodos anteriores, é menos acentuada a hidrólise dos ésteres e a polimerização de outros constituintes, em particular dos aldeídos (WILLIANS, 1996).

3.5 Análises dos componentes dos óleos essenciais

A análise química de separação e identificação dos constituintes dos óleos é feita por meio de técnicas de cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (ROBLES et al., 1998; WEYERSTAHL et al., 1988; KIRK & OTHMER, 1981) e espectroscópicas (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1994), dentre as quais as mais freqüentes são as espectrofotometrias de ultravioleta (UV), infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono 13 (RMN 1H e 13C) e a espectrometria de massas (EM), além do uso de bibliotecas contendo informações existentes na literatura de um grande número de substâncias já conhecidas (KOLLMANNSBERGER; NITZ, 1993; DI STASI, 1996; FAJARDO et al., 1997; CAVICCHIOLI, 1986; WEYERSTAHL et al., 1988; SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1994).

3.5.1 Cromatografia gasosa (CG)

A cromatografia permite determinar, qualitativamente e quantitativamente, as frações individuais que podem ser observadas nos cromatogramas (SCHREIER, 1984; LANÇAS, 1993).

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

3.5.2 Cromatografia gasosa/espectrometria de massas (CG-EM)

Existem no mercado várias empresas que oferecem o conjunto cromatográfico a gás-espectrometria de massas (CG-EM), acoplado por meio de uma interface que aumenta a concentração da amostra no gás de arraste, aproveitando a maior difusibilidade do gás. A velocidade de varredura é grande o suficiente para permitir a obtenção de diversos espectros de massas por pico eluído no cromatógrafo (BUDZIKIEWICZ; DJERSSAI; WILLIAMS, 1964).

A conexão direta de colunas capilares de cromatografia gasosa ao espectrômetro de massas, sem a interface de enriquecimento, permite várias varreduras de massas rápidas em pontos diferentes de um pico cromatográfico, de modo a testar sua homogeneidade. Desse modo, é possível resolver picos cromatográficos parcialmente superpostos. Assim, a espectrometria de massas acoplada à cromatografia gasosa fornece as fragmentações dos componentes individuais separados (ADAMS, 1995).

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

iônicos que podem ser posteriormente decompostos em fragmentos menores (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1994).

Pode-se apresentar o espectro na forma de um gráfico ou uma tabela. O gráfico tem a vantagem de mostrar seqüências de fragmentação que com a prática podem ser facilmente reconhecidas. No espectro de massas por impacto de elétrons, gerado por um computador na forma de um gráfico de barras, a abundância relativa dos picos apresentados como percentagem do pico base (100%), é lançada contra a razão massa/carga (m/z).

3.6 A importância dos óleos essenciais nas plantas medicinais

O valor condimentar de uma planta está quase sempre associado ao teor de óleos essenciais, que são compostos químicos gerados durante o desenvolvimento da planta (SOUZA et al., 2004).

Soares e colaboradores. (2008), discutem que o crescente interesse pelos antioxidantes naturais de extratos de plantas é devido à sua baixa toxicidade em relação aos antioxidantes sintéticos. Extratos de frutas, vegetais, cereais e seus subprodutos industriais são ricos em antioxidantes, em ácido ascórbico, tocoferóis, carotenóides e em compostos fenólicos e têm demonstrado eficaz atividade antioxidante em sistemas modelos.

Angelo e seus colaboradores (2008) avaliaram os efeitos, isolado e sinergista, dos antioxidantes, extrato de coentro e palmitato de ascorbila, em óleo de girassol submetido ao teste acelerado em estufa. Desta forma, o óleo de girassol isolado e adicionado de 1.600mg/kg de extrato de coentro, 500mg/kg de palmitato de ascorbila e da mistura destes antioxidantes foi submetido ao teste acelerado em estufa a 60°C por 10 dias, cujas amostras foram tomadas nos intervalos de tempo de 0, 2, 4, 6, 8 e 10 dias e analisadas quanto ao índice de peróxidos e dienos conjugados. Os resultados obtidos das determinações analíticas foram submetidos às análises de variância e aos testes de Tukey para as médias a 5%, em esquema fatorial, no delineamento inteiramente casualizado. A partir dos resultados, verificou-se que os antioxidantes extratos de coentro, palmitato de ascorbila e a mistura dos antioxidantes quando adicionados no óleo de girassol apresentaram capacidade em

retardar a formação de peróxidos. A mistura dos antioxidantes adicionada ao óleo de girassol apresentou um poder antioxidante maior que os antioxidantes aplicados isolados, comprovando o efeito sinérgico dos antioxidantes estudados.

3.7 Óleo essencial da canela

Trabalhos prévios sobre o óleo de *Cinnamomum zeylanicum blume*, extraídos das folhas indicaram uma grande diversidade da composição química, com relato de pelo menos quatro quimiotipos: eugenol (THOMAS; GREETHA; SHYLARA, 1987; SENANAYAKE; LEE; WILLS, 1978), (E)-cinamaldeído (VARIYAR e BANDYOPADHYAY, 1989; SENANAYAKE; LEE; WILLS, 1978; BERNARD et al. (1989); MÖLLENBECK et al., 1997), benzoato de metila (RAO; PAUL; DUTTA, 1988), linalol (JIROVETZ et al., 2001) e cânfora (SENANAYAKE; LEE; WILLS, 1978).

Em contraste com outros alilbenzenos, o eugenol (Figura 2) é reconhecido pela Food and Drug Administration (FDA) como seguro quando usado em alimentos em concentrações de até 1.500µg/mL. Em alimentos, o eugenol (Figura 2) vem sendo usado basicamente como flavorizante, mas, tem também aplicações como repelente de insetos e em preparações farmacêuticas (PEREIRA e MAIA, 2007).

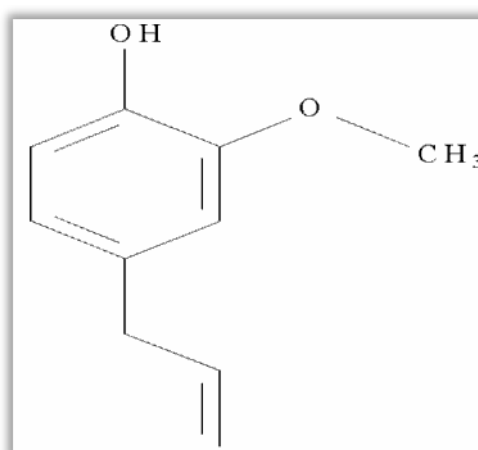


Figura 2 – Fórmula estrutural do eugenol.

Benarroz e colaboradores (2008), avaliou o efeito do tratamento *in vivo* com um extrato aquoso de canela na marcação de constituintes sangüíneos com

99mTc e na morfologia de hemácias de ratos Wistar. Os resultados sugerem que o extrato aquoso de canela não afetaria, in vivo, as estruturas da membrana envolvidas no transporte de íons ou o estado de oxidação dos íons estanho e pertecnetato.

Patel e colaboradores (2007) caracterizaram o óleo essencial extraído das folhas da *Cinnamomum verum* (Canela) usando a técnica de cromatografia gasosa com detector de massa e encontraram um teor de eugenol de 86% em sua composição.

Lima e colaboradores (2005), pesquisaram os óleos essenciais das folhas e dos galhos de *Cinnamomum zeylanicum* coletada no município de Manaus, estado do Amazonas, obtidos por hidrodestilação e analisados através de CG-EM. Vinte e três constituintes foram identificados nas folhas, dos quais o eugenol foi o que apresentou maior porcentagem (60%). Nos galhos foram identificados trinta e seis componentes, com predominância dos monoterpenos α - e β -pineno (9,9%; 3,5%), α -felandreno (9,2%), p-cimeno (6,2%), limoneno (7,9%), linalol (10,6%); os sesquiterpenos β -copaeno (3,3%), (β)-cariofileno (6,7%), óxido de cariofileno (3,1%) e os alilbenzenos (E)-cinamaldeído (7,8%) e acetato de (E)-cinamila (9,7%).

Morsbach e colaboradores (1997) trabalhou com óleos essenciais de cascas e folhas de canela do Ceilão (*Cinnamomum verum Presl*, sin. *Cinnamomum zeylanicum Bl.*) cultivada na Estação Experimental de Morretes do IAPAR, foram analisados por CG e CG-EM. As cascas e folhas foram provenientes de 12 árvores submetidas à adubação apenas com matéria orgânica (MO) ou associada com adubo químico (C). Análises do "headspace" foram utilizadas na caracterização das amostras individuais e no agrupamento para fins de extração por arraste a vapor e coobação. O rendimento médio de óleo essencial foi de 0,2% nas cascas e 2,0% nas folhas. O teor de aldeído cinâmico nos óleos essenciais das cascas foi de 54,7% (MO) e 58,4% (C). Os óleos essenciais de folhas apresentaram 94,1% (5 árvores - MO) e 95,1% (5 árvores - C) de eugenol. Entretanto, a composição dos óleos essenciais das folhas de duas árvores distintas, uma de cada tipo de tratamento, foi diferente da maioria das árvores estudadas, apresentando 58,7% (MO) e 55,1% (C) de eugenol, com teor elevado de safrol (29,6% e 39,5%, respectivamente).

3.7.1 Aplicabilidade industrial

As indústrias utilizam os óleos essenciais para conferir aromas especiais em inúmeros produtos, tais como perfumes, cosméticos, sabonetes, condimentos etc. (BERNALE, 1984; CLAY et al., 1993; FUH et al., 1996; ROBLES et al., 1998), também para mascarar odores desagradáveis em ambientes de trabalho e instalações sanitárias, e muito usadas como insumos em diversos produtos das indústrias de plásticos, tintas, borrachas, inseticidas e outras. (COSTA, 1975; KALIL FILHO, 2000).

3.8 Toxicidade

Segundo Forbes e Forbes (1994), o teste de toxicidade tem como finalidade avaliar ou prever os efeitos tóxicos nos sistemas biológicos e dimensionar a toxicidade relativa das substâncias.

Muitos ensaios podem ser utilizados, como o ensaio de letalidade com o microcrustáceo *Artemia salina*, que foi desenvolvido para detectar compostos bioativos em extratos vegetais (MEYER et al., 1982).

O bioensaio de toxicidade com *Artemia salina* é em geral simples, rápido, sensível e barato, e consiste na estimativa da concentração de uma substância através da medida de uma resposta biológica, na qual existe apenas um parâmetro envolvido: vida ou morte. O ensaio de letalidade permite a avaliação da toxicidade aguda e, portanto, é considerado essencial como bioensaio preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica, sendo atualmente aceito pela comunidade científica (CAVALCANTE et al., 2001). Pode ser útil também para prever a toxicidade de extratos de plantas e orientar seu fracionamento fitoquímicos (CÁCERES, 1996).

A *Artemia salina* é uma espécie de microcrustáceo da ordem Anostracea. Esta espécie é utilizada em testes de toxicidade devido à sua capacidade de formar cistos dormentes, fornecendo desse modo material biológico que pode ser armazenado durante longos períodos de tempo sem perda de viabilidade e sem

necessidade de se manterem culturas contínuas de organismo-teste. É uma espécie de fácil manipulação em laboratório e baixo custo econômico (CALOW, 1993).

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

Segundo Dolabela (1997) as amostras que demonstrarem CL₅₀ menor que 80 mg/L são consideradas altamente tóxicas; com CL₅₀ entre 80 a 250 mg/L moderadamente tóxicas e com CL₅₀ maior que 250 mg/L baixa toxicidade ou atóxicas.

É crescente a utilização de produtos naturais pela população como alternativa no tratamento de diversas enfermidades. O estudo das possíveis propriedades farmacológicas e seus efeitos tóxicos correspondentes é imprescindível.

3.9 Esquistossomose

A esquistossomose, conhecida como barriga d'água, xistosa, doença do caramujo, xistosomose é transmitida por caramujo da espécie *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (RAGHAVAN et al., 2003). É uma doença complexa devido aos seus variados fatores causais e sua ampla distribuição geográfica, motivo pelo qual se encontra inserida no contexto das doenças consideradas problema de saúde pública (OMS, 2001).

No Brasil, a esquistossomose mansônica é endêmica em vasta extensão do território, porque acomete milhões de pessoas, provocando, anualmente, um

número expressivo de formas graves e óbitos (MS, 1995). Considera-se uma doença endêmica aquela que existe constantemente em determinado lugar, atacando um número maior ou menor de indivíduos; já epidemia refere-se ao ataque rápido de uma doença, que acomete um grande número de pessoas ao mesmo tempo. A epidemia pode, também, ser o surto de agravamento de uma endemia (MS, 2007).

A esquistossomose ocorre em localidades sem saneamento ou com saneamento básico inadequado, sendo adquirida pela pele e pelas mucosas devido ao contato do homem com águas contaminadas com as formas infectantes de *S. mansoni* (MS, 2007).

Entretanto, para que ocorra a transmissão da doença, é indispensável a presença do homem na condição de hospedeiro definitivo, que excreta os ovos do verme pelas fezes, e dos caramujos aquáticos do gênero *Biomphalaria*, que atuam como hospedeiros intermediários, liberando as larvas infectantes do *Schistosoma mansoni* nas intermediações hídricas utilizadas pelos seres humanos susceptíveis à doença (MS, 2007).

A presença do hospedeiro intermediário constitui condição necessária e indispensável para que se desenvolva o ciclo do parasita. Atualmente, existem dez espécies e uma subespécie do gênero *Biomphalaria* e, destas, três são hospedeiras intermediárias naturais (*B. glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*) (Figura 3) e duas (*B. amazonica* e *B. peregrina*) são hospedeiras intermediárias potenciais, uma vez que só se infectam experimentalmente (MS, 1995).

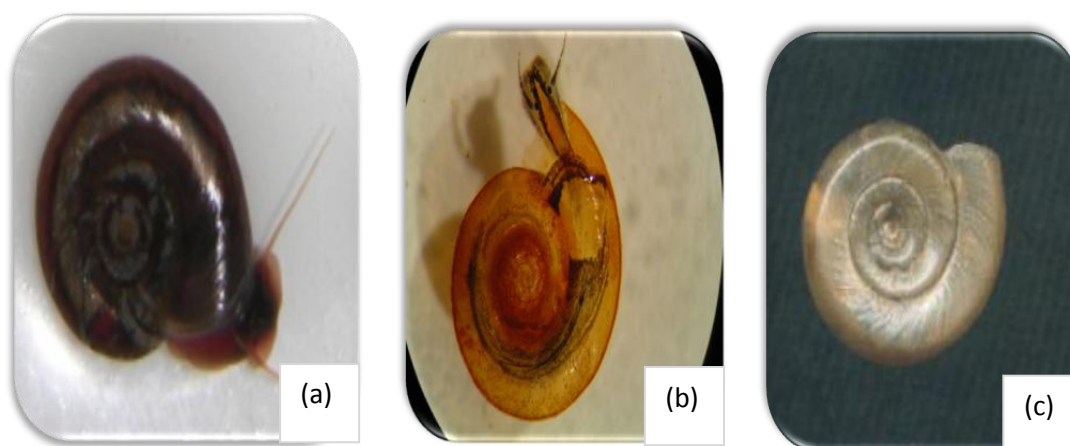


Figura 3 – Espécies hospedeiras intermediárias *B. Glabrata* (a), *B.straminea* (b) e *B. Tenagophila* (c)

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

O *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Figura 4), reconhecido popularmente como caramujo, pertencente ao reino Animália, da classe Gastropoda, e da família Planorbidea é um importante vetor do *Schistosoma mansoni* nas Américas, devido ao alto potencial biológico de infecção natural e vasta distribuição (SOUZA et al., 1996; BARBOSA et al., 2000), sendo encontrado em todos os Estados brasileiros desde a Paraíba até o Rio Grande do Sul e também em algumas áreas do Pará, Maranhão e Piauí, ao norte e Goiás e Mato Grosso no Centro-Oeste.

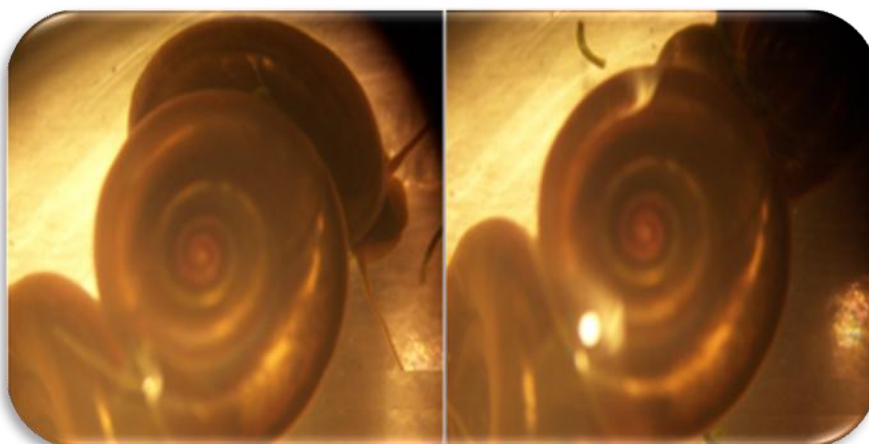


Figura 4 – Caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*

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

3.9.1 Ciclo evolutivo

O ciclo evolutivo (Figura 5) acontece de duas formas, uma no interior do caramujo e outra no interior do homem.

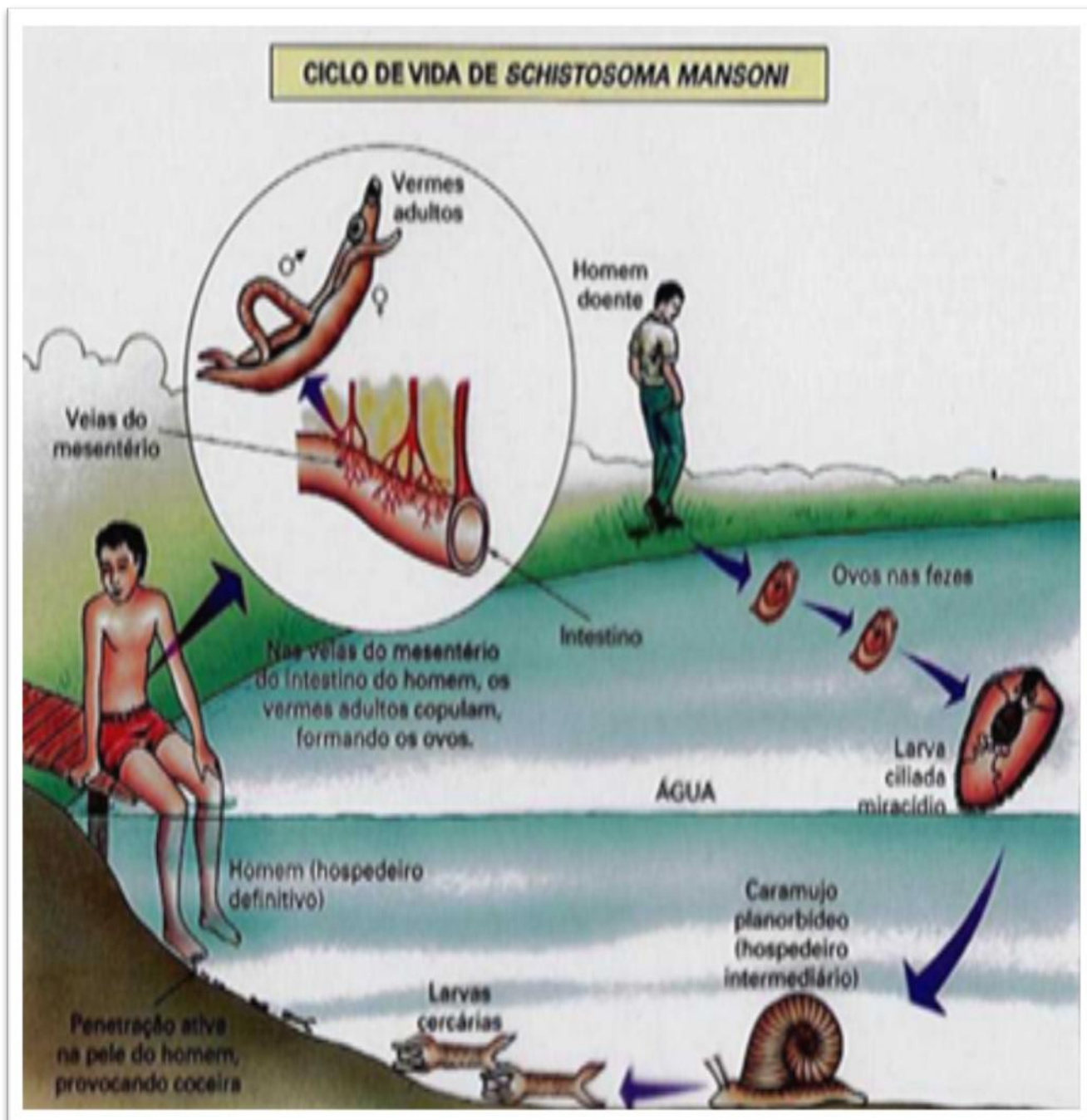


Figura 5 – Ciclo evolutivo
Fonte: Filo Platelminthes, 2009

O homem, quando doente, elimina ovos do verme pelas fezes. Estes, em contato com a água, rompem-se e libertam o miracídio (Figura 6) que é a larva ciliada, que nada ativamente, penetrando no caramujo onde penetram pelo tegumento.

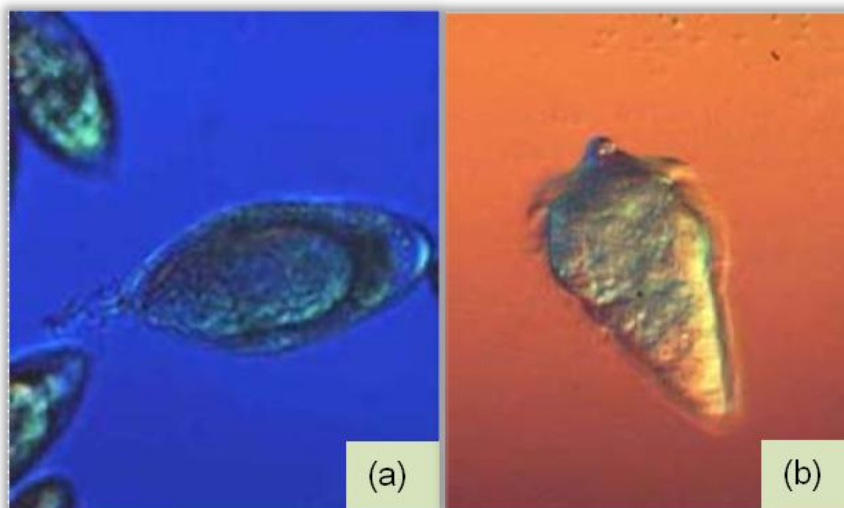


Figura 6 – Os ovos (a) e o miracídio (b)
Fonte: Sinclair Stammers/OMS/TDR

Por reprodução assexuada, os miracídios transformam-se em esporocistos primários, que produzem internamente esporocistos secundários; estes desenvolvem cercárias de cauda bifurcada após 25 a 35 dias (Figura 7).



Figura 7 – Cercária da *S.mansoni*
Fonte: Sinclair Stammers/OMS/TDR

As cercárias, por estímulo de luz e calor, deixam o caramujo e passam para a água, onde nadam à procura de contato com o hospedeiro vertebrado; neste

penetram ativamente através da pele e perdem a cauda. Após a penetração no vertebrado, as cercárias dão origem a esquistossômulos, que podem ser destruídos na derme, ou ganhar a circulação geral, sendo arrastadas para o coração e pulmões, de onde migram ativamente até o fígado. Ao chegar no sistema porta intra-hepático, os esquistossômulos desenvolvem-se até a fase adulta 28 a 48 dias após a penetração no órgão. Os vermes adultos machos e fêmeas acasalam-se e migram para as vênulas da parede intestinal, caminhando contra a corrente sanguínea da veia porta e das veias mesentéricas. As fêmeas eliminam ovos um a um, em fila, até 300 por dia. Cerca de 22% dos ovos chega a luz intestinal e saem com as fezes, e o restante fica retido nos tecidos do fígado e paredes do intestino, dando origem a granulomas. Os parasitos podem viver 20 a 25 anos no organismo humano não tratado (CUNHA, 1970; SOUZA & LIMA, 1990; REY, 2001).

3.9.2 Atividade moluscicida

Uma substância é considerada moluscicida quando nas condições ambientais em que o caramujo vive elimina todas as fases do seu ciclo de vida, desde o ovo até o adulto, sendo que essas substâncias devem ser utilizadas em pequenas concentrações, devem ainda apresentar baixo custo, ser estável no armazenamento em condições tropicais; fácil de transportar e aplicar; no transporte, manuseio e aplicação deve ser atóxico; ter ação letal seletiva a caramujos, ser inócuo para o homem, animais domésticos, peixes e plantas, não sofrer decomposição na água e no solo e ser estável em condições de temperatura e irradiação solar (PAULINI, 1965).

No passado, diversos produtos com propriedades moluscicidas foram testados e utilizados em campo, porém somente a niclosamida é aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (CAS n.º 50-65-7), sendo a única disponível comercialmente (MS, 1995).

A niclosamida (Figura 8), substância conhecida como Bayluscide, nomenclatura (IUPAC) 2',5-dicloro-4'-nitrosalicilanilida, fórmula molecular $C_{13}H_8Cl_2N_4O_4$ de uso exclusivo em Campanhas de Saúde Pública, no controle da esquistossomose, no combate aos caramujos vetores, sob a responsabilidade da

Fundação Nacional de Saúde. Devido a sua baixa seletividade, atua também sobre outras espécies da fauna e a resistência dos caramujos a essa substância, faz com que aumente a procura por substâncias de origem vegetal, facilmente biodegradável (NEVES, 2004).

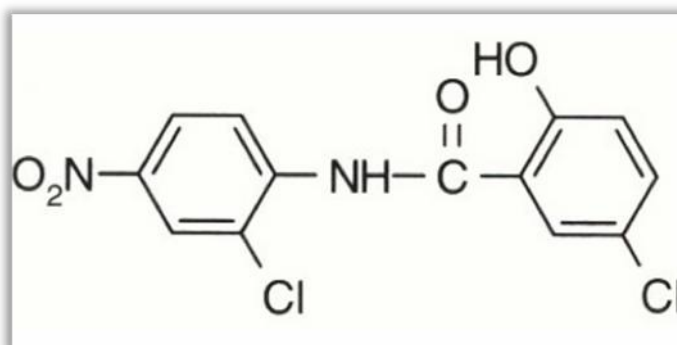


Figura 8 – Fórmula estrutural da niclosamida

Os estudos com extratos vegetais têm sido realizados de acordo com as especificações da Organização Mundial de Saúde (OMS) para moluscidas químicos. Para padronização dos ensaios fitoquímicos, a OMS publicou um guia para avaliação de plantas com potencial moluscicida, onde define que um bom moluscicida deve apresentar efeito tóxico em moluscos adultos em concentração menor ou igual a 20 ppm do extrato solúvel e menor ou igual a 100 ppm do extrato bruto, além de ser atóxico para os demais organismos.

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

O ciclo do *Schistosoma mansoni* pode ser interrompido com a utilização de plantas ricas em substâncias moluscicidas que são eficazes no controle do caramujo e das cercárias (CARVALHO et al., 1998; RUG & RUPPEL, 2000).

As pesquisas realizadas por Jumberg e colaboradores (1989) em 73 espécies com um total de 344 exemplares, apresentaram mortalidade entre 20% e 100%, nas concentrações que variaram de 0,5 mg/L a 20 mg/L, ou seja, dentro dos critérios estabelecidos pela OMS as seguintes espécies: *Anacardium occidentale*,

Dasyphylium brasiliensis, *Delonix regia*, *Eclipta alba*, *Euphorbia cotinifolia*, *Euphorbia splendens*, *Euphorbia splendens* var. *hisiopil*, *Euphorbia tirucalli*, *Macrosiphonia guaranitica*, *Magonia pubescens*, *Pithecolobium multiflorum*, *Buta gryeolens*, *Spathodea campanulata*, *Ziziphus loazeiro*.

Capítulo 4



Metodología

4 METODOLOGIA

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

4.1 Reagentes e Materiais

Bomba de oxigênio, álcool etílico a 70%, tween 80, água destilada, sal marinho, solução de iodo 30%, lupa STEMI SV6 marca ZEISS GERMANY, refratômetro de ABBE modelo 2 WAJ, Picnômetro de 1mL, moinho elétrico Tecnal, modelo TE-340, coletor de caramujos, hipoclorito de sódio 50%, câmera fotográfica digital, aparelho de Clevenger, cromatógrafo gasoso acoplado à espectroscopia de massas GC/EM, HP 5880, água desclorada,

4.2 Métodos

4.2.1 Coleta das folhas de canela

Para obtenção da exsicata, as folhas da planta foram secas, prensadas e acondicionadas em folhas de jornal. A temperatura utilizada para a secagem foi de 38°C, durante 48 horas. Em seguida, as exsicatas foram enviadas ao herbário da UFMA, que efetuou a caracterização botânica da espécie com base nas características físicas do material coletado. De acordo com a caracterização botânica, a espécie de canela estudada, foi identificada pela Profa. Especialista Ana Zélia Silva, do Departamento de Farmácia da UFMA, como pertencente à família das Lauráceas, cujo nome científico é *Cinnamomum zeylamicum* Blume., conforme características das folhas e galhos da espécie. A exsicata encontra-se depositada no herbário da UFMA sob o nº 1153.

4.2.2 Extração dos óleos essenciais

O óleo essencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume.) extraído das folhas foi obtido por hidrodestilação em sistema de Clevenger de vidro acoplado a um balão de fundo redondo de 1000 mL, com uma manta aquecedora controlando-se a temperatura a 100°C (Figura 9).



Figura 9 – Sistema Extrator de Clevenger

Para a extração foram utilizados 30 gramas da amostra com 300 mL de água destilada (proporção 1:10), sendo realizadas em triplicata e o óleo obtido foi seco por meio da percolação com Na_2SO_4 anidro, armazenados em coletores de vidro envolto em papel alumínio sob refrigeração, a fim de evitar perdas de constituintes voláteis. Em seguida esse óleo foi submetido às análises.

O cálculo do rendimento da extração do óleo foi avaliado de duas maneiras distintas. O primeiro cálculo foi baseado na relação massa/volume, onde o volume foi sendo observado no próprio sistema de extração, sendo feitas seis extrações nos tempos 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; e 5,0 horas, e o melhor tempo foi determinado em função do rendimento do óleo essencial. No segundo, o rendimento foi expresso em porcentagem, na relação massa/massa pela medida da densidade, observando o volume máximo obtido do óleo por massa(g) do vegetal em estudos, de acordo com a Equação 1 (FARMACOPEIA BRASILEIRA IV, 1996).

$$\% R = (V \times d/m) \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

V = volume total de óleo extraído (mL)

d = densidade do óleo (g/mL)

m = massa do vegetal (g)

4.2.3 Caracterização física dos óleos essenciais

As propriedades físicas do óleo de canela foram determinadas em função dos seguintes parâmetros: densidade, solubilidade em etanol (90% v/v), índice de refração, cor e aparência do óleo.

4.2.3.1 Densidade

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

4.2.3.2 Solubilidade em etanol (90%)

Para a determinação da solubilidade, utilizou-se uma mistura de álcool/água a 90% (v/v), mantendo-se constante o volume de óleo e adicionando-se proporcionalmente volumes crescentes da mistura alcoólica até a completa solubilização do óleo.

4.2.3.3 Índice de refração

Na determinação do índice de refração foram utilizados tubos capilares de vidro para adicionar a amostra do óleo diretamente sobre o prisma de Flint do refratômetro, a uma temperatura de 25°C.

4.2.3.4 Cor

A análise foi realizada visualmente, comparando a cor do óleo essencial com as cores conhecidas e já descritas na literatura.

4.2.3.5 Aparência

A técnica utilizada foi visual onde se efetuava uma comparação das essenciais quanto a sua limpidez e transparência.

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

Os constituintes do óleo de canela foram identificados através da técnica cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Foi dissolvido 1,0 mg da amostra em 1000 µL de diclorometano (pureza 99,9%). As condições de análise foram as seguintes:

- Volume injetado: 0,3 µL;
- Coluna : Capilar, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm. HP-5MS, 5% difenil, 95% dimetil polisiloxano (Equivalente DB-5MS ou CP-Sil 8CB LB/MS);
- Gás de arraste: He (99,9995); 1,0 mL/min;
- Injetor : 280 °C, modo Split (1:10);
- Forno: 40 °C (5,0 min.), 240 °C (4°C /min.); 240 °C 300 °C (8°C /min, 7,5 min.); t = 60,0 min;

- Detector : EM; EI (70 eV)
- Modo varredura (0,5 seg/scan),
- Faixa de massas: 40 – 500 daltons (uma)
- Linha transferência: 280 °C.
- Filamento: desligado 0,0 a 4,0 min
- Espectrômetro de massas tipo quadrupolo linear.

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

4.2.5 Amostragem dos caramujos

As amostras dos caramujos vieram dos criadouros naturais do bairro Sá Viana, periferia de São Luis – Maranhão.

4.2.5.1 Coleta dos caramujos

A captura foi realizada nos períodos chuvosos (Janeiro a junho), com utilização de EPI's (equipamento de proteção individual), como luva, bota sete léguas e pinça metálica.

A técnica de coleta consiste em raspar com a concha as áreas submersas e os caramujos recolhidos foram colocados em um recipiente de vidro com tampa, com água do próprio criadouro (BRASIL, 2007). A busca dos mesmos foi em diversos pontos de cada criadouro, a fim de obter uma boa amostragem, depois da coleta foram etiquetados por criadouro e levados para o NIBA, para posteriores análises (Figura 10)



Figura 10 – Coleta de caramujos com concha metálica

4.2.5.2 *Análise para testar positividade dos caramujos*

Foram colocados 05 caramujos em frascos de vidro transparente (com capacidade de 30 mL) com 25 mL de água desclorada, ou seja, 5 mL/caramujos, levado a exposição da luz (lâmpadas de 100 W), com uma distância de 30 cm, durante 1 h, para estimular a liberação das cercárias (SMITHERS & TERRY, 1965 apud SOUZA, 1992). Após exposição, os vidros foram levados para serem analisados, através de visualização com auxílio de uma lupa estereoscópica (8x), aqueles que estavam parasitados (positivos) eram etiquetados e separados para futura análise individual, a fim de verificar qual está contaminado e os que não apresentaram sinais de infecção pelo trematódeo no período de 30 dias foram selecionados para o teste de atividade moluscicida.

Os caramujos foram analisados a cada 07 dias, durante um mês (30 dias) para confirmação da ausência de estágios larvais.

4.2.5.3 Armazenamento dos caramujos após teste da positividade

Os caramujos após teste da positividade foram colocados em recipientes de poliestireno, com água desclorada e alimentados com alface hidropônico, para futuro teste da atividade moluscicida.

4.2.6 Atividade moluscicida

A atividade moluscicida foi realizada através da técnica preconizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), utilizando na análise apenas os caramujos que foram negativos para o teste da positividade.

4.2.6.1 Método da Organização Mundial de Saúde (OMS)

Foram realizados dois testes para o óleo essencial a ser estudado, sendo em triplicata. O primeiro, denominado de teste piloto, foi colocado 10 caramujos adultos, negativos para *S. mansoni* em cada Béquer contendo 500 mL de uma solução obtida da diluição do óleo com água destilada e 0,15mL de Tween 80 (tensoativo) na concentração de 100 mg.L^{-1} , obtendo-se no final uma proporção de 50 mL de solução para cada caramujo e alimentando-os com alface hidropônico *ad.libittum* (MALEK, 1995). Ficaram expostos na solução por 24 h, sob temperatura ambiente. Os caramujos foram removidos da solução, lavados por duas vezes com água desclorada, colocados em cada béquer contendo 500 mL de água desclorada, alimentando-os com alface hidropônico e observados a cada 12 h (método preconiza 24 h), por 4 dias para avaliar a mortalidade.

No segundo teste, denominado de concentração letal (C_L), foram colocado 10 caramujos adultos, negativos para *S. mansoni* em cada béquer contendo 500 mL de uma solução obtida da diluição de cada óleo com água destilada e 0,15 mL de Tween 80 (tensoativo) nas concentrações de 75, 50, 25 e 10 mg.L^{-1} , obtendo-se no final uma proporção de 50 mL de solução para cada caramujo e alimentando-os com alface hidropônico *ad.libittum* (MALEK, 1995).

Ficaram expostos na solução por 24 h, sob temperatura ambiente. Os caramujos foram removidos da solução, lavados por duas vezes com água desclorada, colocados em cada béquer contendo 500 mL de água desclorada, alimentando com alface hidropônico e observados a cada 12 h (método preconiza 24 h), por 4 dias para avaliar a mortalidade.

Para o teste controle, foi utilizado dois testes, no primeiro colocou-se em um vidro transparente 10 caramujos imersos em 500 mL de água desclorada e no segundo 10 caramujos imersos em uma solução com 0,15 mL de Tween 80 em 500 mL de água desclorada e alimentando ambos com alface hidropônico e procedendo-se a análise igual a realizada nos testes anteriores.

Segundo Mccullough e colaboradores (1980), são considerados mortos os moluscos que tiverem sua massa cefalopodal retraída para o interior da concha, liberando a hemolinfa, ou então tornando-se inchado e estende o cefalópode para fora da concha.

4.2.6.2 *Cultura de Artemia salina*

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

4.2.6.3 Análise da toxicidade

Para a avaliação da letalidade de *Artemia salina* Leach, 20 mg do óleo foram adicionados a 0,02 mg de Tween 80, completando-se o volume para 2 mL com salina artificial. Essa diluição foi feita para obtermos solução-mãe de 10 mg/mL e com uma concentração de 0,1% de Tween 80. Amostras de 5, 50 e 500 µL dessa solução-mãe foram transferidas para frascos com 5 mL de solução final, obtendo-se concentrações de 10, 100 e 1000 mg/L, respectivamente. Dez larvas na fase náuplio foram transferidas para cada um dos frascos. O branco (solução salina) foi feito com 20 µL e o controle negativo (solução salina e tween 80 a 0,1%) foi feito com 20 µL. Após 24 horas de incubação, realizou-se a contagem das larvas vivas, considerando-se mortos aqueles microcrustáceos que não se movimentaram durante a observação e nem com a leve agitação do frasco.

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

4.2.7 Análise estatística da concentração letal (CL_{50})

A análise estatística dos dados foi realizada de acordo com o método de REED-MUENCH (1938), o qual parte do princípio de que um animal que sobreviva a certa dose, também irá sobreviver em qualquer outra dose menor que aquela; conseqüentemente o animal que morrer com certa dose, também irá morrer em doses maiores que aquela. A partir de uma tabela contendo os dados de mortalidade para cada concentração testada, é construído um gráfico onde se observa uma curva para o acúmulo de animais mortos em cada concentração e outra curva para o acúmulo de sobreviventes. O ponto de intercessão entre as curvas é a Concentração Letal 50% (CL_{50}), pois nesse ponto o número de animais sobreviventes é igual ao número de animais mortos (COLEGATE & MOLYNEUX, 1993).

O intervalo de confiança foi calculado segundo o método de Pizzi (1950) no qual se constrói um gráfico do percentual de mortos *versus* logaritmo (log) da dose. A seguir determina-se o valor de “R”, que é a diferença entre o log da dose que mata 75% das larvas e o log da dose que mata 25% das larvas. Calcula-se também a variável “h” que consiste na média das diferenças dos valores de log das doses. Com esses dados determina-se o log do erro padrão (SE), através da Equação 2.

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

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

Capítulo 5



*Resultados e
Discussão*

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Avaliação das características físico-químicas do óleo essencial de canela

Em geral, os óleos essenciais na presença de oxigênio, luz, calor, umidade e metais são muito instáveis, sofrendo inúmeras reações de degradação, o que dificulta a sua conservação, fazendo com que o seu processo de armazenamento seja fundamental para a manutenção de sua qualidade (SIMÕES et al., 2003).

De acordo com Simões e Spitzer (1999), pesquisadores comentam ainda que, os óleos essenciais obtidos de diferentes órgãos de uma mesma planta, podem apresentar composição, caracteres e odores distintos (VITTI et al., 2003). Portanto, a qualidade do óleo essencial é considerada um fator básico a ser vinculado à sua obtenção, fazendo com que a realização de amostras constantes seja de grande importância para a avaliação de suas características e, desse modo, serem prevenidos problemas na sua comercialização e uso (VITTI et al., 2003).

A Tabela 1 mostra as características físicas do óleo essencial extraído das folhas da canela no período de junho a setembro de 2010. Observa-se que o óleo apresentou uma densidade bem próxima à densidade da água, no qual vem sustentar a dificuldade encontrada durante o processo de extração pelo sistema Clevenger (SIMÕES et al., 2004). Segundo (MARINI et al., 2005), esses valores podem sofrer variações atribuídas à diferença de época de colheita, tipo de solo, clima da região, tempo de secagem e umidade relativa do ar, no dia da colheita.

Investigando os componentes do óleo extraído das folhas da canela, Miyazawa e Kameoka (2008) obtiveram um valor da densidade de 1.15 g/mL e Jirovetz (2001) de 0,993 g/mL. Para o índice de refração, Tripathi, Dubey e Shukla (2008) obtiveram um valor de 1,4842 e Jirovetz (2001) de 1,4826. No que diz respeito a solubilidade, o valor obtido por Jirovetz (2001) foi de 1:2(álcool 90%).

Tabela 1 – Características físicas do óleo essencial extraído das folhas da espécie *Cinnamomum zeylanicum* Breyn.

Características físico-químicas	Óleo de canela
Densidade (g/mL)	1,023
Índice de refração (N_D 25°)	1,533
Solubilidade em álcool a 70% (v/v)	1:1
Rendimento (mL)	1,3
Cor	Amarelo
Aparência	Límpido
Rendimento (m/m) (%)	4,43

Comparando os valores para o óleo essencial estudado com os da literatura, pode-se observar que há similaridade entre eles, no que diz respeito aos parâmetros analisados. As pequenas diferenças nos valores encontrados podem ser atribuídas a fatores tais como época de coleta, diferentes tipos de solo, condições e tempo de armazenamento (KOKETSU et al., 1997).

5.2 Avaliação da cinética de extração e rendimento dos óleos essenciais

Devemos sempre levar em conta as condições de extração de óleos voláteis, pois a mesma é uma etapa muito importante, por ser um fator determinante na relação entre a composição química e a qualidade do óleo extraído.

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

A extração do óleo essencial estudado foi realizada num tempo de 5 horas para uma massa de 30g/amostra, com uma temperatura de 100°C. Pode-se observar o tempo máximo de extração dos óleos conforme a Tabela 2.

Tabela 2 – Rendimentos da extração do óleo de canela

Tempo de extração (h)	Quantidade extraída (mL)
0	0
1	0,3
2	0,6
3	0,8
4	1,3

O rendimento da extração do óleo de canela é mostrado na Figura 11.

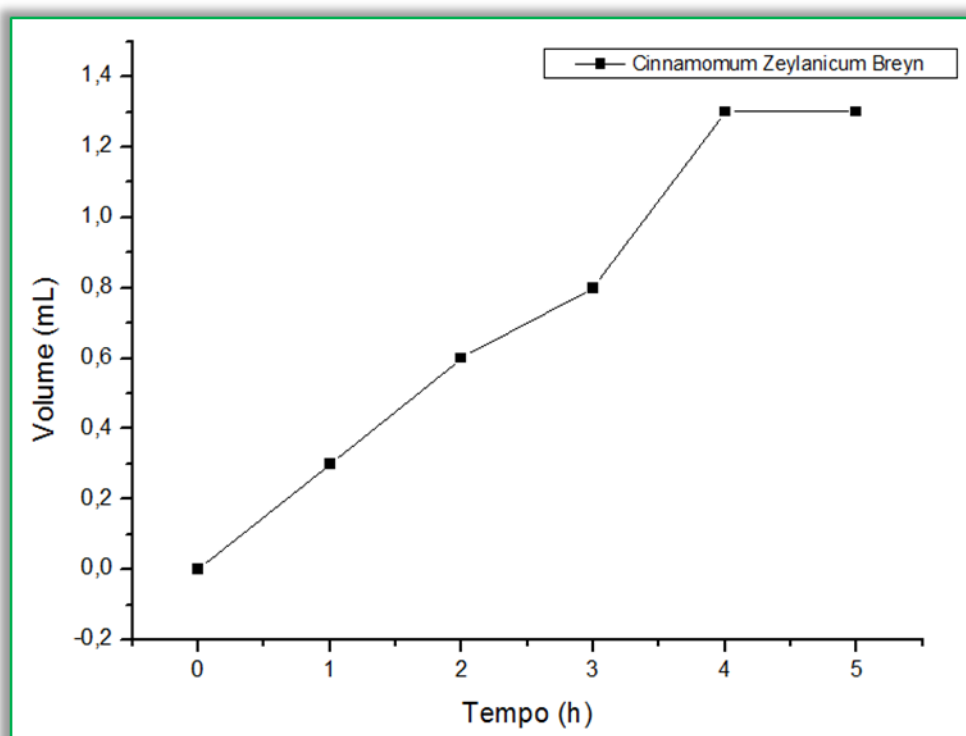


Figura 11 – Cinética referente à extração do óleo essencial da canela em função do tempo, com massa de 30g e temperatura de 100°C.

Analisando a Figura 11 observamos que o tempo máximo de rendimento do óleo essencial em estudo e o volume obtido, com relação as folhas da canela quanto ao tempo foi de 4,0 horas para um volume de óleo essencial igual a 1,3 mL; sendo que quando chegou em 5 horas, o volume permaneceu constante.

O rendimento da extração foi calculado através da quantidade de óleo que se obteve a partir de uma determinada massa do vegetal. Neste experimento partiu-se de uma massa constante do óleo estudado sendo obtido um determinado

rendimento: para as folhas da canela. O rendimento m/v foi de 4,33% e como a densidade do óleo foi determinada em 1,023 g.mL⁻¹ (Tabela 1) então o rendimento m/m foi calculado em 4,43%.

Observou-se que grande parte do óleo essencial é extraída nas primeiras horas da destilação, mantendo os níveis de rendimento satisfatório até 4 horas. Logo após as 4 horas a destilação cessa e a hidrodestilação está completa para as folhas da canela. O rendimento determinado está acima da faixa de valores encontrados na literatura. O valor encontrado foi confirmado segundo os autores (GUENTHER, 1950; PURSEGLOVE, 1981) de 0,2 a 2,0 mL nas cascas e de 0,7 a 1,2 mL (GUENTHER, 1950; PURSEGLOVE, 1981; VERNON et al., 1976) nas folhas (KOKETSU et al., 1997).

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

5.3 Avaliação das características químicas do óleo essenciais obtida por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

O cromatograma do óleo essencial extraído das folhas da *cinnamomum zeylanicum* Blume. (canela) obtido na análise de CG/EM pode ser observado na Figura 12. Os picos cromatográficos foram identificados através da comparação dos respectivos espectros de massa com os dados das espectrotecas (1) WILEY 139; (2) NIST107 e (3) NIST21.

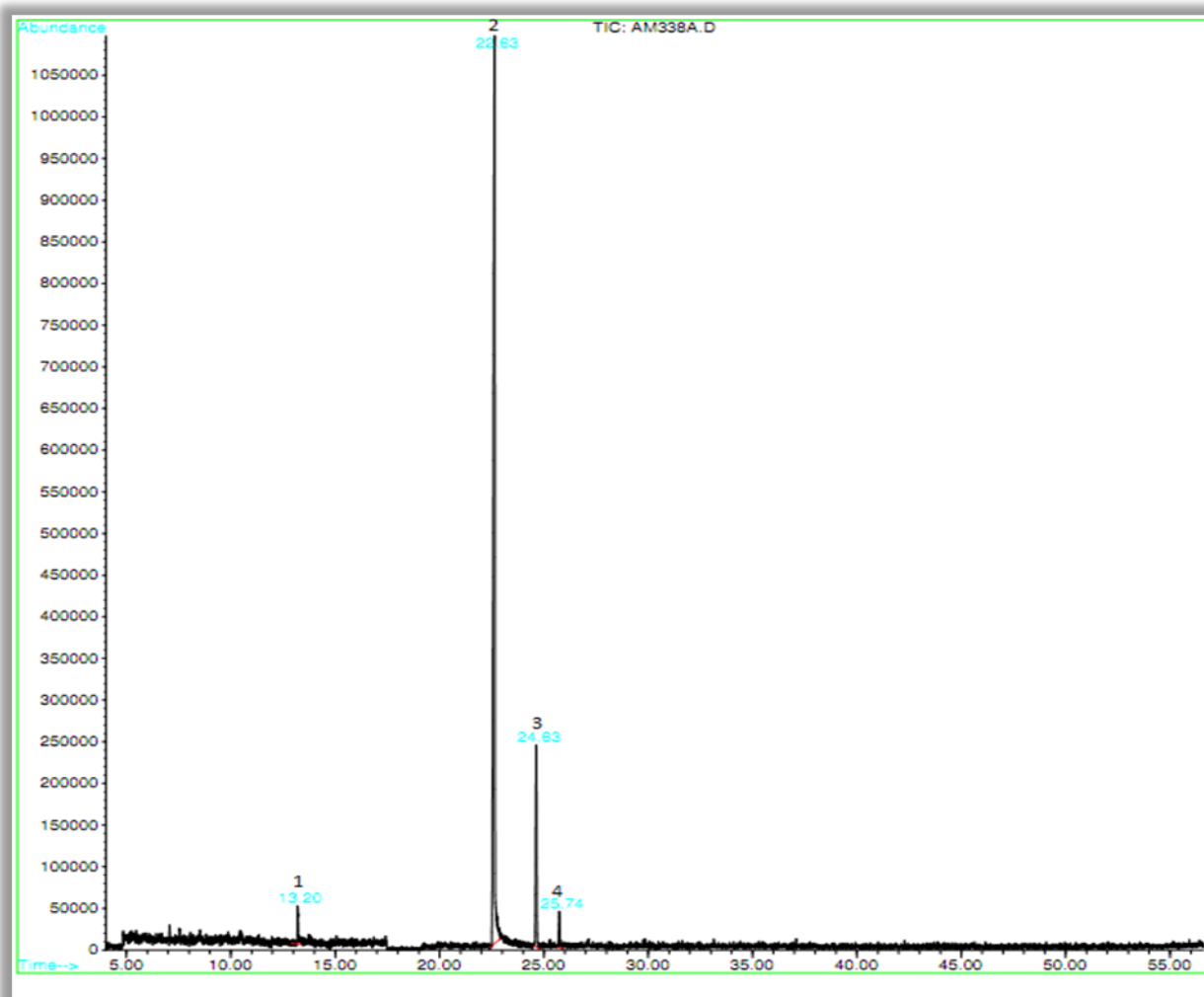


Figura 12 – Íon-cromatograma da amostra do óleo das folhas da *Cinnamomum zeylanicum* Blume. (Canela), apresentando os picos selecionados e identificados através da comparação dos respectivos espectros de massas com a espectroteca.

Na Figura 12 apresentam-se quatro picos cromatográficos, sendo que o pico cromatográfico 1 é o Linalol, cujo tempo de retenção foi 13,20 min; o pico cromatográfico 2 é o Eugenol, com tempo de retenção 22,63 min; o pico cromatográfico 3 é o Cariofileno, o qual apresentou o tempo de retenção 24,63 min; o pico cromatográfico 4 é o Humuleno, cujo tempo de retenção foi 25,74 min, sendo que o que apresentou maior rendimento foi o Eugenol.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3, os compostos identificados no óleo essencial extraídos das folhas da *cinnamomum zeylanicum* Blume. estão em ordem de tempo de retenção.

Tabela 3 – Compostos identificados na amostra do óleo essencial extraído da canela

Pico ¹	tr ² (min.)	Componentes	% A ⁴	Qualidade ⁵
1	13,20	Linalol	2,68	80
2	22,63	Eugenol	82,67	98
3	24,63	Cariofileno	12,18	97
4	25,74	Humuleno	2,47	72

Nota: ¹Número do pico pela ordem de eluição da coluna; ²tr: Tempo de retenção dos composto na coluna em minutos; %A⁴: Porcentagem da área normalizada a qual indica a distribuição relativa dos componentes na amostras e Qualidade⁵: índice de pesquisa na base de dados que reflete a similaridade do espectro de massas obtido com os registros nas bibliotecas utilizadas.

Como pode ser observado na Tabela 3 foram identificados quatro componentes na amostra, sendo o constituinte majoritário do óleo o eugenol com 82,67%, seguido do Cariofileno com 12,18%, do Linalol com 2,68% e por último do Humuleno apresentando 2,47%.

A Figura 13 mostra o espectro de massas correspondente ao constituinte majoritário identificado no óleo essencial e os possíveis fragmentos.

Comparando os compostos extraídos das folhas da canela com a literatura, iremos notar que o constituinte Cariofileno pode ser encontrando também na forma Trans e Cis já o Humuleno também ser encontrado na forma α ou β .

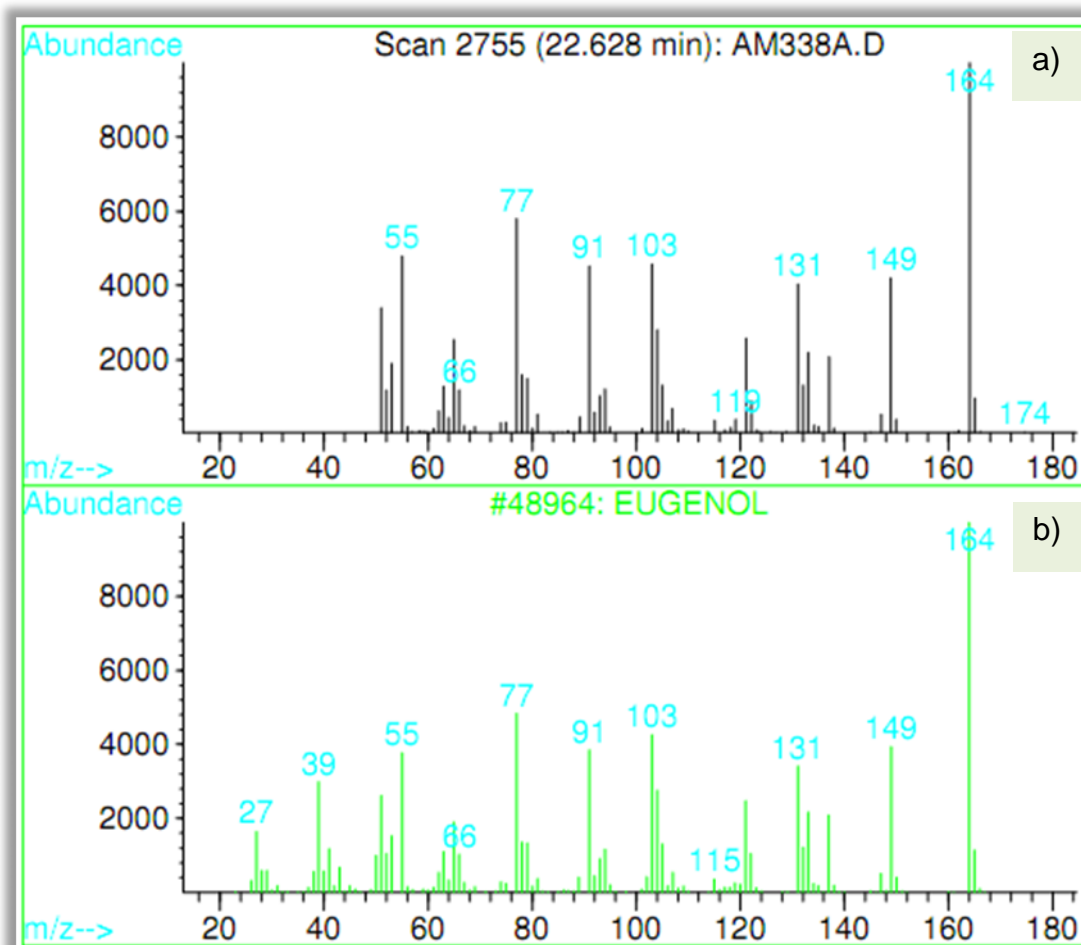


Figura 13 – Espectros de massas: composto majoritário (eugenol) da amostra referente ao pico 2 do cromatograma (a) e proposta de identificação através da espectroteca NIST02 (b).

O pico intenso com $m/z=164$ [M^+], correspondente à fórmula $C_{10}H_{12}O_2$ mostra a presença majoritária do componente eugenol no óleo. Conforme Silverstein; Webster; Kiemle (2007) os fenóis apresentam um pico intenso correspondente ao íon molecular, o que facilita a sua identificação.

Segundo Silverstein; Webster; Kiemle (2007) a quebra de fenóis e éteres aromáticos mostram ainda picos típicos, sendo o pico $m/z=149$ [$M - 15$] característico da perda do radical metila ($CH_3\cdot$) e os picos $m/z=77$ e $m/z=65$ são correspondentes aos íons [$C_6H_5^+$] e [$C_5H_5^+$], respectivamente, originados por rearranjo – com a saída do grupo CO; já o fragmento com pico em $m/z=133$ [$M - 31$] é referente à perda do grupo OCH_3 da molécula do eugenol.

Conforme Cortez et al. (1998) o mecanismo de fragmentação dos principais picos característicos formados pelo eugenol são mostrados na Figura 14.

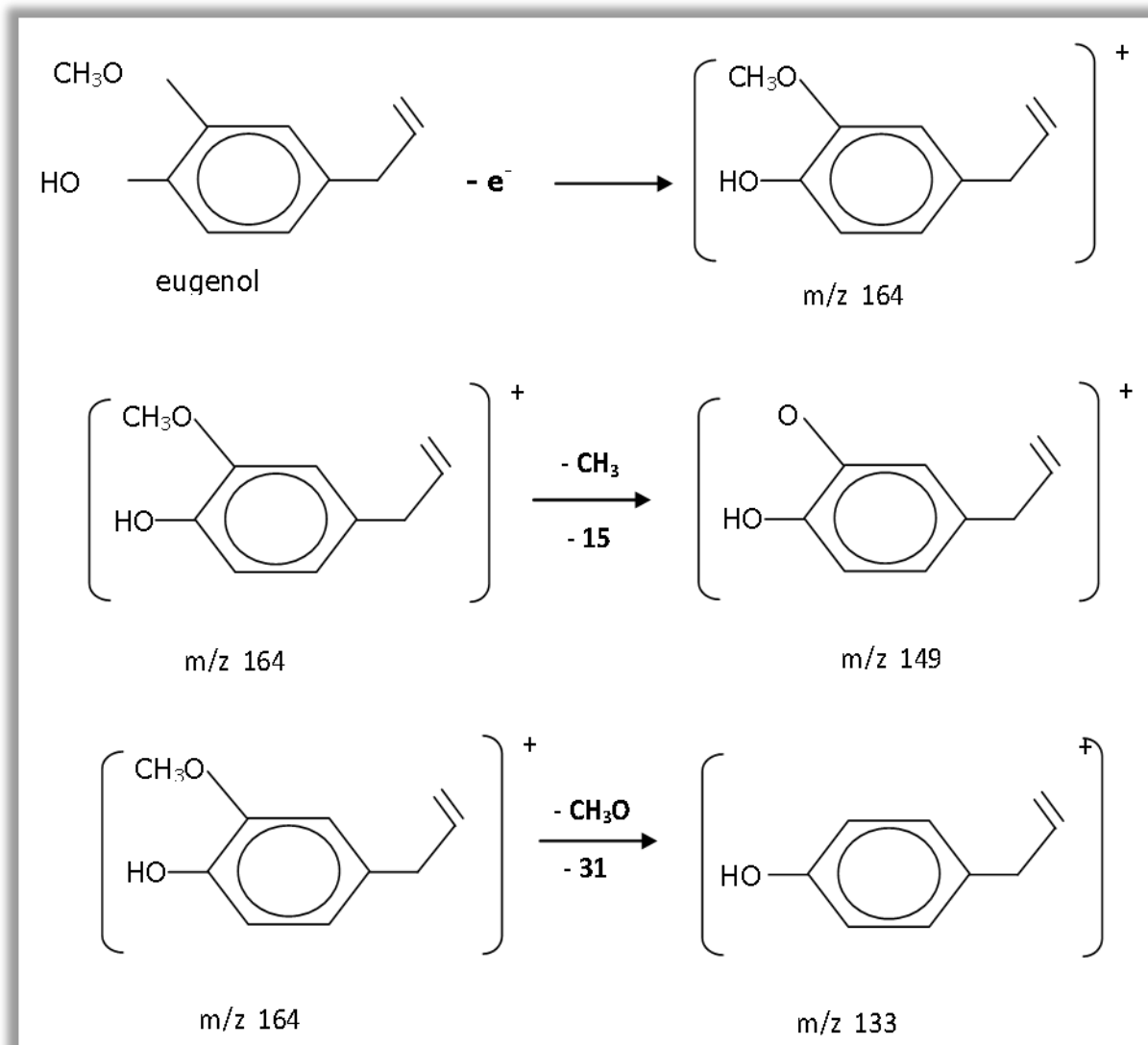


Figura 14 – Fragmentação do eugenol.

Um dos compostos do óleo de canela que pode ser o grande responsável pela ação bactericida, fungicida, anestésico, anti-séptico, anticoagulante, antioxidante, inseticida, repelente, efeito alelopático é o composto majoritário eugenol como mostra a Tabela 3, porém os outros componentes podem também influenciar no processo.

5.4 Avaliação do teste de toxicidade

As culturas de *Artemia salina* foram incubadas a temperatura média de aproximadamente 28 °C, sendo feita a leitura do número de mortos após 24 horas. Foram consideradas larvas mortas todas que não apresentavam qualquer movimento ativo em um tempo de observação. A Tabela 4 mostra a média dos testes de toxicidade do óleo extraído das folhas de canelas.

Tabela 4 – Mortalidade das larvas após testes nas diferentes concentrações do óleo essencial extraído das folhas da canela

Concentração (mg.L ⁻¹)	Log Concentração	Mortos	Vivos	Acumul. Mortos	Acumul. Vivos	Mortalidade (%)
1000	3	10	0	14	0	100
100	2	3	7	4	7	30
10	1	1	9	1	16	10

Na Figura 15 observa-se a taxa de percentagem da mortalidade das larvas frente ao óleo.

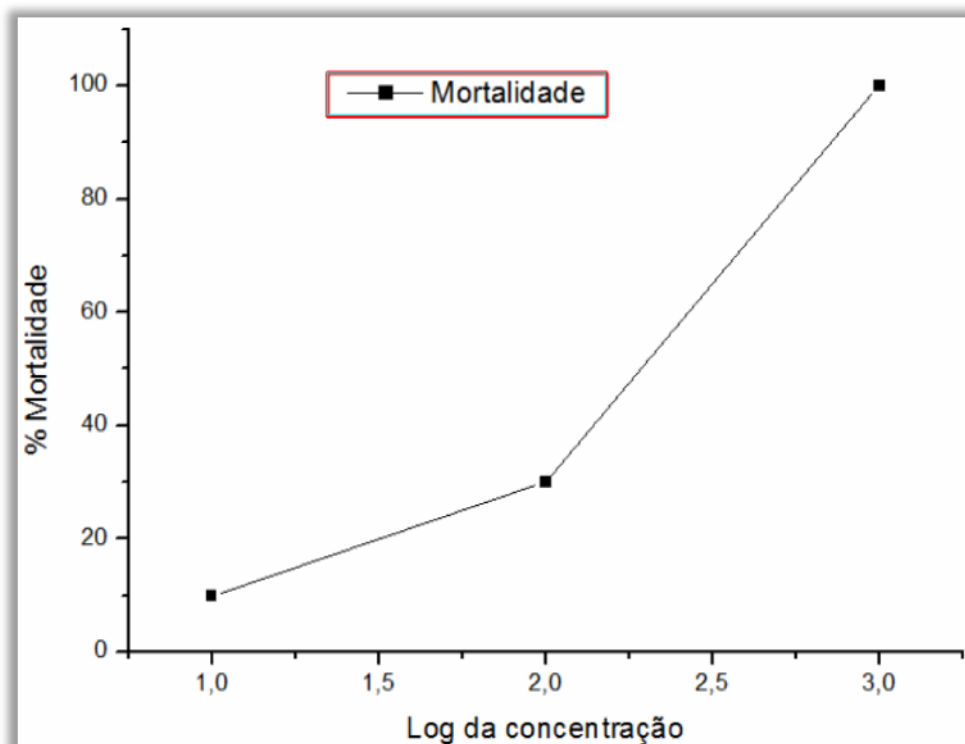


Figura 15 – Taxa de percentagem de mortalidade das larvas, nas diferentes concentrações do óleo essencial da canela.

A Concentração Letal 50% (CL_{50}) do óleo essencial foi encontrado próxima ao Logaritmo da concentração 2,21, sendo calculada através da intersecção das curvas de acumulados mortos e vivos, como mostra a Figura 16.

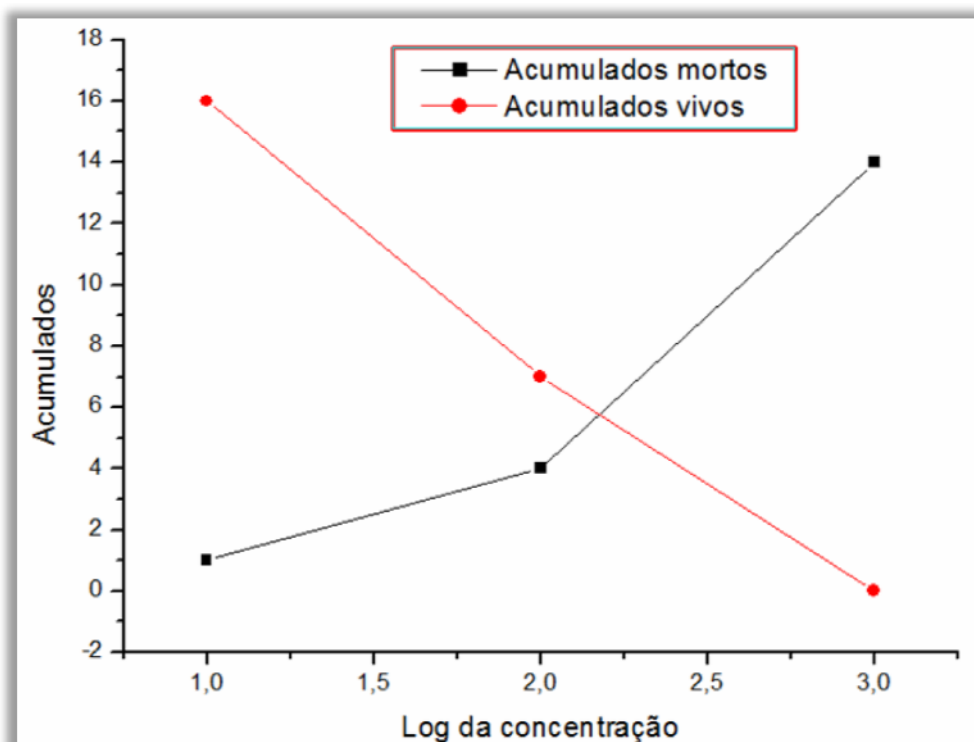


Figura 16 – Estimativa da CL_{50} do óleo essencial da canela pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de Larvas vivas e mortas em função do logaritmo da concentração aplicada. A CL_{50} é o ponto de intersecção das duas curvas

No bioensaio de letalidade das larvas de *Artemia salina*, os dados foram calculado utilizando o método Reed-Muench e expressos como CL_{50} (Concentrações letais 50%). As amostras que apresentam CL_{50} menor que 80 mg.L^{-1} , são consideradas altamente tóxicas; com CL_{50} entre 80 a 250 mg.L^{-1} , moderadamente tóxicas e com CL_{50} maior que 250 mg.L^{-1} , baixa toxicidade ou atóxicas (DOLABELA, 1997).

Conforme Dolabela (1997), a avaliação da toxicidade do óleo essencial nas concentrações testadas frente ao microcrustáceo *Artemia salina*, mostrou, no período de exposição de 24 horas, toxicidade moderadamente tóxico, ou seja, CL_{50} (mg.L^{-1}) igual a 162,1, com um intervalo de confiança de 95% a $2,80 \text{ mg.L}^{-1}$ para o óleo extraído da folha da canela.

Através de estudos feitos por Nascimento (2004) e Monteiro (2008), do uso dos óleos extraídos do rizoma de *Zingiber officinale Roscoe* e das folhas de Pimenta dióica Lindl respectivamente, como agente bactericida, fungicida entre outras; assim o uso para fins de atividade larvicida requer cuidados mais criteriosos, necessitando ainda de maiores estudos sobre seu potencial de intoxicação, a fim de assegurar a saúde de seus usuários.

5.5 Avaliação do teste controle

Depois do período de exposição, ou seja, 24 h observou-se que não houve mortalidade das larvas, conforme demonstrado na Tabela 5.

Tabela 5 – Avaliação da mortalidade do teste controle para as larvas da artemia salina

Controle	Reagentes	Mortalidade
Branco 1	Solução salina	Todas as larvas ativas
Branco 2	Solução salina + tween 80 a 0,1%	Todas as larvas ativas

Conforme Dolabela (1997), a avaliação da toxicidade do óleo essencial na concentração indica a importância do ensaio de toxicidade geral, para comprovar a segurança contra organismos não-alvo nas regiões de ocorrência dos caramujos. Na literatura não foi encontrado estudos referentes à toxicidade de plantas deste gênero.

5.6 Captura e teste da positividade dos caramujos

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

5.7 Avaliação da atividade moluscicida

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

5.8 Avaliação do teste piloto

Neste estudo foi realizado um teste piloto com os óleos essenciais, na concentração de 100 mg.L⁻¹. O percentual de mortalidade pelo tempo de exposição e observação são mostrados na Figura 17.

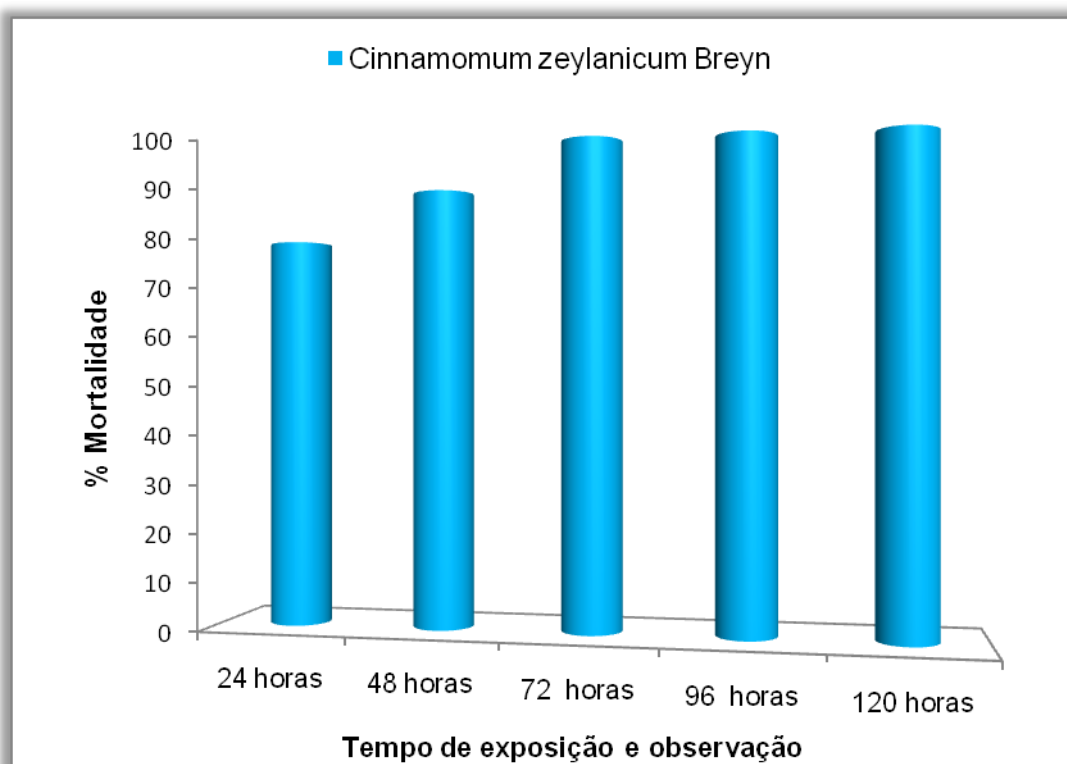


Figura 17 – Percentual de mortalidade dos caramujos por tempo de exposição e observação para o teste piloto

Embora o óleo essencial extraído da espécie de planta em estudo já tenham algumas publicações em atividades biológicas, a sua atividade moluscicida, na literatura consultada, ainda não havia sido avaliada. Esta é a primeira vez que esse óleo é submetido a ensaios de atividade moluscicida contra caramujos adultos do gênero *Biomphalaria glabrata*.

Inicialmente, foram realizados os testes pilotos na concentração de 100 mg.L⁻¹ para verificar se existe ou não atividade moluscicida do óleo. O estudo mostrou que o óleo extraído das folhas da *Cinnamomum zeylanicum* Breyn eliminou 80% dos caramujos exposto no período de 24 horas, notando-se ainda hemorragia, e no tempo de 72 horas 100% dos caramujos haviam morrido. Caracterizando assim que o óleo possui componentes capazes de eliminar os caramujos adultos do gênero *Biomphalaria glabrata*.

5.9 Avaliação da concentração letal

Para o óleo essencial foram realizados testes nas concentrações de 100, 75, 50, 25 e 10 mg.L⁻¹, onde determinou-se a menor concentração letal.

Para avaliação da concentração letal do óleo essencial extraído da folha da canela pode-se observar na Figura 18 os percentuais de mortalidade pela concentração e na Figura 19 os percentuais de mortalidade pelo tempo.

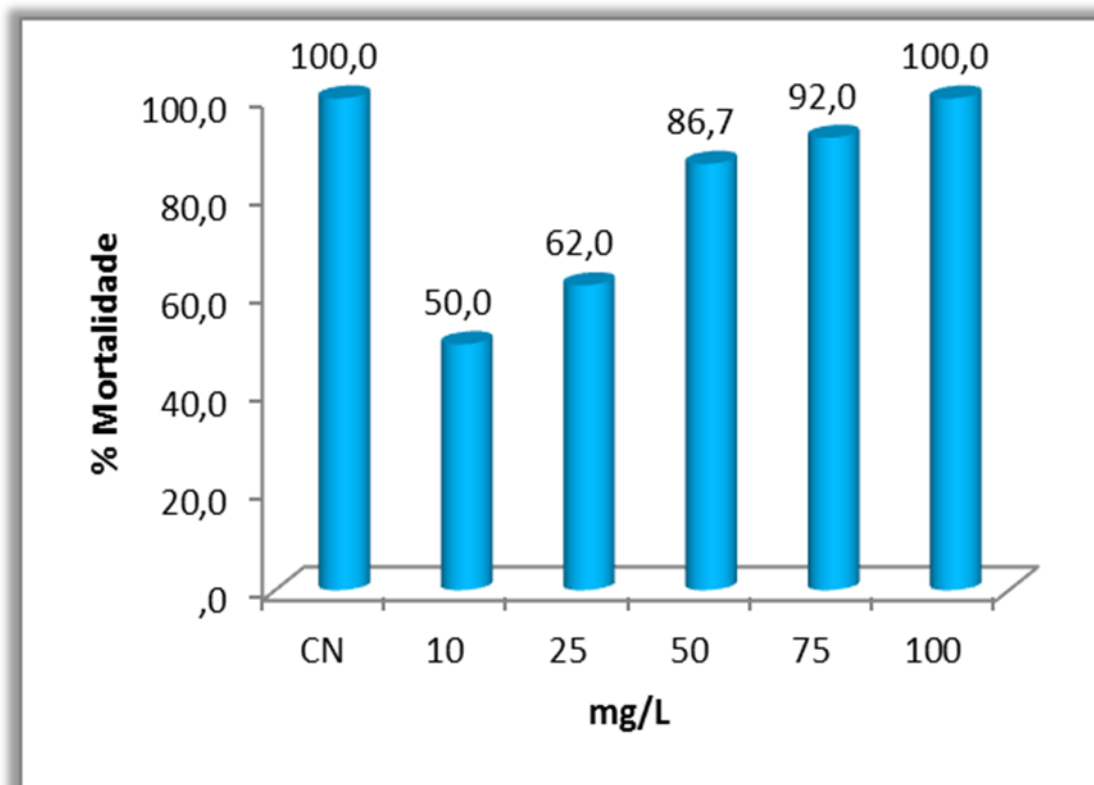


Figura 18 – Percentual de mortalidade pelas concentrações do óleo essencial extraído da canela.

A Figura 18 mostra que a mortalidade está diretamente ligada ao aumento da concentração do óleo de canela, ou seja, conforme a concentração aumenta a mortalidade também aumenta. Comparamos ainda a mortalidade com a condição de normalidade (CN), usado como parâmetro na determinação da mortalidade. Quando comparamos a CN com a mortalidade, observa-se que a concentração que mais se aproxima da mesma é a de 100 mg.L⁻¹, sendo que as demais são inferiores a ela.

Quando comparamos a concentração (mg.L⁻¹) Figura 18 com o tempo (h) Figura 19 observamos que com o aumento da concentração e do tempo a mortalidade também aumenta, ou seja, denotando assim que o tempo é indicador de mortalidade. Observa-se ainda que na Figura 19, que conforme o tempo passa a mortalidade aumenta e quando o tempo chega em 120 horas, a mortalidade é de quase 90% isso demonstra que óleo de canela tem ação gradativa quando aplicado como moluscicida.

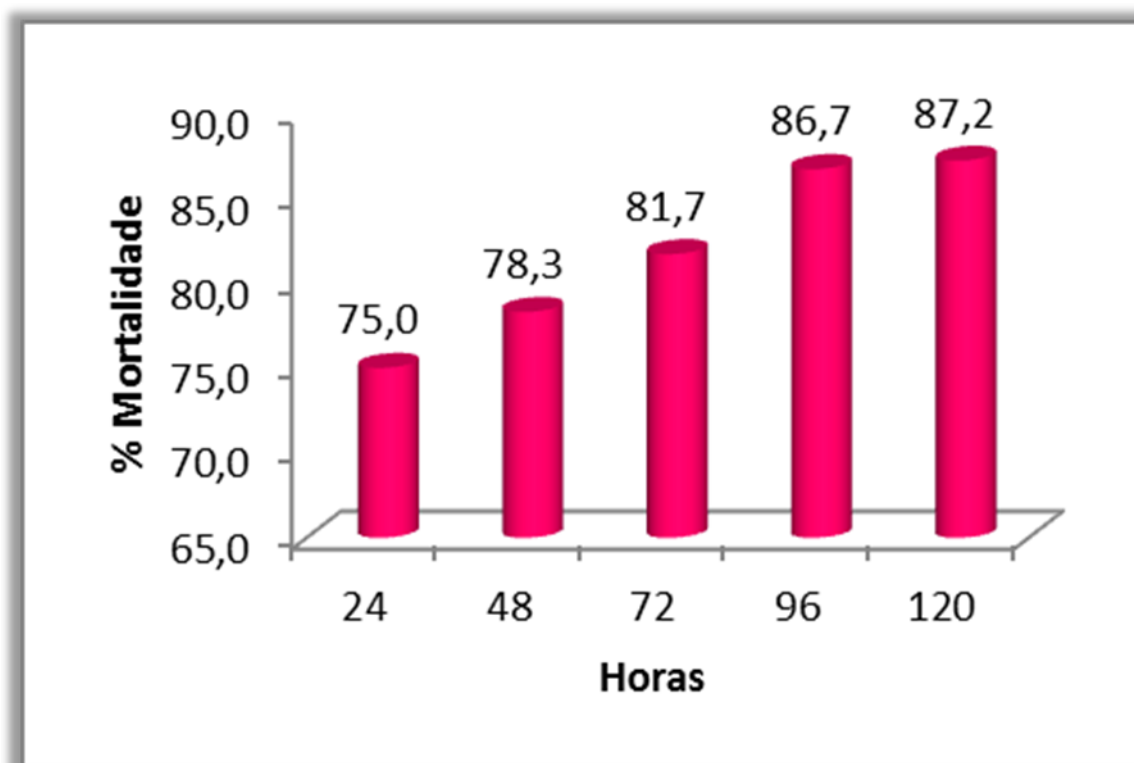


Figura 19 – Percentual de mortalidade pelo tempo do óleo essencial da canela

Para cada concentração em um determinado tempo em (h) o teste foi realizado em triplicata e os dados sobre o número de caramujos vivos e mortos foram encontrados através de uma média das três repetições para cada uma das cinco concentrações testadas (Tabela 6).

Tabela 6 – Mortalidade dos caramujos após testes em várias concentrações do óleo essencial extraído das folhas da canela

Concentração (mg.L ⁻¹)	Log Concentração	Mortos	Vivos	Acumul. Mortos	Acumul. Vivos	Mortalidade (%)
100	2	10	0	38	0	100
75	1,8751	9	1	28	1	90
50	1,699	8	2	19	3	80
25	1,398	6	4	11	7	60
10	1	5	5	5	12	50

A taxa de percentagem da mortalidade dos caramujos frente ao óleo da *Cinnamomum zeylanicum Breyn.*, o que observa-se é que a mortalidade é diretamente proporcional ao logaritmo da concentração, ou seja, quando o logaritmo da concentração aumenta, a taxa de mortalidade também aumenta, conforme mostra o gráfico da Figura 20.

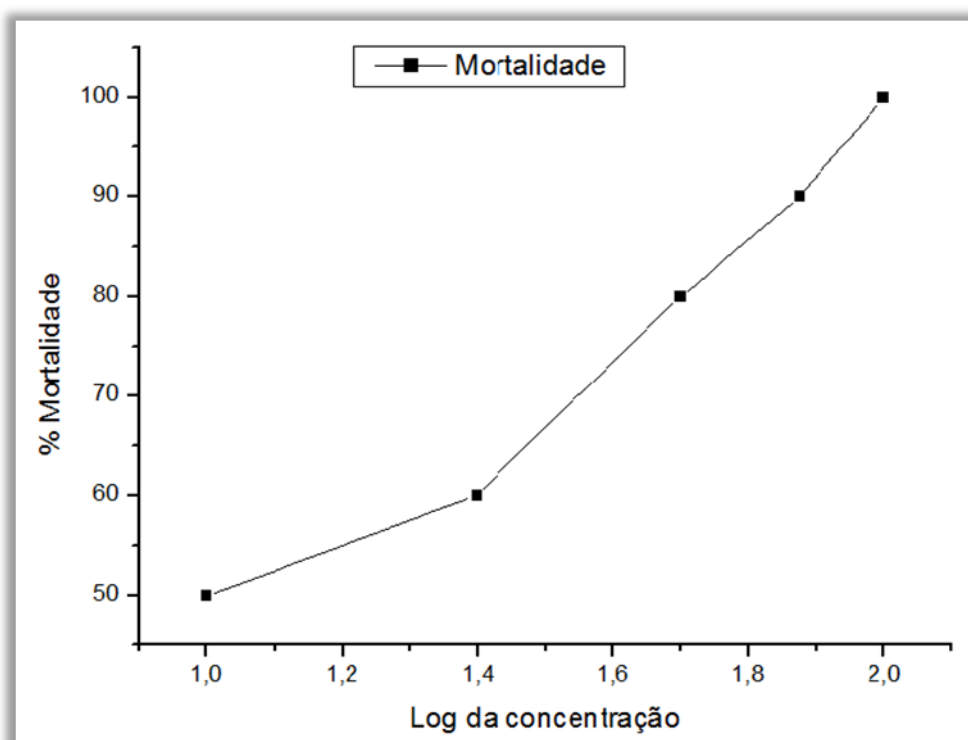


Figura 20 – Taxa de mortalidade dos caramujos nas cinco concentrações diferentes do óleo essencial da canela.

A Figura 21 mostra que a Concentração Letal 50% (CL₅₀), foi encontrada próxima ao Logaritmo da concentração 1,27 calculada através da intersecção das

curvas de acumulados mortos e acumulados vivos, tendo como resultado a concentração letal de $18,62 \text{ mg.L}^{-1}$ com um intervalo de confiança de 95% a $2,18 \text{ mg/L}$. A CL_{50} é o ponto de intersecção das duas curvas.

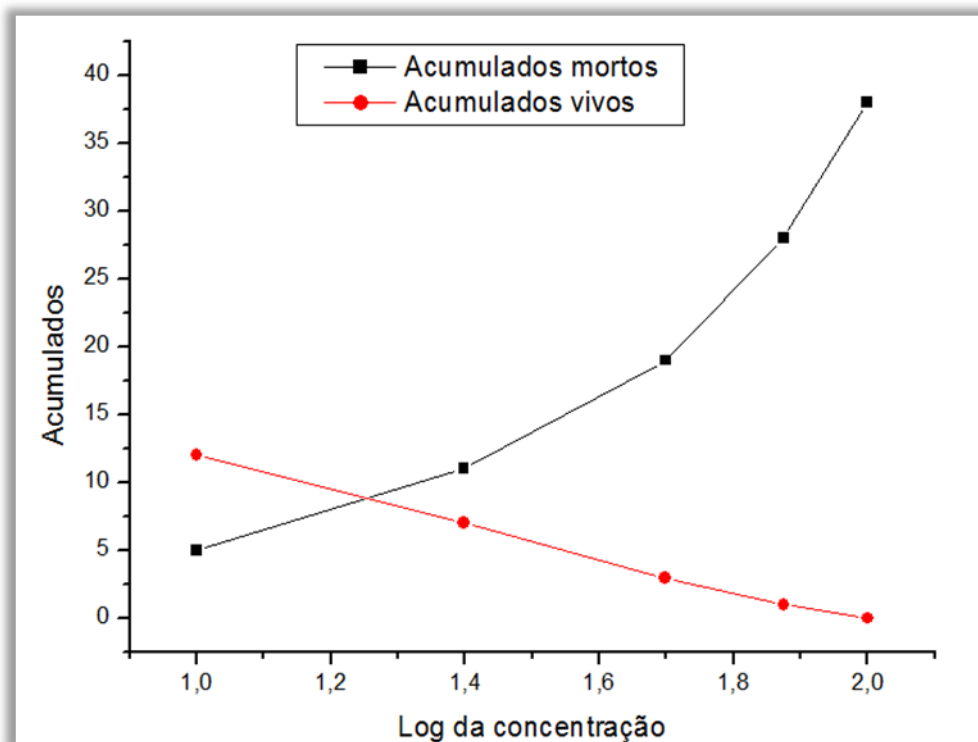


Figura 21 – Estimativa da CL_{50} do óleo essencial da canela pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de caramujos vivos e mortos em função do logaritmo da concentração aplicada.

O resultado encontrado, em termos de potencial moluscicida, obtido com o óleo essencial da folha da *Cinnamomum zeylanicum Breyn*, onde a concentração letal em 50% (CL_{50}) foi de $18,62 \text{ mg.L}^{-1}$, entando dentro do estabelecido pela OMS (1983), na qual indica que a planta só deva ser considerada moluscicida quando a mortalidade nas concentrações iguais ou inferiores a 20 mg.L^{-1} para extratos e 100 mg.L^{-1} para o vegetal bruto e possam ser submetidos a ensaios em campo.

5.10 Avaliação do teste controle

Passado do período de exposição, ou seja, 120 h observou-se que não houve mortalidade dos caramujos, conforme mostrado na Tabela 7.

Tabela 7 – Avaliação da mortalidade do teste controle para os caramujos na Figura 22.

Controle	Reagentes	Mortalidade
Branco 1	Água desclorada	Todos os caramujos ativos
Branco 2	Água desclorada + tween 80 a 0,1%	Todos os caramujos ativos

Podemos concluir que os caramujos permaneceram ativos e se alimentando, não havendo interferência na bioatividade como pode ser visto na Figura 22.



Figura 22 – Grupo controle do branco e do Tween 80

Capítulo 6



Conclusão

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos nos estudos analíticos e na avaliação da toxicidade e atividade moluscicida dos óleos essenciais extraídos da folha *Cinnamomum zeylanicum Blume.*, podemos concluir que:

- O rendimento do óleo essencial extraído das folhas da *Cinnamomum zeylanicum Blume.* (canela) foi de 4,43%, ficando acima de valores encontrados na literatura para extração por hidrodestilação;
- Os parâmetros físico-químicos dos óleos essenciais estudados apresentaram valores semelhantes ao obtidos pela literatura;
- A caracterização por CG-EM permitiu identificar os componentes majoritários e minoritários do óleo em estudo, para o extraído das folhas da *Cinnamomum zeylanicum Blume.*, o componente majoritário foi o eugenol com teor de 82,67% no tempo de retenção de 22,63 min e o componente minoritário foi o Humuleno com teor de 2,47%, no tempo de retenção de 25,74min;
- O ensaio biológico com *Artemia salina* para a concentração letal 50% (CL₅₀) realizado com o óleo essencial em estudo, mostrou que o extraído das folhas da *Cinnamomum zeylanicum Blume.*, apresentou resultado, de 162,1 mg.L⁻¹, com um intervalo de confiança de 95% a 2,80 mg.L⁻¹ sendo considerado moderadamente tóxico, segundo critérios de Dolabela (1997), indicando a importância deste ensaio.
- Para o teste piloto, a atividade moluscicida dos óleos apresentou uma mortalidade de 100% em 72 h, indicando a presença de componentes tóxicos nos óleos frente ao caramujo da espécie *Biomphalaria glabrata*;
- A atividade moluscicida do óleo essencial extraído das folhas da *Cinnamomum zeylanicum Blume.* obteve resultado referente à concentração letal 50% de 18,62 mg.L⁻¹ com um intervalo de confiança de 95% de 2,18 mg.L⁻¹, abaixo do preconizado pela organização mundial de saúde (OMS), ou seja, (CL₅₀) ≤ a 20 mg.L⁻¹ mostrando-se, portanto, ser ativo frente ao caramujo *Biomphalaria glabrata*.

Capítulo 7



*Perspectivas
Futuras*

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Extrair os óleos essenciais das folhas da *Cinnamomum zeylanicum* Blume. (canela), por meio de outras técnicas de extração e comparar os rendimentos obtidos;

- Isolar e testar atividade moluscicida e toxicidade dos componentes majoritários e minoritários dos óleos essenciais;

- Avaliar a atividade moluscicida e toxicidade da planta estudada, utilizando somente os extratos brutos.



Referências

REFERÊNCIAS

- ABDEL-GAWAD, M.; EL-SAYED, M. M.; ABDEL-HAMED, E. S. **Molluscicidal steroidal saponins and lipid content of agave decipiens**. *Fitoterapia*, n.70, p.371-381, 1999;
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Illinois: Allured, 1995. p. 118.
- ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, A. ZANI, C. L. **Biological screening of Brazilian medicinal plants**. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 95, p. 367-373, 2000.
- ANGELO, P.M.; JORGE, N. Evaluation of stored sunflower oil with the addition of antioxidants. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 2, p. 498-502, 2008.
- ARCHIBALD, R. G. The use of the fruit of the tree *Balanites aegyptiaca* in the control of schistosomiasis in the Sudan. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 27, p. 207-210, 1933.
- BALMÉ, F. **Plantas Mediciniais**. São Paulo: Hemus, 1978
- BARBOSA, C. S.; PIERI, O. S.; SILVA, C. B.; BARBOSA, F.S. **Ecoepidemiologia da esquistossomose urbana na ilha de Itamaracá**. Estado de Pernambuco. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo 34: 4, 2000.
- BARBOSA, S. **Ervas milagrosas enriquecem o capital estrangeiro**. ONG Conhecer para preservar. Disponível em: <<http://www.conhecerparaconservar.org/opini%C3%A3o/not%C3%ADcias/descricao.asp?NewsID=1687>> Acesso em: dez 2010.
- BENARROZ, M. O. et al. **Cinnamomum zeylanicum extract on the radiolabelling of blood constituents and the morphometry of red blood cells: in vitro assay**. *Applied Radiation and Isotopes*, v. 66, n. 2, 139-146, 2008.
- BERNALE, J. V. **Planta medicinales amazônicas: realidade y perspectiva**. Lima: TCA, 1984.
- BERNARD, T. et al. Extraction of essential oils by refining of plant materials. II. Processing of products in the dry state: *Illicium verum* Hooker (fruit) and *Cinnamomum zeylanicum* Nees (bark). **Flav. Fragr. J.**, v. 4, p. 85-90, 1989.
- BRASIL, Ministério Da Saúde. **Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: diretrizes técnicas: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE)** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica.– 2. ed. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2007.

BUDZIKIEWICZ, H.; DJERSSAI, C.; WILLIAMS, D. H. **Structure elucidation of natural products by mass spectrometry. II: steroids, terpenoids, sugars and miscellaneous class.** Amsterdam: Holden-Day, 1964. 306p.

CÁCERES, A. **Plantas de uso medicinal en guatemala.** 1. ed. Universitaria: San Carlos de Guatemala, 1996. p. 61, 67, 167, 236, 283, 325, 328.

CALIXTO, J. B SANTOS, A.R.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. **Extract and compounds obtained from *Mandevilla velutina* inhibit arachidonic acid induce ear oedema im mice, but not rat stomach contraction.** Prostaglandins, v. 41, n. 15, p. 515-526, 1997.

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

CÂMARA, E. **Sem proteção, indústria perde mercado para estrangeiros.** Jornal Vida Integral .Disponível em: <<http://www.vidaintegral.com.br/complem/fitoterapicos.php>> Acesso em: dez. 2010.

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

CAVALCANTE, M. F. et al. Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* leach. **Química Nova**, v. 23, n. 1, São Paulo, 2001.

CAVICCHIOLI, M. **Análise de óleos essenciais de frutas cítricas por cromatografia gasosa de alta resolução (colunas capilares).** São Carlos: USP, 1986. 38p. Monografia (Graduação) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1986.

CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

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

CHEVALIER, A. **The encyclopedia of medicinal plants: a practical reference guide to more than 550 key medicinal plants and their uses.** New York: DK Publishing Book, 1996.

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

CLAY, J. W. CLEMENT, C. R.; CL.; SAMPAIO, P. de T. B. **Selected species and strategies to enhance income generation from Amazonian Forest**. Roma: FAO, 1993.

CORTEZ, D.A.G.; YOUNG, M.C.M.; MARSTON, A.; WOLFENDER, J.L. &HOSTETTSMANN, K. 1998. **Xanthones, triterpenes and biphenil from *Kielmeyera coriacea***. *Phytochemistry* 47: 1367-1374, 1998.

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

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

CRACKER, L. E.; SIMON, J. E. **Herbs, species and medicinal plants**. v. 1. Phoenix: Onyx, 1987. 329 p.

CUNHA, A. S. **Esquistossomose mansoni**. 1. Ed. São Paulo: EDUSP; 1970.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: UNESP, 1996. 231 p.

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

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

FAO. 1995. **Flavours and fragrances of plant origin: non-wood forest products**. Disponível em: <<http://www.fao.org/>> Acesso em: mai 2004.

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

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

FREIRE, J. M. **Óleos essenciais de canela, manjerona e anis-estrelado: Caracterização química e atividade biológica sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus***. Lavras: UFLA, 2008. 68 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

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

GUENTHER, E. **The Essential Oils. Individual essential oils of the plant families Gramineae, Lauraceae, Burseraceae, Myrtaceae, Umbelliferae and Geraniaceae**. New York: D. Van Nostrand, 1950. p. 370-377.

IAL – Instituto Adolf Lutz. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3.ed. v.1. São Paulo: IAL, 1985.

JIROVETZ, L; BUCHBAUER G; JAGER W. **Analysis of *Cinnamomum zeylanicum* Blume leaf oil from south India**. J. Essent. Oil Res., v. 13, p. 442-443, 2001.

JURBERG, P.; VASCONCELLOS, M. C.; MENDES, N. M. Plantas empregadas como moluscidas: uma visão crítica. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 84, p. 76-83, 1989.

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

KLOOS, H.; MCCULLOUGH, F. S. **Plant Molluscicides: a review**. Wld Hlth Org., 1981.

KOKETSU, M; CARAUTA, J. P. P; OLIVEIRA, R. R. Óleos essenciais de cascas e folhas de canela (*Cinnamomum verum* Presl) cultivada no Paraná. **Ciênc. Tecnologia Alimentos**, v. 17, n. 3, p. 281-285, 1997.

KOLLMANNBERGER, H.; NITZ, S. The flavour-composition of supercritical gas extracts: 2. Allpice (*Pimenta dioica*). **Chemie Mikrobiologie Technologie der Lebensmittel**, p. 116-126, 1993.

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

LE MOS, T. L. G.; Costa, S. M. O.; Santos, H. S.;. **Antimicrobial activity of essential oils of brazilian plants**. Phytotherapy Research Chichester, v. 4, n. 2, p. 82-84, 1990.

LIMA, M. P. et al. Volatile constituents from leaves and branches of *Cinnamomum zeylanicum* Blume (*Lauraceae*). **Acta Amazônica**, v. 35, n. 3, 2005.

LIMA, R. K. **Caracterização química e bioatividade do óleo essencial de folhas de goiabeira sobre a lagarta-do-cartucho do milho**. Lavras: UFLA, 2006. 57 p. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

MALEK, E. A. Snail hosts of schistomiasis and other snail transmitted diseases in Tropical América. In: BARBOSA, F. S. **Tópicos de Malacologia Médica**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1995. p. 300-310.

MARINI, L. J; GUTKOSKI, L.C; ELIAS, M.C; MEZZOMO, N. et al. Efeito da secagem intermitente na estabilidade de grãos de aveia. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 3, p. 260-267, 2005.

McCULLOUGH, F. S; Gayral, P; Duncan, J. & Christie, J. D et al. Molluscicides in schistosomiasis control. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 58, n. 5, p. 681-689, 1980.

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

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

MIYAZAWA, M.; KAMEOKA, H. **Volatile flavor components of Canela (*Cinnamomum zeylanicum* Breyn)**. Agriculture and Biological Chemistry, v. 52, n. 11, p. 2961-2963, 2008.

MS – Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. **Proposta de política nacional de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos**. 1. ed. Ministério da Saúde, 2007.

MS – Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. 1995. Disponível em: <www.saude.gov.br/svs>

MÖLLENBECK., S. KÖNIG, T., SCHREIER, P., SCHWAB, W.,. **Chemical composition and analyses of enantiomers of essential oils from Madagascar**. Flav. Fragr. J., v. 12, p. 63-69, 1997.

MONTEIRO, O. S. **Caracterização do óleo essencial da Pimenta dióica Lindl e sua aplicação como atrativo de abelhas euglossina**. João Pessoa: UFPB, 2008. 148 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, 2008.

MORAES, M. O., Ferreira EG, Wilke DV, Jimenez PC, Portela TA,. **Avaliação da eficácia e segurança de fitoterápicos no Brasil**. Arquivos Brasileiros de Fitomedicina Científica, v. 1, p. 30-39, 2010.

MORSBACH, N., RODRIGUES, A. dos S.; CHAIMSOHN, F. P., et al. **Óleos essenciais de cascas e folhas de canela (*Cinnamomum verum* Presl) cultivada no Paraná**. Ciências Tecnologia de Alimentos, v. 17, 1997.

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

NASCIMENTO, A. R. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais frente a bactérias isoladas de sururu (*Mytella falcata*)**. Lavras: UFLA, 2004. 91p. Tese (Doutorado) – Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

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

OLIVEIRA, A. B.; BRAGA, F. C. Produtos naturais bioativos de plantas brasileiras e sua contribuição para o desenvolvimento da química medicinal. **Arquivos Brasileiros de Fitomedicina Científica**, v. 1, p. 49-58, 2003.

OMS – Organización Mundial de la Salud. **Empleo inocuo de plaguicidas**. Genève, OMS, 1991. 29 p.

OMS – Organização Mundial de Saúde. **OMS apóia estudo com plantas medicinais**. Disponível em: <http://www.drashi/fitoterapia_oms_apoia_estudos_com_plantas_medicinais.ht> Acesso em: 17 abr. 2011.

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

PATEL, K., ANDERSON, J.G.; MEADOWS, P.S. Publisher: **Har Krishan Bhalla & Sons**, CODEN: JEOPFB, v. 10, n. 5, p. 374-377, 2007.

PAULINI, E. Estado atual do conhecimento composition of the leaf essential oil of *Cinnamomum verum* (Lauraceae) from Fiji islands. Journal of Essential Oil-Bearing Plants, sobre moluscicidas. **Rev. Bras. Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 4, n. 15, p. 355-62, 1965.

PARRY, J. W. **Spices**. v. 1. New York: Chemical, 1969. p.163-165.

PEREIRA, C. A. M.; MAIA, J. F. Study of the antioxidant activity and essential oil from wild basil (*Ocimum gratissimum* L.) leaf. **Ciência Tecnologia Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 3, p. 624-632, 2007.

- PEREIRA, M.L; BASTOS, E.M.A.F; MONTEIRO, E.P; AMÂNCIO, G.C.S; SERRANO, A.M. **Antibiotic activity of Brazilian green própolis against bactéria from human clinical etiology.** In: CONGRESS APIMANDIA '99, 36, 1999. Vancouver. Anais... Vancouver, 1999. p.225.
- PEREIRA, R. S., SOUZA MUÑOZ, M.E. ; GIOVANNI, R.; SIQUEIRA, M.F.; SUTTON, T.; BREWER, P., et al. **Antibacterial activity of essential oils on microorganisms isolated from urinary tract infection.** Revista de Saúde Pública, n. 2, v. 38, 2004.
- PIZZI, M. **Sampling variation of the fifty percent end-point, determined by the Reed-Muench (Behrens) Method.** Human Biol., 22, 151-190, 1950.
- PURSEGLOVE, J. W. **Tropical crops.** Dicotyledons. Longman, 1960. p. 408-414.
- RAGHAVAN, N., MCREYNOLDS LA, MAIANA CV, FEINSTONE SM, JAYARAMAN K et al. **Comparative gene analysis of Biomphalaria glabrata hemocytes pre-and post-exposure to miracidia of Schistosoma mansoni.** Molécular & Biochemical Parasitology, v.126, p.181-191, 2003.
- RALPH, L.S. **Identificação sistemática de compostos orgânicos.** Manual de Laboratório. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1983. p. 367-378.
- RAO, Y. R.; PAUL, S. C.; DUTTA, P. K. Major constituents of essential oils of Cinnamomum zeylanicum. **Indian Perfum.**, v. 32, p. 86-89, 1988.
- RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.
- REY, L. **Parasitologia.** 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2001.
- ROBLES, C., MELLADO, A.; ÁLVAREZ, M. **Essential oil composition of cistus albidus leaves.** Phytochemistry, v. 48, n. 8, p. 1343-1345, 1998.
- RUG, M.; RUPPEL, A. Toxic activities of the plant *Jatropha curcas* against intermediate snail hosts and larvae of schistosomoses. **Tropical medicine and international health**, v. 5, n. 6, p. 422-30, 2000.
- SALVAT, A; ANTONNACI, L; FORTUNATO, R.H; SUAREZ, E.Y; GODOY, H.M. **Screening of some plants from Northern Argentina for their antimicrobial activity.** Letters in Applied Microbiology, Oxford, v.32, n.5, p.293-297, May 2001.
- SANTOS, K. K, SANT'ANA, A. E. Activities of some brazilian plants against. **Fitoterapia**, v. 76, p. 629-636, 1999.
- SANTOS, L. C.; SOUZA, A. M. O homem da natureza brasileira: ciência e plantas medicinais no início do século XIX. **História, Ciências, Saúde – Manguinhos**, v. 15, n. 4, p. 1025-1038, 2008.

SCHIPER, L. P. **Segredos e virtudes das plantas medicinais**. Rio de Janeiro: Reader's Digest Brasil, 1999.

SCHREIER, P. **Analysis of volatiles methods and applications**. Berlin: Walter de Gruyter, 1984. 469p.

SENANAYAKE, U. M., LEE, T. H., WILLS, R. B. H. Volatile constituents of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) oils. **J. Agric. Food Chem.**, v. 26, p. 822-824, 1978.

SERAFIN, C. **Estudo da composição química e das propriedades biológicas das partes aéreas de *Plinia glomerata***. Itajaí: Univali, 2006. 84 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2006.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. SIMÕES, C. M. O. Óleos Voláteis. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFSC, p. 467-495, 2004.

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

SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 12, n. 1, p. 35-40, 2002.

SIMÕES, C. M. O. , E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; PETROVICK, L.A.; **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2003. p.1102.

SIMÕES, C. M. O; SPITZER, V. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS, 1999. 821 p.

SMITHERS, S. R.; TERRY. **The imunoly of schistosomiasis**. 1965. In: SOUZA, N. S. **Visão Parasitológica da cepa humana de *Schistosoma mansoni* em roedor silvestre**. São Luís: UFMA, 1992. Monografia (Graduação) – Curso de Farmácia, Universidade Federal do Maranhão, São Luis, 1992.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. **Latters in Applied microbiology**, v. 26 p. 214, 1997.

SOARES, A. C. Se bem não fizer, mal também não fará. **Revista Eletrônica de Ciências**, n. 12, out. 2002. Disponível em: <http://www.cdcc.sc.usp.br/ciencia/artigos/art_12/medicamento.html> Acesso em: 4 fev. 2010.

SOUZA, C. P.; LIMA, L. C. **Moluscos de interesse parasitológico do Brasil**. 1. ed. Belo Horizonte: FIOCRUZ, 1990.

SOUZA, C. P. LIMA, L. C. Esquistossomose: a expansão de *Biomphalaria straminea* em Belo Horizonte, Minas Gerais. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 12, p. 541-544, 1996.

SOUZA, S. M. C., CARVALHO, V. D. CHAGAS, S. J. R. Evaluation of condiments essential oils on micelial growth of fungi associated to bread-making products. **Ciências agrotecnicas**, Lavras, v. 28, n. 3, p. 685-690, 2004.

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

THOMAS, J., GREETHA, K., SHYLARA, K. S. Studies on leaf oil and quality of *Cinnamomum zeylanicum*. **Indian Perfum.**, v. 31, p. 249-251, 1987.

VARIYAR, P. S., BANDYOPADHYAY, C. **On some chemical aspects of Cinnamomum zeylanicum**. PAFAI J., 10: 35-38, 1989.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J.O.; **Óleo essencial de eucalipto**, São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, 2003, nº 17, 26p.

WEYERSTAHL, P., CHRISTIANSEN, C.; MARSCHALL, H., et al. **Volatile constituents of Eugenia uniflora leaf oil**. Planta Med., v. 54, n. 6, p. 546-549, Dec. 1988.

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