

Avaliação da toxicidade e atividade moluscicida do óleo essencial *Cinnamomum zeylanicum* Blume contra o caramujo *Biomphalaria* *glabrata* (Say, 1818)

Paulo Roberto Barros Gomes^{1*}, Jonas Batista Reis², Jeremias Caetano da Silva¹, Rayone Wesley Santos de Oliveira², Maria do Livramento de Paula³, Hilton Costa Louzeiro⁴, Victor Elias Moucherek Filho², Maria Alves Fontenele⁵

¹Diretoria de Ensino, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará, 68440-000 Abaetetuba, PA, Brasil. Correio eletrônico: prbgomes@yahoo.com.br

²Departamento de Tecnologia Química, Universidade Federal do Maranhão, 65080-805, São Luís, MA, Brasil.

³Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Maranhão- Campus São Luís, 65080-805, São Luís, MA, Brasil.

⁴Coordenação de Licenciatura em Ciências Naturais, Universidade Federal do Maranhão, Pinheiro, MA, Brasil.

⁵Coordenação de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Maranhão, 65915-240, Imperatriz, MA, Brasil.

Recebido em: 22 de agosto de 2018

Aceito em: 27 de dezembro de 2018

RESUMO

Este trabalho determina a toxicidade e o efeito moluscicida do óleo extraído das folhas de *Cinnamomum zeylanicum* Blume contra o caramujo *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). Para isso, o óleo essencial foi extraído quantitativamente por hidrodestilação. Em seguida, quantificações de seus componentes foram realizadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS) e a toxicidade e atividade moluscicida do óleo foram testadas, respectivamente, contra *Artemia salina* e caramujos *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818).

A concentração letal (CL₅₀) foi calculada a partir dos métodos Reed-Muench & Pizzi, respectivamente, para toxicidade e teste moluscicida. Os resultados das análises cromatográficas mostraram que o óleo possui 83% de eugenol (constituente majoritário) e 2,5% de humuleno (componente minoritário). Na avaliação de toxicidade, o óleo foi considerado moderadamente tóxico com uma CL₅₀ de 162,1 mg.L⁻¹ ± 2,80, com intervalo de confiança de 95%, enquanto a atividade moluscicida apresentou concentração letal de 50% (CL₅₀) de 18,62 mg.L⁻¹ ± 2,18,

com intervalo de confiança de 95%. Portanto, o óleo é ativo contra o caramujo *Biomphalaria glabrata*.

Palavras-chave: Eugenol, esquistossomose, compostos voláteis, hidrodestilação, *Biomphalaria glabrata*, *Artemia salina*.

SUMMARY

Evaluation of toxicity and molluscicidal activity of the essential oil *Cinnamomum zeylanicum* Blume against the snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818)

This work determines the toxicity and the molluscicidal effect of the oil extracted from the leaves of *Cinnamomum zeylanicum* Blume against the snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). For this, the essential oil was extracted quantitatively by hydrodistillation. Then, quantifications of its components were performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (CG-MS) and the toxicity and molluscicidal activity of the oil were tested, respectively, against *Artemia salina* and snails *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). The lethal concentration (LC₅₀) was calculated from the Reed-Muench & Pizzi methods, respectively, for toxicity and molluscicide testing. The results of the chromatographic analysis showed that the oil has 83% eugenol (majority constituent) and 2.5% humulene (minority component). In the toxicity evaluation, the oil was considered to be moderately toxic with a LC₅₀ of 162.1 mg.L⁻¹ ± 2.80, with a 95% confidence interval, while the molluscicidal activity presented a lethal concentration of 50% (LC₅₀) of 18.62 mg.L⁻¹ ± 2.18, with a 95% confidence interval. Therefore, the oil is active against the snail *Biomphalaria glabrata*.

Key words: Eugenol, schistosomiasis, volatile compounds, hydrodistillation, *Biomphalaria glabrata*, *Artemia salina*.

INTRODUÇÃO

O gênero *Cinnamomum* (canela) pertence à família Lauraceae, muitos dos quais são usados como temperos e aromatizantes [1]. Existem duas variedades principais de canela: o Ceilão ou a verdadeira canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume), que é cultivada no Sri Lanka e sul da Índia, e cassia (*Cinnamom aromaticum* Ness), que é cultivada na China, Indonésia e Vietnã [2, 3].

Além de sua utilidade na culinária, essas variedades são utilizadas na fitoterapia, devido à presença de taninos, mucilagem, açúcar, resinas e óleos essenciais. Dentre estes componentes o mais importante é o óleo essencial. Estudos apontam que o óleo possui em sua maior parte o cinamaldeído e este é responsável pelo sabor e o aroma da canela [4, 5]. No entanto há diferenças quanto a isso, em relação à variedade e as partes da planta. Estudos realizados com óleos essenciais extraídos das cascas do *Cinnamomum zeylanicum* Blume mostraram de 60 a 80% de cinamaldeído e 2% de eugenol, enquanto que nas folhas a composição do eugenol é maior, em torno de 60 a 75% [6-8]. Já óleos essenciais extraídos da variedade *Cinnamomum aromaticum* Ness mostraram a presença de 80 a 90% de cinamaldeído com pouco ou nenhum eugenol [3].

Devido a elevada composição de eugenol no óleo essencial das folhas do *Cinnamomum zeylanicum* Blume, questiona-se a atividade moluscicida deste óleo frente ao *Biomphalaria glabrata* (Say 1818). Estudos realizados com o eugenol, timol e linalol mostraram que estes possuem atividade moluscicida contra *Biomphalaria alexandrina* e *Bulinus truncatus*, sendo estes, respectivamente, hospedeiros intermediários do parasita *Schistosoma mansoni* e *Schistosoma haematobium*, transmissores da doença esquistossomose [9]. Além disso, sabe-se também que o eugenol possui outras atividades, tais como: larvicida [10], antimicrobiana [11], antioxidante [12], anti-inflamatório [12], antifúngico [13], antinociceptivo [14], citotóxica [15].

No Brasil, os hospedeiros intermediários do *S. mansoni* pertencem ao gênero *Biomphalaria*. Até o momento, somente as espécies *B. glabrata*, *B. tenagophila*, *B. straminea* são infectadas, enquanto que as espécies *B. amazonica* e *B. peregrina* são consideradas hospedeiras em potencial, justamente por serem infectadas experimentalmente. No estado do Maranhão, observamos a ocorrência das espécies *B. glabrata* e *B. straminea* em 30 e 39 municípios, respectivamente, principalmente na capital, São Luís [16].

Nesse caso, uma das medidas preventivas é uso de moluscicida. Os moluscicidas químicos mais utilizados são: hidróxido de cálcio, Gramaxone[®], Frescon[®] e Bayluscid[®] (niclosamida) [17]. No entanto, o uso destes é desvantajoso e isto acaba limitando sua utilização. Dentre estas, destacam-se: toxicidade para outras espécies, baixa seletividade, contaminação ambiental e resistência dos moluscos da espécie *B. glabrata*. Assim, há uma grande necessidade de encontrar novos moluscicidas, preferencialmente de origem natural, que sejam menos agressivo ao meio ambiente e mais seletivos [18, 19].

Portanto, neste trabalho, determinamos a atividade tóxica e moluscicida do óleo essencial das folhas do *Cinnamomum zeylanicum* Blume frente ao caramujo *Biomphalaria glabrata* (Say 1818) que são encontrados no Município de São Luís, Maranhão.

PARTE EXPERIMENTAL

Extração do óleo essencial

Obtemos as folhas da canela em supermercado da rede varejista de São Luís e levamos ao herbário. No Herbário Ático Seabra (SLS) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) o *Cinnamomum zeylamicum* Blume, está registrado como pertencente à família das Lauráceas e número 1153.

Para a extração do óleo essencial do *Cinnamomum zeylamicum* Blume, utilizamos o extrator de Clevenger de vidro acoplado a um balão de fundo redondo de 1000 mL e a uma manta elétrica como fonte geradora de calor. A cada rotina de extração, pesamos 30 g da amostra e o triturávamos em um moinho elétrico. Após essa etapa, misturamos essa amostra com água destilada na proporção 1:10 e colocamos em um balão de fundo redondo acoplado ao sistema extrator. Em seguida, ligávamos a manta elétrica e mantínhamos a temperatura em 100 °C. Após 5,0 horas encerrávamos a destilação recolhendo-se o óleo essencial. O óleo foi seco por meio de percolação em sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄). Realizamos essas operações em triplicatas e armazenamos as amostras em ampolas de vidro âmbar sob refrigeração (15 °C) para evitar possíveis perdas de constituintes voláteis.

Análises cromatográficas

Utilizamos a técnica cromatográfica em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas por impacto de elétrons e analisador íon trap (CG-EM-IE-Ion trap). O equipamento utilizado foi da marca Varian 2100, utilizando hélio como gás de arraste com fluxo na coluna de 1mL.min⁻¹; temperatura do injetor de 270 °C, split 1:50; coluna capilar (15 m x 0,25 mm) com fase estacionária VF-1ms (100 % metilsiloxano 0,25 µm) e programação de temperatura do forno de 60 a 200 °C com taxa de aquecimento de 8 °C min⁻¹, e de 200 a 290 °C com taxa de aquecimento de 15 °C min⁻¹.

No espectrômetro de massas as temperaturas do manifold, íon trap e da linha de transferência foram de 50 °C, 190 °C e 200 °C, respectivamente. Injetamos alíquotas de 1,0 µL (injetor automático CP-8410) nas amostras diluídas na proporção de 20 µL em 1,5 mL de hexano. Identificamos os componentes do óleo a partir da comparação destes com os dados obtidos de substâncias autênticas existente em bibliotecas de referência [20, 21].

Coleta dos caramujos

Coletamos as amostras de caramujos em criadouros naturais do bairro Sá Viana, periferia de São Luís, Maranhão. Capturamos os mesmos nos períodos chuvosos (janeiro

a junho de 2010), utilizamos EPI's (equipamento de proteção individual): luvas, bota sete léguas e pinça metálica. A técnica de coleta consiste em raspar com a concha as áreas submersas; colocamos os caramujos em um recipiente de vidro com tampa e água do próprio criadouro [22]. A busca dos mesmos foi realizada em diversos pontos de cada criadouro, a fim de obtermos uma boa amostragem. Após as coletas, estas foram etiquetadas por criadouro e levadas para análises.

Teste de positividade parasitária para caramujos

Em um recipiente de 30 mL de capacidade, adicionamos 25 mL de água desclorada e cinco caramujos. Após isso, levamos essa mistura para exposição da luz (lâmpadas de 100 W) a uma distância de 30 cm, durante 1 h, para estimular a liberação das cercárias [23]. Após essa exposição, visualizamos os caramujos com uma lupa estereoscópica (8x) para identificar e separar os que estavam parasitados dos que não estavam. Selecionamos para o teste de atividade moluscicida os caramujos que não apresentaram sinais de infecção pelo trematódeo no período de 30 dias.

Após isso, em um recipiente de poliestireno, adicionamos água desclorada e os caramujos; em seguida, esses foram alimentados com alface hidropônico para futuro teste da atividade moluscicida. Ressaltamos que o período de análise desse teste foi por sete dias, em um período de um mês.

Teste de atividade moluscicida

Realizamos essa atividade de acordo com descrito pela Organização Mundial de Saúde (WHO), somente com os caramujos que não estavam parasitados no teste de positividade. Para isso, o óleo essencial obtido nesse estudo foi utilizado em dois testes, sendo estes realizados em triplicata. No primeiro, denominado de teste piloto, em cada béquer de 500 mL, diluímos o óleo essencial em água destilada e 0,15 mL do tensoativo Tween 80 na concentração de 100 mg.L⁻¹; em seguida, adicionamos 10 caramujos adultos, negativos para *Schistosoma mansoni*, a fim de obtermos uma proporção de 50 mL de solução para cada caramujo. Expulsemos a solução por 24 h, sob temperatura ambiente e após esse período, removemos, lavamos os caramujos duas vezes com água desclorada e os colocamos em cada béquer com 500 mL de água desclorada. Estes foram alimentados com alface hidropônico e observados a cada 12 h (método preconiza 24 h), por 4 dias para avaliar a mortalidade [24].

No segundo teste, denominado de concentração letal (C_L), em cada béquer de 500 mL, diluímos o óleo essencial em água destilada e 0,15 mL do tensoativo Tween 80 nas concentrações de 75, 50, 25 e 10 mg.L⁻¹, a fim de obtermos uma proporção de 50 mL de solução para cada caramujo. Expulsemos a solução por 24 h, sob temperatura ambiente e após esse período, removemos, lavamos os caramujos duas vezes com água desclorada

e os colocamos em cada béquer com 500 mL de água desclorada. Estes foram alimentados com alface hidropônico e observados a cada 12 h (método preconiza 24 h), por 4 dias para avaliar a mortalidade [24].

Para o teste controle, realizamos dois testes. No primeiro, em um recipiente de vidro, imergimos em 500 mL de água desclorada 10 caramujos; no segundo, em um recipiente de vidro, adicionamos 0,15 mL de Tween 80 em 500 mL de água desclorada e imergimos 10 caramujos. Nas duas situações, alimentamos os caramujos com alface hidropônico e procedemos a análise igual a realizada nos testes de concentração letal e piloto.

Consideramos os moluscos mortos àqueles cuja massa cefalopodal estava retraída para o interior da concha, liberando a hemolinfa ou então inchando e estendendo o cefalópode para fora da concha [25].

Teste de toxicidade

Em um aquário com solução sintética (60 g de sal marinho/litro de água destilada), saturada com oxigênio a partir de bomba de ar, adicionamos os cistos de *Artemia salina* Leach. Antes disso, dividimos o aquário em dois compartimentos: um para os cistos e outro sob iluminação artificial (lâmpada de 100 W) para que haja a eclosão e o deslocamento dos cistos para esse compartimento [26]. Procedemos de acordo com o descrito na metodologia de Gomes e colaboradores [15].

Para a avaliação da letalidade de *Artemia salina* Leach, adicionamos 20 mg do óleo essencial em 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⁻¹ 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⁻¹, respectivamente. Em cada frasco, transferimos dez larvas na fase *náuplio* e realizamos o branco (solução salina) com 20 µL e o controle negativo (solução salina e tween 80 a 0,1%) com 20 µL. Após 24 horas de incubação, contamos as larvas vivas e consideramos mortas aquelas que estavam ausentes de movimentação.

Em relação ao critério de toxicidade, consideramos três tipos: altamente tóxicas (CL₅₀ menor que 80 mg.L⁻¹), moderadamente tóxicas (com CL₅₀ entre 80 a 250 mg.L⁻¹) e atóxicas (com CL₅₀ maior que 250 mg.L⁻¹) [27].

Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada de acordo com o método de Reed-Muench, 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 interseção entre as curvas é a Concentração Letal 50% (CL₅₀), pois nesse ponto o número de animais sobreviventes é igual ao número de animais mortos [28, 29].

O intervalo de confiança foi calculado a partir da construção do gráfico do percentual de mortos *versus* logaritmo (log) da dose. A seguir determina-se o valor de “R”, que é a diferença entre o log da dose que mata 75% das larvas e o log da dose que mata 25% das larvas. Calcula-se também a variável “h” que consiste na média das diferenças dos valores de log das doses. Com esses dados determina-se o log do erro padrão (SE), através da seguinte fórmula: $(SE)^2 = 0,79 \times h \times R/20$. Finalmente, o valor do intervalo de confiança é igual 2×10^{SE} [30].

Utilizamos a Anova de único fator para avaliar associação da concentração do óleo essencial com mortalidade a nível de significância de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Análise cromatográfica do óleo essencial

A partir de comparações dos dados obtidos dos cromatogramas com os da biblioteca de referência [20, 21], identificamos e quantificamos a presença de quatro constituintes, sendo estes: Eugenol com 83,0% (componente majoritário), Cariofileno com 12,2%, Linalol com 3,0% e por último Humuleno com 2,5% (componente minoritário).

Avaliação do teste de toxicidade

Nesse estudo, observamos que a mortalidade foi 100% na concentração de 1000 mg.L⁻¹ (ver tabela 1) e concentração letal (CL₅₀) de 162,1 mg.L⁻¹ (ver figura 1).

Tabela 1. 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

Número de larvas (n=10)

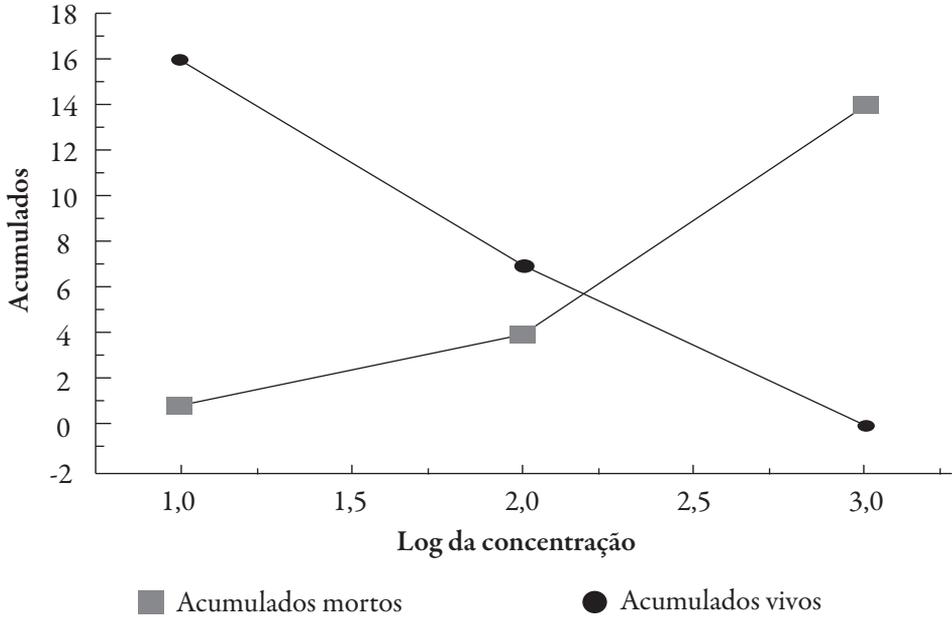


Figura 1. Estimativa da CL_{50} do óleo essencial das folhas do *Cinnamomum zeylanicum* Blume pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas e vivas em função do logaritmo decimal da dose aplicada. A CL_{50} é o ponto de intersecção das duas curvas. (Logaritmo da concentração = 2,21, com um intervalo de confiança de 95% a 2,80 $mg.L^{-1}$).

Depois do período de exposição, ou seja, 24 horas, observamos que não houve mortalidade das larvas (ver tabela 2) para o teste controle.

Tabela 2. 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

Avaliação da atividade moluscicida T2

No teste piloto com óleos essenciais do *C. zeylanicum* Blume na concentração de 100 $mg.L^{-1}$, observamos que a mortalidade porcentual dos caramujos foi máxima no tempo de 72 de horas. Essa concentração é ideal para considerarmos a atividade do óleo essencial em um tempo de 24 h [31].

No estudo para as concentrações de 100, 75, 50, 25 e 10 $mg.L^{-1}$, observamos que a mortalidade foi máxima na concentração de 100 $mg.L^{-1}$ (ver figura 2) e que há efeito da

concentração com mortalidade a nível de significância de $p < 0,05$ (Anova: $F = 1,91$; $p = 0,21$). A partir disso, constatamos que a concentração letal (CL_{50}) foi $18,62 \text{ mg.L}^{-1}$ (ver figura 3).

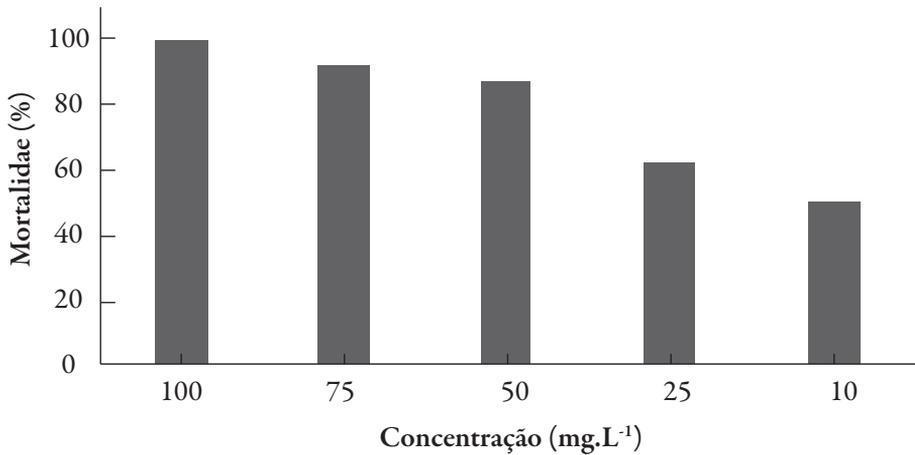


Figura 2. Avaliação da mortalidade em função da concentração.

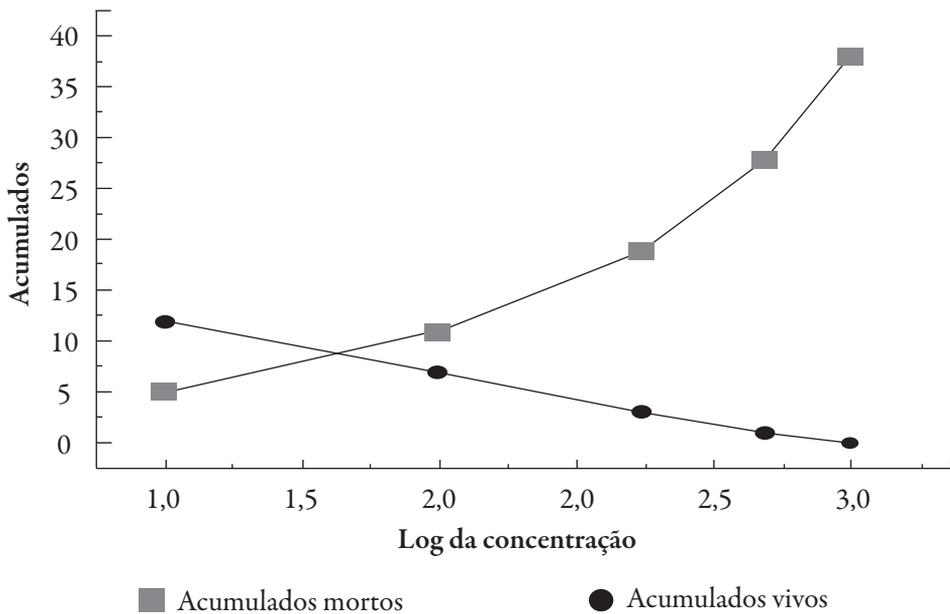


Figura 3. Estimativa da CL_{50} do óleo essencial da canela pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de caramujos vivos e mortos em função do logaritmo da concentração aplicada. A CL_{50} é o ponto de intersecção das duas curvas. Logaritmo da dose = 1,27, com um intervalo de confiança de 95% a $2,18 \text{ mg.L}^{-1}$.

Passados do período de exposição, observamos que não houve mortalidade dos caramujos (ver tabela 3) para o teste controle.

Tabela 3. Avaliação da mortalidade do teste controle para os caramujos.

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

DISCUSSÃO

De fato, concluímos que o óleo essencial extraído das folhas de *C. Zeylanicum* Blume é constituído, majoritariamente, por eugenol e atribuímos a este componente a sua eficácia moluscicida contra o caramujo *Biomphalaria glabrata*. No entanto, este óleo essencial possui atividade tóxica moderada.

A composição de eugenol que obtemos em nosso estudo foi 83%. Apesar desse resultado está dentro da faixa, que é de 70 a 94% [32, 33], observamos em outros estudos diferenças na composição centesimal desse componente para a mesma espécie. Óleos de folhas coletadas no município de Manaus, Amazonas, e de duas árvores cultivadas em Morretes, que foram adubadas com matéria orgânica e com adubo químico, apresentaram eugenol em 60% [6, 34], apesar do estudo realizado [34] mostrar composições de outras partes da planta com valores de 90%. Assim a explicação que atribuímos para essas diferenças está nas variações espaço-temporais, tais como, temperatura, umidade relativa, fotoperíodo, irradiância, genótipo, método de extração e condições agrônômicas que de alguma forma afetam o perfil químico do óleo essencial extraído para a mesma espécie de planta [35-38].

No presente estudo, o óleo essencial extraído das folhas *C. Zeylanicum* Blume exibiu atividade moluscicida contra o caramujo *B. glabrata* com concentração letal (CL_{50}) de 18,62 mg.L⁻¹. De acordo com os critérios adotados pela Organização Mundial de Saúde (WHO) a atividade moluscicida é eficaz quando a concentração letal (CL_{50}), em um período de 24 h a uma determinada temperatura é inferior a 100 mg.L⁻¹ para vegetal bruto e 20 mg.L⁻¹ para extratos [31]. Dessa forma, os resultados do nosso estudo confirmam e ampliam o número de espécies da família *Lauraceae* que possuem atividade moluscicida. O estudo realizado por [39] comprovou a atividade moluscicida do óleo essencial *Ocotea bracteosa* (Meisn) Stem Bark contra o caramujo *B. glabrata* com concentração letal (CL_{50}) de 4,6 µg.mL⁻¹.

No entanto, esse critério não pode ser levado ao pé da letra. Quando se compara a eficácia da atividade moluscicida com concentração ou tempo nos capítulos do livro editado pela Organização Mundial de Saúde (WHO) de 1987, observamos que há dualidade [40]. No capítulo *Guidelines for evaluation of plant molluscicides*, a atividade em moluscos aquáticos é eficaz quando a concentração for menor ou igual a 100 mg.L^{-1} e matar em 90% os caramujos em 24 horas sob temperatura constante. Em outro capítulo, as plantas que apresentam mortalidade de concentração em até 100 mg.L^{-1} são consideradas positivas, enquanto que superiores a essa são negativas, independente da porcentagem [41]. Apesar dessa dualidade na porcentagem, observamos o ponto comum a toda atividade moluscicida de óleos essenciais. Esta é eficaz quando for igual ou menor que 100 mg.L^{-1} .

Avaliar o teste de moluscicidade *in vitro* é essencial, porém quando complementado com o teste de toxicidade, este nos dá uma dimensão de como seria a ação desse óleo em um sistema real. Nesse contexto, estudos de toxicidade realizados com *Artemia salina* tem suas vantagens, que são: capacidade de formar cistos dormentes, fácil manipulação em laboratório e baixo custo econômico, além de ser um ótimo indicador para avaliar a interferência da substância com outros organismos. [42, 43]. Assim, o resultado do nosso estudo revelou toxicidade moderada do óleo essencial. A partir disso, concluímos que este óleo pode afetar outros organismos que não sejam alvos. Mas para isso é necessário a realização de estudos em campo para confirmar ou negar essa hipótese.

CONCLUSÃO

Concluimos que o óleo essencial da canela é constituído em sua maior parte pelo eugenol e que este componente possui atividade moluscicida contra os caramujos *Biomphalaria glabrata* e toxicidade moderada frente a *Artemia salina*. Portanto, esse óleo essencial pode afetar outros organismos que não sejam o caramujo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPEMA e ao CNPQ por financiarem essa pesquisa.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

1. V. Jakhetia, R. Patel, P. Khatri, N. Pahuja, S. Garg, A. Pandey, S. Sharma, Cinnamon: a pharmacological review, *Journal of Advanced Scientific Research*, **1**, 19-23 (2010).
2. P. Ranasinghe, S. Perera, M. Gunatilake, E. Abeywardene, N. Gunapala, S. Premakumara, K. Perera, M. Lokuhetty, P. Katulanda, Effects of *Cinnamomum zeylanicum* (Ceylon cinnamon) on blood glucose and lipids in a diabetic and healthy rat model, *Pharmacognosy Research*, **4**, 73-9 (2012). doi:10.4103/0974-8490.94719
3. B. Shan, Y.Z. Cai, J.D. Brooks, H. Corke, Antibacterial Properties and Major Bioactive Components of Cinnamon Stick (*Cinnamomum burmannii*): Activity against Foodborne Pathogenic Bacteria, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 5484-5490 (2007). doi:10.1021/jf070424d
4. T. Molania, A.A. Moghadamnia, M. Pouramir, S. Aghel, D. Moslemi, L. Ghassemi, M. Motallebnejad, The effect of Cinnamaldehyde on mucositis and salivary antioxidant capacity in gamma-irradiated rats (a preliminary study), *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, **20**, 89 (2012). doi:10.1186/2008-2231-20-89
5. D.W. Peterson, R.C. George, F. Scaramozzino, N.E. La Pointe, R.A. Anderson, D.J. Graves, J. Lew, Cinnamon Extract Inhibits Tau Aggregation Associated with Alzheimer's Disease In Vitro, *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, **17**, 585-597 (2009). doi:10.3233/JAD-2009-1083
6. M. da P. Lima, M. das G.B. Zoghbi, E.H.A. Andrade, T.M.D. Silva, C.S. Fernandes, Constituintes voláteis das folhas e dos galhos de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae), *Acta Amazonica*, **35**, 363-366 (2005). doi:10.1590/S0044-59672005000300009
7. V.N. Trajano, E. de O. Lima, A.E. Travassos, E.L. de Souza, Inhibitory effect of the essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume leaves on some food-related bacteria, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **30**, 771-775 (2010). doi:10.1590/S0101-20612010000300032
8. M. Vangalapati, S. Satya, S. Prakash, S. Avanigadda, A review on pharmacological activities and clinical effects of cinnamon species, *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, **3**, 653-663 (2012)

9. A.T. Sharaf el-Din, Molluscicidal effect of three monoterpenes oils on schistosomiasis and fascioliasis vector snails in Egypt, *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, **36** (2), 599-612 (2006)
10. P.R.B. Gomes, R.W.S. De Oliveira, V.E. Mouchrek Filho, A.A. Do Nascimento, A.P. Everton, H.C. Louzeiro, J.B. Reis, M.A. Fontenele, Activity larvicide of the essential oil *Syzygium aromaticum* (Carnival-of-india) in front of the mosquito *Aedes Aegypti* (Linnaeus, 1762), *Periodico Tche Quimica*, **15**, 184-195 (2018).
11. N. Sanla-Ead, A. Jangchud, V. Chonhenchob, P. Suppakul, Antimicrobial Activity of Cinnamaldehyde and Eugenol and Their Activity after Incorporation into Cellulose-based Packaging Films, *Packaging Technology and Science*, **25**(1), 7-17 (2012).
12. B. Yogalakshmi, P. Viswanathan, C.V. Anuradha, Investigation of antioxidant, anti-inflammatory and DNA-protective properties of eugenol in thioacetamide-induced liver injury in rats, *Toxicology*, **268**, 204-212 (2010). doi:10.1016/j.tox.2009.12.018
13. S.-Y. Wang, P.-F. Chen, S.-T. Chang, Antifungal activities of essential oils from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves, *Bioresource Technology*, **96**(7), 813-818 (2005).
14. A.N. Daniel, S.M. Sartoretto, G. Schmidt, S.M. Caparroz-Assef, C.A. Bersani-Amado, R.K.N. Cuman, Anti-inflammatory and antinociceptive activities A of eugenol essential oil in experimental animal models, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **19**, 212-217 (2009). doi:10.1590/S0102-695X2009000200006
15. P.R. Barros-Gomes, V.E. Mouchrek-Filho, W. Ferreira-Rabêlo, A. Albuquerque do Nascimento, H. Costa-Louzeiro, W. da Silva-Lyra, M. Alves-Fontenele, Caracterização química e citotoxicidade do óleo essencial do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **47**, 37-52 (2018).
16. O. dos S. Carvalho, P.M.Z. Coelho, H.L. Lenzi, Schistosoma mansoni e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. SciELO-Editora FIOCRUZ, 2008.
17. S.P.D. Cantanhede, A. de M. Marques, N. Silva-Souza, A.L. Valverde, Atividade moluscicida de plantas: uma alternativa profilática, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **20**, 282-288 (2010). doi:10.1590/S0102-695X2010000200024
18. D.G. Colley, A.L. Bustinduy, W.E. Secor, C.H. King, Human schistosomiasis, *The Lancet*, **383**, 2253–2264 (2014). doi:10.1016/S0140-6736(13)61949-2

19. Jr. A. Gasparotto, M.A. Brenzan, I.C. Piloto, D.A.G. Cortez, C.V. Nakamura, D. Filho, B. Prado, E. Rodrigues Filho, A.G. Ferreira, Estudo fitoquímico e avaliação da atividade moluscicida do *Calophyllum brasiliense* Camb (Clusiaceae), *Química Nova*, **28**, 575-578 (2005). doi:10.1590/S0100-40422005000400003
20. R.P. Adams, O.D. Sparkman, Review of Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, *Journal of the American Society of Mass Spectrometry*, **18**, 803-806 (2007).
21. NIST 08. National Institute of Standards and Technology: Mass Spectral Library (NIST/EPA/NIH) (2008).
22. Ministério da Saúde Brasil, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica: Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica diretrizes técnicas: programa de vigilância e controle da esquistossomose (PCE) 2008.
23. S.R. Smithers, R.J. Terry, The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms, *Parasitology*, **55**, 695-700 (1965).
24. E.A. Malek, "Snail hosts of schistosomiasis and other snail-transmitted diseases in tropical America: a manual". Pan American Health Organization, Pan American Sanitary Bureau, Regional Office of the World Health Organization, Washington, D.C. U.S.A. 1985.
25. F.S. McCullough, P. Gayral, J. Duncan, J.D. Christie, Molluscicides in schistosomiasis control, *Bulletin of the World Health Organization*, **58**, 681-689 (1980).
26. B.N. Meyer, N.R. Ferrigni, J.E. Putnam, L.B. Jacobsen, D.E. Nichols, J.L. McLaughlin, Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents, *Planta Medica*, **45**, 31-34 (1982).
27. C. B. D. Amarante, A. H. Müller, M. M. Póvoa, M. F. Dolabela, Phytochemical study bioassay-guided by tests of toxicity on *Artemia salina* and antiplasmodial activity from stem of aninga (*Montrichardia linifera*), *Acta Amazonica*, **41**(3), 431-434 (2011).
28. S.M. Colegate, R.J. Molyneux, "Bioactive natural products: detection, isolation, and structural determination", Second Edition, CRC Press, 2007.

29. L.J. Reed, H. Muench, A simple method of estimating fifty per cent endpoints, *American Journal of Epidemiology*, **27**, 493-497 (1938). doi:10.1093/oxford-journals.aje.a118408
30. M. Pizzi, Sampling variation of the fifty percent end-point, determined by the Reed-Muench (Behrens) method, *Human Biology*, **22**, 151-190 (1950).
31. World Health Organization: Report of the Scientific working Group on Plant Molluscicide & Guidelines for evaluation of plant molluscicides. *Bulletin of the World Health Organization*, Geneva: TDR/SC, 1983.
32. E. Guenther, "The essential oils", Vol. 4, Van Nostrand Reinhold, 1950.
33. J. Purseglove, "Spices", Vol. 2. Longman, London, 1981.
34. M. Koketsu, S.L. Gonçalves, R.L. de O. Godoy, D. Lopes, N. Morsbach, Óleos essenciais de cascas e folhas de canela (*Cinnamomum verum* Presl) cultivada no Paraná, *Food Science and Technology*, **17**, 281-285 (1997). doi:10.1590/S0101-20611997000300017
35. K.H.C. Baser, G. Buchbauer, "Handbook of essential oils: science, technology, and applications", CRC Press, 2015.
36. A.C. Figueiredo, J.G. Barroso, L.G. Pedro, J.J. Scheffer, Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils, *Flavour and Fragrance Journal*, **23**, 213-226 (2008).
37. M.B. Isman, Plant essential oils for pest and disease management, *Crop Protection*, **19**, 603-608 (2000).
38. C. Regnault-Roger, C. Vincent, J.T. Arnason, Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world, *Annual Review of Entomology*, **57**, 405-424 (2012).
39. D.F. Coutinho, C.S. Dias, J.M. Barbosa-Filho, M.F. Agra, R.M. Martins, T.M.S. Silva, E.V.L. da-Cunha, M.S. Silva, A.A. Craveiro, Composition and molluscicidal activity of the essential oil from the Stem Bark of *Ocotea bracteosa* (Meisn.) Mez., *Journal of Essential Oil Research*, **19**, 482-484 (2007). doi:10.1080/10412905.2007.9699958
40. P. Jurberg, M.C. de Vasconcellos, N.M. Mendes, P. Jurberg, M.C. de Vasconcellos, N.M. Mendes, Plantas empregadas como moluscicidas: uma visão crítica, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **84**, 76-83 (1989). doi:10.1590/S0074-02761989000500008

41. N. Farnsworth, T. Henderson, D. Soejarto, Plants with potential molluscicidal activity. Presented at the meeting of the Scientific Working Group on Plant Molluscicides, UNDP/World Bank/WHO Spec. Prog. for Res. and Train in Trop Dis. Geneva, 31 Jan-2 Feb/edited by Kenneth E. Mott (1987).
42. P. Calow, Marine and estuarine invertebrate toxicity tests. Hoffman, D. *et al.* Handbook in cytotoxicology. Oxford: Blackwell Scientific Publication. **1**, 1-5 (1993)
43. I.K. Utyama, Determinação da atividade antibacteriana e toxicidade do ácido acético e vinagres branco e tinto, *Revista Eletrônica de Farmácia*, **4**, (2007).

COMO CITAR ESTE ARTIGO

P.R. Barros-Gomes, J. Batista-Reis, J. Caetano da Silva, R.W. Santos de Oliveira, M. do Livramento de Paula, H. Costa-Louzeiro, V.E. Moucherek-Filho, M. Alves-Fontenele, Avaliação da toxicidade e atividade moluscicida do óleo essencial *Cinnamomum zeylanicum* Blume contra o caramujo *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **48**(1), 112-127 (2019).