

Estudo da composição química, toxicidade e atividade moluscicida do óleo essencial *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

Paulo Roberto Barros Gomes^{1*}, João de Deus da Costa Leite Júnior², Dionney Andrade de Sousa², Gustavo Oliveira Everton², Jonas Batista Reis², Hilton Costa Louzeiro³, Maria Alves Fontenele⁴, Maria do Livramento de Paula⁵, Adriana Crispim de Freitas⁴, Virlane Kelly Lima Hunaldo⁴, Victor Elias Mouchrek Filho²

¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará, 68440-000 Abaetetuba - PA, Brasil.

²Universidade Federal do Maranhão, 65080-805, São Luís, MA, Brasil.

³Universidade Federal do Maranhão, Campus Pinheiro, MA, Brasil.

⁴Coordenação de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Maranhão, 65915-240, Imperatriz, MA.

⁵Universidade Federal do Maranhão, Departamento de Farmácia, 65080-805, São Luís, MA, Brasil.

*Autor correspondente, correio eletrônico: prbgomes@yahoo.com.br

Recibido para evaluación: 13 de agosto de 2019

Aceptado para publicación: 3 de abril de 2020

RESUMO

Determinamos a composição química e testamos a toxicidade e a atividade moluscicida do óleo essencial extraído das cascas do *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. Para isso, o óleo essencial foi extraído quantitativamente por hidrodestilação. Em seguida, as quantificações de seus componentes foram realizadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS) e a toxicidade e atividade moluscicida foram testadas, respectivamente, contra *Artemia salina* e caramujos *Biomphalaria glabrata*. Os resultados mostraram que o óleo contém 81,50% de D-limoneno (constituente principal) e 0,06% de citronelal (componente menor) e este possui atividade moluscicida com concentração letal (CL₅₀) de 100,08 mg.L⁻¹ e atoxicidade, com CL50 de 321,84 mg.L⁻¹ a um nível de confiança de 95%. Portanto, o óleo é ativo contra o caramujo *Biomphalaria glabrata* e atóxico para outros seres vivos.

Palavras chave: *Biomphalaria glabrata*, hidrodestilação, compostos voláteis, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, esquistossomose, *Artemia salina*.

SUMMARY

Study of the chemical composition, toxicity and molluscicidal activity of the essential oil *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

In this present study, we determined the chemical composition and we tested the toxicity and the molluscicidal activity of the essential oil extracted from the barks of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. 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 were tested, respectively, against *Artemia salina* and snails *Biomphalaria glabrata*. The results showed that the oil contains 81.50% of D-limonene (main constituent) and 0.06% of citronellal (minor component) and it has lethal activity (LC50) of 100.08 mg.L⁻¹ and a toxicity, with LC50 of 321.84 mg.L⁻¹ at a 95% confidence level. Therefore, the oil is active against the snail *Biomphalaria glabrata* and non-toxic to other living being.

Key words: *Biomphalaria glabrata*, hydrodistillation, compounds volatiles, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, *schistosomiasis*, *Artemia salina*.

INTRODUÇÃO

A esquistossomose afeta mais pessoas do que a malária. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que 240 milhões de pessoas estejam infectadas e mais de 700 milhões vivem em áreas de risco em 78 países [1]. No Brasil, o número de infectados está entre 4 e 6 milhões, enquanto 25 milhões estão em área de risco [2, 3]. Nesse contexto, essa doença está à frente de outra doença tropical, a malária, cujo número de infectados está em torno de 216 milhões só em 2016.

No Brasil, a esquistossomose tem como agente etiológico o *Schistosoma mansoni*. Para completar o ciclo, esse parasita precisa de dois hospedeiros: um (definitivo), que é o homem e o outro (intermediário), o caramujo do gênero *Biomphalaria*. Dos caramujos desse gênero, três são hospedeiros naturais (*B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*) e dois (*B. amazonica* e *B. peregrina*) em potencial [4]. Dos três hospedeiras naturais, o mais importante é o *B. glabrata*, devido a duas características: a compatibilidade entre parasito-hospedeiro e sua distribuição geográfica nos estados brasileiros [5]. Logo, uma das formas de se controlar a transmissão dessa doença é controlando a população de caramujos através de moluscidas.

Atualmente, um dos moluscidas sintético utilizados no controle do caramujo é a niclosamida [6]. Apesar deste eliminar os caramujos na concentração de 1 mg.L^{-1} , a sua aplicação provoca toxicidade a outras espécies, contaminação ambiental e resistência dos moluscos *B. glabrata*. Devido a essas desvantagens, a busca por moluscida biodegradáveis, ou seja à base de plantas, acaba sendo a melhor alternativa [7, 8].

Na literatura há relatos de plantas com atividade moluscida. O mais recente são os estudos que mostraram a atividade do óleo essencial extraído do *Cinnamomum zeylanicum* Blume e da *Pimenta dioica* com concentração letal, respectivamente, CL_{50} de 18,62 e 14,13 mg.L^{-1} contra o *B. glabrata*. Embora esses resultados sejam bons, o estudo de toxicidade mostrou que esses óleos possuem toxicidade de alta a moderada contra outros organismos, respectivamente. Portanto, estes não são considerados bons moluscidas [9, 10].

A Organização Mundial da Saúde recomenda estudos de campo e de toxicidade. Os testes de toxicidade são ensaios laboratoriais, realizados sob condições experimentais específicas e controlados, utilizados para estimar a toxicidade de substâncias, efluentes industriais e amostras ambientais (águas ou sedimentos). Nesses ensaios, organismos-testes são expostos a diferentes concentrações de amostra e os efeitos tóxicos produzidos sobre eles são observados e quantificados [11, 12].

No entanto, sabemos que os compostos bioativos são quase sempre tóxicos em altas doses. Desta maneira, a avaliação da letalidade em um organismo animal menos complexo pode ser usada para um monitoramento simples e rápido durante o fracionamento de extratos. O ensaio de letalidade para larvas de *Artemia salina* tem sido introduzido na rotina de muitos grupos de pesquisa envolvidos com isolamento, purificação e elucidação estrutural, já que muitos laboratórios de fitoquímica não estão preparados para a realização de ensaios biológicos [13-15]. Os cistos de *Artemia salina* são de baixo custo e facilmente encontrados no comércio, além de permanecerem viáveis por anos no estado seco [16]. Essas vantagens contribuíram para a popularização do bioensaio, sobretudo a partir da década de 90.

Devido ao incentivo da OMS por estudos de toxicidade de plantas ou produtos bioativos com atividades moluscida, sabemos na literatura que os compostos eugenol, limoneno e timol possuem atividade comprovada contra os caramujos *Biomphalaria alexandrina* e *Bulinus truncatus* [17]. Dessa forma, como sabemos que o óleo essencial extraído das cascas do *Citrus sinensis* (L.) Osbeck possui em sua maioria o limoneno, o nosso estudo determinou a composição e testou a atividade moluscida e toxicidade desse óleo contra o caramujo *Biomphalaria glabrata*, uma vez que até o momento só são conhecidos as atividades antibacteriana [18], antifúngica [19], antioxidante [20] e inseticida [21] do óleo essencial dessa planta.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção e extração do óleo essencial

As amostras (frutos) da espécie vegetal *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, foram coletadas no campus do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão (IFMA) - Maracanã, localizado na Avenida dos Curiós, S/Nº, Vila Esperança, (2°36'32.81"S; 44°16'3.25"W). As mudas cultivadas da espécie em questão foram concedidas e certificadas pelo Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura (CNPMPF) da Empresa Brasileira de Agropecuária (Embrapa), localizado em Cruz das Almas no estado da Bahia, estando registrada no Ifma pelo setor de fruticultura como D-25 (laranja doce, variação: pera).

Os frutos foram obtidos manualmente em outubro de 2016. Para extrair o óleo essencial, um extrator de Clevenger de vidro foi acoplado ao frasco de fundo redondo de 1000 mL e ligada a manta elétrica como fonte de calor. Em cada rotina de extração, foram pesados e triturados em moinho elétrico 120 g da amostra. Após este passo, foi misturado com água destilada na proporção 1:10 e colocado em um balão de fundo redondo acoplado ao sistema extrator. Em seguida, a manta elétrica foi conectada e a temperatura foi mantida a 100 °C. Após 5 h, a destilação foi extinta pela coleta do óleo essencial. Esta foi seca por meio de percolação em sulfato anidro de sódio. Essas operações foram realizadas em triplicatas e as amostras armazenadas em ampolas de vidro âmbar sob refrigeração para evitar possíveis perdas de constituintes voláteis; para a determinação da densidade, utilizamos um picnômetro.

Análise cromatográfica CG/EM

Os constituintes do óleo essencial foram identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Os constituintes voláteis foram analisados em cromatógrafo a gás da marca Shimadzu, acoplado a um espectrômetro de massa CG/EM QP5050A, equipado com coluna capilar fenilpolisfenileno-siloxano de BPX 5%, (30 m comprimento x 0,25 mm de espessura e 0,25 µm de espessura do filme), utilizando-se o hélio como gás de arraste. A temperatura do injetor e interface do CG com detector seletivo foi mantida em 280 °C em fluxo na coluna de 2,7 mL/min, programada para operar em 50 °C. Para as análises, injetamos alíquotas com volume de 1 mL em acetato de etila. Os componentes do óleo foram identificados a partir da comparação destes com os dados obtidos de substâncias autênticas existente em bibliotecas de referência [22].

Obtenção e avaliação dos caramujos

De fevereiro a agosto de 2017, nos criadouros naturais do bairro de Sá Viana, na periferia de São Luís, no Maranhão, coletamos os caramujos. Para isso, utilizamos luva, bota de sete léguas, braçadeira metálica e concha. Com a concha, raspamos as áreas submersas e armazenamos os caramujos em um recipiente de vidro com tampa e com água do criadouro [23]. A partir das análises morfológica, foi confirmado que a espécie era o caramujo *Biomphalaria glabrata* [24, 25].

No laboratório, avaliamos os caramujos por 30 dias. A cada sete dias, confirmávamos a ausência da infecção por *Schistosoma mansoni*. Após essa etapa, cinco caramujos foram colocados em frascos de vidro transparente (capacidade de 30 mL) com 25 mL de água desclorada e os expostos à luz artificial (lâmpadas de 100 W), a uma distância de 30 cm por 1 h para estimular a liberação de cercárias [26]. Após essa exposição, com uma lupa estereoscópica, foi observado se havia liberação de cercarias. Dessa forma, foram selecionados os caramujos adultos não infectados, cujas conchas tinham diâmetro de 15 a 20 mm.

Teste de atividade moluscicida

A atividade foi realizada de acordo com descrito pela Organização Mundial de Saúde (OMS) 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, o óleo essencial foi diluído em água destilada e 0,15 mL do tensoativo Tween 80 na concentração de 100 mg.L⁻¹; em seguida, foram adicionados 10 caramujos adultos, negativos para *Schistosoma mansoni* na proporção de 50 mL de solução para cada caramujo. A solução foi exposta por 24 h sob temperatura ambiente. Após esse período, os caramujos foram removidos, lavados duas vezes com água desclorada e colocados em um 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 [27].

No segundo teste, denominado de concentração letal (CL), em cada béquer de 500 mL, o óleo essencial foi diluído em água destilada e 0,15 mL do tensoativo Tween 80 nas concentrações de 25; 50; 75; 100; 125; 150 e 200 mg.L⁻¹, a fim de obtermos uma proporção de 50 mL de solução para cada caramujo. A solução foi exposta por 24 h, sob temperatura ambiente. Após esse período, os caramujos foram removidos, lavados duas vezes com água desclorada e colocados 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 [27].

Para o teste controle, foram realizados dois testes. No primeiro, em um recipiente de vidro, 10 caramujos foram emergidos em 500 mL de água desclorada; no segundo, em um recipiente de vidro, foram adicionados 0,15 mL de Tween 80 em 500 mL de água desclorada e imergidos 10 caramujos.

Teste de toxicidade contra organismo não alvo

Em um aquário com solução sintética (60 g de sal marinho/litro de água destilada), saturada com oxigênio a partir de bomba de ar, foram adicionados os cistos de *Artemia salina* Leach. Antes disso, o aquário foi dividido em dois compartimentos: um para os cistos e outro sob iluminação artificial (lâmpada de 100 W) para a eclosão e deslocamento dos cistos para o compartimento iluminado artificialmente [16]. O procedimento foi realizado de acordo com o descrito na metodologia descrita por Gomes e colaboradores [28].

Para a avaliação da letalidade de *Artemia salina* Leach, foi preparada uma solução estoque (solução-mãe) de cada óleo na concentração 10 000 mg.L⁻¹ e dimetilsulfóxido (DMSO) 0,1%. Amostras de 5, 50, 125, 250 e 500 µL dessa solução-mãe foram transferidas para frascos com 5 mL de solução final, obtendo-se concentrações de 10, 100, 250, 500 e 1000 mg.L⁻¹, respectivamente.

Os ensaios foram realizados, colocando-se 10 larvas na fase *náuplio* em cada frasco. No controle positivo e negativo, foram utilizados 5000 µL, respectivamente, de uma solução de dicromato de potássio (3 mg.L⁻¹) e solução de 4 mg.L⁻¹ de DMSO 0,1%. Após 24 h de incubação, as larvas foram contadas e consideradas mortas aquelas que estavam ausentes de movimentação.

Análise estatística

O teste estatístico utilizado foi a Anova de fator único para avaliar o efeito da concentração com a mortalidade e expressamos os resultados percentuais médio e o desvio padrão para a mortalidade. Para o cálculo da concentração letal (CL₅₀), coeficiente de correlação e desvio padrão, utilizamos o teste Probit. Em todos os testes estatísticos, consideramos a significância de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Rendimento e análises cromatográficas do óleo essencial

Realizamos, em triplicata, o teste cinético de extração no intervalo de tempo de 0 a 5 h para verificarmos qual é o melhor rendimento. A partir deste teste, constatamos que

o rendimento foi maior no tempo de 3,5 h, obtendo-se assim um volume de 3,20 mL. Calculamos o rendimento da extração a partir da massa que utilizamos, volume obtido após a extração, da medida da densidade, que foi de $0,850 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e da fórmula expressa pela Farmacopeia brasileira. A partir disso, o resultado obtido foi de 2,47% na relação massa/massa.

O resultado do cromatograma mostrou 15 picos, indicando a presença de 15 compostos (figura 1). Identificamos esses compostos comparando-os com os dados da biblioteca Nist e Willey. Na tabela 1, mostramos os 15 componentes do óleo essencial com seus respectivos tempos de retenção e porcentagem da área normalizada. Desses, temos os componentes majoritário e minoritário, que são, respectivamente, o D-limoneno (81,50%) e o citronelal (0,06%).

Tabela 1. Identificação dos compostos na amostra de óleo essencial das cascas do *Citrus sinensis* (L) Osbeck.

Pico ¹	² TR (min) ²	Componentes	Porcentagem (%)
1	5,155	α -Pino	0,33
2	6,350	β -Mirceno	2,95
3	6,861	Octanal	1,93
4	7,610	d-Limoneno	81,50
5	8,287	1-Octanol	0,46
6	8,919	Linalol	6,36
7	8,959	Nonanal	1,08
8	9,866	Citronelal	0,06
9	105,23	Terpineol	0,12
10	10,873	α -Terpineol	1,39
11	10,926	Decanal	0,25
12	11,352	β -Citronelol	0,08
13	11,643	Neral	1,13
14	12,210	Citral	1,17
15	12,496	Ciclohexano	1,20

Nota: ¹ número de pico na ordem de eluição da coluna; ²TR: tempo de retenção dos compostos.

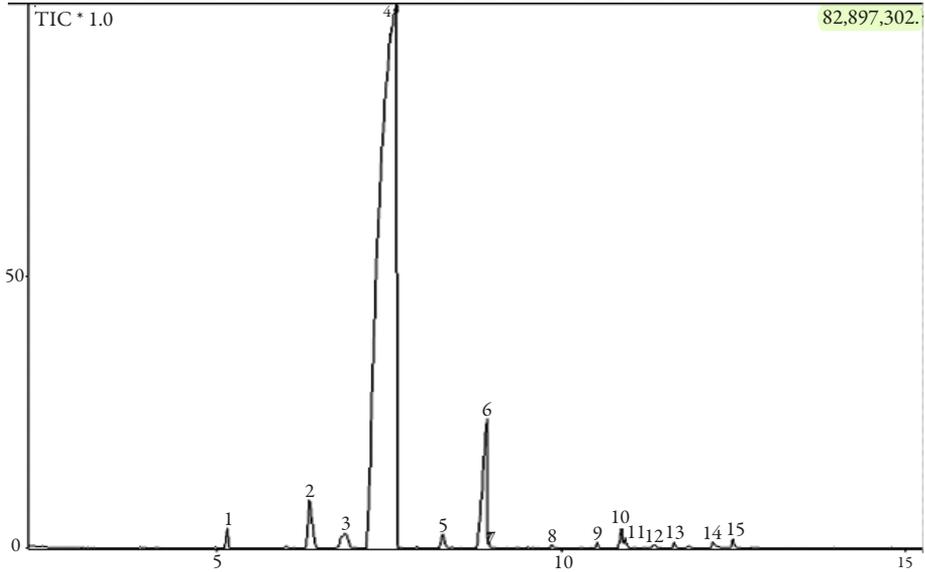


Figura 1. Cromatograma do óleo essencial extraído das cascas do *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.

Avaliação de teste de toxicidade

Na tabela 2, observamos que a mortalidade percentual aumenta com o aumento da concentração e esta foi maior na concentração de 1000 mg.L⁻¹. Para cada concentração, utilizamos dez larvas e realizamos o estudo em triplicata. A partir do método Probit, calculamos a concentração letal, CL₅₀, que foi 381,24 mg.L⁻¹, coeficiente de correlação (R²= 0,989) e o desvio padrão (DP 0,714). No teste estatístico, observamos que há efeito entre as concentrações (p= 0,9725 e F= 0,02792). Para o teste controle não houve bioatividade.

Tabela 2. Toxicidade do óleo essencial contra as larvas *Artemia salina*.

Concentração (mg.L ⁻¹)	% Mortalidade da larva
10	0,0 ± 0,00
100	20 ± 0,00
250	40 ± 0,00
500	60 ± 0,00
1000	73,33 ± 0,44

Os valores da média e o desvio padrão das medidas em triplicata.

Atividade moluscicida

Na tabela 3 mostramos a atividade moluscicida do óleo essencial contra o caramujo *Biomphalaria glabrata*. Observamos que a mortalidade percentual foi maior na concentração de 200 mg.L⁻¹. Para cada concentração, utilizamos dez caramujos e realizamos o estudo em triplicata. A partir do método Probit, calculamos a concentração letal, CL₅₀, que foi 100,08 mg.L⁻¹, coeficiente de correlação (R²= 0,870) e o desvio padrão (DP 0,198). No teste estatístico, observamos que há efeito entre as concentrações (p= 0,9971 e F= 0,00294). Para o teste controle, os moluscos mantiveram-se ativos durante as 24h de exposição, enquanto o teste piloto mostrou a maior mortalidade foi na concentração de 200 mg.L⁻¹.

Tabela 3. Atividade moluscicida do óleo essencial contra o caramujo *Biomphalaria glabrata* em um período de 24 h.

Concentração (mg.L ⁻¹)	% Mortalidade dos caramujos
25	0,0 ± 0,00
50	10 ± 0,00
75	10 ± 0,00
100	60 ± 0,00
125	73,33 ± 0,44
150	80 ± 0,00
200	100 ± 0,00

Os valores da média e o desvio padrão das medidas em triplicata.

DISCUSSÃO

A esquistossomose é uma doença que afeta milhões de pessoas em todo mundo e precisa de alguma forma ser controlada ou erradicada. Uma das medidas adotadas para contê-la é interrompendo o ciclo através de moluscicidas sintéticos. No entanto, está comprovado que os mesmos provocam de alguma forma prejuízos ao meio ambiente e resistência aos caramujos. Nesse contexto, a busca por produtos à base de óleos essenciais torna a sua aplicação mais segura e menos nociva ao meio ambiente, uma vez que estes são vantajosos por serem biodegradáveis [29, 30]. Portanto, nesse estudo, extraímos o óleo essencial das cascas do *Citrus sinensis* (L.) Osbeck por hidrodestilação, identificamos os componentes do óleo essencial pela técnica cromatográfica gasosa

acoplada ao espectrômetro de massa e constatarmos a atividade moluscicida e baixa toxicidade, respectivamente, para o *B. glabrata* e *Artemia salina*.

As composições químicas do óleo essencial extraído do *Citrus sinensis* (L.) Osbeck divergem. Em nosso estudo, obtemos um percentual de D-limoneno em 81,50%. Porém os valores obtidos para o mesmo componente variam de 92 a 97% na literatura [31]. Apesar do limoneno está presente em quantidades acima de 90% na composição do óleo essencial dos *Citrus*, em nosso estudo, este está abaixo. Para explicar essa diferença, recorremos a dois fatores: um externo a planta, que são: temperatura, umidade relativa, fotoperíodo, irradiância, genótipo, método de extração e condições agrônômicas [32-35] e outro, interno a planta, que são: fisiológicos e genéticos [36]. Dessa forma, os nossos resultados estão próximos dos encontrados na literatura e explicamos os fatores que são responsáveis por essas diferenças.

Outro ponto que pode influenciar nos resultados da composição do óleo é rendimento obtido no tempo de extração. Quando esta é rápida, há predominância de constituintes mais voláteis, porém destituído das melhores características. Do contrário, o produto é sobrecarregado com aromas indesejáveis [37, 38]. Em nosso estudo, obtemos um rendimento de 2,47% m/m em um tempo de 3,5 h de extração. Levando-se em consideração o que observamos na literatura, esse resultado é bom, pois os melhores rendimentos são obtidos em um tempo de extração de 3 a 5 h [9, 10, 28, 39].

Para avaliar se uma planta possui ou não atividade moluscicida, utilizamos os critérios que estão descritos no manual da Organização Mundial da Saúde (OMS). Segundo esse manual, a atividade é mensurada para duas condições: extrato e vegetal bruto. No extrato, a concentração é até 20 mg.L⁻¹, enquanto que no vegetal bruto é até 100 mg.L⁻¹ a temperatura constante [40]. Assim, tendo como referência o critério vegetal bruto, consideramos o óleo essencial do *Citrus sinensis* L ativo, uma vez que a concentração letal, CL₅₀, que obtemos nesse estudo foi 100,08 mg.L⁻¹.

Na maioria das vezes, a atividade biológica é atribuída ao composto majoritário presente no óleo essencial. No entanto, o grande responsável não é, necessariamente, o componente majoritário, mas sim o sinergismo que há com outros compostos. As interações sinérgicas ocorrem quando o efeito produzido por uma combinação de substâncias é superior ao que se poderia esperar com base na contribuição individual de seus componentes. Assim, outros compostos presentes no óleo atuam na atividade biológica [41].

Como vimos, o sinergismo entre os componentes da planta confere a ela a atividade biológica. No entanto, outro fator precisa ser avaliado para que essa planta seja ou não utilizada como moluscicida natural. A Organização Mundial da Saúde recomenda, além de estudos sobre plantas moluscicida, estudos de toxicidade. Nesse contexto, determinamos a toxicidade do óleo pelo teste com *A. salina*. O emprego deste microcrustáceo

é vantajoso, devido a sua alta sensibilidade a diversas substâncias. Com isso, garantimos a segurança dessa avaliação dos riscos que essa substância pode oferecer ao meio ambiente e a outros organismos em geral [6]. Assim, os nossos estudos demonstraram que o óleo essencial do *Citrus sinensis* L é atóxico, uma vez que concentração letal, CL_{50} foi superior a 250 mg.L^{-1} segundo o critério adotado por Dolabela [42].

Mesmo que o óleo essencial de uma planta possua atividade moluscicida, o estudo da toxicidade é fundamental para simular a interação desse produto com outros seres vivos. Na literatura, observamos a existência de plantas que possuem atividade moluscicida, mas que são tóxicas ou moderadamente tóxicas a outros seres vivos. O estudo realizado por Gomes e colaboradores (2019) mostraram que o óleo essencial do *Cinnamomum zeylanicum* Blume é ativo contra o caramujo *B. glabrata* com concentração letal, CL_{50} , de $18,62 \text{ mg.L}^{-1}$ e moderadamente tóxico com outros organismos, com concentração letal $162,1 \text{ mg.L}^{-1}$ [10]. De acordo com os autores, o principal componente foi o eugenol, uma vez que este estava em maior quantidade. Outra planta que também possui atividade moluscicida e tem o eugenol como composto predominante é o óleo essencial das folhas da *Pimenta dioica*. Porém, o estudo de toxicidade mostrou que o óleo essencial dessa planta é extremamente tóxico, com concentração letal, CL_{50} menor que 80 mg.L^{-1} [9].

Portanto, verificamos nesse estudo que o óleo essencial extraído das cascas do *Citrus sinensis* L é um potencial agente moluscicida natural, além de possuir atoxicidade contra outros organismos, a partir do estudo de toxicidade com *Artemia salina*. No entanto são necessários mais estudos, tal como estudo de campo, para garantir a utilização deste de forma segura e eficaz.

CONCLUSÃO

Analisamos quimicamente o óleo essencial obtido das cascas do *Citrus sinensis* (L) Osbeck e determinamos a atividade moluscicida e toxicidade. Da análise química, identificamos quinze compostos, no qual o majoritário é o limoneno e o minoritário citronelal. Em relação a atividade moluscicida, constatamos que o óleo essencial é ativo contra o *Biomphalaria glabrata* enquanto o estudo de toxicidade, ele é atóxico.

AGRADECIMENTOS

Aos colaboradores do Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada (NIBA) e do Pavilhão Tecnológico, ambos da Universidade Federal do Maranhão pelas orientações e ajuda dada na realização dos experimentos.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

1. H. Wang, M. Naghavi, C. Allen, R.M. Barber, Z.A. Bhutta, A. Carter, D.C. Casey, F.J. Charlson, A.Z. Chen, M.M. Coates, Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015, *The Lancet*, **388** (10053), 1459-1544 (2016).
2. J.R. Lambertucci, Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **105**(4), 422-435 (2010).
3. D.A. Guiguet-Leal, R.M.B. Franco, M.F. Neves, L.F. Simões, L.A.D. Bastos, S.M. Allegretti, E.M. Zanotti-Magalhaes, L.A. Magalhaes, Acute schistosomiasis in Brazilian traveler: the importance of tourism in the epidemiology of neglected parasitic diseases, *Case Rep. Infect. Dis.*, **2012**, 650929 (2012).
4. O.d.S. Carvalho, P.M.Z. Coelho, H.L. Lenzi, *Schistosoma mansoni* & *Esquistosomose: uma visão multidisciplinar*, SciELO-Editora FIOCRUZ, 2008.
5. O.d.S. Carvalho, C.L.F.d. Mendonça, J.M.d.R. Marcelino, L.K.J. Passos, M.A. Fernandez, R.d.S. Leal, R.L. Caldeira, R.G.C. Scholte, E.H. Carmo, S.G. Mesquita, Distribuição geográfica dos hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni* nos estados do Paraná, Minas Gerais, Bahia, Pernambuco e Rio Grande do Norte, 2012-2014, *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, **27**, e2017343 (2018).
6. S.P.D. Cantanhede, A.d.M. Marques, N. Silva-Souza, A.L. Valverde, Atividade moluscicida de plantas: uma alternativa profilática, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **20**(2), 282-288 (2010).
7. A. Gasparotto, M.A. Brenzan, I.C. Piloto, D.A.G. Cortez, C.V. Nakamura, B. Filho, E. Filho, A.G. Ferreira, Estudo fitoquímico e avaliação da atividade moluscicida do *Calophyllum brasiliense* Camb (Clusiaceae). *Quím. Nova*, **28**(4), 575 (2005).
8. D.G. Colley, A.L. Bustinduy, W.E. Secor, C.H. King, Human schistosomiasis, *The Lancet*, **383**(9936), 2253-2264 (2014).

9. P.R.B. Gomes, J.B. Reis, R.P. Fernandes, V.E. Mouchrek Filho, A.G. de Souza, M.A. Fontenele, J.C. da Silva, Toxicidad y actividad moluscicidal del aceite esencial Pimenta dioica contra el caracol *Biomphalaria glabrata*, *Revista Peruana de Biología*, **26**(1), 101-108 (2019).
10. P.R.B. Gomes, J.B. Reis, J.C. da Silva, R.W.S. de Oliveira, M.d.L. de Paula, H.C. Louzeiro, V.E. Mouchereck Filho, M.A. 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), 122-127 (2019).
11. J.M. Ribo, Interlaboratory comparison studies of the luminescent bacteria toxicity bioassay, *Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal*, **12**(4), 283-294 (1997).
12. C.B. Dornfeld, *Utilização de análises limnológicas, bioensaios de toxicidade e macroinvertebrados bentônicos para o diagnóstico ambiental do reservatório de Salto Grande (Americana, SP)*. Tese de Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental, Universidade de São Paulo, 2002.
13. M. Falkenberg, D. Baumgarten, C. Simionato, *Screening of some Brazilian medicinal plants with the brine shrimp assay*, in: *II WOCMAP Congress Medicinal and Aromatic Plants, Part 2: Pharmacognosy, Pharmacology, Phytomedicine, Toxicology 501*, 1997.
14. M.A.M. Maciel, A.C. Pinto, J.V. Veiga, N.F. Grynberg, A. Echevarria, Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares, *Química Nova*, **25**(3), 429-438 (2002).
15. A. Ruiz, E. Magalhães, A. Magalhães, A. Faria, M. Amaral, D. Serrano, E. Zanotti-Magalhães, L. Magalhães, Toxic evaluation of four species of the genus *Eleocharis* (Cyperaceae) in *Artemia salina* and *Biomphalaria glabrata*, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **15**(2), 98-102 (2005).
16. B. Meyer, N. Ferrigni, J. Putnam, L. Jacobsen, D.J. Nichols, J.L. McLaughlin, Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents, *Planta Medica*, **45**(05), 31-34 (1982).
17. A.T. el-Din, Molluscicidal effect of three monoterpenes oils on schistosomiasis and fascioliasis vector snails in Egypt, *J. Egypt. Soc. Parasitol.*, **36**(2), 599-612 (2006).

18. N. Arooj, N. Dar, Z.Q. Samra, Stable silver nanoparticles synthesis by *Citrus sinensis* (orange) and assessing activity against food poisoning microbes, *Biomedical and Environmental Sciences*, **10**(27), 815-818 (2014).
19. P. Singh, R. Shukla, B. Prakash, A. Kumar, S. Singh, P.K. Mishra, N.K. Dubey, Chemical profile, antifungal, antiaflatoxigenic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene, *Food and Chemical Toxicology*, **48**(6), 1734-1740 (2010).
20. O.M. Atrooz, The antioxidant activity and polyphenolic contents of different plant seeds extracts, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **12**(15), 1063 (2009).
21. A.F. Traboulsi, S. El-Haj, M. Tueni, K. Taoubi, N.A. Nader, A. Mrad, Repellency and toxicity of aromatic plant extracts against the mosquito *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae), *Pest Management Science: Formerly Pesticide Science*, **61**(6), 597-604 (2005).
22. R.P. Adams, O. Sparkman, Review of identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **18**, 803-806 (2007).
23. Departamento de Vigilância Epidemiológica, *Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: diretrizes técnicas: programa de vigilância e controle da esquistossomose (PCE)*, 2 ed., Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasília, 2008, p. 175.
24. N. Deslandes, Técnica de dissecação e exame de planorbídeos, *Ver. Serv. Espec. Saude Publica*, **4**, 371-382 (1951).
25. W. Paraense, Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros, *Arq. Mus. Nac.*, **55**, 105-128 (1975).
26. S. Smithers, R. Terry, The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms, *Parasitology*, **55**(4), 695-700 (1965).
27. Malek, E.A., *Snail hosts of schistosomiasis and other snail-transmitted diseases in tropical America: a manual*. 1985: Pan American Health Organization.
28. P.R. Barros-Gomes, V.E. Mouchrek-Filho, W. Ferreira-Rabêlo, A. Albuquerque do Nascimento, H. Costa-Louzeiro, W. da Silva-Lyra, M.A. Fontenele, Chemical characterization and cytotoxicity of clove essential oil (*Syzygium aromaticum*), *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **47**(1), 37-52 (2018).

29. F. McCullough, P. Gayral, J. Duncan, J. Christie, Molluscicides in schistosomiasis control, *Bulletin of the World Health Organization*, **58**(5), 681 (1980).
30. T. Clark, C. Appleton, The molluscicidal activity of *Apodytes dimidiata* E. Meyer ex Arn (Icacinaceae), *Gardenia thunbergia* Lf (Rubiaceae) and *Warburgia salutaris* (Bertol. F.) Chiov. (Cannellaceae), three South African plants, *J. Ethnopharmacol.*, **56**(1), 15-30 (1997).
31. A.P. Martins, T. Nogueira, M.d.C. Costa, L. Salgueiro, Requisitos de qualidade em óleos essenciais: a importância das monografias da Farmacopeia Europeia e das normas ISO, *Rev. Fitoter.*, **11**(2), 133-145 (2011).
32. K.H.C. Baser, G. Buchbauer, *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*, CRC Press, BocaRaton (FL), 2015.
33. 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**(4), 213-226 (2008).
34. M.B. Isman, Plant essential oils for pest and disease management, *Crop Protection*, **19**(8-10), 603-608 (2000).
35. C. Regnault-Roger, C. Vincent, J.T. Arnason, Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world, *Annu. Rev. Entomol.*, **57**, 405-424 (2012).
36. A. Cunha, C. Cavaleiro, L. Salgueiro, *Fármacos aromáticos (plantas aromáticas e óleos essenciais)*, Farmacognosia e Fitoquímica, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 2005, pp. 339-401.
37. V.E. Mouchrek Filho, G.O. Chierice, *Estudos analíticos e modificações químicas por metilação e acetilação do eugenol contido no óleo essencial extraído das folhas da espécie Pimenta dioica Lindl*, Tese de Doutorado em Química, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, Brasil, 2000.
38. J.d.S. Chaar, *Estudos analíticos e modificação química por acetilação do linalol contido no óleo essencial da espécie Aniba Duckei Kostermans*. Tese de Doutorado em Química, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2000.
39. P. Gomes, A. Silva, H. Pinheiro, L. Carvalho, H. Lima, E. Silva, R. Silva, C. Louzeiro, M. Oliveira, Evaluation of the larvicidal effect of the essential oil of *Zingiber officinale* Roscoe (ginger) against the mosquito *Aedes aegypti*, *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, **18**(2), 597-604 (2016).

40. World Health Organization, *Report of the Scientific working Group on Plant Molluscicide & Guidelines for evaluation of plant molluscicides*, TDR/SC, Geneva, 1983.
41. H. Wagner, G. Ulrich-Merzenich, Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals, *Phytomedicine*, **16**(2-3), 97-110 (2009).
42. M. Dolabela, *Triagem in vitro para atividade antitumoral e anti Trypanossoma cruzi de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas*, Tese de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, 1997.

COMO CITAR ESTE ARTIGO

P.R. Barros-Gomes, J.d.D. da Costa Leite-Júnior, D.A. de Sousa, G. Oliveira-Everton, J. Batista-Reis, H. Costa-Louzeiro, M. Alves-Fontenele, M.d.L. de Paula, A.C. de Freitas, V.K. Lima-Hunaldo, V.E. Mouchrek- Filho, Estudo da composição química, toxicidade e atividade moluscicida do óleo essencial *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **49**(1), 28-43 (2020)