

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS – CCAE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

MITSUE ITO

Efeito dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* e dos terpenos timol e carvacrol, sobre adultos e massas ovíferas de *Pseudosuccinea columella*

ALEGRE-ES

2021

MITSUE ITO

Efeito dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* e dos terpenos timol e carvacrol, sobre adultos e massas ovíferas de *Pseudosuccinea columella*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e Terapêutica das Enfermidades Clínico-Cirúrgicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a.: Isabella Vilhena Freire Martins

ALEGRE-ES

2021

MITSUE ITO

Efeito dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* e dos terpenos timol e carvacrol, sobre adultos e massas ovígeras de *Pseudosuccinea columella*

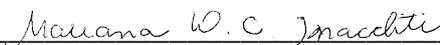
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias – CCAE, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e Terapêutica das Enfermidades Clínico-Cirúrgicas.

Aprovado em 17 de agosto de 2021.

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Isabella Vilhena Freire Martins
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora



Prof. Dr^a. Mariana Drummond Costa Ignacchiti
Universidade Federal do Espírito Santo



Dr^a. Barbara Rauta de Avelar
Universidade Federal do Rural do Rio de Janeiro



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por ISABELLA VILHENA FREIRE MARTINS - SIAPE 1455640 Departamento de Medicina Veterinária - DMV/CCAEE Em 17/11/2021 às 17:28

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/310378?tipoArquivo=O>

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

I88e Ito, Mitsue, 1994-
Efeito dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* e dos terpenos timol e carvacrol, sobre adultos e massas ovíferas de *Pseudosuccinea columella* / Mitsue Ito. - 2021.
66 f. : il.

Orientadora: Isabella Vilhena Freire Martins.
Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) -
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Moluscos. 2. Tomilho. 3. Orégano. 4. Essências e óleos essenciais. 5. Terpenos. I. Martins, Isabella Vilhena Freire. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. III. Título.

CDU: 619

“A persistência é o menor caminho do êxito”.
(Charles Chaplin)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à Deus, pois sem ele nada seria possível.

A Universidade Federal do Espírito Santo agradeço pela estrutura e serviços prestados durante a realização do mestrado.

Agradeço imensamente a minha orientadora Isabella que me recebeu de braços abertos, teve muita paciência e me ensinou muito durante todo o programa de pós graduação.

Obrigada principalmente à minha família, em especial a minha mãe e minha avó, que me apoiaram durante todos os meus estudos.

Agradeço também, a todos os meus amigos que estiveram me apoiando e ajudando durante essa caminhada, em especial a Lais, que esteve em todos os momentos difíceis da pós graduação e da vida pessoal.

Gostaria de agradecer a todos os colegas de laboratório, principalmente ao Ygor, Lais e Natânia que me ajudaram com o moluscário.

Agradeço a Professora Jankerle Neves Boeloni, Júlio Francisco Valiati Marin e todos as colegas do laboratório de patologia pelo auxílio na preparação e leitura das lâminas de histologia.

Agradeço a Bárbara Rauta de Avelar pela ajuda e orientações na realização da estatística do experimento.

Agradeço ao Laboratório de Química do CCAE, pela parceria e empenho na diluição dos óleos.

Agradeço também ao Laboratório de Malacologia da FIOCRUZ, e a todos os seus funcionários, principalmente a Silvana e a Martinha por me recebem e ensinarem com tanto empenho durante meu treinamento da instituição.

Agradeço ao Professor Eduardo Torres e ao aluno de Pós-graduação Makoto Enoki Caracciolo por terem me auxiliado e cedido o laboratório de parasitologia na UERJ. Agradeço também aos professores Michel Picanço Oliveira e Danilo de Lima Camelo pela disponibilidade e auxílio na MEV.

A FAPES (TO099/2019), pelo auxílio financeiro do projeto durante a pós graduação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

ITO, MITSUE Efeito dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* e dos terpenos timol e carvacrol, sobre adultos e massas ovígeras de *Pseudosuccinea columella*, 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Centro de Ciências Veterinárias) – Centro de Ciências Agrárias e Engenharias – CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2021.

A fasciolose é uma doença de distribuição mundial que pode levar a grandes prejuízos econômicos na criação de ruminantes e possui como hospedeiro intermediário moluscos aquáticos, sendo *Pseudosuccinea columella* uma das espécies mais frequentes. Os moluscidas sintéticos são indicados para o controle dos moluscos, entretanto, são tóxicos para diversas espécies de plantas e animais, sendo prejudiciais ao meio ambiente. Devido a necessidade da busca de novas substâncias naturais, menos nocivas ao meio ambiente e que possam atuar no controle de moluscos, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* e dos terpenos timol e carvacrol, sobre adultos e massas ovígeras de *P. columella*. Os óleos de *T. vulgaris*, *O. vulgare* e os majoritários, timol e carvacrol, foram diluídos nas concentrações de 10, 20, 40, 60, 80 e 100 ppm, como controle positivo se utilizou o sulfato de cobre (CuSo₄) e como controle negativo se utilizou a água potável (H₂O) e o Dimetilsulfóxido (DMSO) 1% (diluyente das soluções). Os moluscos foram divididos em grupos de 10 espécimes para cada solução, foram expostas as diferentes soluções teste pelo período de 24 horas e avaliados durante esse período nos tempos de 30 minutos, duas, seis, 12 e 24 horas. A mesma metodologia foi utilizada com as massas ovígeras, entretanto, as massas foram expostas as substâncias por 24 horas, passaram pelo processo de lavagem e foram avaliadas por 18 dias após exposição. Durante o estudo biológico dos moluscos adultos se observou que os óleos essenciais de orégano nas concentrações de 60, 80 e 100 ppm e tomilho na concentração de 100 ppm levaram a morte de 100% dos e se mostraram dentro das normas estabelecidas pela Organização Mundial da Saúde para uma mistura complexa de substâncias. Os óleos essenciais e componentes majoritários se mostraram efetivos na inibição do crescimento e da eclosão das massas. Somente as massas expostas ao majoritário timol, nas concentrações de 10, 20 e 40 ppm, eclodiram. Em relação a histologia, foi possível observar vacuolizações e fragmentação nos tecidos de glândula digestiva, ovotestis e manto nos moluscos

tratados com os óleos essenciais e os componentes majoritários. Notou-se ainda na histologia, áreas de autólise em moluscos tratados com timol na concentração de 80 ppm. Na Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) encontraram-se alterações teciduais em glândula digestiva e manto nas concentrações de 100 ppm dos óleos essenciais e seus componentes majoritários. Assim, pode-se concluir que os óleos essenciais de *O. vulgare* e *T. vulgaris* se comportaram como substâncias moluscidas em *P. columella*. Além disso, notou-se efeitos inibitórios no crescimento e eclosão das massas ovígeras tratadas com os componentes majoritários e os óleos essenciais estudados.

Palavras-chave: 1. Caramujo 2. *Controle alternativo* 3. *Fasciola hepatica* 4. *Moluscicida*

ABSTRACT

ITO, MITSUE **Effect of essential oils from *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* and terpenes thymol and carvacrol on adults and ovigerous masses of *Pseudosuccinea columella*.**, 2021. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinárias) – Centro de Ciências Agrárias e Engenharias– CCAE, Universidade Federal Espírito Santo, Alegre, ES, 2021.

Fasciolosis is a disease with worldwide distribution that can lead to great economic losses in ruminant breeding and has aquatic molluscs as an intermediate host, with *Pseudosuccinea columella* being one of the most frequent species. Synthetic molluscicides are indicated for the control of molluscs, however, they are toxic to several species of plants and animals, being harmful to the environment. Due to the need to search for new natural substances, less harmful to the environment and that can act in the control of molluscs, the aim of the study was to evaluate the effect of essential oils from *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* and terpenes thymol and carvacrol, on adults and ovigerous masses of *P. columella*. The oils of *T. vulgaris*, *O. vulgare* and the major ones, thymol and carvacrol, were diluted in concentrations of 10, 20, 40, 60, 80 and 100 ppm, as a positive control using copper sulfate (CuSO₄) and as negative control, drinking water (H₂O) and 1% Dimethylsulfoxide (DMSO) (solutions diluent) were used. The molluscs were divided into groups of 10 specimens for each solution, the different test solutions were exposed for a period of 24 hours and evaluated during this period at times of 30 minutes, two, six, 12 and 24 hours. The same methodology was used with the ovigerous masses, however, the masses were exposed to substances for 24 hours, went through the washing process and were evaluated for 18 days after exposure. During the biological study of adult molluscs, it was observed that essential oils of oregano at concentrations of 60, 80 and 100 ppm and thyme at a concentration of 100 ppm led to the death of 100% of them and were within the standards established by the World Health Organization for a complex mixture of substances. Essential oils and major components proved to be effective in inhibiting the growth and hatching of eggs. Only the masses exposed to the majority of thymol, at concentrations of 10, 20 and 40 ppm, hatched. Regarding histology, it was possible to observe vacuolization and fragmentation in the tissues of the digestive

gland, ovotestis and mantle in molluscs treated with essential oils and major components. It was also noted in histology, areas of autolysis in molluscs treated with thymol at a concentration of 80 ppm. Scanning Electron Microscopy (SEM) showed tissue changes in the digestive gland and mantle at 100 ppm concentrations of essential oils and their major components. Thus, it can be concluded that the essential oils of *O. vulgare* and *T. vulgaris* behaved as molluscicide substances in *P. columella*. In addition, inhibitory effects were noted on the growth and hatching of ovigerous masses treated with the major components and essential oils studied.

Keywords: 1. Snail 2. Alternative control 3. *Fasciola hepatica* 4. Molluscicide

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomia do sistema reprodutivo do molusco *Pseudossucinea columella*. 6

Figura 2 - Estruturas histológicas dos moluscos *Pseudossucinea columella*. 1- Ovotestis (objetiva 4x); 2- Glândula albuminosa (objetiva 4x); 3- massa cefalopodal (objetiva 4x) e 4- glândula digestiva (objetiva 4x).....7

Figura 3 - Fotografia ultra estrutural do molusco *Pseudossucinea columella* em microscopia eletrônica de varredura. Demonstrando estruturas gerais dos moluscos (glândula digestiva, massa cefalopodal e manto) (A e B) e glândulas digestiva e albuminosa (C e D).8

Figura 4 - Avaliação das massas ovígeras de *Pseudossucinea columella* tratadas com os controles DMSO 1% e CUSO₂ (sulfato de cobre) 1%. Foi avaliado o crescimento e movimentação dos embriões, além da eclosão dos mesmos em estereomicroscópio no aumento de 2x.....28

Figura 5 - Avaliação das massas ovígeras de *Pseudossucinea columella* após exposição aos óleos essenciais e componentes majoritários no período do dia 0 e após 18 dias de avaliação.30

Figura 6 Histologia dos moluscos tratados com os óleos essenciais de *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* e seus componentes majoritários.33

Figura 7 Microscopia Eletrônica de Varredura em *Pseudossucinea columella* evidenciando alterações decorrentes do uso dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* (D) e *Thymus vulgaris* (F) e componentes majoritários, timol (E) e carvacrol (C) nas concentrações de 100 ppm. Controles de cobre 1% (A) e DMSO 1% (B)...35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Porcentagem de mortalidade de *Pseudossucinea columella* em relação ao tempo após exposição aos óleos essenciais de *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* e aos componentes majoritários timol e carvacrol.....23

Tabela 2. Dados estatísticos da CL₅₀ de *Pseudossucinea columella* tratados com óleos essenciais e *Thymus vulgaris* e *Origanum vulgare* e o majoritário carvacrol...25

Tabela 3. Percentual de eclosão de massas ovíferas de *Pseudossucinea columella* após a exposição aos óleos essenciais de *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, timol e carvacrol em avaliações periódicas durante 18 dias.27

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.2 <i>Pseudosuccinea columella</i> (say, 1817)	5
2.3 Medidas de controle de moluscos	8
2.4.1 <i>Origanum vulgare</i> L.	14
2.4.2 <i>Thymus vulgaris</i>	14
2.5 Componentes majoritários.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Coleta dos moluscos adultos de <i>Pseudossuccinea columella</i> e manutenção do moluscário.....	16
3.3 Exposição do <i>Pseudossuccinea columella</i> adultos aos óleos de <i>Thymus vulgaris</i> , <i>Origanum vulgare</i> e seus componentes majoritários, Timol e Carvacrol.	17
3.4 Fixação dos moluscos	18
3.5 Exposição das massas ovíferas dos moluscos aos óleos de <i>Thymus vulgaris</i> , <i>Origanum vulgare</i> e componentes majoritários, timol e carvacrol.....	19
3.6 Histologia.....	19
3.7 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	20
3.8 Análise estatística de dados	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1 Identificação e composição dos óleos essenciais de <i>Thymus vulgaris</i> e <i>Origanum vulgare</i>	22
4.2 Teste biológico com moluscos adultos	22
4.3 Teste biológico com as massas ovíferas dos moluscos	26
4.4 Análises histológicas <i>Pseudossuccinea columella</i> expostos aos óleos essenciais e componentes majoritários	31

4.5	Analises da Microscopia Eletrônica de Varredura em <i>Pseudossucinea columella</i>	34
6.	REFERÊNCIAS	37

1. INTRODUÇÃO

A fasciolose é uma zoonose emergente causada por *Fasciola hepatica*, um helminto que parasita o fígado de vários mamíferos, principalmente bovinos e ovinos. *F. hepatica* pode levar a grandes prejuízos econômicos na produção pecuária, isso ocorre porque os animais parasitados, quando abatidos, apresentam os fígados impróprios para o consumo levando a sua condenação nos frigoríficos (COSTA *et al.*, 2015; RODRIGUES; SOUZA, 2019). Além dos prejuízos no abate dos animais, a parasitose leva a diminuição na fertilidade, baixo ganho de peso, diminuição na produção de carne, leite e lã (MARTINS *et al.*, 2014).

Um dos principais moluscos vetores da fasciolose encontrado no Brasil é *Pseudosuccinea columella*, um molusco aquático que vive em proximidade a água doce estagnadas com curso lento e podem ser encontrados sobre lama úmida ou ainda sobre vegetais em decomposição. Estes moluscos estão presentes no ciclo de *F. hepatica* atuando como o hospedeiro intermediário desse trematoda, sendo seu controle essencial para o controle da fasciolose (CASTRO *et al.*, 2019a; DIAS *et al.*, 2013).

Oreganum vulgare (orégano) é uma Lamiaceae, uma planta aromática com origem na bacia do Mediterrâneo, cultivada em todo o mundo. O orégano é abundante em carvacrol, uma substância que possui atividades anti-inflamatórias e antitumorais. *Thymus vulgaris* (tomilho) também está presente na família das Lamiaceas, se encontra distribuída mundialmente, possui como componentes majoritários o timol e o carvacrol, compostos monoterpênicos fenólicos que possuem atividade antissépticas e antibacterianas (PALLA *et al.*, 2020; REIS *et al.*, 2020).

As Lamiaceas *T. vulgaris* e *O. vulgare* podem ser utilizadas como base para obtenção de óleos essenciais. Os óleos essenciais são substâncias presentes naturalmente em plantas, sendo compostos voláteis, com odor e não miscíveis ou pouco miscíveis em água (REIS *et al.*, 2020; SANTORO *et al.*, 2006). Atualmente, estudos demonstraram que compostos vegetais desempenharam ação moluscicida sobre os moluscos da espécie *P. columella* como por exemplo: óleo essencial *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Poaceae), o óleo essencial *Eugenia uniflora* L e os extratos *Davilla elliptica* e *D. nitida* (COSTA *et al.*, 2015; GARDIOLI *et al.*, 2017;

PINHEIRO *et al.*, 2017).

Atualmente vem crescendo a necessidade do uso de compostos biodegradáveis de origem vegetal que acarretem menos prejuízos econômicos ao meio ambiente para o controle de moluscos vetores (COSTA *et al.*, 2015), visto que a única substância recomendada pela Organização das Nações Unidas (OMS) é a niclosamida, uma substância sintética e tóxica para várias espécies e que pode levar a contaminação ambiental (COSTA *et al.*, 2015; PINHEIRO *et al.*, 2003).

Visto a necessidade da busca de novas substâncias que possuam atividade moluscicida e que sigam as diretrizes da OMS, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito dos óleos essenciais de *T. vulgaris*, *O. vulgare* e dos terpenos timol e carvacrol, sobre adultos e massas ovígeras de *P. columella*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Fasciola hepatica*

Fasciola hepatica é um platelminto trematoda que acomete os ductos biliares de diversos mamíferos. Pode ser encontrado em regiões com o clima temperado, regiões frias com altitude elevada nos trópicos e também em regiões subtropicais. Morfologicamente apresenta corpo achatado dorso-ventralmente, com coloração cinza-amarronzada e formato foliáceo. Apresenta duas ventosas para fixação, seu sistema digestório é simples e sua extremidade anterior é alongada em formato de cone (ALEMU, 2019).

Este trematoda possui como hospedeiro definitivo mamíferos, principalmente ruminantes, como por exemplo, os ovinos, bovinos, caprinos, equinos, veados, coelhos e em alguns casos pode acometes até os humanos, sendo considerada então uma zoonose (BENNEMA *et al.*, 2014; BOSTELMANN *et al.*, 2020).

Para que se complete o ciclo da fasciolose é necessário que se tenha presente o hospedeiro intermediário, *P. columella*. Embora esteja com maior prevalência nos estados da região sul, o molusco está amplamente distribuído no Brasil, o que está diretamente relacionado com seu habitat e clima adequado para se desenvolver (BENNEMA *et al.*, 2014; MEDEIROS *et al.*, 2014).

O parasito está presente nos ductos biliares de mamíferos e lá excreta ovos que saem na bile e chegam ao intestino. Os ovos, por conseguinte, são liberados juntamente com as fezes, onde se desenvolvem e eclodem na fase evolutiva de miracídios. O miracídio por sua vez penetra em um molusco da família Lymnaeidae, onde prossegue com seu crescimento dentro do hospedeiro intermediário passando pelos estágios de esporocisto, rédia e cercária. A cercária é excretada pelo molusco e se fixa na vegetação próxima, se encista e origina a metacercária. O hospedeiro definitivo acaba por ingerir a forma infectante, que se fixa e se encista no intestino delgado, migram até chegar ao fígado e ductos biliares, onde alcançam a maturidade sexual. *F. hepatica* demora de 17 a 18 semanas para completar seu ciclo (TAYLOR; COOP; WALL, 2017).

As fases jovens do trematoda migram para o parênquima do fígado e promove lesões, caracterizando a fase aguda da doença. Já os parasitos adultos levam a espoliação dos ductos biliares, gerando calcificação dos ductos na fase crônica da doença. Pode-se destacar ainda que as lesões do parasito no parênquima hepático podem predispor a infecções bacterianas (MARTINS, 2019).

No caso dos humanos, *F. hepatica* poderá completar o seu ciclo quando ocorrer a ingestão de plantas aquáticas como Agrião (*Nasturtium officinale*) e o alface (*Lactuca sativa*), em saladas cruas, e também por ingestão de suco de alfafa (*Medicago sativa*), que poderão estar contaminados com forma infectante do parasito (CASTRO *et al.*, 2019b).

Os fígados parasitados pela *F. hepatica* geram grandes prejuízos econômicos pois, não são indicados para consumo e condenados pelo serviço de inspeção nos frigoríficos (RODRIGUES; SOUZA, 2019). Segundo MOLENTO *et al.* (2018), a fasciolose levou uma perda econômica de aproximadamente 210 milhões de dólares por ano no Brasil entre os anos de 2002 a 2010. Os autores puderam constatar também que se não houver medidas de controle parasitárias adequadas para a doença haverá um provável aumento na fasciolose no país.

Medidas de controle devem ser tomadas para que ocorra controle do hospedeiro intermediário pois, sem o caramujo *F. hepatica* não consegue chegar à forma infectante, sendo essencial dentro do ciclo. Algumas das medidas de controle utilizadas são: Utilização dos sistemas de drenagem, filtração da água de beber dos animais, e controle dos pastoreios dos animais (CARMONA; TORT, 2016; MORALES, *et al.* 2013).

Outras medidas de controle são a utilização fármacos fasciolícticas e moluscicidas, entretanto as substâncias químicas fasciolícticas possuem período de carência no leite e as moluscicidas podem levar a intoxicação de outras espécies no ambiente (MORALES, *et al.*, 2013). Além disso, os produtos químicos que possuem atividade moluscicida podem induzir uma seleção na população de moluscos resistentes, agravando ainda mais o problema (ALEIXO *et al.*, 2015).

2.2 *Pseudosuccinea columella* (say, 1817)

Fasciola hepatica possui como hospedeiro intermediário moluscos pertencentes a família Lymnaeidae, distribuídos geograficamente por em todo o mundo. A espécies dos moluscos encontrados no Brasil são *Pseudosuccinea columella*, *Galba viatrix* e *Lymnaea rupestres* (CARVALHO *et al.*, 2014), entretanto, a mais comum que atua como hospedeiro intermediário é o *P. columella* (MEDEIROS *et al.* 2014).

O molusco está presente no Brasil nos estados do Acre, Amazonas, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Paraíba, Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Goiás, Paraná, São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (CARVALHO *et al.*, 2014). Segundo Medeiros *et al.* (2014); Dias *et al.* (2013); Carneiro *et al.* (2010), *P. columella* também se encontra presente no estado do Espírito Santo. Medeiros *et al.* (2014) relatam que *P. columella* é a espécie mais comum e bem distribuída nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, tem poucos registros nas regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste.

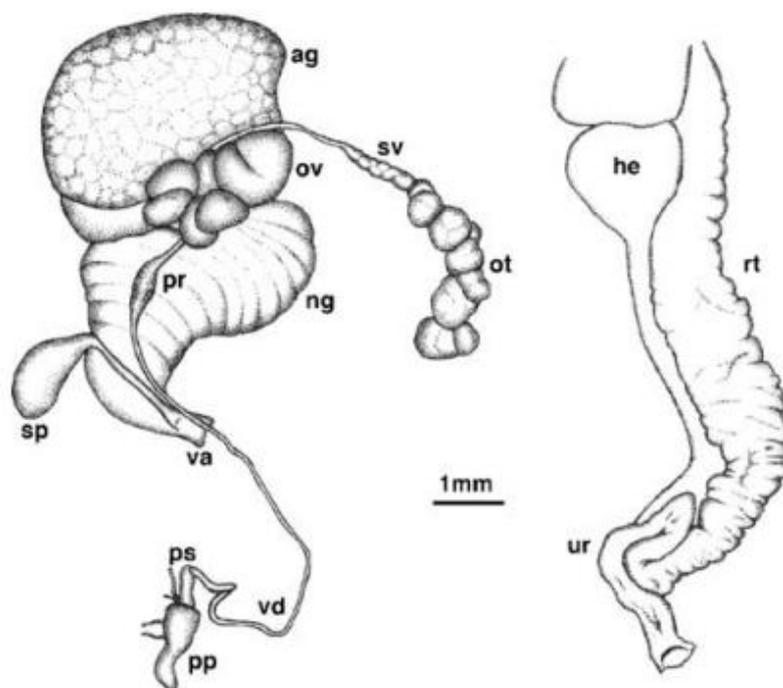
Pseudosuccinea columella se encontra em pequenas coleções de água, próximo as margens, em águas limpas e de fraca correnteza. Seu habitat pode ser em ambientes naturais, como córregos e lagoas, ou ainda em ambientes artificiais, como pequenos açudes e valas de irrigação (CARVALHO *et al.*, 2014). Em relação ao substrato dos locais onde os moluscos habitam, é importante destacar que devem ser ricos em argila fina e detritos orgânicos, principalmente ricos em detritos vegetais e micro-organismos epifíticos e epilíticos, pois é a principal fonte de alimento dos caramujos. Além disso, os sedimentos presentes nos substratos o tornam denso e macio, facilitando que os moluscos se enterrem, evitando o contato direto com a luz, o que ocorre principalmente em habitats com pouco cobertura vegetal (BARBOSA, 1995).

A espécie *P. columella* possui conchas que medem em torno de 8mm largura e aproximadamente 17mm de comprimento, possuindo suturas rasas, giros arredondados, espira pequena e um giro no corpo volumoso podendo ocupar até 2/3 do comprimento da concha. No manto, se encontra o aparelho urinário (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Os tentáculos apresentam formato achatado e triangular, podem utilizar a autofecundação ou a fecundação cruzada, sendo então classificados como

hermafroditas (CARVALHO *et al.*, 2014). Os animais apresentam coloração acinzentada ou amarela, podendo apresentar manchas enegrecidas com diversos tamanhos na região do manto (UETA, 1977).

Em relação as características mais importantes para a identificação da espécie de *P. columella*, podemos citar a presença de uma dupla flexão no ureter, a próstata se apresenta do tipo fio para o tipo fita, o tamanho do prepúcio é de duas a seis vezes maior que o comprimento do pênis e a bainha penial do animal está desprovida de minuto e câmaras apicais (PARAENSE, 1983; POINTIER *et al.*, 2007). Na figura 1 pode-se observar as estruturas do sistema reprodutivo do molusco *P. columella*.

Figura 1. Anatomia do sistema reprodutivo do molusco *Pseudossucinea columella*.



Ag: glândula albuminosa, he: coração; ng: glândula nidamental, ot: ovoteste, ov: oviduto, pr: próstata, pp: prepúcio, os: bainha do pênis, rt: tubo renal, sp: espermatoteca, ur: ureter, va: vagina, vd. ducto deferente (observar dupla flexão do ureter, característica do *P. columella*).

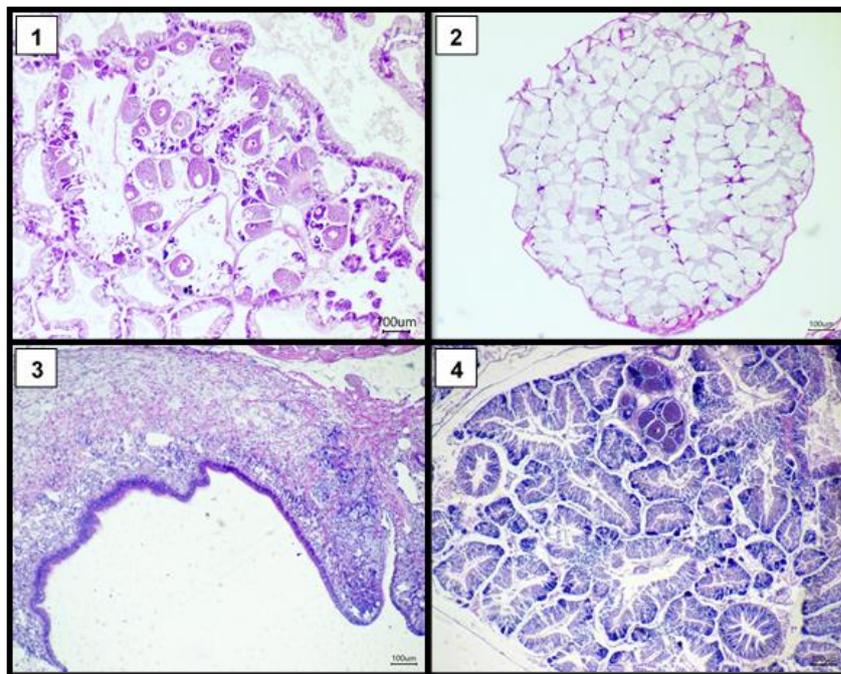
Fonte: Pointier *et al.* (2007)

Os moluscos Lymneideos apresentam a glândula digestiva em quase todo o seu corpo, ela apresenta epitélio escamoso, apoiado em uma fina camada de tecido

conjuntivo fibroso. As glândulas são revestidas por epitélio simples, onde predominam dois tipos de células: as células digestivas e as células secretoras. As glândulas digestivas dos moluscos são órgãos-alvo para agentes contaminantes, pois está diretamente ligada ao metabolismo de substâncias orgânicas, inorgânicas e também produtos químicos. Os moluscos apresentam a ovotestis, glândula onde se localizam as células germinativas masculinas e femininas e esta glândula é recoberta pela glândula albuminosa (KANAPALA; ARASADA, 2013).

O manto dos moluscos é uma fina camada, com uma única camada de células epiteliais revestindo o corpo e com organização de células glandulares subepidérmicas (VIAJAYA; PRIYADARSINI, 2014). A massa cefalopodal possui função sensitiva e de locomoção (CARVALHO, 2014). A figura 2 mostra as estruturas histológicas dos moluscos da espécie *P. columella*.

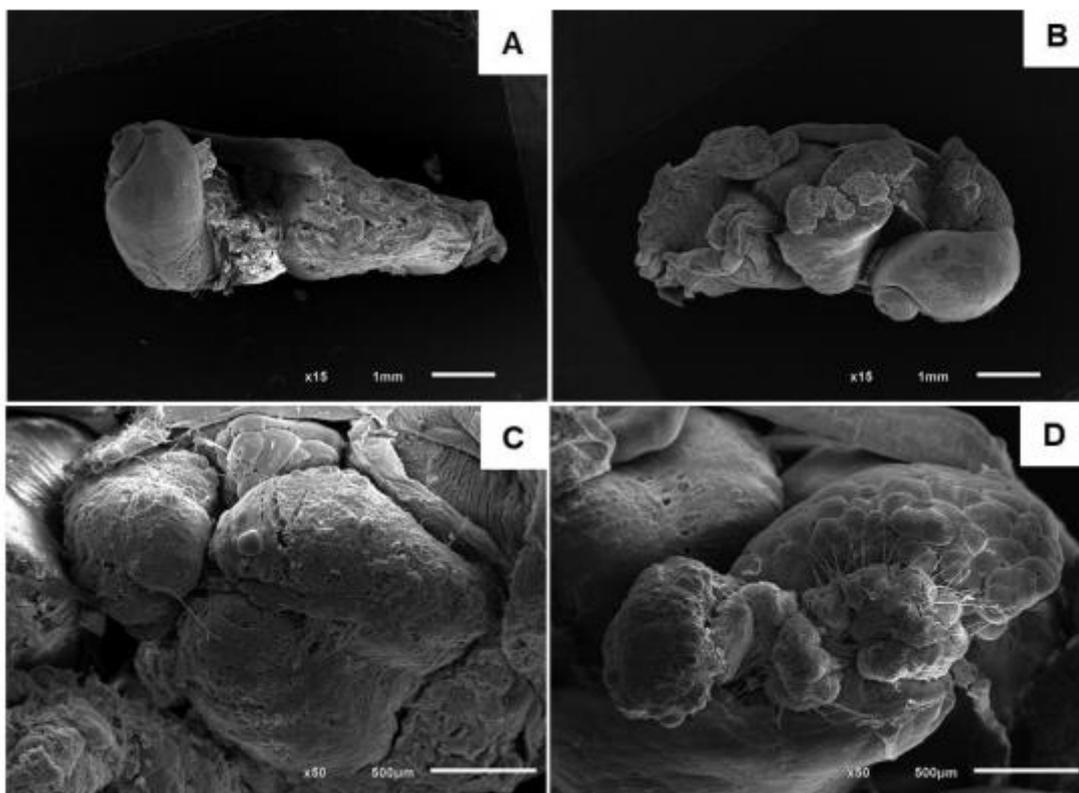
Figura 2 - Estruturas histológicas dos moluscos *Pseudosuccinea columella*. 1- Ovotestis (objetiva 4x); 2- Glândula albuminosa (objetiva 4x); 3- massa cefalopodal (objetiva 4x) e 4- glândula digestiva (objetiva 4x).



Fonte: O autor

Vidal (2020) demonstrou as estruturas gerais de *Pseudosuccinea columella* na Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), como a glândula albuminosa, massa cefalopodal e glândula digestiva (figura 3).

Figura 3 - Fotografia ultra estrutural do molusco *Pseudossucinea columella* em microscopia eletrônica de varredura. Demonstrando estruturas gerais dos moluscos (glândula digestiva, massa cefalopodal e manto) (A e B) e glândulas digestiva e albuminosa (C e D).



Fonte: Vidal, 2020 modificado.

2.3 Medidas de controle de moluscos

O controle da população de hospedeiros intermediários é essencial para que ocorra a redução da transmissão de fasciolose, já que os moluscos são essenciais para *F. hepatica* completar seu ciclo biológico. Algumas formas de controle são: controle químico com fármacos de ação moluscicida como por exemplo cobre e niclosamida; controle ambiental ou físico; controle biológico; e ainda o controle com produtos de origem vegetal (ALEMU, 2019).

O controle físico ou ambiental dos moluscos se define como combater as condições que são propícias para o crescimento e permanência destes animais, pela modificação física dos criadouros. As medidas de controle dos caramujos adotadas são em sua maioria, mudanças drásticas dos habitats, eliminando coleções de água

ou ainda tornando-as inviáveis como criadouro dos moluscos, como por exemplo na canalização das águas. Na maior parte dos países onde se tem uma endemia de moluscos aquáticos transmissores de zoonoses, não se possui uma perspectiva para melhorias que levem a eliminação total dos focos de transmissão (BARBOSA, 1995).

Outra opção para o controle físico desta parasitose, pode ser realizado com a diminuição das áreas de alagamentos nas pastagens pelo uso da drenagem dos solos, além de predadores naturais, como por exemplo, criação de aves aquáticas (OLIVEIRA; SPOSITO-FILHA, 2009).

Segundo VIDAL (2020) realiza-se ainda como métodos de controle de moluscos, o aterramento de corpos hídricos, retificação de leito dos rios, retirada e limpeza da vegetação aquática do ambiente, entretanto alguns malefícios podem ser notados como custo elevado, alterações ambientais e eutrofização pela drenagem de sedimentos.

Se utiliza o controle ambiental como uma estratégia complementar ao controle químico ou ainda como única alternativa nos casos onde não se pode utilizar outro método de controle químico. Além disso, as medidas de controle ambiental envolvem uma série de medidas em larga escala e possuem altos custos, e por isso as campanhas que atuam no combate dos caramujos vetores tem dado preferência ao controle com substâncias químicas (BARBOSA, 1995).

As substâncias moluscidas possuem a função de exterminar os moluscos que vivem em campos e jardins, além de atuarem no controle de caramujos vetores de zoonoses. Elas podem ser classificadas como substâncias sintéticas ou podem possuir origem vegetal (COSTA *et al.*, 2015).

Atualmente são conhecidas algumas substâncias sintéticas para controle químicos dos moluscos: Gramaxone, hidróxido de cálcio, N-tritilmorfolina, niclosamida, carbamato, metaldeido, Sulfato de cobre e organofosfato (COSTA *et al.*, 2015; CANTANHEDE *et al.*, 2010). A niclosamida, um moluscida sintético, é a única substância recomendada pela Organização das Nações Unidas para eliminar os moluscos vetores de zoonoses. Para que uma substância seja caracterizada como substância moluscida ela deverá levar a mortalidade de 90% (DL₉₀). Em relação a substância ativa, ela deverá alcançar mortalidade maior que 90% em concentrações menores que 20 ppm (MCCULLOUGH *et al.*, 1980; WOH, 1983;).

A niclosamida a três ppm foi utilizada para controle de moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata* em coleções hídricas de Capim Branco- MG, inicialmente houve

redução do número de caramujos, mas a população se tornou resistente, se refazendo em três meses após aplicação do moluscicida. Não houve a diminuição permanente da população de caramujos, demonstrando que o uso de niclosamida como medida única de controle de moluscos não é eficaz (COURA-FILHO *et al.*, 1992).

O cobre e seus derivados podem ser utilizados no controle de moluscos aquáticos vetores de zoonose e seu sucesso está ligado com a não necessidade de ocorrer a ingestão do íon para que ocorra o efeito tóxico, somente o contato do cobre com o molusco já é o suficiente para se ter o efeito moluscicida da substância. Notou-se ainda que o sulfato de cobre se mostrou extremamente tóxico para *Pomacea canaliculata* (VENTURINI; CRUZ; PITELLI, 2008).

Soares *et al.* (2009) relataram que o uso de sulfato de cobre, como agente moluscicida, não é recomendado por órgãos ambientais, como por exemplo pelo EPA (United States Environmental Protection Agency), pois é tóxico para os organismos aquáticos. De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2011) o uso de cobre nas formas de hidróxido, oxicloreto, sulfato, óxido e octanoato são proibidos para uso após a colheita e como agente fungicida, sendo necessária autorização para seu uso pelo OAC (organização de Avaliação da Conformidade Orgânica) ou pela OCS (Organização de Controle Social), minimizando o acúmulo de substância no solo.

As substâncias sintéticas de caráter moluscicida vêm se mostrando muito agressivas ao meio ambiente, além disso, essas substâncias proporcionaram aumento da resistência dos moluscos, possuem baixa seletividade de espécies quando expostas ao meio ambiente levando a significativas alterações de ecossistema e apresentam custo elevado, se mostrando inviáveis para o uso em países com pouco recurso financeiro (CATANHEDE *et al.*, 2010). Visto esses fatores, o uso de substâncias naturais biodegradáveis se mostra uma alternativa interessante para o controle de moluscos vetores de zoonoses (CATANHEDE *et al.*, 2010; Mcclough *et al.* 1980).

Experimentos com relação ao controle biológico de moluscos límnicos de caráter zoonótico vem ocorrendo desde a década de 50 (BRASIL, 2008).

Foram descritos na literatura o controle biológico de moluscos dulcícolas pelo uso de outros moluscos gerando uma competitividade de habitat. O caramujo *Marisa cornuarietis* foi utilizado como predador acidental de moluscos jovens e ovos, conseguindo até eliminar totalmente algumas populações de *Biomphalaria* (FREITAS;

SANTOS, 1995; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Ministério da saúde (2008) cita ainda que peixes como a tilápia, são capazes de atuar como predadores e competidores dos caramujos dulcícolas, isso ocorre pois, ingerem plantas, massas ovíferas e também caramujos recém eclodidos.

Duarte *et al.* (2015) utilizaram em seus estudos o fungo nematófago *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* como alternativa de controle de postura de massas ovíferas de *B. glabrata* e perceberam que viabilidade e maturação das massas ovíferas foram inibidas pelos fungos, sendo estes fungos alternativas de controle. Castro e colaboradores (2019) expuseram experimentalmente a massas ovíferas dos moluscos da espécie *P. columella* ao fungo *Pochonia chlamydosporia* Pc – 10 e observou que houve inibição do processo de embriogênese, levando também ao comprometimento da eclodibilidade dos embriões e confirmando possível uso para controle do molusco hospedeiro intermediário *F. hepatica*.

Os nematóides entomopatogênicos (NEPs) também atuam como alternativa de controle de moluscos límnicos, uma vez que os gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* estão associados a bactérias do gênero *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* (BURNEL; STOCK, 2000; TUNHOLI *et al.* 2017) atuando como vetores para disseminação destas bactérias no corpo do hospedeiro, podendo levar a septicemia e morte dos animais parasitados (GREWAL *et al.*, 2001; TUNHOLI *et al.*, 2017).

Tunholi-Alves *et al.*, (2011) utilizaram experimentalmente NEPs que parasita o pulmão de roedores, *Angiostrongylus cantonensis*, como alternativa de controle do molusco *B. glabrata*. As larvas deste nematoide atuam na castração parasitária levando a diminuição no conteúdo de galactogênio na glândula albuminosa dos animais infectados.

Vidal (2020) utilizaram NEPs da espécie *Heterorhabditis baujardi* LPP7 em moluscos da espécie *P. columella*, onde os nematoides levaram a alterações fisiológicas, reprodutivas e teciduais, sendo uma alternativa de controle dos moluscos.

Os extratos vegetais são substâncias produzidas pelo esgotamento, a quente ou a frio e com solventes lícitos, a partir de produtos de origem vegetal. Durante a extração ocorre seletividade de compostos específicos da planta, em função dos solventes que serão utilizados durante a extração (ANVISA, 2007).

Os Produtos de origem vegetal vêm sendo utilizados como alternativa para o controle de moluscos vetores de zoonoses. Os extratos de *Davilla nitida* e *Davilla elliptica*, plantas naturais do cerrado, apresentaram atividade moluscicida em adultos

de *P. columella* em um período de 24 horas. *D. elliptica* também conseguiu desencadear efeitos ovicidas nas desovas destes moluscos (GARDIOLI, 2017).

Outros extratos também foram testados e se mostraram eficazes contra outras espécies de moluscos: *Melia azedarach* L. apresentou atividade moluscicida em *Lymnaea cubensis* (PEREZ *et al.*, 2017) e os extratos vegetais de *Ammona muricata*, *Jatropha elliptica* (ROCHA *et al.*, 2003), *Kielmeyra variabilis* (PINHEIRO *et al.*, 2003), *Lycopersicon esculentum* (LEYTON *et al.*, 2005) se mostraram efetivos em *B. glabrata*.

Vasconcellos e Amorim, (2003) utilizaram o látex da planta *Euphorbia splendens* var. *hisloppi* NEB (“coroa de Cristo”) para avaliar potencialidade moluscicida em *P. columella*, e obtiveram resultados positivos, obtendo morte de 100% dos moluscos com concentração de 5 mg/ L.

Srivastava e Singh (2019) relatam que o terpenóide timol se mostrou um biocida promissor para moluscos, pois apresentou atividade moluscicida para ovos de molusco adultos da espécie *Biomphalaria similis*. Salama; Taher e El-bahy (2012) testaram os compostos *Thymus capitus* e *Marrubium vulgare* L., com os componentes majoritários timol e carvacrol relatam que, somente timol atuou como biocida para *B. alexandrina*. Os autores obtiveram resultados positivos também nas concentrações de 200 e 400 ppm em *T. capitus* e nas concentrações de 50 e 100ppm em *M. vulgare*, ambos no período de 3 horas. *M. vulgare* se mostrou efetivo também contra as desovas dos moluscos, entretanto, o *T. capitus* não apresentou atividade ovicida.

Em relação a fisiologia dos moluscos após o contato com as substâncias moluscicidas naturais, Cantanhede *et al.* (2010) citam que os moluscos podem apresentar necrose da glândula digestiva, redução das reservas de glicogênio e aumento das proteínas presentes na hemolinfa do molusco.

Catanhede *et al.*, (2010); Singh *et al.*, (2010) relatam que possivelmente a atividade moluscicida dos compostos de origem vegetal se dá pela presença de metabólitos secundários, como por exemplo os taninos, saponinas, terpenoides, alcaloides, esteroides, lactonas sesquiterpênicas e flavonoides. Estes compostos, podem provocar uma intoxicação nos caramujos, o que desencadeia: desequilíbrio osmótico, projeção anormal da massa cefalópode para fora da concha ou retração da massa cefalopodal para o interior da concha e liberação de hemolinfa.

Segundo Srivastava e Singh (2019) os componentes comuns presentes nos óleos essenciais, substâncias terpenóides como o eugenol e o timol, apresentaram

atividade moluscicida e ovicida, afetando a sobrevivência, reprodução e sucesso de incubação dos moluscos. E com esses efeitos citados, os terpenóides apresentam grande potencial para uso no controle de moluscos vetores. Outra forma de avaliar o potencial moluscicida de uma substância é avaliar se ela inviabiliza o crescimento massa ovígera ou leva a morte das mesmas (GARDIOLI *et al.*, 2017).

2.4 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são constituintes voláteis, com odor e pouco miscíveis em água, são substâncias encontradas naturalmente em plantas, possuem várias substâncias químicas em sua composição, geralmente derivadas de misturas de terpenóides ou fenilpropanóides. Podem estar presentes em folhas, frutos, raízes, sementes, rizomas e hastes. Estes compostos também apresentam grande importância na indústria alimentícia, como flavorizantes, aromatizantes e conservantes naturais dos alimentos (PINHEIRO *et al.*, 2018; REIS *et al.*, 2020;).

A constituição dos óleos pode variar entre 20 a 60 componentes em concentrações distintas. Por tanto, os efeitos biológicos produzidos podem ser resultado de sinergismo das moléculas presentes no composto, ou das moléculas presentes em maior concentração n. Por outro lado, em alguns casos o componente majoritário do óleo essencial pode se mostrar mais ativo sozinho do que quando estava presente no óleo essencial, o que se justifica por uma ocorrência de antagonismo entre os componentes do óleo (PENSEL *et al.*, 2014).

Há vários métodos que podem ser empregados na extração dos óleos essenciais, são eles: hidro destilação, destilação a vapor, extração por fluido supercrítico, extração por solventes orgânicos e prensagem a frio. É importante destacar, que o rendimento da extração, bem como a composição do óleo essencial pode ter interferência de diversos fatores, por exemplo, a escolha da planta, composição da planta, horário que houve a colheita da plântula, temperatura do ambiente, método de extração e também, a interação entre o óleo essencial e o solvente utilizado no ensaio. Assim, os métodos empregados para a extrair o óleo essencial e o tipo de órgão vegetal a ser utilizado pode influenciar no rendimento da extração do óleo, entretanto o tempo empregado na extração não é um fator de variação (ALMEIDA; ALMEIDA; GHERARDI, 2020).

Os óleos essenciais apresentam um papel importante no controle de pragas agrícolas e vetores de doenças, como por exemplo em moluscos (PINHEIRO *et al.*, 2018). Alguns óleos essenciais já foram testados e se mostraram eficazes como agente moluscicida em moluscos adultos da espécie *P. columella*. São eles: a *Eugenia uniflora* (PINHEIRO *et al.*, 2018) e *Cymbopogon winterianis jowitt* (COSTA *et al.*, 2015).

2.4.1 *Origanum vulgare L.*

Origanum vulgare L. (nome popular: orégano) uma planta pertencente à família Lamiaceae da ordem Tubiflorae Lamiales, possui distribuição mundial. (LIMA; CARDOSO, 2007). É uma planta originada do Mediterrâneo Oriental. Se propaga no ambiente por sementes, estaquia ou divisão de touceiras. A planta mede em torno de 50 a 80 cm de altura e é ramosa. Suas folhas são pecioladas, simples, opostas, aveludadas na parte interior da folha, formato oval e denticuladas e suas flores possuem coloração branca ou lilás. (GRANDI, 2014).

Essa Lamiaceae é constituída quimicamente por timol, carvacrol, terpineol e hidrocarbonetos monoterpenos, ácidos orgânicos, taninos, flavonoides, resinas, princípios minerais e amargos (GRANDI, 2014). Entretanto, ao analisar a composição dos óleos essenciais, os componentes majoritários descritos são o timol e o carvacrol. Possuem ainda ação antimicrobiana, bactericida, inseticida, acaricida e tripanomicida (LIMA; CARDOSO, 2007).

2.4.2 *Thymus vulgaris*

Thymus vulgaris (nome popular: tomilho) é uma erva de origem europeia, cultivada no Brasil, nas regiões Sul e Sudeste. Essa erva possui ampla utilização da culinária e na medicina, seus componentes majoritários são o timol e o carvacrol. É uma erva que possui altura entre 10 e 30 cm, é bem ramificada, com caule tortuoso, lenhoso, seus ramos possuem coloração acinzentada, são retos e compactos.

Suas folhas apresentam formato lanceolado de tamanho diminuto, sua disposição é de forma oposta entre os pares de folha no galho e lineares, em sua face

abaxial é observado coloração branca, enquanto na adaxial as cores são brancas ou róseas. Sua floração é em forma de falsos capítulos com abertura entre junho e julho, em sua corola bilabiada pode se observar quatro estames. Sua multiplicação se dá por estolhos, preferencialmente em solo drenado e seco, leve e quente (GRANDI, 2014).

Os componentes majoritários do óleo essencial tomilho são os principais responsáveis pela ação biológica. O timol por exemplo, possui efeitos antifúngicos, age contra bactérias e possui efeitos anti-helmínticos, em contra partida, o carvacrol, possui ação antibactericida (SAKURAI *et al.*, 2016). *Thymus. capitus*, que possui como componentes majoritários timol e o carvacrol, apresentou atividade moluscicida em moluscos da espécie *B. alexandrina*, mostrando ser um biocida promissor (SALAMA; TAHER; EL-BAHY, 2012).

2.5 Componentes majoritários

Os óleos essenciais são uma mistura complexa de vários compostos químicos encontrados estruturas vegetais. Os álcoois, ésteres, aldeídos, éteres, cetonas, fenóis e terpenos algumas das principais substâncias químicas encontradas nos óleos essenciais. Além disso, cada grupo de composto é construído por várias substâncias. Entre os componentes dos óleos essências existem algumas substâncias que apresentam em maiores concentrações e estas são denominadas, componentes majoritários (Kačániová *et al.*, 2012).

O timol e o carvacrol são compostos fenólicos monoterpenos que apresentam estruturas similares, sua diferença está na posição da hidroxila presente no anel aromático dos compostos. Essas substâncias são sintetizadas em plantas pelo g-terpineno e o p-cimeno. (LLANA, 2014).

Os compostos químicos, timol e carvacrol, são caracterizados por possuírem ação anti-inflamatória, antibacteriana, antioxidante e anticarcinogênica (IZIDORO *et al.*, 2021; DEBDIPANWITA *et al.*, 2011; CHAVAN; TUPE, 2014; GUIMARÃES *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2008). Além disso, o timol é considerado um moluscicida promissor para várias espécies de moluscos (FERREIRA *et al.*, 2011)

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta dos moluscos adultos de *Pseudossucinea columella* e manutenção do moluscário

A coleta dos moluscos adultos realizou-se nos bebedouros e em áreas alagadas no chão em torno dos bebedouros no Instituto Federal do Espírito Santo no setor de bovinocultura, no distrito de Rive em Alegre, Espírito Santo, a coleta obteve autorização do SISBIO n° 65664-2 de 26/11/2019.

Após a sua obtenção, os moluscos foram transportados em recipientes plásticos até o Laboratório de Parasitologia do Hospital Veterinário do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE-UFES), onde foram limpos em água corrente e acondicionados em aquários de vidro (12x24x14 cm) com água decolorada, acrescido de cascas de ovos e argila (previamente autoclavada), mimetizando seu ambiente natural, permanecendo em temperatura média de 24°C.

Os aquários de *P. columella* foram higienizados periodicamente, de acordo com a sujeira apresentada e evitando acúmulo de matéria orgânica no fundo dos aquários. Alimentação desses animais realizou-se com *Lactuca sativa* “ad libitum”, sendo renovadas em dias alternados. Os moluscos realizaram ovoposição sob placas de poliestireno quadradas de aproximadamente 5cm² colocadas no interior dos aquários.

Alguns aquários foram reservados para as massas ovígeras e filhotes dos moluscos, de modo que estes não entrassem em contato com moluscos adultos após a eclosão pois, após a eclosão, os espécimes iriam competir pelo ambiente e os filhotes estariam em desvantagem. Desse modo, a cada 3 dias as placas dos aquários dos moluscos adultos eram retiradas e colocadas nos aquários-berçários, e os moluscos permaneciam lá até a maturidade sexual.

A espécie dos moluscos foi confirmada após realização dissecação e identificação morfológica, onde pode-se notar a dupla flexão do ureter no interior do manto dos espécimes, e utilizando como base a metodologia descrita nos estudos de Paraense (1982).

3.2 Obtenção dos óleos essenciais e componentes majoritários

Os óleos essenciais de *O. vulgare* e *T. vulgaris* foram adquiridos comercialmente da empresa Quinari®, a extração dos óleos foi realizada por arraste a vapor. No caso dos componentes majoritários, carvacrol e timol, também adquiridos comercialmente, vieram da empresa Sigma-Aldrich® e Neon Comercial, respectivamente, destaca-se que ambos apresentavam grau de pureza maior que 98%.

A análise cromatográfica e caracterização química dos óleos foi descrita por Vieira (2017). O componente majoritário para o óleo de *O. vulgare* foi o carvacrol (67,67%). Para o *T. vulgaris*, os majoritários descritos foram o carvacrol (23,93%) e o timol (20,23%) (VIEIRA, 2017).

Antes da utilização dos óleos essenciais e componentes majoritários no teste biológico, foi feita a diluição das soluções em água deionada e solvente (DMSO 1%), de maneira que se obtivesse as substâncias *T. vulgaris*, *O. vulgare*, carvacrol e timol, nas concentrações de 10, 20, 40, 60, 80 e 100 ppm.

3.3 Exposição do *Pseudosuccinea columella* adultos aos óleos de *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* e seus componentes majoritários, Timol e Carvacrol.

Foram utilizados 10 moluscos por cada concentração abordada (total de 270 moluscos), e com tamanhos de concha variando entre 0,7 à 1,5 cm. Os espécimes foram acondicionados individualmente em poços de placas de cultivo com 24 poços que apresentavam em seu interior 2,0 mL das soluções estudadas em cada poço da placa.

As soluções estudadas continham água potável deionada acrescida do óleo essencial de *T. vulgaris*, *O. vulgare* ou ainda dos componentes majoritários, Timol e

Carvacrol, ambos diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) a 1% (v/v), com concentrações finais de 10, 20, 40, 60, 80 e 100 ppm. Como controle negativo, foram usados o DMSO a 1% (v/v) e água potável declorada. Já como controle positivo, o Sulfato de Cobre (CuSO₄) a 1% foi selecionado (COSTA, *et al.* 2015).

Os moluscos *P. columella* depois de imersos nas soluções, foram observados e avaliados nos tempos de 30 minutos, duas, seis, 12 e 24 horas, a mesma metodologia foi utilizada por Costa, *et al.* (2015). Avaliou-se a mortalidade dos moluscos neste período, utilizando os critérios descritos por McCullough *et al.* (1980): retração da massa cefalopodal para o interior da concha, projeção anormal de cefalópode para fora da concha e também a liberação ou não da hemolinfa. Após a constatação do óbito, os moluscos eram encaminhados para soluções fixadoras..

Após o período de avaliação de 24 horas, os moluscos que permaneceram vivos foram acondicionados em recipientes plásticos por um período de 14 dias. Durante esse período, foi realizada a troca das placas de poliestirenos duas vezes na semana. Os moluscos que morreram ao longo do tempo de avaliação de 24 horas e os que permaneceram vivos ao final da avaliação, nos recipientes plásticos, foram fixados.

3.4 Fixação dos moluscos

Após a constatação da morte dos moluscos durante o experimento e após observação de 14 dias dos moluscos que permaneceram vivos após o teste biológico, houve a fixação destes nas soluções de Dubosc (com posterior troca do fixador para álcool 70% após 12 horas do primeiro fixador) e formol a 10% como fixadores para a realização da histologia. Além dos outros fixadores citados anteriormente, os moluscos foram fixados na solução a base de glutaraldeído (2,5%), PBS (0,2 M) e paraformaldeído (2%) (KARNOVISKY, 1965). Posterior a fixação os frascos foram levados a refrigeração até o momento da realização do processamento das amostras na Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), onde foram avaliadas as estruturas externas e internas dos moluscos.

Foram utilizados 10 moluscos para cada concentração de óleos essencial, componente majoritário e grupos controle. Nas soluções de Dubosc e formol 10%

foram fixados três moluscos por cada concentração, no caso do fixador glutaraldeído, foram fixados quatro moluscos por concentração das substâncias estudadas

3.5 Exposição das massas ovígeras dos moluscos aos óleos de *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* e componentes majoritários, timol e carvacrol.

Os moluscos adultos realizavam a desova em placas de poliestireno previamente inseridas nos aquários (3 dias antes do início do experimento), de modo que as massas apresentassem de 0 a 3 dias. Os ovos presentes em cada massa ovígera foram contabilizados. Utilizaram-se três massas para cada grupo teste.

Posteriormente desovas foram retiradas cuidadosamente das placas de poliestireno com auxílio de uma espátula e pinça. Foram expostas a dois (2) mL das substâncias testadas, presentes no interior de poços da em placas de cultivo celular, e permaneceram no recipiente até completar 24 horas. Após 24 horas, as soluções testes foram retiradas dos poços das placas de cultivo, as massas ovígeras foram lavadas em triplicata com água declorada e todos os poços receberam dois (2) mL água declorada. As placas de cultivo permaneceram em BOD em temperatura de 24°C durante todo experimento.

As análises, para avaliar o desenvolvimento embrionário, foram realizadas em estereomicroscópio a cada três dias até completar o período de 18 dias (tempo de eclosão das massas), avaliando o crescimento embrionário e eclosão das desovas.

3.6 Histologia

Durante o teste biológico os moluscos que morreram foram fixados conforme o tópico de fixação. A concha foi retirada com auxílio de estereomicroscópio, pinça e pincel e as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Patologia Animal no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo, onde foram processadas.

As amostras passaram primeiramente pelo processo de desidratação em banhos de álcool nas concentrações de 80, 90 e 95%, seguida por clarificação com o

uso do xilol, processo onde ocorrerá a remoção do álcool residual. Posteriormente ocorreu o processo de impregnação com a parafina líquida a 60° C, dando início ao processo de inclusão do material. Após a inclusão do material, o mesmo é encaminhado para o micrótomo, onde ocorrerá o corte dos blocos em espessura ultrafina (4-6 micrometros) que foram distendidos em banho-maria e colocados em lâmina de vidro. As lâminas foram encaminhadas para estufa aquecida a 60°C onde permaneceram pelo período de 12 horas (VIDAL *et al.*, 2019).

Posterior a etapa de fixação do material em lâminas, ocorreu a etapa de coloração em hematoxilina e eosina. As lâminas foram analisadas morfológicamente em microscópio óptico Olympus nos aumentos de 40x e 100x.

3.7 Microscopia Eletrônica de Varredura

Os moluscos que vieram a óbito após a exposição aos óleos essenciais e componentes majoritários nas concentrações de 100 ppm, bem como os controles DMSO 1% e sulfato de cobre, no total de duas amostras para cada concentração, foram encaminhados para processamento da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Estes espécimes, foram fixados como descrito no tópico de fixação. Posteriormente foi feita a retirada da concha dos animais. Os animais que permaneceram na solução fixadora e ambiente refrigerado até o processamento das amostras.

Após o processo de fixação, os moluscos foram encaminhados para o Laboratório de Parasitologia na Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ) onde sofreram o processamento para MEV. Uma das duas amostras de cada solução foram cortadas ao meio (lateralmente) com auxílio de lupa e gilette para que se pudessem ser realizadas as análises dos órgãos internos e posteriormente as amostras passaram pelo processo de lavagem em cacodilato 0,1 M em triplicada no tempo de 10 minutos em cada lavagem. Posterior as lavagens, os espécimes foram para a etapa de pós fixação com tetraóxido de ósmio (OsO₄ 1%), cacodilato 0,1 M, e com adição de ferrocianeto de potássio 1,25 %, em capela sem luz, onde foram condicionados em papel alumínio e permaneceram por um período de 40 minutos. Após o processo, as amostras foram lavadas em solução de cacodilato em triplicata por 5 minutos em cada lavagem. Em seguida, foram encaminhadas para

o processo de desidratação dos tecidos, onde são feitos banhos em etanol nas concentrações de 50%, 70%, 90% e álcool absoluto (100%) em triplicata, pelo período de 30 minutos.

Na segunda fase de processamento, as amostras foram para secagem em câmara de gás pressurizada até a obtenção do ponto crítico. Após a secagem, as amostras foram acondicionadas em “stubs” metálicos, previamente identificados, onde recebem uma cobertura de ouro aumentando a condutividade da superfície da amostra e aumento da emissão de elétrons. Após a montagem do material os mesmos foram acondicionados em caixa plástica com sílica, até o estudo topográfico de varredura.

As amostras foram encaminhadas para o laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura da Universidade Federal do Espírito Santo em Jerônimo Monteiro – ES. Os “stubs” com as amostras foram levadas para o equipamento JEOL JSM-IT200.

3.8 Análise estatística de dados

Para avaliar as diferenças estatísticas entre os grupos de moluscos expostos aos óleos essenciais e seus majoritários, os dados de mortalidade foram submetidos ao teste Exato de Fisher, com 95% de significância ($p \leq 0,05$), no programa BioEstat 5.0. A Concentração Letal (CL) dos óleos essenciais e majoritários, assim como seus limites mínimos e máximos, slope, qui-quadrado e R foram calculadas no programa computacional R 4.04.

A análise das massas ovíferas foi realizada de forma descritiva, com cálculo de média, desvio padrão e número mínimo e máximo de ovos observados nas massas, além do cálculo de percentual de inibição de eclosão de ovos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação e composição dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris* e *Origanum vulgare*.

A partir da análise cromatográfica dos óleos foram identificados os componentes majoritários. Para o óleo essencial de *O. vulgare* foi o carvacrol (67,67%) e no caso do tomilho, os componentes com maiores concentrações foram o carvacrol (23,93%) e o timol (20,23%) (Viera, 2017). No trabalho de Pozzo *et al.* (2011), que também utilizou os óleos essenciais de *O. vulgare* e *T. vulgares*, foi possível observar que o orégano também apresentou o carvacrol como majoritário, sendo a presença deste de 92,6%. Já no caso do tomilho, o componente de maior concentração foi γ -terpineno (64%). Romero *et al.* (2012) utilizaram *O. vulgare* em seu estudo e observou que o carvacrol também era o majoritário, representando 50% da composição do óleo essencial.

Plantas da mesma espécie podem apresentar diferenças na composição química no que se refere a concentração das substâncias que compõe o óleo essencial, e isso pode ocorrer devidos aos quimiotipos diferentes. Essas diferenças na composição se dão pela interação da planta com insetos e no ambiente, época e horário de colheita, idade da planta, localização geográfica e fatores biológicos. Pode ocorrer de uma planta da mesma espécie apresentar concentrações de componentes majoritários diferentes (ALMEIDA, ALMEIDA, GHERARDI, 2020; COSTA, *et al.* 2015).

4.2 Teste biológico com moluscos adultos

Na tabela 1 observa-se os dados dos testes biológicos dos moluscos adultos que foram expostos aos óleos essenciais de *O. vulgare*, *T. vulgaris* e seus componentes majoritários timol e carvacrol. As avaliações foram feitas nos tempos de 30 minutos, duas, seis, 12 e 24 horas. Posteriormente os animais que ficaram vivos foram avaliados durante um período de 48 horas e fixados para posterior avaliação.

Tabela 1 Porcentagem de mortalidade de *Pseudossucinea columella* em relação ao tempo após exposição aos óleos essenciais de *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* e componentes majoritários timol e carvacrol.

Tratamento	Concentração (ppm)	TM (%) em função do tempo de exposição					
		30 min	2 h	6 h	12 h	24 h	TM _F
<i>O. vulgare</i>	10	0	0	0	0	20	20
	20	0	0	0	0	0	0
	40	0	0	0	0	30	30
	60	0	10	60	60	100	100
	80	0	60	90	90	100	100
	100	0	40	90	90	100	100
<i>T. vulgaris</i>	10	0	0	0	0	0	0
	20	0	0	0	0	0	0
	40	0	0	0	0	0	0
	60	0	0	10	10	20	20
	80	0	0	0	20	100	100
	100	0	0	0	10	60	60
Timol	10	0	0	0	0	0	0
	20	0	0	0	0	0	0
	40	0	40	40	40	70	70
	60	0	30	80	90	100	100
	80	0	100	-	-	-	100
	100	0	100	-	-	-	100
Carvacrol	10	0	0	0	0	0	0
	20	0	0	0	10	10	10
	40	0	0	0	0	0	0
	60	0	10	20	20	30	30
	80	40	100	-	-	-	100
	100	20	100	-	-	-	100
DMSO	1%	0	0	0	0	0	0
Água	-	0	0	0	0	0	0
CuSO ₄ .5H ₂ O	1%	100	-	-	-	-	100

TM = taxa de mortalidade em porcentagem; TM_F - taxa de mortalidade final, após 24h; — não observado.

Notou-se que o solvente DMSO a 1% não alterou a viabilidade e nem levou a morte dos moluscos que entraram em contato com a substância, ocorrendo o mesmo no controle água, evidenciando que atividade moluscicida se dá pelos óleos e componentes majoritários e não pelo solvente. Outros autores utilizaram DMSO como solvente na concentração de 10%, e mesmo em concentração mais altas, o DMSO não provocou alterações e nem levou a morte dos moluscos (COSTA *et al.*, 2015; GARDIOLI, 2017).

De acordo com WHO (1983), uma substância pura (caso do componente majoritário do óleo) é viável para uso como moluscicida se apresentar efeito tóxico em caramujos adultos em concentrações menores ou iguais a 20 ppm; ou causar efeito tóxico quando em concentração menor ou igual a 100 ppm para estudo de extrato bruto. Notou-se que o óleo essencial de *O. vulgare* levou a mortalidade de 100 % dos moluscos que foram expostos a concentração de 60 ppm. Já o óleo essencial de *T. vulgaris* levou a morte de 100% dos moluscos na concentração de 80 ppm. Ambas as concentrações citadas anteriormente estão dentro do padrão estabelecido pela WHO (1983) para uma mistura complexa de substâncias.

Os óleos essenciais que possuem maior toxicidade para os moluscos vetores de zoonoses apresentam em sua constituição monoterpenos de hidrocarbonetos, um dos monoterpenos encontrado com maior frequência é o carvacrol (PEREIRA *et al.*, 2020). Durante o teste biológico notou-se que o majoritário carvacrol levou a mortalidade de 100% dos moluscos expostos nas concentrações de 80 e 100 ppm em apenas duas horas.

O timol é considerado um moluscicida promissor para várias espécies de moluscos (FERREIRA *et al.*, 2011). No presente estudo, as concentrações de 60, 80 e 100 ppm do timol levaram a mortalidade de 100 % dos moluscos expostos. No experimento de Ferreira *et al.* (2011) o timol foi utilizado juntamente com o DMSO em diferentes concentrações (2,5 g/L e 5g/L) no molusco *Bradybaena similares* e constatou-se ação moluscicida e morte de moluscos juvenis e adultos (FERREIRA *et al.*, 2011).

Srivastava e colaboradores (2013) testaram a toxicidade do timol para moluscos *Lymnaea acuminata* na água dos aquários dos espécimes em cada mês durante um ano durante, na CL₅₀, e puderam constatar que a toxicidade do timol varia de acordo com a temperatura da água, e que na maior temperatura no mês de maio se obteve a máxima toxicidade do timol. Pode-se constatar ação moluscicida e

mosquitocida dos óleos essenciais de *T. capitus* e *M. vulgare* que possuem o timol e carvacrol como componentes majoritários, respectivamente (SRIVASTAVA *et al.*, 2019; SALAMA *et al.*, 2012).

Srivaslava e Sinsh (2019) notaram que substâncias terpenóides, como o timol e o carvacrol, possuem potencial ovicida e moluscicida. Costa *et al.*, (2015) relatam que atividade moluscicida das substâncias terpenóides se dá pelo desequilíbrio osmótico o que leva a projeção anormal da massa cefalopodal para dentro ou fora da concha, além de liberação de hemolinfa levando a morte dos moluscos.

Pode-se notar que os animais que morreram durante o experimento apresentaram retração anormal da massa cefalopodal para dentro e também projeção anormal para fora da concha e perda de reflexo de dor na compressão da massa cefalopodiana. Entretanto, não se observou a liberação de hemolinfa, como foi relatado por Costa *et al.* (2015). A não observação da hemolinfa no teste biológico ocorreu pois os moluscos da espécie *P. columella* apresentam hemolinfa transparente, tornando-a imperceptível caso haja liberação, diferenciando-se da hemolinfa da espécie *B. glabrata* que possui coloração avermelhada.

Notou-se na CL₅₀, representando na tabela 2, que o tomilho, orégano e carvacrol, no período de 24 horas, apresentaram a CL₅₀ de 72,8 ppm, 32,3 ppm e 48,9 ppm respectivamente. A CL₅₀ do timol não pode ser calculada pois o mesmo apresentava resultados muito discrepantes, e seria necessário a inserção de uma outra concentração entre 40 e 20 ppm, para que a CL₅₀ fosse realizada com êxito, o que pode ser observado na tabela 2. Gardioli *et al.* (2017) realizaram um estudo com *D. nítida* e *D. elliptica* para avaliar atividade moluscicida sobre a espécie *P. columella*, e utilizaram a Dose Letal de 50% (DL₅₀) na concentração de 50 ppm como uma das análises estatísticas, e puderam perceber que DL 50 % levou a morte de 66% dos moluscos no período de 24 horas.

Tabela 2. Determinação da CL₅₀ e dados estatísticos do tratamento de *P. columella* com os óleos essenciais de *T. vulgaris* e *O. vulgare*, e o majoritário carvacrol.

Substâncias	Leitura	CL ₅₀	Slope	Desvio padrão do Slope	R ²	X ²	P valor do X ²
Tomilho	24 h	71,843	6,989	3,249	0,816	10,839	0,972

Orégano	24 h	32,370	3,709	1,754	0,899	20,907	1,000
Carvacrol	24 h	48,966	4,669	2,234	0,940	9,748	0,979

Análise de probit – programa computacional R versão 4.04

De acordo com o teste estatístico exato de fisher realizado, os óleos essenciais de tomilho na concentração de 80 ppm, orégano e o componente majoritário timol nas concentrações de 60, 80 e 100 ppm e carvacrol nas concentrações de 80 e 100 ppm apresentaram diferença estatísticas significativas frente as mortalidades observadas no controle negativo, com $P=0,0000$. O timol 40 ppm também se mostrou significativo, entretanto, com $P= 0,0031$, e todo citados anteriormente não apresentam diferenças significativas frente ao controle positivo.

4.3 Teste biológico com as massas ovígeras dos moluscos

As massas ovígeras que receberam os tratamentos de timol nas concentrações 60, 80 e 100 ppm e as demais soluções de orégano, tomilho e carvacrol levaram a inibição da eclodibilidade das desovas dos moluscos (0% de massas eclodidas), demonstrando que a soluções são eficientes para inviabilizar o desenvolvimento embrionário das massas ovígeras, apresentando caráter ovicida para *P. columella* (tabela 3). Notou-se que as desovas tratadas com timol nas concentrações de 10, 20 e 40 ppm se desenvolveram e eclodiram, se diferenciando dos demais tratamentos e demonstrando que estas soluções não possuem ação contra as desovas de *P. columella*.

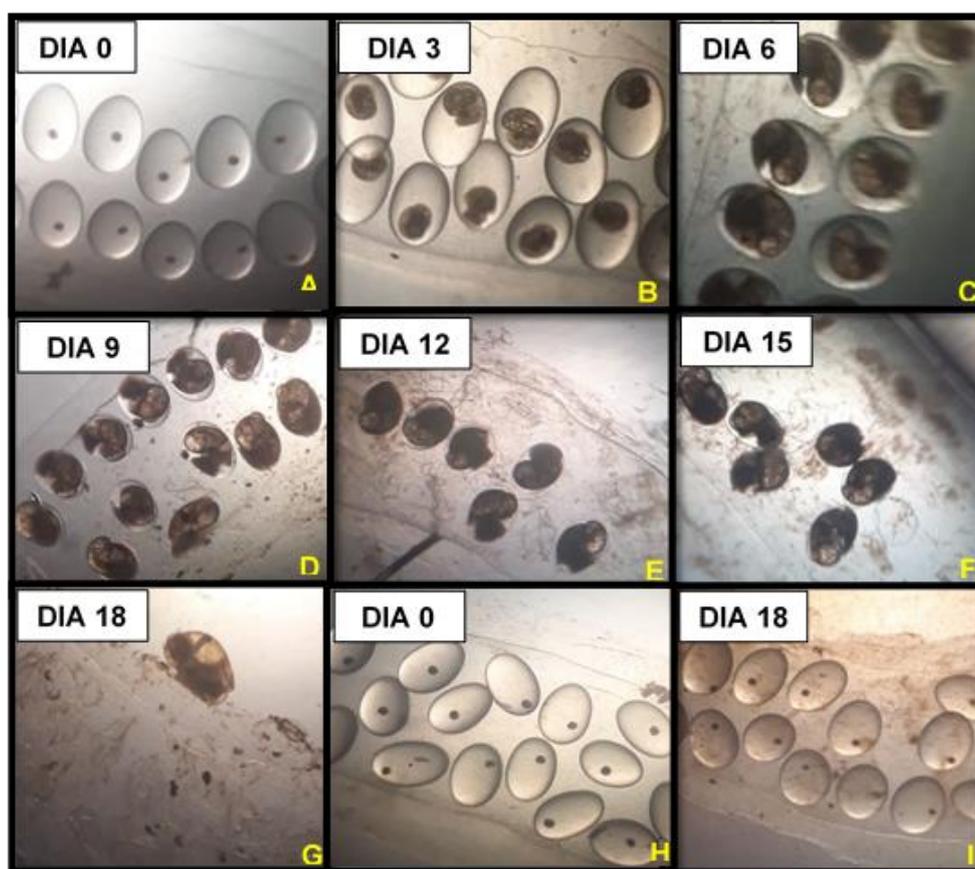
Tabela 3. Porcentagem de eclodibilidade de massas ovígeras de *Pseudossucinea columella* após a exposição aos óleos essenciais de *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, timol e carvacrol em avaliações periódicas durante 18 dias.

T	[] ppm	N° M. O. eclodidas			+-	D.P.	T. E.	% TEM
		M1	M2	M3				
Orégano	10	14	15	17	15,333	1,527	0	0
	20	23	16	25	21,333	4,725	0	0
	40	27	17	27	23,666	5,773	0	0
	60	15	15	14	14,666	0,577	0	0
	80	17	15	16	16	1	0	0
	100	12	26	13	17	7,810	0	0
Tomilho	10	22	14	29	21,666	7,505	0	0
	20	16	16	16	16	0	0	0
	40	25	14	22	20,333	5,686	0	0
	60	19	18	15	17,333	2,081	0	0
	80	13	12	21	15,333	4,932	0	0
	100	30	28	14	24	8,717	0	0
Timol	10	24	26	27	25,666	1,527	67	87
	20	28	16	25	23	6,244	49	28,98
	40	22	14	16	17,333	4,163	51	98
	60	22	17	31	23,333	7,094	0	0
	80	14	19	17	16,666	2,516	0	0
	100	22	22	26	23,333	2,309	0	0
Carvacrol	10	14	14	9	12,333	2,886	0	0
	20	14	17	17	16	1,732	0	0
	40	13	16	15	14,666	1,527	0	0
	60	10	12	13	11,666	1,527	0	0
	80	16	16	13	15	1,732	0	0
	100	11	10	18	13	4,358	0	0
DMSO	1%	22	26	21	23	2,645	69	100
Água	-	21	24	24	23	1,732	69	100
CuSO ₄ .5H ₂ O	1%	0	0	0	0	0	0	0

T: tratamentos; [] ppm: concentração em partes por milhão; M1: massa 1; M2: massa 2; M3: Massa 3; +-: média; D.P.: desvio padrão; T. E: total de massas eclodidas; TEM%: porcentagem de massas eclodidas.

O controle DMSO 1% começou a ter eclodibilidade no dia 12 e obteve eclodibilidade total no dia 18, após a exposição, o que também ocorreu com o controle água (Figura 4). Tair-Abbaci e colaboradores (2017) sugerem que liberação dos moluscos das desovas ocorrem entre 14 e 15 dias, dependendo das condições ambientais favoráveis. No controle positivo (sulfato de cobre 1%), as massas ovígeras não apresentaram nenhum tipo de crescimento desde o dia 0 até o dia 18 após a exposição (figura 4).

Figura 4 - Avaliação das massas ovígeras de *Pseudossucinea columella* tratadas com os controles DMSO 1% e CUSO₂ (sulfato de cobre) 1%.



A, B, C, D, E, F e G: Massa ovígeras avaliadas após contato com controle de DMSO a 1% avaliadas nos dias 0, 3, 6, 9, 12, 15, e 18 respectivamente; H e I: Massas ovígeras após contato com controle de cobre a 1% nos dias 0 e 18 respectivamente. Avaliação por estereomicroscopia no aumento de 2x.

Fonte: o autor, 2020.

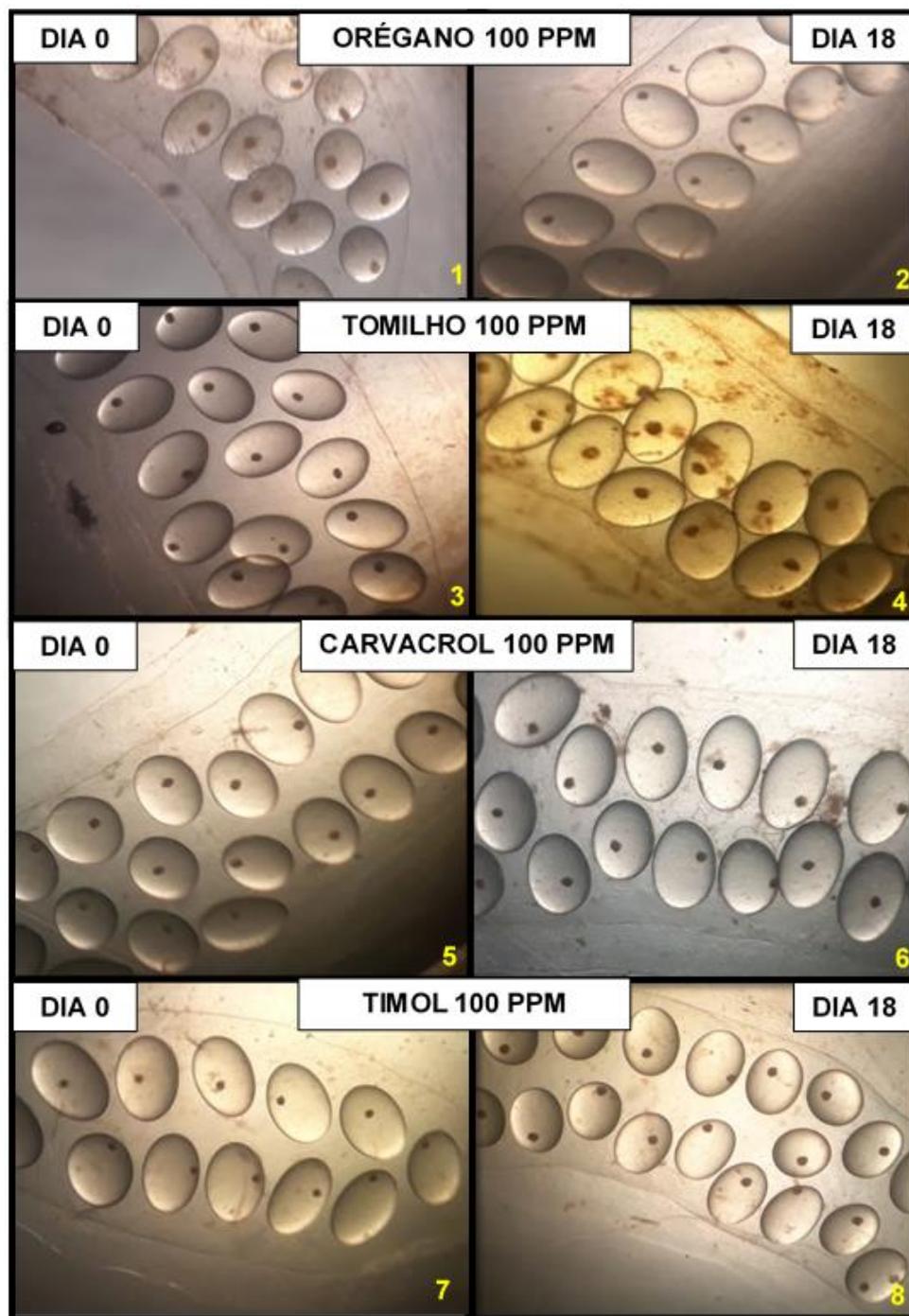
Embora alguns extratos e óleos possam atuar como substância moluscicida em animais jovens e adultos, nem sempre são eficazes contra as massas ovígeras

(CATANHEDE *et al.*, 2010). É bem provável que a baixa atividade ovicida das substâncias naturais ocorra pelo alto peso molecular dessas substâncias, impedindo que penetre na membrana gelatinosa que recobre a desova (LEMMA; YAU, 1974).

Foi observado que o orégano, tomilho, timol e carvacrol na concentração de 100 ppm não permitem o desenvolvimento da massa ovígera, (Figura 5), já que não houve crescimento embrionário do período de exposição e nos 18 dias subsequentes. Não foram encontrados na literatura pesquisada, estudos com uso de óleos essenciais em massas ovígeras de *P. columella*. Mendes *et al.* (1990) realizaram experimento com uma metodologia parecida com a descrita no presente estudo, entretanto com hidrolato e o óleo de *Eucalyptus daenei*, as avaliações foram feitas somente no período de 3 dias após a exposição inicial, com desovas de *B. glabrata*, e se obteve o resultado de que as desovas expostas as concentrações acima de 20 ppm não conseguiram completar o crescimento.

Pinheiro *et al.* (2017) avaliaram a taxa de ovoposição de moluscos *P. columella* e *B. glabrata* exposto ao óleo essencial de *Eugenia uniflora*, na concentração de 20 ppm. Notou-se que ambas as espécies tratadas com *E. uniflora* obtiveram redução na ovoposição. No presente estudo não se avaliou a taxa de ovoposição dos moluscos adultos após exposição dos tratamentos. Entretanto, avaliou-se a taxa de eclosão das desovas expostas as substâncias testadas, onde notou-se que *O. vulgare*, *T. vulgaris*, carvacrol nas concentrações de 10, 20, 40, 60, 80 e 100 ppm e timol nas concentrações de 60, 80 e 100 ppm inibiram a eclosão de 100% das desovas

Figura 5 - Avaliação das massas ovígeras de *Pseudosuccinea columella* após exposição aos óleos essenciais e componentes majoritários.



Fonte: O autor, 2020.

4.4 Análises histológicas *Pseudossucinea columella* expostos aos óleos essenciais e componentes majoritários

No presente trabalho foi possível observar o manto, a glândula digestiva, glândula reprodutiva e glândula de albúmen, estrutura estas que são órgãos de grande importância para os moluscos. Vidal (2020) também observou em *P. columella* a presença das estruturas de glândula digestiva, que apresenta conformação de vários lóbulos formados por ácinos, a ovotestis (presença de ovogônias e espermatogônias) e manto, que apresenta em sua constituição fibras de colágeno emaranhadas em tecido conjuntivo frouxo. E a glândula albuminosa, estrutura constituída por ácidos glandulares bem delimitados e circunscritos.

Pode-se perceber durante a análise histológica dos moluscos adultos que foram expostos, que os óleos de orégano e carvacrol nas concentrações de 80 e 100 ppm e tomilho na concentração 60 ppm apresentavam áreas com vacuolização em glândula digestiva, as moléculas de gordura presentes nestas estruturas podem ter sido dissolvidas durante o processamento histológico (figura 6a). Kela e Bowen (1995) relatam vacuolizações e necrose na glândula digestiva de moluscos da espécie *L. stagnalis* expostos ao extrato de *Detarium microcarpum*. Yousef e El-kassas (2013) também encontraram áreas com vacuolizações no tecido da glândula digestiva na espécie *B. alexandrina* na utilização dos extratos vegetais de *Euphorbia splendens*, *Ziziphus spnina-christi* e *Ambrosia Maritima* para o controle dos espécimes.

Kela e Bowen (1995) expuseram que o extrato vegetal de *Detarium microcarpum* pode levar a necrose da glândula digestiva do caramujo. Mello-Silva *et al.* (2006) Notaram a redução das reservas de glicogênio nas glândulas digestivas e elevação das proteínas na hemolinfa dos moluscos que são expostos a substâncias químicas.

Foi observado no tratamento de *P. columella* com timol 80 ppm áreas de autólise na glândula digestiva (figura 6B). Além disso, outra alteração encontrada foi fragmentação do tecido da glândula digestiva, evidenciado nos moluscos tratados com timol nas concentrações de 40 e 60 ppm e tomilho nas concentrações de 80 e 100 ppm (figura 6c). Araújo *et al.* (2002) relataram que moluscos da espécie *P. columella* tratado com látex de *Euphorbia splendens* nas concentrações de 0,47µl/L e 0,76µl/L apresentaram degeneração, necrose e depósito intersticial na glândula digestiva. Os autores também demonstraram que nas concentrações acima de 0,94µl/L, as

alterações de degeneração do epitélio e depósito intralamelar foram observadas na região sacular do rim dos espécimes estudados.

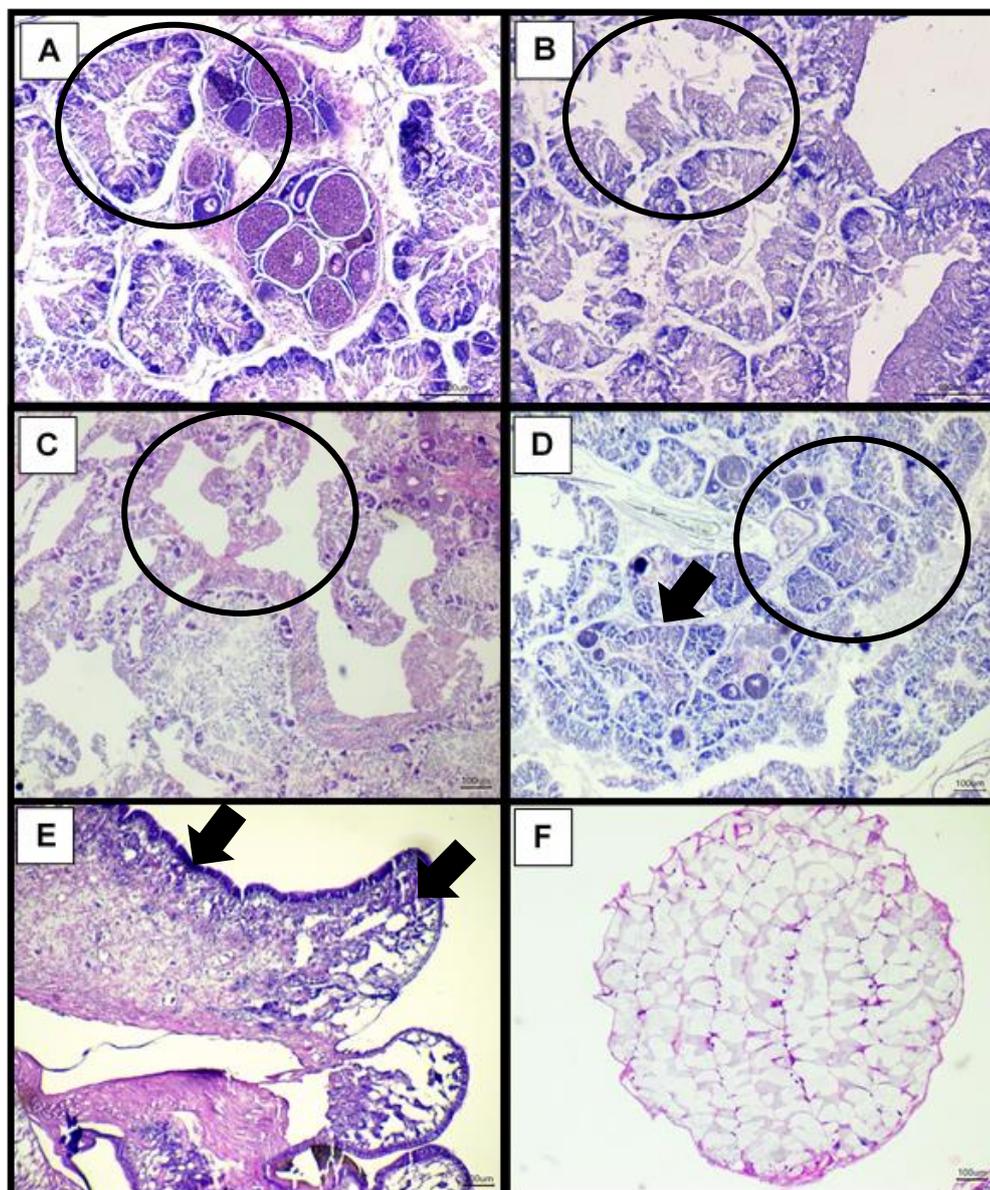
Em relação a glândula reprodutiva dos moluscos *B. alexandrina* que foram expostos ao extrato de *Anagallis arvensis*, foram observadas células de vacuolização e preenchimento do lúmen dos túbulos com substâncias hialinas, além de áreas focais necróticas. Notou-se também que os espécimes tratados com o extrato de *Viburnum tinus* apresentaram degeneração vacuolar e necrose tecidual (EL-KHAYAT *et al.*, 2018).

Yousef e El-kassas (2013) observaram degeneração e mudanças na conformação dos acinos, indicado necrose tecidual nas glândulas reprodutivas de *B. alexandrina* e *Bulinus truncatus* tratados com extratos de *Euphorbia splendens*, *Ziziphus spina* variedade Christi e *Ambrosia maritima*. No presente estudo notou-se vacuolização nos tecidos da ovotestis dos moluscos tratados com carvacrol 100 ppm e no órgão na concentração de 80 ppm e 100 ppm (figura 6A). Evidenciou-se também a fragmentação dos tecidos das glândulas reprodutivas (ovotestis) (figura 6 D) nos moluscos tratados com tomilho nas concentrações de 80 e 100 ppm, carvacrol 80 ppm e timol na concentração de 40 ppm.

Não se observou alteração nos espécimes tratados com orégano 60 ppm e timol nas concentrações de 60, 80 e 100 ppm, embora os tratamentos tenham levado a mortalidade dos moluscos em 100 %. As alterações podem não ter ocorrido pois, os moluscos apresentaram mortalidade poucas horas após o contato com as soluções testadas e por isso, não houve tempo hábil para que houvesse alterações teciduais na histologia.

Notou-se que o manto (figura 6 E) estava presente em todos cortes histológicos, entretanto com vacuolizações tanto no controle com sulfato de cobre, como, também nos moluscos expostos aos óleos de *O. vulgare*, *T. vulgaris* nas concentrações de 60, 80 e 100 ppm, timol nas concentrações de 40, 80 e 100 ppm e nas concentrações de 80 e 100 ppm em carvacrol. A glândula albuminosa (figura 6 F) se mostrou sem alterações histológicas de importância em todas as concentrações das substâncias avaliadas.

Figura 6 Histologia dos moluscos tratados com os óleos essenciais de *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* e seus componentes majoritários.



A: ovotestis e glândula digestiva (*O. vulgare* 100 ppm); B: glândula digestiva com autólise (timol 80 ppm); C: fragmentação de glândula digestiva (*T. vulgaris* 100 ppm); D: fragmentação de ovotestis (*T. vulgaris* 100 ppm); E: manto com vacuolização (timol 80 ppm); F: ovotestis sem alterações (DMSO 1%). * Os círculos e setas nas imagens estão evidenciando as áreas com as alterações citadas.

Fonte: O autor, 2021.

4.5 Análises da Microscopia Eletrônica de Varredura em *Pseudossucinea columella*

Foi possível visualizar na MEV as estruturas gerais dos moluscos, como: massa cefalopodal, que permite movimentação dos espécimes; glândula digestiva, manto, boca e também os tentáculos.

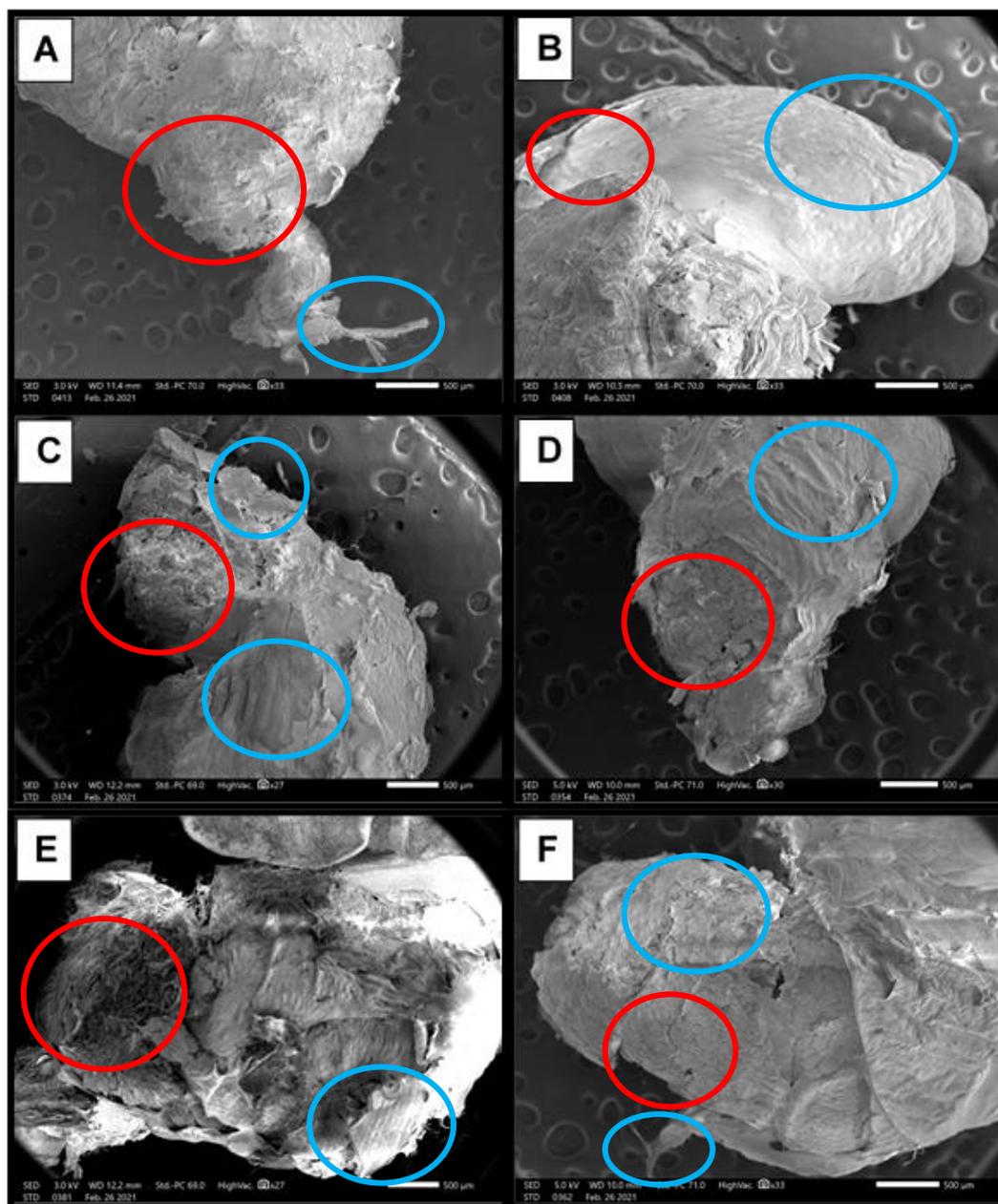
Alguns estudos relataram que a degeneração e a necrose da glândula digestiva são alterações histológicas encontradas quando se utiliza produtos naturais de origem vegetal com propriedades moluscidas (CATANHEDE *et al.*, 2010; EL-KHAYAT *et al.*, 2018; YOUSEF E EL-KASSA 2013). No entanto, esses estudos citados anteriormente, foram feitos somente com análises histológicas, e não houve nenhum outro estudo que demonstrasse as alterações na microscopia eletrônica de varredura decorrentes do uso de óleos essenciais e componentes majoritários em moluscos da espécie *P. columella*.

Na Microscopia Eletrônica de Varredura foi possível observar que o manto não recobre a glândula digestiva totalmente e apresentava áreas de degeneração tecidual nos moluscos que receberam o tratamento com *T. vulgaris*, *O. vulgare*, carvacrol e timol à 100 ppm, (figura 7 C, D, E, F). Além disso, a glândula digestiva também apresentava com degeneração e superfície irregular nos mesmos tratamentos citados anteriormente.

No controle de sulfato de cobre 1% (figura A) é possível notar áreas de degeneração tecidual da glândula digestiva e quase não se observa o manto recobrindo a glândula digestiva. No controle DMSO 1% (Figura B) nota-se que o manto recobre quase toda a glândula digestiva, entretanto, uma parte glândula digestiva está sem o manto recobrindo e nota-se a superfície lisa e sem degeneração em relação aos tratamentos e o controle de sulfato de cobre.

Alguns estudos relataram que a degeneração e a necrose da glândula digestiva são alterações histológicas encontradas quando se utiliza produtos naturais de origem vegetal com propriedades moluscidas (CATANHEDE *et al.*, 2010; EL-KHAYAT *et al.*, 2018; YOUSEF E EL-KASSA, 2013).

Figura 7 Microscopia Eletrônica de Varredura em *Pseudossucinea columella* evidenciando alterações decorrentes do uso dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* (D) e *Thymus vulgaris* (F) e componentes majoritários, timol (E) e carvacrol (C) nas concentrações de 100 ppm. Controles de cobre 1% (A) e DMSO 1% (B).



Aro vermelho: Glândula digestiva; Aro azul: manto.

Fonte: O autor, 2021.

5. CONCLUSÃO

Baseado dos dados obtidos neste estudo, conclui-se que os óleos essenciais de *O. vulgare* nas concentrações de 60, 80 e 100 ppm e *T. vulgaris* na concentração de 80 ppm apresentaram ação moluscicida em *P. columella*, de acordo com as normas estabelecidas por WHO (1983), levando a morte de 100% dos moluscos.

Os tratamentos de *T. vulgaris*, *O. vulgare* e carvacrol nas concentrações de 10, 20, 40, 60, 80 e 100 ppm e timol nas concentrações de 60, 80 e 100 ppm inviabilizaram o crescimento e eclosão das massas ovígeras em 100%, demonstrando que possuem potencial ovicida as massas de *P. columella*.

6. REFERÊNCIAS

ALEIXO, M. A. *et al.* Fasciola hepatica: Epidemiology, perspectives in the diagnostic and the use of geoprocessing systems for prevalence studies. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 3, p. 1451-1465, 2015. DOI:10.5433/1679-0359.2015v36n3p1451. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/281927814_Fasciola_hepatica_Epidemiology_perspectives_in_the_diagnostic_and_the_use_of_geoprocessing_systems_for_prevalence_studies. Acesso em: 01 mar. 2021.

ALEMU, B. Bovine Fasciolosis in Ethiopia. A review. **Journal of Veterinary and Animal Research**. v. 2, n. 2, p. 1-11, 2019. ISSN: 2639-7315. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/337085782_Bovine_Fasciolosis_in_Ethiopia-A_review_Journal_of_Veterinary_and_Animal_Research. Acesso em: 18 fev. 2021.

ALMEIDA, J. C.; ALMEIRA, P. P.; GHERARDI, S. R. M. Potencial antimicrobiano de óleos essenciais: uma revisão de literatura de 2005 a 2018. **Nutri Time**, Urutaí, v. 17, n. 1, p. 8623-8633, 2020. ISSN: 1983-9006. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Sandra_Gherardi/publication/339513003_Potencial_antimicrobiano_de_oleos_essenciais/links/5e56ca58a6fdccbeba055d53/Potencial-antimicrobiano-de-oleos-essenciais.pdf. Acesso em: 21 abr. 2020.

ARAÚJO, S. M. *et al.* Alterações histológicas em *Lymnaea columella* provocadas pelo látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopilii*. **Braz. J. Vet. Res. Anim.** v. 39, n. 3, p. 157-159, 2002. DOI: 10.1590/S1413-95962002000300009. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1413-95962002000300009&lng=es&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 30 abr. 2021.

BARBOSA, F. S. Tópicos em malacologia médica. **FIOCRUZ**, Rio de Janeiro, 1995. Disponível em: <https://static.scielo.org/scielobooks/np7z/pdf/barbosa-9788575414019.pdf>. Acesso em: 13 mar. 2021.

BENNEMA, C. *et al.* Fasciola hepatica IN BOVINES IN BRAZIL: data availability and spatial distribution. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [S.L.], v. 56, n. 1, p. 35-41, 2014. DOI: 10.1590/s0036-46652014000100005. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652014000100035. Acesso em: 10 fev. 2021.

BOSTELMANN, S.C.W. *et al.* Histopatologia comparativa em fígados de bovinos, bubalinos e ovinos infectados por *Fasciola hepatica*. **Archives of Veterinary Science**, v. 5, n. 1, p. 95-100, 2000. Universidade Federal do Paraná. DOI: 10.5380/avs.v5i1.3892. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/veterinary/article/view/3892>. Acesso em: 10 fev. 2021.

BURNEL, A.; STOCK, P. *Heterorhabditis*, *Steinernema*. Nematology, and Their Bacterial Symbionts. **Letal Pathogens of Insects**. v. 2, n. 1. p. 31-42, 2000. DOI: 10.1163/156854100508872. Disponível em: <https://arizona.pure.elsevier.com/en/publications/heterorhabditis-steinernema-and-their-bacterial-symbionts-lethal->. Acesso em: 18 fev. 2021.

CANTANHEDE, S. P. *et al.* Atividade moluscicida de plantas: uma alternativa profilática. v. 20, n. 2, p. 282-288, 2010. DOI: 10.1590/S0102-695X2010000200024. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2010000200024. Acesso em: 8 jan. 2021

CARMONA, C.; TORT, J.F. Fasciolosis in South America: epidemiology and control challenges. **Journal Of Helminthology**, v. 91, n. 2, p. 99-109, 2016. DOI: 10.1017/s0022149x16000560. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27608827/>. Acesso em: 17 fev. 2021.

CARNEIRO, M. B. *et al.* *Fasciola hepatica* em búfalos (*Bubalus bubalis*) no sul do espírito santo*. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 2, n. 32, p. 89-91, 2010. DOI: 10.1590/S1808-16572013000400011. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1808-16572013000400442. Acesso em: 17 fev. 2021.

CARVALHO, O. S. *et al.* **Moluscos Brasileiros de Importância Médica**. 2. ed. Belo Horizonte: Fundação Oswaldo Cruz, 2014. 92 p. Disponível em: http://pide.cpqrr.fiocruz.br/arquivos/Livro_MoluscosBrasileiros2014.pdf. Acesso em: 17 abr. 2020.

CASTRO, L. S. *et al.* Ovicidal potential of *Pochonia chlamydosporia* isolate Pc-10 (Ascomycota: Sordariomycetes) on egg masses of the snail *Pseudosuccinea columella* (**Journal Of Invertebrate Pathology**, v. 166, n. 1, p.107212-107218, 2019a. DOI: 10.1016/j.jip.2019.107212. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/334041967_Ovicidal_potential_of_Pochonia_chlamydosporia_isolate_Pc-10_Ascomycota_Sordariomycetes_on_egg_masses_of_the_snail_Pseudosuccinea_columella_Mollusca_Gastropoda. Acesso em: 17 abr. 2020.

CASTRO, M. de V.; *et al.* A. Potencialidad de *Pseudosuccinea columella* (Say, 1817) (Molusca: gastropoda. Gastropoda. **Ciencia y Salud**, v. 3, n. 2, p. 9-16, 25 jul. 2019b. DOI: 10.22206/cysa.2019.v3i2.pp9-16. Disponível em: https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:u_rrHCUqQ_UJ:https://diaInet.unirioja.es/descarga/articulo/7139881.pdf+&cd=2&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br. Acesso em: 18 fev. 2020.

CHAVAN, P. S.; TUPE, S.G. Antifungal activity and mechanism of action of carvacrol and thymol against vineyard and wine spoilage yeasts. **Food Control**, v. 46 n. 1, p. 115–120, 2014. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.05.007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713514002539?via%3Dihub>. Acesso em: 10 jul. 2021.

COURA-FILHO, P. *et al.* The prolonged use of niclosamide as a molluscicide for the control of *Shistosoma mansoni*. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 34, n. 4, p. 427-231, 1992. DOI: 10.1590/S0036-46651992000500009. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46651992000500009. Acesso em: 17 fev. 2021.

COSTA, A. V. *et al.* Efeito moluscicida do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt (*Poaceae*) sobre *Lymnaea columella* (Say, 1817) e *Biomphalaria tenagophila* (D'Orbigny, 1835). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 41, p.707-712, 2015. DOI: 10.1590/1983-084x/14_017. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722015000500707. Acesso em: 28 fev. 2020.

DEB DIPANWITA, D. *et al.* Effect of thymol on peripheral blood mononuclear cell PBMC and acute promyelotic cancer cell line HL - 60. **Chemico Biological Interactions**, v. 106, n. 1 p. 193, 97, 2011. DOI: 10.1016/j.cbi.2011.05.009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21640085/>. Acesso em 10 jul. 2021.

DIAS, A. S. *et al.* Study of aquatic mollusks distribution in south of Espírito Santo state. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 7, n. 2, p.154-157, 2013. Editora da Universidade Federal Rural do Semi-Arido. DOI:10.21708/avb.2013.7.2.3527. Disponível em: <https://periodicos.ufersa.edu.br/index.php/acta/article/view/3527/5227>. Acesso em: 28 fev. 2020.

DUARTE, G. F, *et al.* Novos insights sobre o am-vida phibious de *Biomphalaria glabrata* e suscetibilidade de seus ovos a fungos infecção. **Journal Of Invertebrate Pathology**, v. 125, n. 1, p. 31-36, 2015 DOI:10.1016/j.jip.2014.12.013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022201114001918?via%3Dihub>

[hub](#). Acesso em: 10 jan. 2021.

EL-KHAYAT *et al.* Biochemical and histological assessment of some heavy metals on *Biomphalaria alexandrina* snails and *Oreochromis niloticus* fish in Lake Burullus, Egypt. **Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries**. v. 22, n. 1, p. 156-182, 2018. DOI:10.21608/ejabf.2018.9737.

FERNANDES, M. C. Métodos escolhidos de técnicas microscópicas, 2 ed. Rio de Janeiro: **Imprensa Nacional**, 1949.

FREITAS, J. R.; SANTOS, M. B. L. Current advances on the study of snail-snail interactions, with special emphasis on competition process. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 90, n. 2, p. 261-269, 1995. DOI: 10.1590/S0074-02761995000200024. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761995000200024. Acesso em: 10 jan. 2021.

GARDIOLI, T. S. G. *et al.*, Plantas do Cerrado brasileiro como possíveis agentes moluscicidas. **Revista de Geografia**, v. 7, n. 2, p.125-135, 2017. Universidade Federal de Juiz de Fora. DOI: 10.34019/2236-837x.2017.v7.18068. Disponível em: <https://periodicos.ufjf.br/index.php/geografia/article/view/18068>. Acesso em: 28 fev. 2020.

GRANDI, T. S. M. Tratado das plantas medicinais. Mineiras, nativas e cultivadas. 1. ed. Belo Horizonte, **Adaequatio Estúdio**, 2014. ISBN 978-85-68322-00-0. Disponível em: <https://www.passeidireto.com/arquivo/46851787/tratado-plantas-medicinais-mineiras>. Acesso em: 22 abr. 2020.

GREWAL, P.; DE NARDO, E.A.B.; AGUILLERA, M.M. Entomopathogenic nematodes: potential for exploration and use in South America. **Neotropical Entomology**, n.30, p.191-205, 2001. DOI: 10.1590/S1519-566X2001000200001. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1519-566X2001000200001&script=sci_abstract. Acesso em: 28 fev. 2020.

GUIMARÃES, A. G. *et al.* Carvacrol attenuates mechanical hypernociception and inflammatory response. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol**, v. 385, n. 1, p. 253–263, 2012. DOI: 10.1007/s00210-011-0715-x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22139435/>. Acesso em: 23 jul. 2021. IZIDORO, M. *et al.* Propriedades funcionais e organolépticas de plantas condimentares: Revisão. **Research Society and Development**, v. 10, n.6, p.1-13. DOI: 10.33448/rsd-v10i6.14958. Disponível em: https://redib.org/Record/oai_articulo3222196-propriedades-funcionais-e-organol%C3%A9pticas-de-plantas-condimentares-revis%C3%A3o. Acesso em 22 jul. 2021.

KAČÁNIOVÁ, M. *et al.* Antimicrobial and antiradicals activity of *Origanum vulgare* L. and *Thymus vulgaris* essential oils. *Journal of Microbiology Biotechnology and Food Sciences*, v. 2, n. 1, p. 263-271, 2012 Disponível em: <https://www.jmbfs.org/wp-content/uploads/2012/08/jmbfs-Kacaniova-A.pdf>. Acesso em: 22 jul. 2021.

KANAPALA, V.K.; ARASADA, S.P. Histopathological Effect of Paraquat (Gramoxone) on the Digestive Gland of Freshwater Snail *Lymnaea luteola* (Lamarck:1799) (Mollusca: Gastropoda). *International Journal of Scientific Research in Environmental Sciences*, v.1, n.9, p.224-230, 2013. Disponível em: [https://www.semanticscholar.org/paper/Histopathological-Effect-of-Paraquat-\(Gramoxone\)-on-Kanapala-Arasada/6ce0e73923b57ba529efcac07792f243ed1a66fb](https://www.semanticscholar.org/paper/Histopathological-Effect-of-Paraquat-(Gramoxone)-on-Kanapala-Arasada/6ce0e73923b57ba529efcac07792f243ed1a66fb). Acesso em: 10 fev. 2021.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cellular Biology*, v.27, p. 137-138, 1965. Disponível em: <http://garfield.library.upenn.edu/classics1985/A1985AEP1600001.pdf>. Acesso em: 20 dez. 2020.

KELA, S. L.; BOWEN, I. D. The histopathological effect of *Dentarium microcarpum* extract, a naturally occurring plant molluscicide on the mid-gut and digestive gland of *Lymnaea stagnalis*. *Cell Biology*, v. 19, n. 3, p. 175-181, 1995. DOI: 10.1006/cbir.1995.1060. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1006/cbir.1995.1060>. Acesso em: 05 abri. 2021.

LEYTON, V. *et al.* Atividade moluscicida de princípios ativos de folhas de *Lycopersicon esculentum* (Solanales, Solanaceae) em *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Planorbidae). Iheringia. *Série Zoologia*, v. 95, n. 2, p. 213–216, 2005. DOI: 10.1590/S0073-47212005000200012. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-47212005000200012. Acesso em: 05 fev. 2021.

LEMMA A.; YAU P. Studies on the molluscicidal properties of endod (*Phytolacca dodecandra*), III. *Ethiopian Med.* v. 12, n. 3, p. 109-114, 1974. PMID: 4471164. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4471164/>. Acesso em: 30 jun. 2021.

LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G. Família Lamiaceae: Importantes Óleos Essenciais com Ação Biológica e Antioxidante. *Revista Fitos*, v. 3, n. 03, p. 14-24, 2013. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/19155>. Acesso em: 22 Abr. 2020.

LLANA-RUIZ-CABELLO, M. *et al.* Evaluation of the mutagenicity and genotoxic potential of carvacrol and thymol using the Ames Salmonella tes tandalkaline, Endo III-and FPGmodified comet assays with the human cell line Caco-2. *Food and*

Chemical Toxicology, v. 72, n. 1, p. 122-128, 2014. DOI: 10.1016/j.fct.2014.07.013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25038394/>. Acesso em: 10 jul. 2021.

MCCULLOUGH, F.S. *et al.* Molluscicides in schistosomiasis control. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 58, n.5, p. 681-689, 1980. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2395986/pdf/bullwho00428-0012.pdf>. Acesso em: 28 de fev. 2020.

MARTINS, I. V. F. *et al.* Distribution of bovine fasciolosis and associated factors in south Espírito Santo, Brazil: an update. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [s.l.], v. 23, n. 1, p.23-29, 2014. DOI:10.1590/s1984-29612014003. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1984-29612014000100004&script=sci_arttext. Acesso em: 28 fev. 2020.

MARTINS, I. V. F. Parasitologia veterinária. 2 ed. Vitória: **EDUUFES**, 2019. Disponível em: <http://edufes.ufes.br/items/show/527>. Acesso em 18 de janeiro de 2021.

MEDEIROS, C. *et al.* Spatial distribution of lymnaeidae (mollusca, basommatophora), intermediate host of *Fasciola hepatica* linnaeus, 1758 (trematoda, digenea) IN brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [S.L.], v. 56, n. 3, p. 235-252, 2014. DOI: 10.1590/s0036-46652014000300010. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0036-46652014000300235&script=sci_arttext. Acesso em: 10 fev. 2021.

MELLO-SILVA, C.C., *et al.*, 2006. Physiological changes in *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Pulmonata: Planorbidae) caused by sub-lethal concentrations of the latex of *Euphorbia splendens* var. *hislop*ii N.E.B (Euphorbiaceae). Mem Inst Oswaldo Cruz v. 101, n. 1, p. 3-8, 2006. DOI: 10.1590/S0074-02762006000100002. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/W5vfgS7C9FKbXctmyrRsXff/abstract/?lang=en>. Acesso em: 23 jul. 2021.

MENDES, N. M. *et al.* Atividade moluscicida e cercaricida de diferentes espécies de *Eucalyptus*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v. 23, n. 4, p. 197-199, 1990. DOI: 10.1590/S0037-86821990000400002. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86821990000400002. Acesso em 11 abri. 2021.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). INSTRUÇÃO NORMATIVA nº INSTRUÇÃO NORMATIVA, de 6 de agosto de 2011. **Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal**, Brasil, n. 46, 6 ago. 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). ANVISA. Resolução. Rdc nº 2, de 15 de janeiro de 2007. **Regulamento técnico sobre aditivos aromatizantes**, GBRA, 15 jan. 2007. Disponível em:

https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2007/rdc0002_15_01_2007.html.

Acesso em: 06 jul. 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Vigilância e Controle de Moluscos de Importância Epidemiológica: Diretrizes Técnicas: Programa de Vigilância e Controle de Esquistossomose (PCE). 2. ed. Brasília: **Editora do Ministério da Saúde**, 2008, 178p. Disponível em:

<https://www.saude.gov.br/images/pdf/2015/agosto/14/vigilancia-controle-moluscos-import-epidemio-2ed.pdf>. Acesso em: 15 abr. 2020.

MOLENTO, M. B *et al.* Bovine fascioliasis in Brazil: Economic impact and forecasting. **Veterinary Parasitology: Regional studies and reports** v. 12, n. 1, p. 1-3, 2018. Elsevier. DOI: 10.1016/j.vprsr.2017.12.004. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/322072583_Bovine_fascioliasis_in_Brazil_Economic_impact_and_forecasting. Acesso em: 15 fev. 2020.

MORALES, Carolina González *et al.* control de *Fasciola hepatica* en el agua de consumo animal a través de filtración rápida y lenta. **Escuela de Ingeniería de Antioquia**, v. 10, n. 19, p. 133-141, 2013. ISSN 1794-1237. Disponível em:

<https://revistabme.eia.edu.co/index.php/reveia/article/view/503>. Acesso em: 10 fev. 2021.

OLIVEIRA, S. M; SPÓSITO-FILHA, E. Fasciolose hepática. **Biológico**, v. 71, n. 1, p. 5-7, 2009.

PALLA, F. *et al.* Essential Oils as Natural Biocides in Conservation of Cultural Heritage. **Molecules**, v. 25, n. 3, p.730-741, 2020. DOI:

10.3390/molecules25030730. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/3/730/htm>. Acesso em: 28 fev. 2020.

PARAENSE, W. L. *Lymnaea columella* in northern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.78, n.4, p.477-482, 1983. DOI: 10.1590/S0074-02761983000400011. Disponível em:

https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761983000400011. Acesso em: 01 mar. 2021.

PENSEL, P. E. *et al.* Efficacy of Essential Oils of *Thymus vulgaris* and *Origanum*

vulgareon Echinococcus granulosus. Interdisciplinary **Perspectives On Infectious Diseases**, v. 2014, p. 1-12, ago. 2014. DOI: 10.1155/2014/693289. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ipid/2014/693289/>. Acesso em: 20 abr. 2020.

PEREIRA, L. P. L. A. Essential oils as molluscicidal agents Against schistosomiasis transmitting snails – a review. **Acta tropica**, v. 209, n. 1, p. 1-9, 2020. DOI:10.1016/j.actatropica.2020.105489. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S001706X19315396>. Acesso em: 23 jul. 2021.

PEREZ, M. P. *et al.* Actividad molusquicida del Paraiso (*Melia azedarach L.*) (Meliaceae) sobre *Lymnaea cubensis*, molusco vector de Fasciolosis. **Saúde Pública**, v. 32, n. 3, p. 262-6, 1998. DOI: 10.1590/S0034-89101998000300009. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89101998000300009. Acesso em: 18 fev. 2021.

PINHEIRO, L. *et al.* Estudo fitoquímico e avaliação da atividade molusquicida da *Kielmeyera variabilis Mart (Clusiaceae)*. **Química Nova**, v. 26, n. 2, p.157-160, 2003. DOI: 10.1590/s0100-40422003000200002. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422003000200002. Acesso em: 28 fev. 2020.

PINHEIRO, P. F. *et al.* Chemical Characterization and Molluscicidal Activity of Essential Oil from Leaves of *Eugenia uniflora L.* on *Lymnaea columella* (Say, 1817) and *Biomphalaria tenagophila* (D'Orbigny, 1835). **Journal Of Essential Oil Bearing Plants**, v. 20, n. 6, p.1482-1491, 2017. DOI: 10.1080/0972060x.2017.1410075. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/322572121_Chemical_Characterization_and_Molluscicidal_Activity_of_Essential_Oil_from_Leaves_of_Eugenia_uniflora_L_on_Lymnaea_columella_Say_1817_and_Biomphalaria_tenagophila_D'Orbigny_1835. Acesso em: 10 fev. 2020.

POINTIER, J. *et al.* *Pseudosuccinea columella* (Say 1817) (Gastropoda, Lymnaeidae), snail host of *Fasciola hepatica*: first record for France in the wild. : first record for France in the wild. **Parasitology Research**, v. 101, n. 5, p. 1389-1392, 2007. Springer Science and Business Media LLC. DOI: 10.1007/s00436-007-0656-y. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/6178240>. Acesso em: 15 abr. 2020.

POZZO, M. D. *et al.* Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus spp.* isolados de mastite caprina. **Ciência Rural**, v.41, n. 4, p. 667-672, 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/x3cbFRBNJ5nZLZDJhWNpVsF/?lang=pt&format=pdf>.

Acesos em 25 jul. 2021.

REIS, J. B. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais contra patógenos alimentares. **Brazilian Journal Of Health Review**, v. 3, n. 1, p.342-363, 2020. Brazilian Journal of Health Review. DOI: 10.34119/bjhrv3n1-025. Disponível em: <http://brazilianjournals.com/index.php/BJHR/article/view/6223/5524>. Acesso em: 28 fev. 2020.

ROCHA, T. J. *et al.* Estudo do efeito moluscicida de espécies vegetais em embriões e caramujos adultos de *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Gastropoda, Planorbidae). **Revista de Patologia Tropical**, v. 42, p. 230-239, 2013. DOI: 10.5216/rpt.v42i2.25524. Disponível em: <https://www.revistas.ufg.br/iptsp/article/view/25524>. Acesso em: 30 abr. 2021.

RODRIGUES, H. C.; SOUZA, H. B.. Prevalência e perdas econômicas por fasciolose em bovinos abatidos sob regime de inspeção municipal em Itaperuna, Rio de Janeiro. **Pubvet**, v. 13, n. 1, p.1-4, 2019. DOI: 10.31533/pubvet.v13n1a254.1-4. Disponível em: <https://www.pubvet.com.br/uploads/ed08cbd262bd444aa102907fb6162637.pdf>. Acesso em: 28 fev. 2020.

ROMERO, A. L. Chemical composition and activity of *Origanum vulgare* essential oil against phytopathogenic fungi. **Cient Ciênc. Biol. Saúde**, v. 14, n. 4, p. 231-235, 2012. Disponível em: <https://journalhealthscience.pgsskroton.com.br/article/view/865/829>. Acesso em 20 jun. 2021.

SAKURAI, F.N. *et al.* Caracterização das propriedades funcionais das ervas aromáticas utilizadas em um hospital especializado em cardiopneumologia. **Demetra: Alimentação, Nutrição & Saúde**, [s.l.], v. 11, n. 4, p. 1097-1113, 22 dez. 2016. Universidade de Estado do Rio de Janeiro. DOI: 10.12957/demetra.2016.18170. Disponível em: <https://www.e-publicacoes.uerj.br/index.php/demetra/article/view/18170>. Acesso em: 22 abr. 2020.

SALAMA, M. M.; TAHER, E. E.; EL-BAHY, M. M. Molluscicidal and mosquitocidal activities of the essential oils of *Thymus capitatus* HOFF. ET LINK. AND *Marrubium vulgare* L. **Rev. Inst. Med. Trop.** v. 53, n. 5, p. 281-286, 2012. DOI: 10.1590/S0036-46652012000500008 . Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652012000500008. Acesso em: 10 fev. 2021.

SANTORO, G. F. *et al.* Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus*

vulgaris L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. **Parasitology Research**. v. 100, n. 4, p.783-790, 2006. DOI: 10.1007/s00436-006-0326-5. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17024354/>. Acesso em: 20 abr. 2021.

SINGH, A. *et al.* Molluscicides of Plant Origin. **Biological Agriculture and Horticulture**. v. 13, n. 1, p. 205-252, 1996. DOI: 10.1080/01448765.1996.9754782. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/loi/tbah20>. Acesso em: 6 fev. 2021.

SOARES, M. F. *et al.* Toxicidade do sulfato de cobre ao mexilhão dourado, *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857), em Água Bruta. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.** v.4, n. 1-3, p. 37-48, 2009. DOI: 10.5132/jbse.2009.01.006. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Daniel-Pereira-5/publication/263007318_Toxicidade_do_Sulfato_de_Cobre_ao_Mexilhao_Dourado_Limnoperna_fortunei_Dunker_1857_em_Agua_Bruta/links/0f31753984f890f34b000000/Toxicidade-do-Sulfato-de-Cobre-ao-Mexilhao-Dourado-Limnoperna-fortunei-Dunker-1857-em-Agua-Bruta.pdf. Acesso em: 7 jul. 2021.

SRIVASTAVA, A. K.; SINGH, V. K. Review article biological action of essential oils (terpenes). **Int. J. Biol. Med. Res.** v. 10, n. 3, p. 6854-6859, 2019. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/343264300_BIOLOGICAL_ACTION_OF_ESSENTIAL_OILS_TERPENES_REVIEW_ARTICLE. Acesso em: 10 fev. 2021.

SRIVASTAVA *et al.* Seasonal variation in abiotic factors and toxicity of thymol against the snail *Lymnaea acuminata*. **Journal of Biology and Earth Sciences**, v. 3, n.1, p. B1-B7, 2013. ISSN: 2084-3577. Disponível em: https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/30856368/JBES2013v3i1artB1-B7.pdf?1362576100=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DSeasonal_variation_in_abiotic_factors_an.pdf&Expires=1627035441&Signature=a9VWZGK5dCas2Kb5dq6nFAL2bYpmubgpK94saSiiAzRGhKuh4gks0NgorZrtClqbU6zTanhIQ8W3PyM8Y-SX8ejcEpG~QAJV8nPo28TMeTOn3xhJhYW5NFSfi3cYBallXJSfYdNsv5LsmFM6cBo1Rfqz7GN1BN7Dwxdb88AzfLY1kIGjHsx5svhcxBXMBkVNndDWkqQT3vb2vz0R8LSnT4hCC9vSqj1F0CixGFtF~d7R~nab~xFh85qTNw3o08XL2NaENPYal9ehSlqScQAI OGGaRIK89-MAzhEBr8YQAfzIBTKsY0GbiHWVcpNI-OD5k2VGHKa7uGUPStYDFc6fQ_&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA. Acesso em: 23 jul. 2021.

TAIR-ABBACI, K. *et al.* Anatomical and histological characterization of the gametogenesis of *Radix balthica* (Linnaeus, 1758) in comparison with *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758). **Journal of Histology & Histopathology**, v.4, n.5, 2017. Disponível em: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01734875>. Acesso em: 15 mar. De 2021.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Parasitologia Veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

TUNHOLI-ALVES, V.M. *et al.* Changes in the reproductive biology of *Biomphalaria glabrata* experimentally infected with the nematode *Angiostrongylus cantonensis*.

Journal of invertebrate pathology, v.108, n.3, p.220-223, 2011. DOI::

10.1016/j.jip.2010.09.006. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20850448/>. Acesso em: 01 mar. 2021.

TUNHOLI, V.M., *et al.* Molluscicidal potential of *Heterorhabditis baujardi* (Rhabditida: Heterorhabditidae), strain LPP7, on *Lymnaea columella* (Gastropoda: Pulmonata):

An alternative for biological control of fasciolosis. **Acta Tropica** v.173, p. 23-29,

2017. DOI: 10.1016/j.actatropica.2017.05.024. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28545895/>. Acesso em: 01 mar. 2021.

UETA, M. T. Variações Anatômicas em *Lymnaea columella* (Mollusca, Gatropoda).

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina tropical. v. 11, n. 6, p. 217-237,

1977. DOI: 10.1590/S0037-86821977000600004. Disponível em:

[http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/21437/1/S0037-](http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/21437/1/S0037-86821977000600004.pdf)

[86821977000600004.pdf](http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/21437/1/S0037-86821977000600004.pdf). Acesso em: 28 fev. 2020.

VASCONCELLOS, M. C.; AMORIM, A. Activity of *Euphorbia splendens* var. *hislopii*

N.E.B.(Euphorbiaceae) Latex against *Lymnaea columella* (Say, 1817) (Pulmonata:

Lymnaeidae), Intermediate Host of *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 (Trematoda:

Fasciolidae). 2: Limited Field-testing. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 7, p. 981-

985, 2003. DOI: 10.1590/S0074-02762003000700021. Disponível em:

https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762003000700021.

Acesso em: 01 abr. 2020.

VENTURINI, F. P.; CRUZ, C.; PITELLI, R. A. Toxicidade aguda do sulfato de cobre e do extrato aquoso de folhas secas de nim para o caramujo (*Pomacea canaliculata*)

Acta Scientiarum. Biological Sciences, v. 30, n. 2, p. 179-183, 2009. ISSN: 1679-

9283. Disponível em: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=187116050009>. Acesso

em: 18 fev. 2021.

VIAJAYA, K.K.; PRIYADARSINI, A.S. Histology and Histochemistry of Manthe of

Lymanaea luteola (Lamarck 1799) Mollusca Gastropoda, **Journal of Pharmacy and**

Biological Sciences, v.9, n.6, p. 28-31, 2014. ISSN:2319-7676. Disponível em:

<http://www.iosrjournals.org/iosr-jpbs/papers/Vol9-issue6/Version-4/F09642831.pdf>.

Acesso em: 01 mar. 2021.

VIDAL, M. I. B. **ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E REPRODUTIVAS EM**

***Pseudosuccinea columella* (Mollusca: Gastropoda) APÓS INFECÇÃO**

EXPERIMENTAL POR *Heterorhabditis baujardi* (Rhabditida: Heterorhabditidae)

cepa LPP7. Orientador: Isabella Vilhena Freire Martins. 2020. 58 f. Dissertação

(Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Alegre, 2020. Disponível em:

http://portais4.ufes.br/posgrad/teses/tese_13928_MARIA%20LARISSA%20BITENCOURT%20VIDAL.pdf. Acesso em: 18 jan. 2021.

VIDAL, M.L.B. *et al.* Caracterização de metodologias aplicadas no estudo bioquímico e sistemático de *Pseudosuccinea columela* (Mollusca: Gastropoda) (Say, 1817).

Tópicos especiais ciência animal VIII [recurso eletrônico] Alegre, ES. CAUFES, Cap. 9, p. 153-166, 2019.

World Health Organization (WHO). **Guidelines for evaluation of plant molluscicides**. In: Report of the scientific working group on plant molluscicide.

Geneva: WHO, 1983, 11 p. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/60086/1/TDR_SCH-SWG_4_83.3_eng.pdf. Acesso em: 15 de abr. 2020.

XU, J. *et al.* The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. Lett. **Journal of Applied Microbiology**, v. 47 n. 1, p. 174–179, 2008. DOI:

10.1111/j.1472-765X.2008.02407.x. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19552781/>. Acesso em: 23 jul. 2021.

YOUSEF, A. A. A.; EL-KASSAS, N. B. Ultrastructure and histopathological effects of some plant extracts on digestive gland of *Biomphalaria alexandrina* and *Bulinus truncatus*. **The Journal of Basic & Applied Zoology**, v. 66, n. 1, p. 27-33, 2013.

DOI: 10.1016/j.jobaz.2012.12.006. Disponível em:

<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S2090989613000106?token=B146D2CECCFDA59CE692FCCB888E831025767EB97791C31F804BF55901CEDDBE98E23250690A3890CE6A36817A0E9B4A&originRegion=us-east-1&originCreation=20210409193743>. Acesso em: 09 abri. 2021.