

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

Atividade biológica dos extratos aquosos de *Solanum lycocarpum* St. Hil. (Solanaceae) procedente de regiões fitogeográficas distintas sobre *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Planorbidae)

Vanessa Barreto Xavier

2010



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS EXTRATOS AQUOSOS DE *Solanum lycocarpum* ST. HIL. (SOLANACEAE) PROCEDENTE DE REGIÕES FITOGEOGRÁFICAS DISTINTAS SOBRE *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818) (PLANORBIDAE)

VANESSA BARRETO XAVIER

Sob a Orientação do Professor
Helcio Resende Borba

e Co-orientação da Professora
Solange Viana Paschoal Blanco Brandolini

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2010

636.089696

X3a

T

Xavier, Vanessa Barreto, 1985-.
Atividade biológica dos extratos
aquosos de *Solanum lycocarpum* St. Hil.
(Solanaceae) procedente de regiões
fitogeográficas distintas sobre
Biomphalaria glabrata (Say, 1818)
(Planorbidae)/ Vanessa Barreto Xavier -
2010.

xiii, 87 f.: il.

Orientador: Helcio Resende Borba.

Dissertação (mestrado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Bibliografia: f. 74-87.

1. Parasitologia veterinária - Teses. 2.
Solanum lycocarpum - Teses. 3.
Biomphalaria glabrata - Teses. I. Borba,
Helcio Resende, 1954-. II. Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

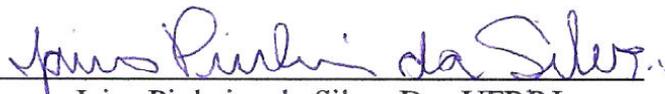
VANESSA BARRETO XAVIER

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

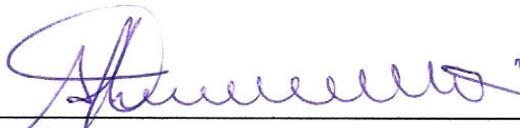
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 11/02/2010.



Helcio Resende Borba. Dr., UFRRJ.
(Orientador)



Jairo Pinheiro da Silva. Dr., UFRRJ.



Mauricio Carvalho de Vasconcellos. Dr., FIOCRUZ.



Clélia Christina Corrêa de Mello Silva. Dra., FIOCRUZ.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades concedidas, por ajudar-me a superar dificuldades, em todos os momentos da elaboração desta dissertação, através de muita força de vontade.

Aos meus pais, Paulo e Sonia, por me incentivarem em todos os momentos, principalmente nos difíceis, pelas nossas conversas engraçadas. Meu pai que sempre me auxiliou na compra de alfaces, nas chamadas “missões” quase que impossíveis, mas todas realizadas com o seu maior esforço; as quais foram essenciais para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

Ao meu namorado pela ajuda nos momentos difíceis, e de estresse, com seu amor, carinho, paciência, compreensão, além de seu bom humor. Obrigada!

Aos queridos professores, Dr. Helcio Resende Borba e Dra. Solange Viana Paschoal Blanco Brandolini, por me auxiliarem nos momentos que mais precisei, através de compreensão, paciência, dedicação e o compartilhamento de conhecimentos fundamentais não só para elaboração deste trabalho, como também, para minha vida.

Ao professor Dr. Jairo Pinheiro da Silva ao laboratório cedido para a elaboração das análises bioquímicas, além da paciência nas análises estatísticas.

Ao professor Mário Geraldo de Carvalho por te cedido seu laboratório para a realização do teste para saponina.

Ao Dr. Yoshimi Sato pela ajuda material para a elaboração da dissertação.

Aos técnicos administrativos que auxiliaram com coleta da planta, além de disponibilizarem, quando solicitado, os materiais de laboratório.

Ao CPGCV/UFRRJ pelo suporte com os materiais para diagnóstico.

Aos professores e amigos do curso, principalmente à Mariana Lima que me ajudou nas análises bioquímicas; e também pela convivência ao longo do curso, e das nossas, longas conversas.

As “meninas” do laboratório da Dra. Marília de Carvalho Brasil Sato pelo apoio.

À UFRRJ, universidade que me acolheu com carinho.

Obrigada a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração desta dissertação.

RESUMO

XAVIER, Vanessa Barreto. **Atividade biológica dos extratos aquosos de *Solanum lycocarpum* St. Hil. (Solanaceae) procedente de regiões fitogeográficas distintas sobre *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Planorbidae)** 2010. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Medicina Veterinária, Departamento de Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

Há necessidade urgente de encontrar moluscidas seletivos e eficientes para o controle de *Biomphalaria glabrata* hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*. Neste sentido, o presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos agudos dos extratos aquosos de *Solanum lycocarpum* procedente da Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG e do Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro sobre *B. glabrata* através de métodos diferenciados de extração; identificar saponina em todos os extratos utilizados; verificar os efeitos crônicos dos extratos sobre os moluscos sobreviventes e da geração F1, analisando os parâmetros de mortalidade e reprodução e também, analisar a influência dos extratos sobre os níveis de glicose, uréia e ácido úrico dos moluscos sobreviventes. Folhas de *S. lycocarpum* após secas a temperatura ambiente, picotadas e pesadas, mantendo uma relação de 10,0% p/v, solução mãe, foram submetidas ao método de infusão, “a quente”, onde o material vegetal permaneceu em contato com água destilada em temperatura de 90°C durante 15 minutos e ao método de maceração estática, “a frio”, onde as folhas permaneceram em contato com a água destilada, em temperatura ambiente, por 24 horas. A partir da solução mãe foram obtidas as demais concentrações, 7,0 e 4,0%. Foram utilizados moluscos de 9-13 mm de diâmetro de concha. As observações dos moluscos submetidos aos bioensaios foram feitas em 24, 48 e 72h. Os moluscos sobreviventes aos bioensaios foram observados durante 60 dias e a geração F1 por 90 dias, quando eram quantificados os moluscos mortos e as massas ovíferas. Foi realizada coleta de hemolinfa dos moluscos sobreviventes nos períodos de 4, 30 e 60 dias. Elevados percentuais de mortalidade foram verificados com as concentrações de 10,0% e 7,0% nas primeiras 24 horas de observação, para ambas as localidades de coleta, independente do método de extração. No entanto, com a concentração de 4,0%, verificou-se um elevado percentual de mortalidade somente com o extrato obtido pelo método a frio, da localidade de Três Marias. O método de maceração estática se mostrou equivalente à infusão, porém influenciou a determinação da CL₉₀ na localidade de Três Marias. Com o método de infusão, a CL₉₀ foi de 7,0% e com método de extração “a frio” foi de 4,0%. Verificou-se a presença de saponinas em todos os extratos aquosos das folhas de *S. lycocarpum* utilizados. A análise bioquímica demonstrou aumento dos níveis de glicose e uréia em alguns grupos tratados, na hemolinfa dos moluscos sobreviventes submetidos ao extrato da planta procedente de Três Marias. Não foi verificada diferença significativa nos níveis de glicose, uréia e ácido úrico dos moluscos sobreviventes submetidos ao extrato da planta coletada no Campus Seropédica da UFRRJ. Não houve diferença significativa no percentual de mortalidade dos moluscos sobreviventes ao longo de 60 dias de observação. No entanto, verificou-se diferença estatística no percentual de mortalidade da geração F1. A atividade moluscicida dos extratos aquosos de *S. lycocarpum* foi influenciada pela localidade de procedência da planta, como também pelo método de extração. Estes aspectos também influenciaram a reprodução dos moluscos sobreviventes a reprodução e a taxa de mortalidade da geração F1.

Palavras-chave: Extrato aquoso, *Solanum lycocarpum*, *Biomphalaria glabrata*.

ABSTRACT

XAVIER, Vanessa Barreto. **Biological activity of aqueous extracts of *Solanum lycocarpum* St. Hil. (Solanaceae) coming from different phytogeographic regions on *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Planorbidae).** 2010. 87f. Dissertation (Master in Veterinary Sciences). Instituto de Medicina Veterinária, Departamento de Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

There is urgent need for selective and effective molluscicidal for control of *Biomphalaria glabrata* the intermediate host of *Schistosoma mansoni*. This study aimed to evaluate the acute effects of aqueous extract of *Solanum lycocarpum* founded the Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG and Campus Seropédica of Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro on *B. glabrata* using different methods of extraction; identify saponin in all extracts used; determine the chronic effects of extracts on the survivors and F1 generation by analyzing the mortality and reproduction and also analyses the influence of extracts on the levels of glucose, urea and uric acid. Leaves of *S. lycocarpum* after dried at room temperature, perforated, heavy, maintaining a ratio of 10.0% w/v, stock solution, were submitted to the infusion, "hot", where the plant material remained in contact with hot distilled water for 15 minutes reached a temperature of 90° C. And the method of static maceration, "cold", where the leaves remain in contact with distilled water at room temperature for 24 hours. From the stock solution were obtained from the other concentrations, 7.0 and 4.0%. Were used snails 9-13 mm diameter shell. The snails' observations submitted to the bioassays were made in 24, 48 and 72h. The survivors' snails were observed for 60 days and the generation F1 over 90 days. This hemolymph of survivors was collected in periods of 4, 30 and 60 days. High rates were observed with concentrations of 10.0% and 7.0% in the first 24 hours of observation in both localities of collection, regardless of the method of extraction. However, the concentration of 4.0% only showed a high percentage of mortality in the cold extraction, in Três Marias. The static maceration was equivalent to the infusion method, but influenced the determination of the LC₉₀ the location Três Marias. Infusion in the LC₉₀ was 7.0% and the method "cold" was 4.0%. It was verified the presence of saponins in all aqueous extracts *S. lycocarpum*'s leaves used. Biochemical analysis showed increased levels of glucose in some treated groups, as well as high levels of urea in the hemolymph of survivors snails exposed to plant extract originating from Três Marias. There was no significant difference in the levels of glucose, urea and uric acid of the snails survivors submitted to extract the plant collected in the Campus Seropédica UFRRJ. There was no significant difference in the mortality's percentage of the survivors during 60 days observation. However, there was no statistical difference in the mortality rate of the F1 generation. It was the influence of extracts on reproduction: number of eggs/snail, eggs/egg masses and snail hatched/number of eggs, the same was observed in the F1 generation, including the number of egg masses/snail. The molluscicidal activity of aqueous extracts of *S. lycocarpum* was influenced by origin of the plant, but also by the method of extraction. These aspects also affected the reproduction of live survivors, reproduction and mortality of the F1 generation.

Key words: Aqueous extract. *Solanum lycocarpum*. *Biomphalaria glabrata*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Morfologia da concha de *Biomphalaria glabrata* 3
- Figura 2.** Detalhe do manto. A) *Biomphalaria* sp.; B) *B. glabrata*, com crista renal. Estruturas: coração (**co**), pericárdio (**pe**), glândula de albúmen (**ga**), veia pulmonar (**vp**), veia renal (**vr**), tubo renal (**tr**), crista lateral (**cl**), crista renal (**cr**), colar do manto (**cm**), ureter (**ur**), meato do ureter (**mu**) e pneumóstoma (**pn**). 4
- Figura 3.** Morfologia de *Biomphalaria*: animal retirado da concha com o manto levemente rebatido, para a visualização dos órgãos internos. Massa cefalopodal (**ms**), cavidade pulmonar (**cp**), mufla (**mf**), tentáculo (**te**), colo (**c**), abertura genital masculina (**mc**), colar ou borda do manto (**cm**), pseudobrânquia (**ps**), pneumóstoma (**pn**), abertura anal (**an**), músculo columelar (**mc**), crista lateral (**cl**), crista retal (**ct**), veia renal (**vr**), veia pulmonar (**vp**), tubo renal (**tr**), reto (**rt**), glândula de albúmen (**ga**), intestino anterior (**ia**), intestino médio (**im**), intestino posterior (**ip**), estômago (**et**), glândula digestiva (**gd**), pé (**p**), ovotestis (**ot**). 5
- Figura 4.** Morfologia interna de *Biomphalaria* sp. Sistema digestivo: mandíbula (**ma**); saco bucal (**sb**); dentes da rádula: central (**c**), marginal (**m**), intermediário (**i**) e lateral (**l**); glândula salivar (**gs**); esôfago (**ef**); estômago: papo (**pa**), moela (**mo**), piloro (**pl**); glândula digestiva (**gd**); intestino: anterior (**ia**), médio (**im**), e posterior (**ip**); reto (**re**); crista retal (**ct**); ânus (**an**). Sistema nervoso: anel periesofágico (**sn**). Sistema respiratório: pseudobrânquia (**ps**). Músculo columelar (**mc**). 6
- Figura 5.** Sistema reprodutor dissecado de *Biomphalaria glabrata*: canal coletor do ovotestis (**cc**), encruzilhada genital (**eg**), ovispermiduto proximal (**odp**), ovispermiduto distal (**odd**), ovotestis (**ot**) e vesícula seminal (**vs**); estruturas masculinas: bainha do pênis (**bp**), canal deferente (**cd**), espermiduto (**ed**), músculos do complexo peniano [retrator (**mr**) e protrator (**mp**)], prepúcio (**pp**); estruturas femininas: bolsa do oviduto (**bo**), bolsa vaginal (**bv**), espermateca (**es**), glândula nidamental (**gn**), vagina (**va**) e útero (**ut**). 7
- Figura 6.** Registro da ocorrência de *Biomphalaria glabrata* no Brasil. 8
- Figura 7.** Distribuição da esquistossomíase mansônica no Brasil. 9
- Figura 8.** Casal de *Schistosoma mansoni*, vendo-se a fêmea alojada no canal ginecóforo do macho. 10
- Figura 9.** Ciclo evolutivo do *Schistosoma mansoni*: A. Vermes adultos acasalados, no interior das vênulas da parede intestinal. B. Ovos são eliminados com as fezes de pessoas infectadas. C. Miracídeos eclodem na água e nadam à procura do molusco hospedeiro (*Biomphalaria* spp.). D. No interior deste, cada miracídio evolui para esporocisto primário, que produz os esporocistos

	filhos, os quais formam cercárias no seu interior. E. Cercárias saem do molusco e nadam em busca do hospedeiro vertebrado (homem), onde irão evoluir até o estágio de vermes adultos.	10
Figura 10.	Formas de ação para o controle da esquistossomíase mansônica.	12
Figura 11.	Reservatórios de <i>Schistosoma mansoni</i> . A. <i>Holochilus brasiliensis</i> ; B. <i>Nectomys squamipes</i> e C. <i>Oxymycterus</i> sp.	13
Figura 12.	Aquário mostrando os moluscos no seu interior.	22
Figura 13.	Morfologia foliar de <i>Solanum lycocarpum</i> . A- Aspecto geral da face ventral; B- Aspecto geral da face dorsal; C-Espinhos preentes nas nervuras da face ventral; D- Espinhos presentes nas nervuras da face dorsal.	22
Figura 14.	Carta imagem do local de coleta de <i>Solanum lycocarpum</i> – Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG.	23
Figura 15.	Hábito arbustivo de <i>Solanum lycocarpum</i> prodecente da Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG.	23
Figura 16.	Visão de satélite do local de coleta de <i>Solanum lycocarpum</i> – Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.	24
Figura 17	Hábito arbustivo de <i>Solanum lycocarpum</i> procedente do Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.	25
Figura 18.	Procedimento utilizado na preparação dos extratos aquosos “a quente” de <i>Solanum lycocarpum</i> .	27
Figura 19.	Procedimento utilizado no preparo do extrato aquoso “a frio” de <i>Solanum lycocarpum</i> .	28
Figura 20.	Preparação das concentrações utilizadas no bioensaio com <i>Solanum lycocarpum</i> .	29
Figura 21.	Procedimento para a separação dos moluscos sobreviventes aos bioensaios e da geração F1.	31
Figura 22	Procedimento para obtenção de hemolinfa. A. A concha era perfurada na altura da cavidade pericárdica. B. Punção cardíaca. C. Microtubo com hemolinfa no banho de gelo, durante toda a coleta. D. Volume final de hemolinfa obtido.	34
Figura 23.	Percentual de mortalidade de <i>Biomphalaria glabrata</i> exposta aos extratos aquosos de <i>Solanum lycocarpum</i> obtidos pelo método de extração por infusão durante a realização do bioensaio. SLFAqQ-TM (<i>Solanum lycocarpum</i> , folha, aquoso, quente – Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG) e SLFAqQ-UFRRJ (<i>Solanum lycocarpum</i> , folha, aquoso, quente – Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de	

- Figura 24.** Percentual de mortalidade de *Biomphalaria glabrata* exposta aos extratos aquosos de *Solanum lycocarpum* obtidos pelo método de extração por maceração estática durante a realização do bioensaio. SLFAqF-TM (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, frio – Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG) e SLFAqF-UFRRJ (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, frio – Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ). 36
- Figura 25.** Percentual de mortalidade de *Biomphalaria glabrata* exposta aos extratos aquosos de *Solanum lycocarpum* coletada na Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG obtidos pelos métodos de extração por maceração estática e por infusão durante a realização do bioensaio. SLFAqF-TM (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, frio – Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG) e SLFAqQ – TM (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, quente – Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG). 37
- Figura 26.** Percentual de mortalidade de *Biomphalaria glabrata* exposta aos extratos aquosos de *Solanum lycocarpum* coletada no Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ obtidos pelos métodos de extração por maceração estática e por infusão durante a realização do bioensaio. SLFAqF - UFRRJ (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, frio – Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ) e SLFAqQ – UFRRJ (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, quente – Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ). 38
- Figura 27.** Recipientes contendo *Biomphalaria glabrata* exposta aos extratos aquosos da folha de *Solanum lycocarpum* durante a realização do bioensaio, onde se verificou o extravasamento de hemolinfa. 41
- Figura 28.** Relação entre o percentual de mortalidade de *Biomphalaria glabrata* submetida ao extrato SLFAqQ – UFRRJ (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, quente, Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ) e as concentrações utilizadas no bioensaio. 44
- Figura 29.** Relação entre o percentual de mortalidade de *Biomphalaria glabrata* submetida ao extrato SLFAqQ – TM (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, quente, Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG) e as concentrações utilizadas no bioensaio. 44
- Figura 30.** Relação entre o percentual de mortalidade de *Biomphalaria glabrata* submetida ao extrato SLFAqF – UFRRJ (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, frio, Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ) e as concentrações utilizadas no bioensaio. 45
- Figura 31.** Relação entre o percentual de mortalidade de *Biomphalaria glabrata* submetida ao extrato SLFAqF – TM (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso,

- frio, Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG) e as concentrações utilizadas no bioensaio. 45
- Figura 32.** Funil de separação contendo amostra do extrato aquoso de *Solanum lycocarpum* evidenciando a formação de duas fases, após adição de clorofórmio. 48
- Figura 33.** Formação de espuma, com colarinho nos extratos aquosos de *Solanum lycocarpum* após a realização do teste para detecção de saponina. A- Extrato submetido à extração a frio. B- Extrato submetido à extração a quente. 49
- Figura 34.** Teste confirmatório para saponina nos extratos aquosos de *Solanum lycocarpum*, com formação de precipitado. 1. SLFAqF-UFRRJ (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, frio, Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ); 2. SLFAqF-TM (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, frio, Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG); 3. SLFAqQ-UFRRJ (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, quente, Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ) e 4. SLFAqQ-TM (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, quente, Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG). 50
- Figura 35.** Mortalidade de *Biomphalaria glabrata* sobrevivente aos bioensaios com extratos aquosos de *Solanum lycocarpum* ao longo de 60 dias de observação sob condições experimentais. 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Evolução das estratégias de controle da esquistossomíase mansônica desde os anos 50. Os sombreados escuros e claros representam, respectivamente, alta e baixa prioridade.	15
Tabela 2.	Percentual de mortalidade de <i>Biomphalaria glabrata</i> no bioensaio com os extratos aquosos de <i>Solanum lycocarpum*</i> , por área de coleta, durante as primeiras 24 horas de observação, sob condições experimentais.	39
Tabela 3.	Número de moluscos mortos durante os bioensaios com os extratos aquosos de <i>Solanum lycocarpum*</i> , por período de observação, sob condições experimentais.	43
Tabela 4.	Biologia reprodutiva de <i>Biomphalaria glabrata</i> sobrevivente aos bioensaios com extratos aquosos de <i>Solanum lycocarpum*</i> ao final de 60 dias, sob condições experimentais.	53
Tabela 5.	Número médio de ovos produzidos por <i>Biomphalaria glabrata</i> sobrevivente aos bioensaios com extratos aquosos de <i>Solanum lycocarpum*</i> ao final de 60 dias de observação, sob condições experimentais.	54
Tabela 6.	Número médio de ovos/massa ovígera de <i>Biomphalaria glabrata</i> sobrevivente aos bioensaios com extratos aquosos de <i>Solanum lycocarpum*</i> aos bioensaios ao final de 60 dias, sob condições experimentais.	55
Tabela 7.	Número médio de moluscos eclodidos/número de ovos de <i>Biomphalaria glabrata</i> sobrevivente aos bioensaios com extratos aquosos de <i>Solanum lycocarpum*</i> ao final de 60 dias, sob condições experimentais.	56
Tabela 8.	Concentração de glicose na hemolinfa de <i>Biomphalaria glabrata</i> exposta aos extratos aquosos de <i>Solanum lycocarpum*</i> , obtidos pelo método de infusão, procedente da localidade de Três Marias, no período de 4 dias de observação, sob condições experimentais.	58
Tabela 9.	Concentração de glicose na hemolinfa de <i>Biomphalaria glabrata</i> exposta aos extratos aquosos de <i>Solanum lycocarpum*</i> , obtidos pelo método de infusão, procedente da localidade de Três Marias, nos períodos de 4, 30 e 60 dias de observação, sob condições experimentais.	58
Tabela 10.	Concentração de glicose na hemolinfa de <i>Biomphalaria glabrata</i> exposta aos extratos aquosos de <i>Solanum lycocarpum*</i> procedente da localidade do Campus Seropédica da UFRRJ, nos períodos de 4, 30 e 60 dias de observação, sob condições experimentais.	59
Tabela 11.	Concentração de uréia e ácido úrico na hemolinfa de <i>Biomphalaria glabrata</i> exposta aos extratos aquosos de <i>Solanum lycocarpum*</i> procedente da localidade de Três Marias, nos períodos de 4, 30 e 60 dias de observação,	

	sob condições experimentais.	61
Tabela 12.	Concentração de uréia e ácido úrico na hemolinfa de <i>Biomphalaria glabrata</i> exposta aos extratos aquosos de <i>Solanum lycocarpum</i> * procedente da localidade do Campus Seropédica da UFRRJ, nos períodos de 4, 30 e 60 dias de observação, sob condições experimentais.	62
Tabela 13.	Número médio de moluscos mortos da geração F1 de <i>Biomphalaria glabrata</i> obtida a partir dos moluscos sobreviventes aos bioensaios com extratos aquosos de <i>Solanum lycocarpum</i> * ao final de 90 dias sob condições experimentais, sob condições experimentais.	63
Tabela 14.	Biologia reprodutiva da geração F1 de <i>Biomphalaria glabrata</i> sobrevivente aos bioensaios com extratos aquosos de <i>Solanum lycocarpum</i> * ao final de 90 dias de observação, sob condições experimentais.	65
Tabela 15.	Número de massas ovíferas/molusco produzidos pela geração F1 obtida a partir de <i>Biomphalaria glabrata</i> sobrevivente aos bioensaios com extratos aquosos de <i>Solanum lycocarpum</i> * ao final de 90 dias, sob condições experimentais.	66
Tabela 16.	Número de ovos/molusco produzidos pela geração F1 obtida a partir de <i>Biomphalaria glabrata</i> sobrevivente aos bioensaios com extratos aquosos de <i>Solanum lycocarpum</i> * ao final de 90 dias, sob condições experimentais.	67
Tabela 17.	Número de ovos/massa ovífera produzidos pela geração F1 de <i>Biomphalaria glabrata</i> obtida a partir dos moluscos sobreviventes aos bioensaios com extratos aquosos de <i>Solanum lycocarpum</i> * ao final de 90 dias, sob condições experimentais.	68
Tabela 18.	Número de moluscos eclodidos/número de ovos da geração F1 de <i>Biomphalaria glabrata</i> obtida a partir dos moluscos sobreviventes aos bioensaios com extratos aquosos de <i>Solanum lycocarpum</i> * ao final de 90 dias, sob condições experimentais.	69

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Classificação Taxonômica, Biologia e Morfologia do gênero <i>Biomphalaria</i>	3
2.2 Distribuição geográfica de <i>Biomphalaria glabrata</i> no Brasil	7
2.3 Distribuição geográfica da esquistossomíase mansônica no Brasil	8
2.4 Ciclo evolutivo do <i>Schistosoma mansoni</i>	9
2.5 A importância da esquistossomíase mansônica na Medicina Veterinária	12
2.6 Estratégias de controle da esquistossomíase mansônica	15
2.6.1 Métodos de controle	15
2.6.1.1 Métodos biológicos	16
2.6.1.2 Métodos físicos	16
2.6.1.3 Métodos químicos	16
2.7 Família Solanaceae: <i>Solanum lycocarpum</i>	18
2.7.1 Classificação botânica	18
2.7.2 Distribuição geográfica	19
2.7.3 Uso medicinal	19
2.7.4 Propriedades químicas	19
2.8 Efeitos moluscidas sobre o metabolismo de carboidratos e produtos nitrogenados de <i>Biomphalaria glabrata</i>	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Manutenção de <i>Biomphalaria glabrata</i> em laboratório	21
3.1.1 Procedência do molusco	21
3.1.2 Água	21
3.1.3 Substrato	21
3.1.4 Alimentação	21
3.1.5 Montagem dos aquários	21
3.2 Material Botânico	22
3.3 Local de preparo dos extratos, realização dos bioensaios e da observação dos moluscos sobreviventes aos bioensaios	25
3.3.1 Preparação do extrato aquoso “a quente” de <i>Solanum lycocarpum</i> através do método de infusão	25
3.3.2 Preparação do extrato aquoso “a frio” de <i>Solanum lycocarpum</i> através do método de maceração estática	25
3.4 Bioensaios com o molusco <i>Biomphalaria glabrata</i>	29
3.4.1 Avaliação moluscida	29
3.4.1.1 Material e procedimento para os testes moluscidas	30
3.5 Manutenção dos moluscos sobreviventes aos bioensaios e da Geração F1	30
3.5.1 Observação dos aquários	31
3.5.2 Protocolo para verificação dos moluscos mortos e contabilização das massas ovíferas	31
3.6 Teste fitoquímico para identificação de saponina	32
3.7 Análises Bioquímicas	33
3.8 Análise Estatística	34

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 Efeitos agudos dos extratos aquosos de <i>Solanum lycocarpum</i> sobre <i>Biomphalaria glabrata</i> através de métodos diferenciados de extração	35
4.2 Teste de verificação e confirmação de saponina nos extratos aquosos de <i>Solanum lycocarpum</i>	48
4.3 Efeitos crônicos verificados em <i>Biomphalaria glabrata</i> sobrevivente aos bioensaios com extratos aquosos de <i>solanum lycocarpum</i> durante 60 dias de observação	50
4.3.1 Influência sobre a taxa de mortalidade dos moluscos	50
4.3.2 Influência sobre a reprodução dos moluscos	51
4.4 Alterações bioquímicas apresentadas por <i>Biomphalaria glabrata</i> exposta aos extratos aquosos de <i>Solanum lycocarpum</i> nos períodos de 4, 30 e 60 dias após a realização dos bioensaios	56
4.4.1 Alterações nos níveis de glicose	56
4.4.2 Alterações nos níveis de uréia e ácido úrico	59
4.5 Efeitos crônicos verificados na geração F1 de <i>Biomphalaria glabrata</i> sobrevivente aos bioensaios com extratos aquosos de <i>Solanum lycocarpum</i> ao final de 90 dias de observação	62
4.5.1 Influência sobre a taxa de mortalidade dos moluscos da geração F1	62
4.5.2 Influência sobre a reprodução dos moluscos da geração F1	63
5 CONCLUSÕES	73
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomíase mansônica é uma doença produzida por trematódeos digenéticos do gênero *Schistosoma* (Weinland, 1858). Atualmente existem seis espécies de *Schistosoma*, sendo que *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907) é a única que se apresenta no continente americano (BRASIL, 2007).

No Brasil, a esquistossomíase mansônica é considerada, ainda, um grave problema de saúde pública e ambiental, já que é endêmica em uma vasta extensão do território e, também, por acometer milhões de pessoas, desencadeando números expressivos de casos graves e de óbitos, anualmente (BRASIL, 2007; REY, 2008).

A ocorrência de *S. mansoni* está diretamente relacionada à presença do hospedeiro intermediário, moluscos aquáticos da família Planorbidae e pertencentes ao gênero *Biomphalaria* Preston, 1910; à presença do homem na condição de hospedeiro definitivo, liberando os ovos com as fezes, e também, à ausência de saneamento básico ou quando presente, realizado de forma inadequada. A infecção humana se dá em proporções acentuadas, devido à utilização de coleções hídricas para lazer ou atividades domésticas, em áreas endêmicas (BRASIL, 2007).

Casos de esquistossomíase mansônica em bovinos têm sido relatados desde a década de 60 (BARBOSA et al., 1962). Devido a seu tamanho e a sua longevidade, o bovino é um reservatório potencial para a manutenção e a disseminação do parasito. A partir, dessa primeira descrição, novos trabalhos surgiram, envolvendo não só bovinos, mas também animais silvestres, servindo de reservatórios para o parasito. Em ambos os casos, existem evidências de uma possível continuidade do ciclo de *S. mansoni*, como a eliminação de ovos viáveis do parasito, no entanto, não há a infecção sem a presença do hospedeiro humano (MODENA et al., 2008).

Um dos principais fatores que ligam o parasito aos hospedeiros são os hábitos de vida dos animais, que podem frequentar as coleções hídricas próximas do seu hábitat natural (COELHO et al., 1982; KAROUM & AMIN, 1985; MODENA, et al., 1993)

Os relatos de roedores infectados naturalmente com *S. mansoni* capturados em áreas, em áreas endêmicas, têm sido verificados com as espécies *Holochilus brasiliensis* (Desmarest, 1819) e *Nectomys squamipes* (Brants, 1827) (ANTUNES, et al., 1973; MILLWARD de ANDRADE, et al., 1976).

Verifica-se assim, a importância do controle da esquistossomíase mansônica, já que estes animais podem servir de reservatório, para o helminto.

Sendo assim, o mecanismo de transmissão da esquistossomíase mansônica é extremamente complexo, dependendo não só dos elementos relacionados de forma direta com o ciclo, mas também, a fatores condicionantes inerentes a cada localidade. Assim, para que haja sucesso na vigilância e no controle da esquistossomíase mansônica, as medidas preventivas, devem ser aplicadas de maneira integrada, desde o diagnóstico precoce e o tratamento dos portadores de *S. mansoni*, passando pela pesquisa, pelo controle dos hospedeiros intermediários, até as ações educativas em saúde para as populações sob risco e, finalmente as ações de saneamento, para modificação dos fatores ambientais favoráveis à transmissão e à manutenção da doença (BRASIL, 2007).

As medidas preventivas, acima relacionadas, particularmente aquelas voltadas para o hospedeiro intermediário, que são objeto deste trabalho, afetam diretamente o ambiente.

Considerando que, em geral, as substâncias ou formulações utilizadas são biocidas, afetando também muitos animais e plantas (ou ambos) onde moluscos habitam, há necessidade urgente de encontrar moluscicidas seletivos e eficientes para o controle dos

moluscos. Neste sentido, tem-se procurado por substâncias naturais com atividade moluscicida na expectativa de que plantas disponíveis no local possam ser usadas para o controle da doença em áreas endêmicas (KLOOS & MCCOLLOUGH, 1982; MARSTON & HOSTETTMANN, 1985; MARSTON & HOSTETTMAN, 1991).

Em decorrência da ampla distribuição geográfica e alta susceptibilidade da *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), ao parasito, este molusco se constitui um excelente alvo para o controle da parasitose através da aplicação de moluscicidas, dentre os quais se destaca, atualmente, os de origem vegetal (SOUZA et al., 1995 a,b).

O presente trabalho tem por objetivos: avaliar a atividade moluscicida do extrato aquoso de *Solanum lycocarpum*; procedências: Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG e do Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ sobre *B. glabrata* através de métodos diferenciados de extração; verificar a presença de saponina em todos os extratos utilizados nos bioensaios; determinar a CL₉₀ dos extratos aquosos de *S. lycocarpum* procedentes das duas localidades em estudo; avaliar a influência de diferentes métodos de extração sobre a CL₉₀ dos extratos de *S. lycocarpum* oriundo das localidades em estudo; analisar os efeitos crônicos dos extratos sobre os moluscos sobreviventes aos bioensaios, e assim como da geração F1, analisando os parâmetros de mortalidade e reprodução e verificar a influência dos extratos sobre os níveis de glicose, uréia e ácido úrico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Classificação Taxonômica, Biologia e Morfologia do gênero *Biomphalaria*

Taxonomicamente, o gênero *Biomphalaria* pertence ao filo Mollusca, classe Gastropoda, sub-classe Pulmonata, ordem Basommatophora e família Planorbidae (BRASIL, 2007). No Brasil existem 10 espécies e uma subespécie de *Biomphalaria*, descritas até o momento, são elas: *B. intermedia* (Paraense & Deslandes, 1962), *B. occidentalis* Paraense, 1981, *B. schrammi* (Crosse, 1864), *B. oligoza* Paraense, 1975, *B. kuhniiana* (Clessin, 1883), *B. peregrina* (Orbigny, 1835), *B. amazonica* Paraense, 1996, *B. glabrata* (Say, 1818), *B. tenagophila* (Orbigny, 1835), *B. straminea* (Dunker, 1848) e *B. tenagophila guaibensis* Paraense, 1984 (BARBOSA, 1995).

No Brasil, apenas *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* foram encontradas naturalmente infectadas, porém *B. peregrina* e *B. amazonica* mostraram-se suscetíveis ao *S. mansoni* em infecções experimentais, podendo ser consideradas hospedeiras em potencial do trematódeo no Brasil (CORREA & PARAENSE, 1971; PARAENSE, 1973; PARAENSE & CORREA, 1985; BARBOSA, 1995).

O gênero *Biomphalaria* possui concha planispiral, apresentando variação de diâmetro, no animal adulto e de acordo com a espécie, em cerca de 7 mm (*B. schrammi*) e 40 mm (*B. glabrata*) conforme ilustrado na Figura 1 (PARAENSE 1972, 1975).

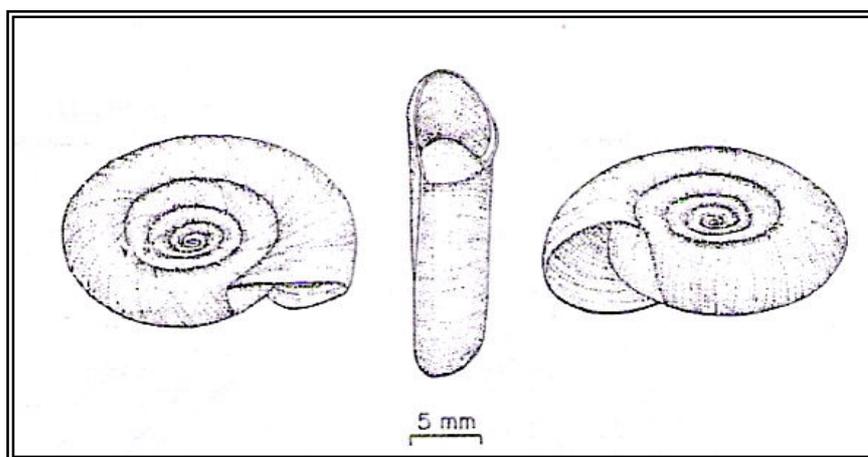


Figura 1. Morfologia da concha de *Biomphalaria glabrata*. Fonte: Paraense (1975).

No manto podem ser observados: coração, contido no pericárdio e constituído por uma aurícula e um ventrículo; parte da glândula de albúmen, veias pulmonar e renal; ureter e seu meato; o rim; o pneumóstoma; e a crista lateral. A observação do manto é extremamente importante para a identificação específica, uma vez que o principal caráter diagnóstico de *B. glabrata*, a crista renal, encontra-se no manto (Figura 2) (PARAENSE, 1972).

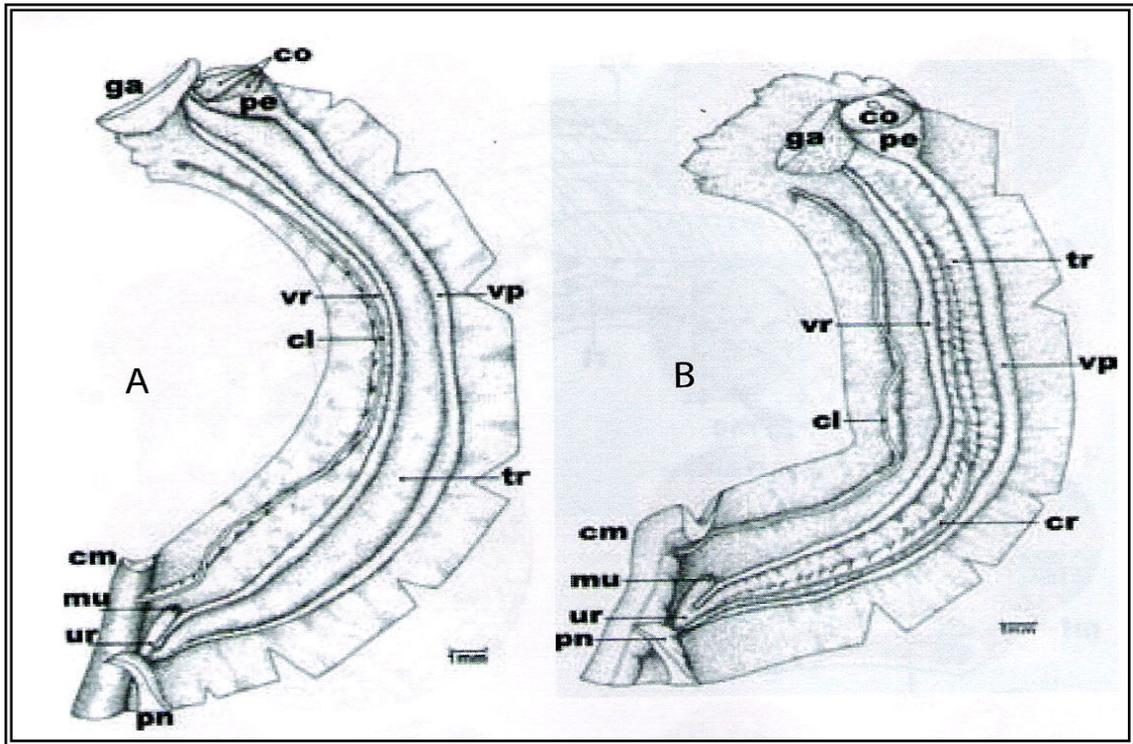


Figura 2. Detalhe do manto. A) *Biomphalaria* sp.; B) *B. glabrata*, com crista renal. Estruturas: coração (**co**), pericárdio (**pe**), glândula de albúmen (**ga**), veia pulmonar (**vp**), veia renal (**vr**), tubo renal (**tr**), crista lateral (**cl**), crista renal (**cr**), colar do manto (**cm**), ureter (**ur**), meato do ureter (**mu**) e pneumóstoma (**pn**). Fonte: Paraense (1975).

Na respiração, a hematose dos moluscos pulmonados planorbídeos apresenta-se na rede vâsculo-conjuntiva da parede pulmonar, de onde o sangue oxigenado flui para o coração através da veia pulmonar. Além da cavidade pulmonar, existe a pseudobrânquia, órgão ricamente vascularizado, considerado a sede principal da respiração aquática. Esta por sua vez, pode se efetuar, acessoriamente, através dos tegumentos em contato direto com o ambiente líquido (Figura 3) (PARAENSE, 1972).

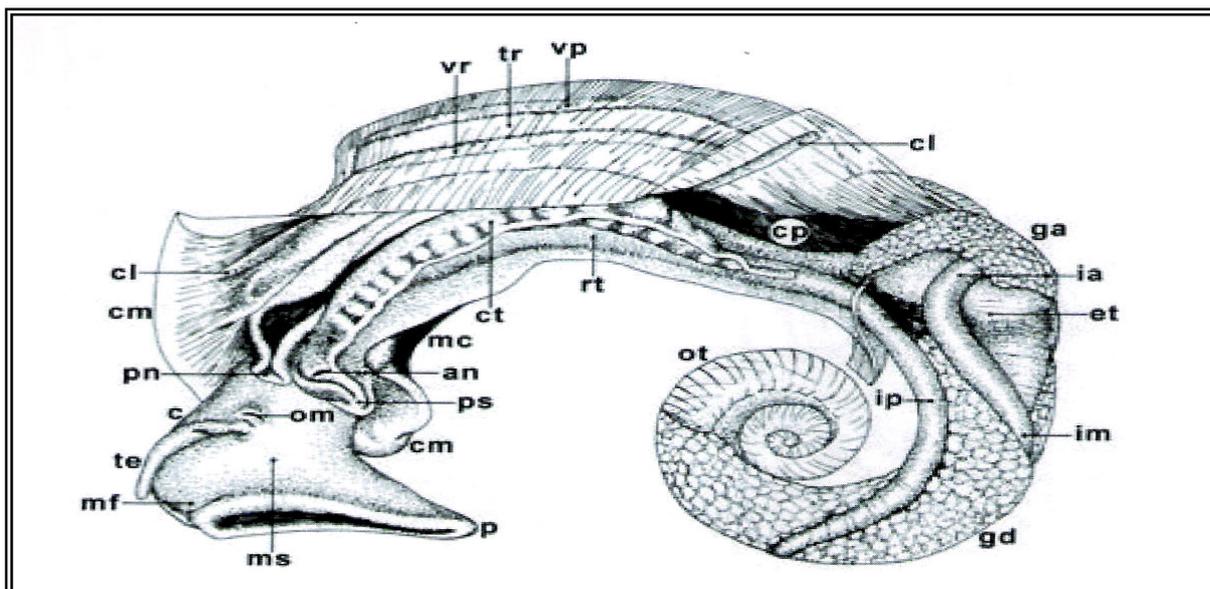


Figura 3. Morfologia de *Biomphalaria*: animal retirado da concha com o manto levemente rebatido, para a visualização dos órgãos internos. Massa cefalopodal (**ms**), cavidade pulmonar (**cp**), mufla (**mf**), tentáculo (**te**), colo (**c**), abertura genital masculina (**mc**), colar ou borda do manto (**cm**), pseudobrânquia (**ps**), pneumóstoma (**pn**), abertura anal (**an**), músculo columelar (**mc**), crista lateral (**cl**), crista retal (**ct**), veia renal (**vr**), veia pulmonar (**vp**), tubo renal (**tr**), reto (**rt**), glândula de albúmen (**ga**), intestino anterior (**ia**), intestino médio (**im**), intestino posterior (**ip**), estômago (**et**), glândula digestiva (**gd**), pé (**p**), ovotestis (**ot**). Fonte: Modificado de Paraense (1975).

Na circulação o sangue é bombeado pelo coração, contido no pericárdio, consta de uma aurícula, que recebe o sangue da veia pulmonar e de um ventrículo, que o impele através da aorta. Esta se divide em troncos arteriais, cujas ramificações levam o sangue para as vísceras, a cabeça e o pé. Ao retornar, o sangue acumula-se em três grandes espaços, os seios cefalopodal, visceral e sub-renal, de onde é forçado através da parede pulmonar para ser reoxigenado e encaminhado às veias renal e pulmonar, e desta última ao coração (PARAENSE, 1972).

No sistema excretor o rim é o principal órgão de excreção, que é constituído por uma porção sacular justaposta à esquerda do pericárdio e que se continua na direção cefálica pelo tubo renal situado entre as veias renal e pulmonar. A extremidade distal do tubo denomina-se ureter. As cavidades do pericárdio e do saco renal se comunicam pelo canal renopericárdico. Através desse canal o soro transudado pelas paredes do coração chega à cavidade do saco renal, a fim de ser filtrado. Depois da reabsorção das substâncias necessárias pelo epitélio do tubo renal, a urina é eliminada pelo ureter (PARAENSE, 1972).

O sistema digestivo compreende a massa bucal com as glândulas salivares, o esôfago, o estômago com a glândula digestiva e o intestino. A massa bucal é toda revestida pelo saco bucal, onde se encontra no interior a rádula. A rádula é exclusiva dos moluscos e está presente em todos os táxons exceto os bivalves, nos quais ela foi secundariamente perdida, presumivelmente por não apresentar função nesses animais, que se alimentam de materiais filtrados nas brânquias. A rádula foi adaptada para o uso numa variedade de hábitos alimentares e sua morfologia varia em conformidade com esses hábitos, sendo assim, sua constituição oferece padrões de organização utilizados na sistemática nos diferentes níveis taxonômicos (BARBOSA, 1995; RUPPERT et al., 2005) A rádula consiste em uma fita quitinosa, a superfície dorsal apresenta numerosas fileiras transversais de dentes

microscópicos. A rádula se desloca pela ação alternada dos músculos protradores e retratores. Esses movimentos fazem com que a rádula atue como um órgão raspador contra o substrato, retirando assim, o material alimentar. Já a glândula digestiva é o órgão preferencialmente colonizado pelas formas evolutivas dos esquistossomos e de outros trematódeos (Figura 4) (PARAENSE, 1972).

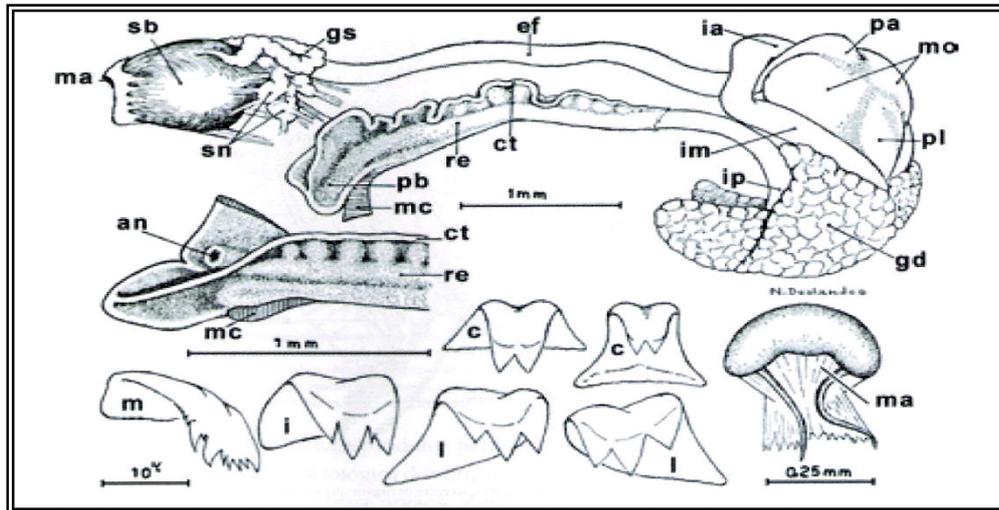


Figura 4. Morfologia interna de *Biomphalaria* sp. Sistema digestivo: mandíbula (**ma**); saco bucal (**sb**); dentes da rádula: central (**c**), marginal (**m**), intermediário (**i**) e lateral (**l**); glândula salivar (**gs**); esôfago (**ef**); estômago: papo (**pa**), moela (**mo**), piloro (**pl**); glândula digestiva (**gd**); intestino: anterior (**ia**), médio (**im**), e posterior (**ip**); reto (**re**); crista retal (**ct**); ânus (**an**). Sistema nervoso: anel periesofágico (**sn**). Sistema respiratório: pseudobrânquia (**ps**). Músculo columelar (**mc**). Fonte: Paraense (1975).

O sistema nervoso central é constituído, como na maioria dos pulmonados, por onze gânglios, sendo cinco em pares (buciais, cerebrais, pleurais, pedais e parietais) e um isolado (visceral). Cada gânglio (com exceção dos pleurais) envia nervos para determinadas partes do corpo: os gânglios bucais para a massa bucal, as glândulas salivares e o esôfago; os cerebrais para os olhos, tentáculos, lábios e estatocistos; os parietais para as partes do corpo e da cavidade pulmonar, e para o pneumóstoma e osfrádio; os viscerais para os órgãos genitais, digestivos e parte anterior do manto; e os pedais para a parede do corpo na região cefalopodal, o pé e o músculo columelar (PARAENSE, 1972).

No sistema genital os planorbídeos, assim como os pulmonados são hermafroditas. Quando criados em isolamento, os planorbídeos são capazes de se reproduzir por autofecundação através de muitas fecundações. Entretanto, as populações naturais dão preferência à fecundação cruzada (Figura 5) (PARAENSE, 1972).

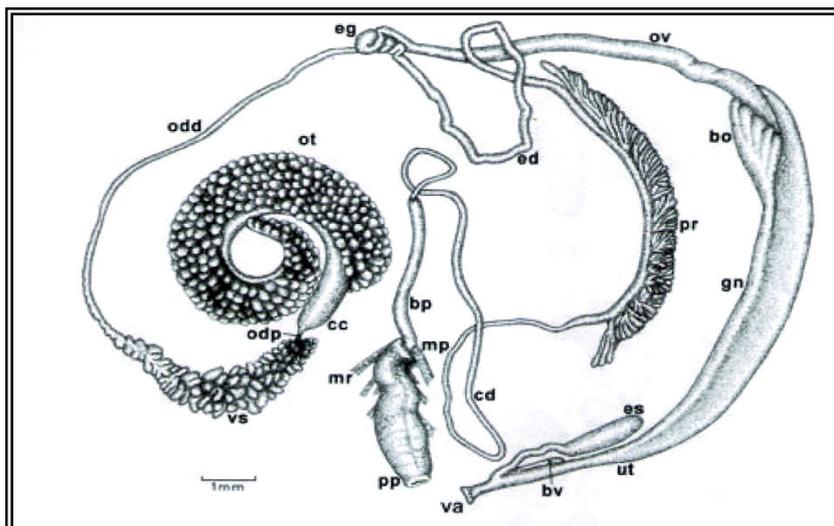


Figura 5. Sistema reprodutor dissecado de *Biomphalaria glabrata*: canal coletor do ovotestis (**cc**), encruzilhada genital (**eg**), ovispermiduto proximal (**odp**), ovispermiduto distal (**odd**), ovotestis (**ot**) e vesícula seminal (**vs**); estruturas masculinas: bainha do pênis (**bp**), canal deferente (**cd**), espermiduto (**ed**), músculos do complexo peniano [retrator (**mr**) e protrator (**mp**)], prepúcio (**pp**); estruturas femininas: bolsa do oviduto (**bo**), bolsa vaginal (**bv**), espermateca (**es**), glândula nidamental (**gn**), vagina (**va**) e útero (**ut**). Fonte: Modificado de Paraense (1975).

2.2 Distribuição geográfica de *Biomphalaria glabrata* no Brasil

Esta espécie é considerada a principal hospedeira do *S. mansoni*, por apresentar ampla distribuição geográfica, ocorrendo em quase em todo território nacional. Além disso, sua distribuição está quase sempre associada à distribuição da esquistossomíase mansônica. A distribuição geográfica apresenta-se da seguinte forma: Alagoas, Bahia, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, São Paulo e Sergipe como pode ser observado na Figura 6 (BARBOSA, 1995; BRASIL, 2007).

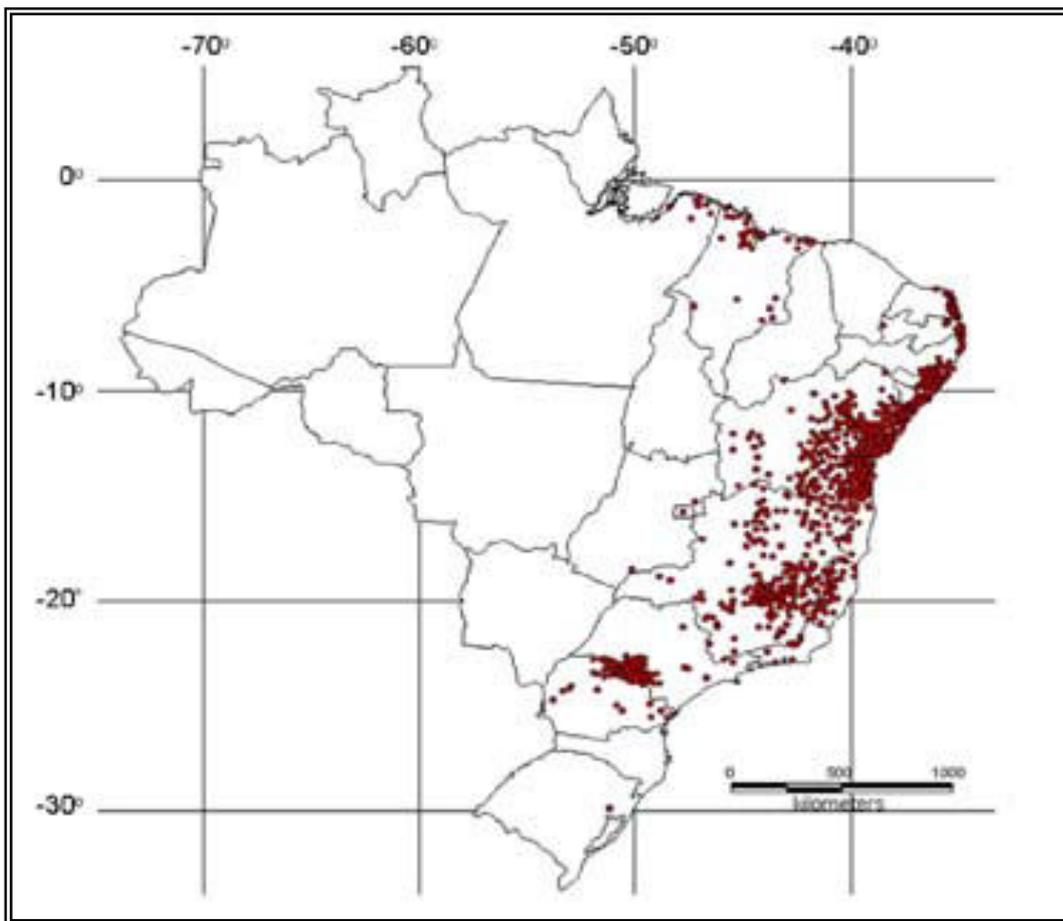


Figura 6. Registro da ocorrência de *Biomphalaria glabrata* no Brasil. Fonte: Carvalho & Caldeira (2004) *apud* (BRASIL, 2007).

2.3 Distribuição geográfica da esquistossomíase mansônica no Brasil

Geograficamente, a esquistossomíase mansônica continua expandindo-se em função de zonas agrícolas e de áreas de irrigação, sem a melhoria das condições de vida dos trabalhadores rurais (REY, 2008).

As áreas endêmicas estão compreendidas no norte do Maranhão e uma faixa que abrange as regiões orientais do Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco (Zonas do Litoral e Mata, do Agreste e do Brejo), grande parte dos Estados de Alagoas e Sergipe, bem como da Bahia e de Minas Gerais, e a Zona Serrana do Espírito Santo (REY, 2008).

De acordo com Rey (2008) as mais altas prevalências concentram-se, atualmente, em municípios dos Estados de Pernambuco, Alagoas e Sergipe. Focos isolados da doença já foram assinalados nos estados citados, fora das áreas de maior prevalência, bem como em outros estados, tais como: Pará, Maranhão, Ceará, Rio de Janeiro, São Paulo, Brasília, Paraná, Santa Catarina, e recentemente casos autóctones no Rio Grande do Sul (Figura 7).

Em vista da mobilidade das populações das zonas endêmicas, a presença de pacientes portadores desta parasitose é observada em quase todos os estados brasileiros, independente da existência de focos de transmissão. As migrações internas de portadores da esquistossomíase mansônica contribuem para a dispersão da doença e instalação de focos da parasitose, dependentes da existência de hospedeiros intermediários (REY, 2008).

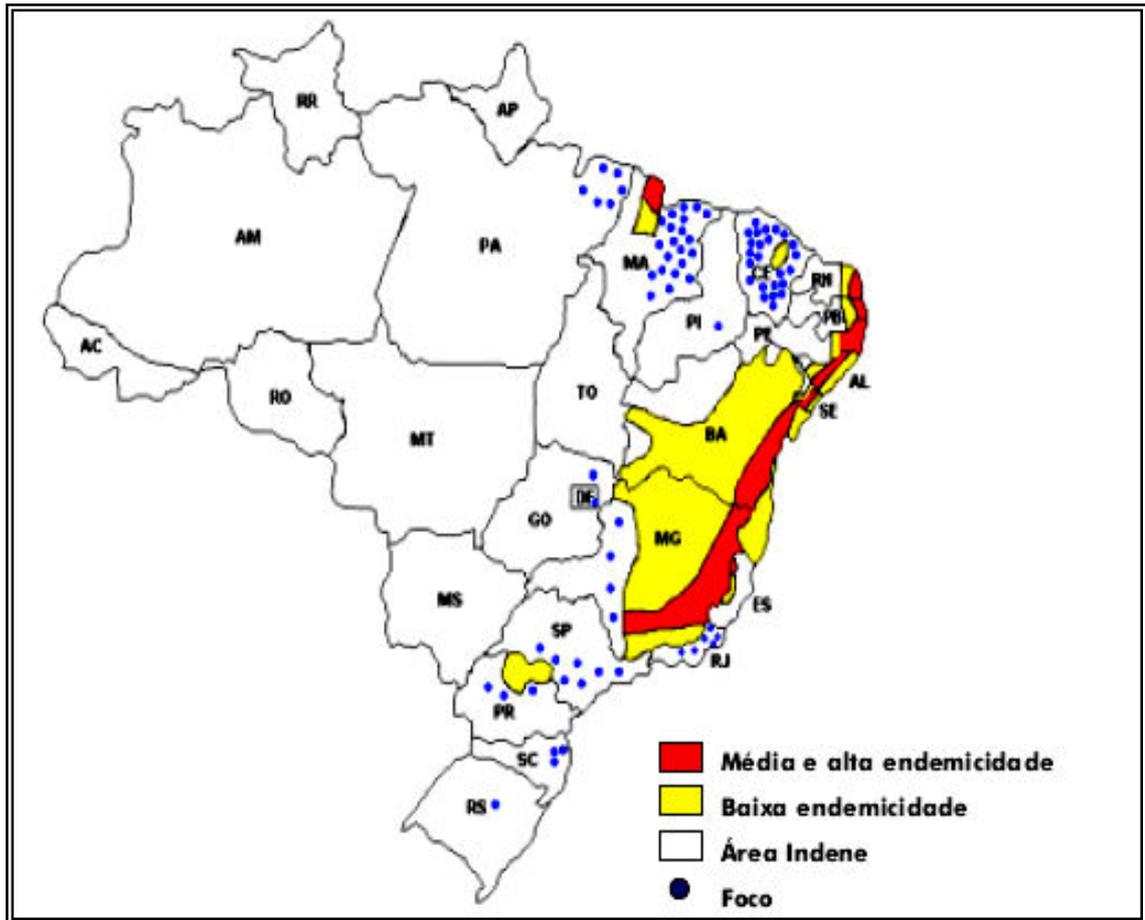


Figura 7. Distribuição da esquistossomíase mansônica no Brasil. Fonte: Brasil (2002).

2.4 Ciclo evolutivo do *Schistosoma mansoni*

Espécimes adultos de *S. mansoni* podem medir um pouco mais de 1 cm de comprimento (PRATA, 1987). O macho é mais robusto, possuindo um canal ginecóforo onde a fêmea fica alojada. Apresenta na extremidade anterior uma ventosa oral, e a pequena distância desta uma segunda ventosa, o acetábulo. A fêmea é delgada e maior que o macho, suas ventosas são pequenas, e muito próximas (Figura 8) (REY, 2008).



Figura 8. Casal de *Schistosoma mansoni*, vendo-se a fêmea alojada no canal ginecóforo do macho. Fonte: (Jornal de Uberaba -<http://www.jornaldeuberaba.com.br/?MENU=CademoB&SUBMENU=Saude&CODIGO=223>).

O ciclo de vida envolve as seguintes fases de desenvolvimento: miracídio, esporocisto mãe ou primário, esporocisto filho ou secundário, cercárias, esquistossômulo e verme adulto (Figura 9).

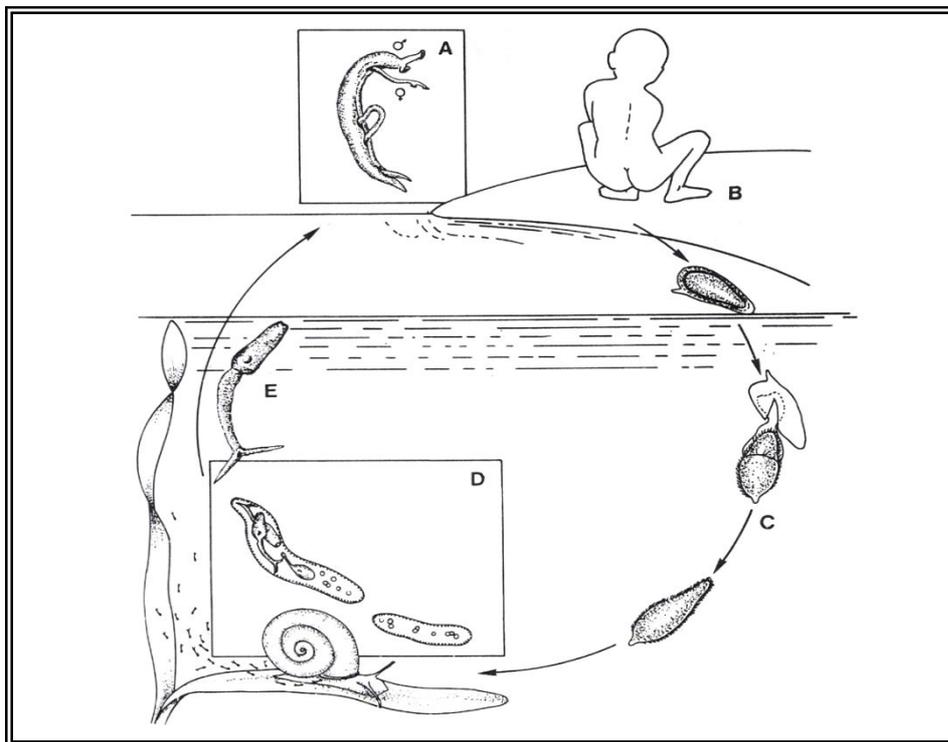


Figura 9. Ciclo evolutivo do *Schistosoma mansoni*: A. Vermes adultos acasalados, no interior das vênulas da parede intestinal. B. Ovos são eliminados com as fezes de pessoas infectadas. C. Miracídios eclodem na água e nadam à procura do molusco hospedeiro (*Biomphalaria* spp.). D. No interior deste, cada miracídio evolui para esporocisto primário, que produz os esporocistos filhos, os quais formam cercárias no seu interior. E. Cercárias saem do molusco e nadam em busca do hospedeiro vertebrado (homem), onde irão evoluir até o estágio de vermes adultos. Fonte: Adaptado de REY, 2008.

Os ovos de *S. mansoni* são eliminados com as fezes do homem ou de outros mamíferos, e chegam até uma coleção de água doce, onde devido às variações de temperatura, luminosidade, oxigenação, pH e osmolaridade os miracídios eclodem e nadam ativamente durante algum tempo até encontrarem moluscos do gênero *Biomphalaria* (REY, 2008).

Após o contato inicial, o miracídio perde seu envoltório ciliado e penetra na parte mole externa do molusco, transformando-se em esporocisto primário, que por poliembrionia, geram esporocistos secundários e depois larvas infectantes para os hospedeiros vertebrados: as cercárias (REY, 2008).

As cercárias que abandonam o hospedeiro invertebrado nadam quase sempre em direção à superfície. Ao entrar em contato com a pele do hospedeiro vertebrado, perdem a cauda e penetram ativamente. Após a penetração, as cercárias que conseguem sobreviver à ação do sistema imunológico, transformam-se em esquistossômulos e iniciam a migração através do sistema sanguíneo. Esses esquistossômulos chegam ao coração direito e aos pulmões, local onde podem ser retidos ou destruídos, de onde vão para o coração esquerdo e são enviados pela circulação geral a todas as partes do corpo, chegando ao fígado, por mecanismos, ainda, não totalmente conhecidos (REY, 2008).

No sistema porta-hepático, os esquistossômulos alimentam-se de sangue, desenvolvem-se e alcançam a maturidade (28 a 48 dias após a penetração). Nas veias mesentéricas inferiores se acasalam, iniciando a oviposição (REY, 2008).

Cada fêmea pode liberar até trezentos ovos por dia. Parte desses ovos cai na luz intestinal e 25 a 35% saem nas fezes. Os ovos que não conseguem alcançar a luz intestinal ficam retidos nos tecidos do fígado e paredes do intestino, dando origem a microgranulomas, que posteriormente poderão obstruir, total ou parcialmente, a passagem de sangue; e outra porção é distribuída para diferentes órgãos através da corrente sanguínea (REY, 2008).

Os vermes adultos podem viver de 20 a 25 anos no organismo humano não tratado. O ciclo tem duas fases: assexuada no molusco e sexuada no hospedeiro definitivo (BRASIL, 1998; REY, 2008).

Através do estudo do ciclo de vida deste trematódeo digenético, evidencia-se que a manutenção do ciclo em uma região depende basicamente de três fatores: presença de pessoas infectadas eliminando ovos, existência do hospedeiro intermediário e contato de pessoas com águas naturais, infestadas por cercárias. Desta forma, o combate à doença pode se realizar por meio do tratamento de indivíduos infectados; profilaxia da doença que pode ser realizada mediante destruição das cercárias e controle do molusco, hospedeiro intermediário, saneamento do meio com recursos básicos, como por exemplo, abastecimento de água tratada, instalações sanitárias, tratamento dos esgotos sanitários e também a educação sanitária a ser exercida por todos os membros da equipe de saúde (Figura 10) (PRATA, 1987; REY, 2008).

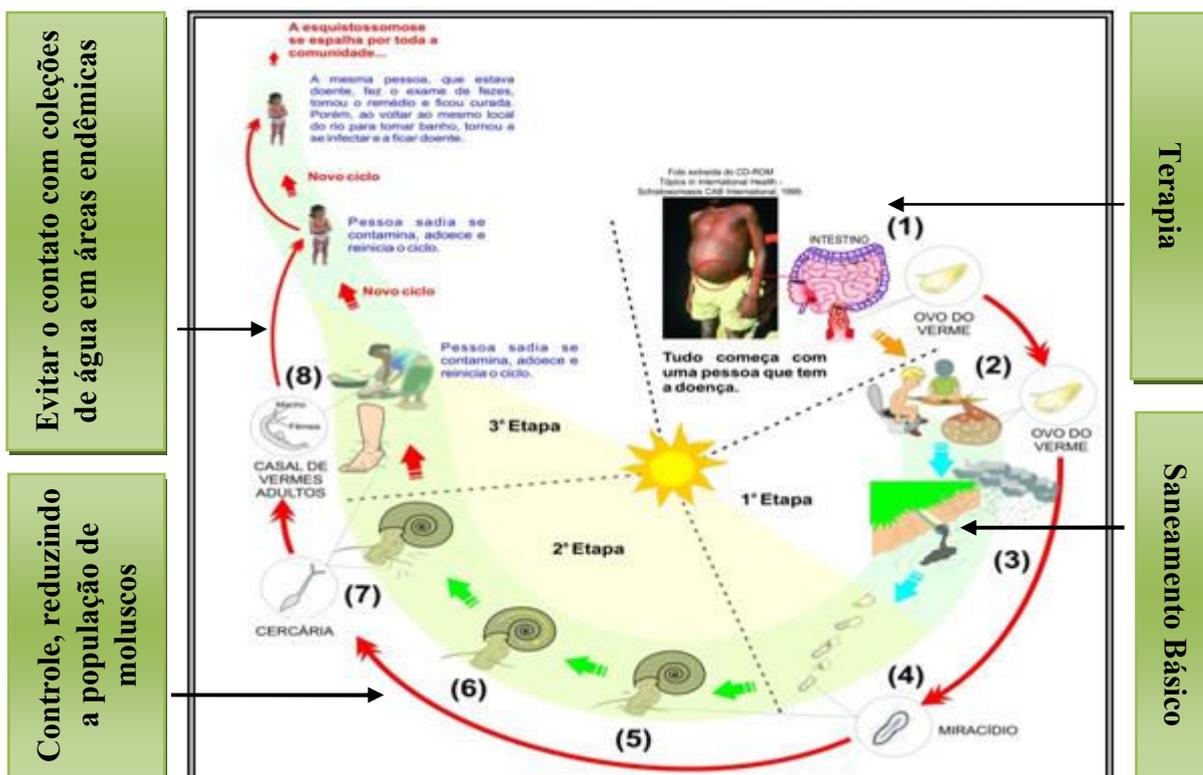


Figura 10. Formas de ação para o controle da esquistossomíase mansônica. (Fonte: Adaptado de Domínio Público - <http://www.dominiopublico.gov.br/download/imagem/ea000157.jpg>) Fundação Oswaldo Cruz, Desenhos de autoria de Rodolfo Cunha.

2.5 A importância da esquistossomíase mansônica na Medicina Veterinária

A esquistossomíase mansônica é uma zoonose, onde o homem é considerado o principal vertebrado para a manutenção do ciclo do *S. mansoni*, atuando como hospedeiro definitivo (NELSON, 1960).

Algumas zoonoses são classificadas como anfixenoses, isto é, tanto os animais como os humanos funcionam como hospedeiros do agente, com a função de manter a doença em regiões endêmicas (NELSON, 1960).

No continente africano, as espécies do gênero *Schistosoma*, que parasitam o homem, também circulam entre outras ordens de mamíferos: Artiodactyla, Perissodactyla, Primata, Insectivora e Rodentia (NELSON, 1960; PITCHFORD, 1977).

No Brasil, somente a espécie *S. mansoni* foi registrada em marsupiais (MARTINS et al., 1955), gados bovinos (BARBOSA et al., 1962) e roedores (AMORIM, 1953; BARBOSA et al., 1953; PIVA & BARROS, 1966; BARBOSA, 1972; DIAS et al., 1978), além do homem.

O primeiro registro de animais naturalmente infectados pelo *S. mansoni*, no Brasil, ocorreu no início da década de 50, onde o autor alertava que mamíferos poderiam ser reservatórios para a manutenção da helmintose, além da provável manutenção do ciclo, juntamente com o homem (AMORIM, 1953).

Os roedores mais frequentemente capturados com infecção natural por *S. mansoni*, em áreas de alta e média endemicidade, são as seguintes espécies: *H. brasiliensis*, *N. squamipes* e com menor frequência em *Oxymycterus* Waterhouse, 1837 (Figura 11).

As duas primeiras espécies apresentam hábitos semi-aquáticos e frequentam regularmente as coleções hídricas próximas do seu habitat natural (KAWAZOE & PINTO, 1983).

Holochilus brasiliensis apresenta um grande número de vermes adultos nos órgãos internos, bem como a eliminação de ovos viáveis através das fezes. Dessa forma, contribui para a manutenção do ciclo de *S. mansoni* em áreas endêmicas (KAWAZOE & PINTO, 1983).



Figura 11. Reservatórios de *Schistosoma mansoni*. A. *Holochilus brasiliensis*; B. *Nectomys squamipes* e C. *Oxymycterus* sp. Fontes: Blogspot - http://4.bp.blogspot.com/_WrdzfKHDxmQ/SJE6tkICJI/AAAAAAAAABzw/mp1zOfj7hhw/s400/rato+de+junco.jpg; http://3.bp.blogspot.com/_WrdzfKHDxmQ/SJE642S6MI/AAAAAAAAABz4/DaDCHaFSDDE/s400/rato+dagua.jpg; e Animal Picture <http://www.animalpicturesarchive.com/WebImg/073/1208856833-t.jpg>, respectivamente.

A liberação de cercárias, pelos moluscos infectados pelo *S. mansoni* é baseada em aspectos cronobiológicos. Sendo assim, há um sincronismo entre as atividades realizadas pelos hospedeiros definitivos com a liberação cercariana. Para a infecção humana, as cercárias apresentam uma liberação precoce e intermediária, porém, quando a infecção é em roedores, a liberação é tardia ou crepuscular (THÉRON, 1984; THÉRON & POINTER, 1995).

Isso ocorre, pois com o passar do tempo, sua atividade natatória tende a diminuir, pois as reservas energéticas vão se esgotando, tornando-as menos ativas, levando a sedimentação, além de diminuir sua capacidade de penetrar nos hospedeiros definitivos (REY, 2008).

No Brasil, alguns focos de esquistossomíase são mantidos por seres humanos, animais ou por ambos. A persistência do foco, juntamente com o potencial de exposição ao parasito demonstram a necessidade de que novas estratégias de controle devam ser consideradas (MODENA et al., 2008).

A primeira descrição de bovinos naturalmente infectados com *S. mansoni* foi feita por Barbosa et al. (1962), que encontraram quatro helmintos no mesentério. Em seguida, Piva & Barros (1966) observaram ovos de *S. mansoni* no fígado de três bovinos adultos. A prevalência de 3,0% foi detectada em uma fiscalização epidemiológica realizada por Coelho et al. (1982), no Estado de Minas Gerais, região sudeste do Brasil.

Coelho et al. (1982) também verificaram uma surpreendente susceptibilidade de bezerros experimentalmente infectados com cercárias de *S. mansoni*. Contudo, em certas condições, a espécie bovina poderia atuar permanentemente em um foco endêmico, pois em uma das fazendas estudadas, quatro dos oito bezerros analisados eliminaram ovos viáveis nas fezes.

Karoum & Amin (1985) avaliaram a infecção natural em bovinos, caprinos, ovinos e caninos em uma área endêmica no Sudão. De um total de 98 bovinos examinados através de inspeção visceral, apenas dois bezerros apresentavam helmintos no mesentério, incluindo fêmeas adultas de *S. mansoni* com ovos.

Modena et al. (1991) realizaram raspado de mucosa retal em 894 bezerros de áreas endêmicas de Minas Gerais, e verificaram ovos viáveis em nove animais. Todos os animais positivos pertenciam às pequenas propriedades que faziam parte de uma economia de subsistência.

De acordo com Modena et al. (1991) as condições bioecológicas para a transmissão da esquistossomíase mansônica foram encontradas em todas as propriedades analisadas. Realizou-se um levantamento malacológico da área, onde foram encontrados espécimes de *B. glabrata* positivos para cercárias de *S. mansoni*. A amostragem feita na população humana apresentou resultado positivo para ovos de *S. mansoni* nas fezes.

Nos estudos de Coelho et al. (1982) e Karoum & Amin (1985), a conclusão de que apenas os animais jovens foram infectados pode ser devido as condições apresentadas na economia de subsistência, onde há é uma estreita e frequente utilização da água partilhada pela população humana com animais.

Uma análise da infecção natural em hospedeiros não-humanos mostra que o padrão de infecção do roedor difere fundamentalmente dos bovinos. Devido ao tamanho dos bovinos, apenas um indivíduo é capaz de eliminar uma quantidade de fezes superior a cem roedores, diariamente, assim, no ambiente a contaminação é significativa. Além disso, o gado pode disseminar o parasito durante a reprodução e circulação diária (Modena et al., 1993).

Outros animais domésticos foram anteriormente avaliados como hospedeiros definitivos, através de modelos experimentais de infecção.

Coelho et al. (1989) utilizaram infecção experimental de *Bubalus bubalis* (Linnaeus, 1758) e concluíram que búfalo é refratário à infecção por *S. mansoni*.

Ocampo et al. (1981) demonstraram que suínos, *Sus scrofa* (Linnaeus, 1758), eram naturalmente resistentes à infecção experimental.

A transmissão de *S. mansoni* em condições experimentais utilizando um bovino e *B. glabrata*, foi realizado por Modena et al. (1993). Este estudo produziu evidências de que a espécie bovina pode agir como um potencial hospedeiro na manutenção e disseminação do parasito, independentemente da população humana.

Da mesma forma, utilizando roedores silvestres infectados com *S. mansoni* e *B. glabrata* em condições naturais, também foi possível completar o ciclo de vida do parasito utilizando *N. squamipes* e *H. brasiliensis* (ANTUNES et al., 1973; CARVALHO et al., 1976). No entanto, os roedores silvestres, em função do tamanho reduzido, território limitado e baixa expectativa de vida (no máximo de 2 anos) apresentam limitações como um reservatório para a eficiente manutenção da doença em áreas endêmicas. Além disso, em todas as áreas onde se encontrou os roedores silvestres, infectados por *S. mansoni* era possível identificar uma fonte de poluição fecal humana.

Considerando a expansão agrícola em novas áreas no Brasil, existe uma necessidade urgente de fazer estudos detalhados sobre o papel da população bovina na manutenção da doença.

Especula-se que as novas formas de organização do espaço agrário, como o trânsito intenso e com maior confinamento, possa introduzir o gado como um fator importante na transmissão da esquistossomíase mansônica em áreas endêmicas. Esta forma de organização agrária pode criar depois de certo tempo, condições para o surgimento de novos hospedeiros definitivos (MODENA et al., 2008).

O surgimento de novos hospedeiros definitivos da esquistossomíase mansônica está baseado no processo de co-evolução parasito-hospedeiro, que requer mudanças de infectividade do parasito e da susceptibilidade do hospedeiro (KOSKELLA & LIVELY, 2007). No entanto, Poulin (2007), um questionador das leis da ecologia do parasitismo, afirma que essas leis são verdadeiras apenas em circunstâncias especiais, sendo reflexões teóricas e

empíricas, o que anteriormente, foi distinguido por Keeling et al. (2000), Kristt et al. (2000), Mahmoud (2004), Osnas & Lively (2004), Ovaskainen & Cornell (2006).

Em conclusão, considerando o grau de expansão da esquistossomíase mansônica em áreas rurais, há uma urgente necessidade de aumentar os estudos do papel dos bovinos no modelo epidemiológico desta doença (MODENA et al., 2008).

2.6 Estratégias de controle da esquistossomíase mansônica

Até a década de 70, a principal medida de combate da esquistossomíase mansônica era a redução das populações de moluscos hospedeiros intermediários. Na década de 80, o principal objetivo, passou a ser o controle da morbidade, através dos tratamentos quimioterápicos, como as drogas quimioterápicas mais eficazes e baratas (Tabela 1). Atualmente, o objetivo é conjugar o controle quimioterápico com medidas preventivas de saneamento básico e educação em saúde (BRASIL, 2007).

O controle de moluscos é recomendado, somente quando há um surto de casos agudos ou quando altas prevalências persistem mesmo com o tratamento da população (BRASIL, 2007).

Tabela 1. Evolução das estratégias de controle da esquistossomíase mansônica desde os anos 50. Os sombreados escuros e claros representam, respectivamente, alta e baixa prioridade. (BRASIL, 2007).

Estratégias de controle da esquistossomose		Décadas					
		50	60	70	80	90	00
Objetivo	Transmissão						
	Morbidade						
Controle de moluscos	Químico						
	Biológico						
	Físico						
Controle quimioterápico							
Outras medidas de controle	Educação						
	Saneamento						

2.6.1. Métodos de controle

Os métodos para o controle de moluscos podem ser classificados em três modalidades: biológicos, físicos e químicos. O biológico envolve a introdução de organismos antagonistas, com ação predadora, competidora, parasitária ou patogênica sobre os moluscos hospedeiros. O físico consiste em impedir o desenvolvimento e a manutenção das populações de moluscos, como alterações nos criadouros, com a retirada da vegetação, remoção de detritos, drenagem e

aterro, etc. O químico consiste na aplicação de produtos tóxicos (moluscidas) nos criadouros, visando reduzir drástica e rapidamente as populações dos moluscos (BRASIL, 2007; FAVRE et al., 2007).

2.6.1.1 Métodos biológicos

Este método de controle tem sido realizado desde a década de 50, principalmente em caráter experimental. Espécies de animais têm sido utilizadas como “competidoras” das populações de moluscos, como por exemplo, *Melanoides tuberculatus* (Müller, 1774), espécie exótica, que demonstrou em algumas localidades efetiva redução e/ou eliminação das populações de *Biomphalaria* (ABÍLIO, 1997, 2002; BRASIL, 2007). No entanto, esta espécie apresenta capacidade de se espalhar com rapidez e colonizar novos habitats, constituindo, provavelmente, uma ameaça à fauna nativa (THIENGO et al., 2007).

Este método apresenta algumas desvantagens: o perigo da introdução de espécies exóticas, que podem reduzir e/ou eliminar a biodiversidade nativa, algumas espécies que atuam como hospedeiros intermediários de outras espécies de trematódeos e de nematóides (BRASIL, 2007); a presença de vegetação aquática favorecendo a população de moluscos, inclusive de planorbídeos e redução da ação competidora com outros gastrópodes (THOMAS, 1995).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, nenhuma espécie, até o momento, apresentou eficácia comprovada no controle de moluscos e que tenha sido utilizada em campanhas de controle. No entanto, deve-se incentivar a busca por elementos naturais que possam promover o controle biológico, desde que seja sem agressões drásticas ao ambiente e também ser promovido por pesquisadores especializados, uma vez que a introdução de espécies exóticas pode ser nociva ao equilíbrio ambiental (OMS, 1994).

2.6.1.2 Métodos físicos

O saneamento hídrico e o manejo ambiental para o controle dos moluscos são considerados métodos de controle físico. Apresentam como objetivo, a eliminação de criadouros pelo aterramento de coleções hídricas, sempre que a medida for recomendada. A drenagem e a retificação de leitos, o revestimento e a canalização dos cursos d’água também, podem ser úteis (BRASIL, 2007).

Os métodos físicos representavam a única alternativa de controle na década de 50, quando não se dispunha de drogas eficazes e seguras no tratamento da população parasitada e quando os moluscidas eram pouco seletivos e apresentavam ação limitada (BRASIL, 2007).

Este tipo de método apresenta algumas desvantagens: promover alterações drásticas no ambiente; englobar projetos de infra-estrutura de alto custo financeiro; pode produzir e/ou acelerar o processo de eutrofização, através da dragagem do sedimento (BRASIL, 2007).

2.6.1.3 Métodos químicos

Os moluscidas são substâncias empregadas para matar os moluscos. Para que um produto seja usado como moluscida, este precisa reunir propriedades indispensáveis, como: ser eficaz contra os moluscos, mesmo em baixas concentrações; ser de baixo custo; não ser tóxico ao homem, aos animais ou às plantas; não produzir ter efeitos acumulativos nos tecidos do homem e dos animais aquáticos e ser de fácil manipulação (BRASIL, 2007).

Deve-se criar um plano para a aplicação do moluscicida, ou seja, após a realização do inquérito malacológico e selecionados os criadouros que devem ser tratados (BRASIL, 2007).

Duncan (1974) em sua revisão bibliográfica menciona em meados da década de 10, alguns autores que realizaram os primeiros experimentos utilizando compostos químicos com fins moluscicida, dentre os quais se destacam o sulfato de cobre, óxido de cálcio, cal clorada, fosfato de cálcio e sulfato de amônio.

O modo de ação de alguns desses compostos químicos, tais como: sulfato de cobre, pentaclorofenato de sódio, organoestânicos e niclosamida foram destacados por Duncan (1987) em sua revisão.

A utilização de sulfato de cobre em altas doses demonstrou a retração total da massa cefalopodal do molusco para o interior da concha denotando envenenamento (NOLAN et al., 1953). Já a administração deste mesmo composto em doses mais baixas revelou a síndrome do “distress” que apresenta extensão da massa cefalopodal, os tentáculos tornam-se inchados na base e redução dos batimentos cardíacos (HARRY et al., 1957).

Autores como Cheng & Sullivan (1973a, 1974) estudaram o efeito de 26 complexos de cobre, sobre a frequência cardíaca e a taxa de respiração de *B. glabrata* demonstrando a redução das mesmas, sendo, portanto, uma técnica que poderia ser utilizada em bioensaios moluscicidas.

Já o pentaclorofenato de sódio quando presente em baixas concentrações é um desacoplador da fosforilação oxidativa nos tecidos do molusco, mas a inibição da via glicolítica pode ocorrer em concentrações mais elevadas (WEINBACH, 1954; WEINBACH & NOLAN, 1956).

Os compostos organoestânicos tais como - Tributilestanho (TBT) ou Trifenilestanho (TPhT) apresentam como efeitos do uso ação biocida e atuam sobre fungos, bactérias, helmintos, insetos, moluscos e organismos marinhos originando mutações e condenando espécies à extinção (KERK, 1954, 1962). E também, apresenta efeitos acumulativos e degenerativos nos mamíferos (DUNCAN, 1987).

A niclosamida é o único produto que permanece disponível comercialmente, conhecida como Bayluscide e é aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (CAS n.º 50-65-7) para uso em programas de controle (BRASIL, 2007).

Embora a niclosamida seja o mais potente moluscicida utilizado no mundo, a sua ação biocida, seu alto custo tornam necessário o investimento em novas pesquisas, em busca de alternativas mais bem sucedidas de controle malacológico (BRASIL, 2007).

Existe uma tendência de se pesquisar plantas na busca de substâncias ativas para o desenvolvimento de produtos alternativos, já que há uma necessidade de se encontrar moluscicidas mais eficientes e ecologicamente aceitáveis (BRASIL, 2007).

A primeira tentativa de controle da esquistossomíase mansônica pelo uso de moluscicidas de origem vegetal foi realizada em 1930 quando Archibald (1933) e Wagner (1936) plantaram a palma do deserto *Balanites aegyptiaca* (Abdel-Rahim, 1986) e *B. maughamii* (Aitzetmuller, 1995), ao longo do curso das águas do Sudão e sudeste da África, respectivamente. Testes no campo e em laboratório realizados por esses cientistas indicaram que o fruto dessas plantas derrubado na água inibia o aumento da densidade populacional dos moluscos (KLOOS & MCCULLOUGH, 1982).

Desde então, mais de 1100 espécies de plantas foram testadas e muitas apresentaram atividade moluscicida. Planta de várias famílias com diferentes classes de compostos vêm sendo testadas e os resultados são bastante promissores (MARSTON & HOSTETTMANN, 1991; SPARG et al., 2000).

No Brasil, os primeiros estudos utilizando plantas demonstraram atividade moluscicida dos extratos aquosos do caule do gênero *Serjania* Schumach. conhecida popularmente como cipó-timbó, e também dos frutos de *Sapindus saponaria* L. conhecida

como saboneteira, sendo ambas as espécies da família Sapindaceae, em *B. glabrata*, sendo estes resultados atribuídos às saponinas presentes nestas espécies vegetais (PINTO & ALMEIDA, 1944).

Em seguida, destacam-se os trabalhos de Amorin & Pessoa (1962), que revelaram satisfatórios efeitos moluscicidas em *Paullinia pinnata* L. e *Stenolobium velutinum* Benth., plantas da flora alagoana. Barbosa & Mello (1969) estudaram *Magonia pubescens* St. Hill. planta do nordeste brasileiro. Já Sousa et al. (1970), Sousa & Rouquayrol (1974), Silva et al. (1971), revelaram que *Pithecelobium multiflorum* Benth. apresentava atividade moluscicida dentre as espécies vegetais testadas.

No trabalho de Mendes et al. (1984) foram estudadas em laboratório 23 espécies de plantas brasileiras, através de extratos etanólico e hexânico. Dentre as espécies vegetais testadas apresentaram atividade moluscicida na concentração de 100ppm sobre *B. glabrata*: *Euphorbia pulcherrima* Willd., *Euphorbia splendens* Bojer, *Caesalpinia peltophoroides* Benth. e *Stryphnodendron barbatiman* M.

A espécie *Euphorbia splendens* var *hislopii* N.E.B. (= *Euphorbia milii* Des Moul. var. *splendens* (Hook.) Ursch & Leandri) (CARTER, 1994).é conhecida popularmente como coroa-de-cristo sendo considerado seu látex bruto o mais promissor dentre os moluscicidas. Quando testada em moluscos hospedeiros do *S. mansoni* e *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) apresentou resultados interessantes na determinação das concentrações letais, que se apresentaram em baixas concentrações, sob condições laboratoriais (VASCONCELLOS & SCHALL, 1986; VASCONCELLOS & AMORIM, 2003a). Já em situações de campo, a concentração letal utilizada foi um pouco maior, por exemplo, em laboratório a maior CL₉₀ encontrada para *Lymnaea columella* (Say, 1817) foi de 1,51 mg/l, já para o teste de campo utilizou-se a concentração de 5 mg/l (VASCONCELLOS & AMORIN, 2003b).

O gênero *Solanum* L. apresenta grande propagação de espécies no Brasil. Vários estudos utilizando diversos membros deste gênero demonstraram atividade moluscicida considerável (HOSTETTMAN et al., 1982; MARSTON & HOSTETTMAN, 1985; SILVA et al., 2005; SILVA et al., 2006).

2.7 Família Solanaceae: *Solanum lycocarpum*

2.7.1 Classificação botânica

A espécie vegetal *S. lycocarpum* pertence ao gênero *Solanum* e à família Solanaceae, sendo esta família incluída na subclasse Asteridae, ordem Solanales (CRONQUIST, 1981; JUDD et al., 1999) e compreende cerca de 3.000 espécies distribuídas em 150 gêneros possuindo distribuição cosmopolita. No Brasil, ocorrem em 32 gêneros e 350 espécies (SOUZA & LORENZI, 2005).

Esta família apresenta inúmeras contribuições medicinais, dentre as diversas famílias botânicas que apresentam atividades medicinais comprovadas (AGRA, 1999).

Solanum lycocarpum é conhecida popularmente como lobeira ou fruta-do-lobo, devido a grande apreciação deste fruto pelo lobo-guará do cerrado, *Chrysocyon brachyurus*, (Illiger, 1815), representando até 50,0% de sua dieta (CAMPOS, 1994; LOMBARDI & MOTTA Jr., 1993; LORENZI & MATOS, 2008). Também é conhecida como: capoeira-branca, berinjelado-mato, jurubebão, baba-de-boi, loba e jurubeba-de-boi (LORENZI & MATOS, 2008).

Apresenta-se como arbusto grande ou pequena árvore espinhenta, semidecídua de 3-5 m de altura, copa arredondada e aberta, com ramos frágeis. As folhas são simples, alternadas, apresentando margem lobada. Já os troncos são tortuosos e cilíndricos. Os frutos são

globosos, verdes e lisos, contendo polpa carnosa com muitas sementes (LORENZI, 2002; LORENZI & MATOS, 2008).

2.7.2 Distribuição geográfica

Distribui-se em todo Brasil tropical e subtropical, com predominância nos cerrados e campos cerrados do Brasil central (LORENZI, 2002). O período de florada compreende o ano inteiro, porém com intensidade na estação chuvosa (OLIVEIRA FILHO & OLIVEIRA, 1988).

2.7.3 Uso medicinal

Os frutos de *S. lycocarpum* são utilizados pelas populações rurais para o preparo de doces e geléias (SILVA et al., 1994; LORENZI & MATOS, 2008).

A literatura etnofarmacológica revela o emprego do fruto como diurético, calmante, antiespasmático, antiofídico e antiepilético (CARIBÉ & CAMPOS, 1991). Dos frutos, também, produz-se um polvilho, ao qual é atribuída propriedade hipoglicemiante, essa eficácia tem sido comprovada através de relatos de casos com seres humanos (DALL'AGNOL & VON-POSER, 2000; GRASSELLI et al., 2001). Acredita-se que o fruto da lobeira apresenta ação terapêutica contra vermes-dos-rins, *Diocetophyma renale* (Goeze, 1782) um nematóide, que é muito frequente e na maioria das vezes fatal no lobo-guará (LORENZI & MATOS, 2008).

O chá das folhas em decocção é indicado contra afecções das vias urinárias, cólicas abdominais e renais, espasmos e epilepsia (CARIBÉ & CAMPOS, 1991).

O estudo de extratos aquosos preparados com o pó obtido de seus frutos, em ratos sugeriu um efeito tóxico sobre o sistema reprodutivo masculino, contudo sem indicação aparente sobre a fertilidade (SA et al., 2000).

2.7.4 Propriedades químicas

Frutos maduros de *Solanum* frequentemente contêm alcalóides que possuem inúmeras atividades biológicas como: inibição da germinação, efeito laxante em animais, constipação intestinal em pássaros, entre outras (CIPPOLINI, 2000). Estudos demonstram que na composição química dos frutos de *S. lycocarpum* há compostos de solamargina e solasonina (MOTIDOME et al., 1970). Já nas folhas a análise fitoquímica identificou a presença de fenóis, alcalóides e flavonóides (OLIVEIRA, 2003).

Os glicoalcalóides de *Solanum* são indiscutivelmente um dos grupos de substâncias mais pesquisados quanto as suas propriedades biológicas. Este gênero é conhecido por produzir efeito alelopático devido aos glicoalcalóides espirosolano tais como solamargina e solasodina que suprimem o crescimento de outras plantas (ALVES et al., 2003).

2.8 Efeitos moluscidas sobre o metabolismo de carboidratos e produtos nitrogenados de *Biomphalaria glabrata*

O glicogênio e galactogênio são os polissacarídeos de reserva de maior importância. O glicogênio é encontrado em células especiais na região anterior do manto, e entre os ácinos da

glândula digestiva (CHIANG, 1997). Em muitos gastrópodes, ocorre também, em tecido muscular, como a massa cefalopodal (LIVINGSTONE & ZWAAN, 1983; PINHEIRO & AMATO, 1994). O galactogênio está presente, somente, na glândula de albúmen, dos moluscos pulmonados, sendo a principal fonte de energia da reprodução, como por exemplo, o desenvolvimento dos ovos (LIVINGSTONE & ZWAAN, 1983).

O glicogênio pode ser degradado em glicose, dependendo das condições fisiológicas do molusco, para suprir suas necessidades energéticas (BECKER, 1980; PINHEIRO & AMATO, 1994).

Os mecanismos de regulação da glicemia são precisos e complexos. A formação de glicose a partir de precursores não carboidratos é chamada de neoglicogênese, nos animais os precursores importantes são: o lactato, o piruvato, o glicerol, a maioria dos aminoácidos, e os intermediários do ciclo de Krebs. Essa via determina o aumento dos níveis glicêmicos, sendo suas vias de regulação diferentes de organismo para organismo (LEHNINGER et al., 1985).

As concentrações de glicose na hemolinfa dos moluscos variam, dependendo da disponibilidade de alimento, das mudanças de temperatura e sazonalidade. Moluscos pulmonados apresentam os menores níveis de carboidratos durante o inverno e os maiores níveis durante o verão e o outono (LIVINGSTONE & ZWAAN, 1983).

Durante o verão, a sobrevivência dos moluscos envolve mecanismos de resistência a dessecação, tais como a anidrobiose. Mecanismo em que o molusco se retrai na concha, quando há ressecamento de seu habitat, reduzindo seu metabolismo (BARBOSA & OLIVIER, 1958). Além desse mecanismo, contra a dessecação, *B. glabrata* pode exibir o mecanismo de diapausa. O molusco apresentará a formação de lamelas na abertura da concha, entrando em estado de dormência, antes do habitat secar. Sendo assim, os moluscos anidrobiontes são menos resistentes que os moluscos em diapausa (PIERI & THOMAS, 1992; DANNEMANN & PIERI, 1993).

Dessa forma, na estivação o metabolismo de carboidratos pode ser parcialmente ou totalmente anaeróbio. A estivação, também, é caracterizada pela queda de consumo de oxigênio (LIVINGSTONE & ZWAAN, 1983).

Durante o jejum a taxa metabólica é reduzida, porém as taxas são bem maiores do que dos moluscos em estivação (LIVINGSTONE & ZWAAN, 1983).

A infecção por estágios larvais de trematódeos pode interferir no metabolismo do molusco, hospedeiro intermediário, determinando um crescimento exagerado (gigantismo) e uma diminuição ou total perda da capacidade reprodutiva (castração parasitária). Entretanto, o gigantismo deve ser considerado como um indicativo, mas de modo algum uma consequência da castração; além de alterar o metabolismo de carboidratos (MEULEMAN, 1971; VAN ELK & JOOSSE, 1981; MOHAMED & ISHAK, 1981). A diminuição dos níveis de carboidratos dos tecidos e/ou na concentração de glicose na hemolinfa, como resultado de infecção tem sido observada em *B. alexandrina* (MOHAMED & ISHAK, 1981) e *B. glabrata* (CHENG & LEE, 1971; CHRISTIE et al., 1974; STANISLAWSKI & BECKER, 1979).

Sendo assim, os moluscos quando são submetidos a condições de estresse, tais como: parasitismo por larvas de trematódeos e inanição utilizam substratos alternativos para manterem seus processos metabólicos vitais, além dos polissacarídeos, glicogênio e galactogênio (JOOSSE & VAN ELK, 1986), gerando alterações no conteúdo de proteínas e de aminoácidos livres, acarretando elevação dos conteúdos de produtos nitrogenados: uréia, ácido úrico e amônia (BECKER, 1980).

Torna-se importante o estudo das alterações metabólicas dos moluscos submetidos aos extratos vegetais, pois há a possibilidade de identificar o mecanismo de ação dos mesmos, desenvolvendo, assim produtos mais específicos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Manutenção de *Biomphalaria glabrata* em laboratório

3.1.1 Procedência do molusco

Espécimes de *B. glabrata* linhagem BH (Belo Horizonte – Minas Gerais) obtidos junto ao Departamento de Malacologia da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) foram utilizados para dar início à colônia no laboratório de Biologia e Ecologia de Helmintos, os descendentes (pool de gerações) desses exemplares foram utilizados nos bioensaios.

3.1.2 Água

É recomendável que a água fornecida pelas distribuidoras de abastecimento, fique acondicionada em recipientes durante alguns dias. Isto, antes de ser utilizada nos aquários (BRASIL, 2007). Sendo assim, a água da torneira permanecia por um período de 72 h em barrilhete de plástico antes de ser utilizada nos aquários.

Os aquários eram limpos toda semana em decorrência do excesso de excremento na água, ausência de substrato, alta turbidez, dependendo da magnitude destes fatores a troca de água ocorria total ou parcialmente. Quando a troca era total, aquários e moluscos eram lavados com solução de ácido acético 0,05% v/v e posteriormente com água corrente, para prevenir a colonização por protozoários.

3.1.3 Substrato

O complemento alimentar constitui-se em fonte de ferro e cálcio para hemolinfa e concha, respectivamente. Sendo composto de uma mistura de (10 partes) de argila peneirada enriquecida com (2 partes) de farinha de ostra e (1,5 parte) de carbonato de cálcio (BRASIL, 2007).

O complemento era fornecido a cada troca de água, total ou parcialmente, com uma colher rasa de sobremesa.

3.1.4 Alimentação

Os moluscos foram alimentados *ad libitum*, três vezes por semana, com alface (*Lactuca sativa* L.) *in natura*, previamente lavada em solução de ácido acético 0,05% v/v.

3.1.5 Montagem dos aquários

Os moluscos foram mantidos em aquários de vidro, que facilitava a limpeza e a visualização de seu interior, com água desclorada em temperatura ambiente. Pedacos de isopor foram utilizados como substrato de oviposição. Os aquários foram tampados com tecido (Voil), com elástico, o que garantia uma boa aeração, evitava a fuga dos moluscos e a exposição aos insetos (Figura 12).

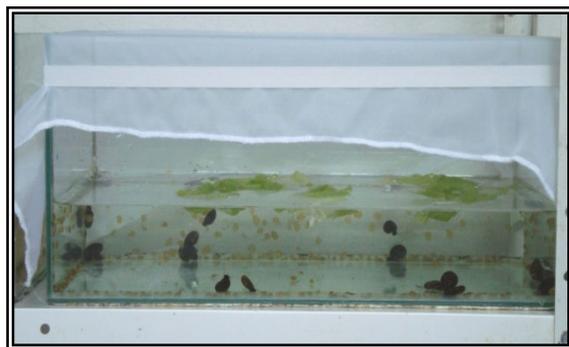


Figura 12. Aquário mostrando os moluscos no seu interior.

3.2 Material Botânico

Folhas de *S. lycocarpum* (Figura 13) foram coletadas na Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG, o que foi possível através do Acordo de Cooperação Técnico-Científico entre a UFRRJ-IBAMA, MG; e no Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ e as exsicatas foram depositadas no Herbário do Departamento de Botânica da UFRRJ, Seropédica, RJ, sob os números: RBR28010 e RBR14071, respectivamente.

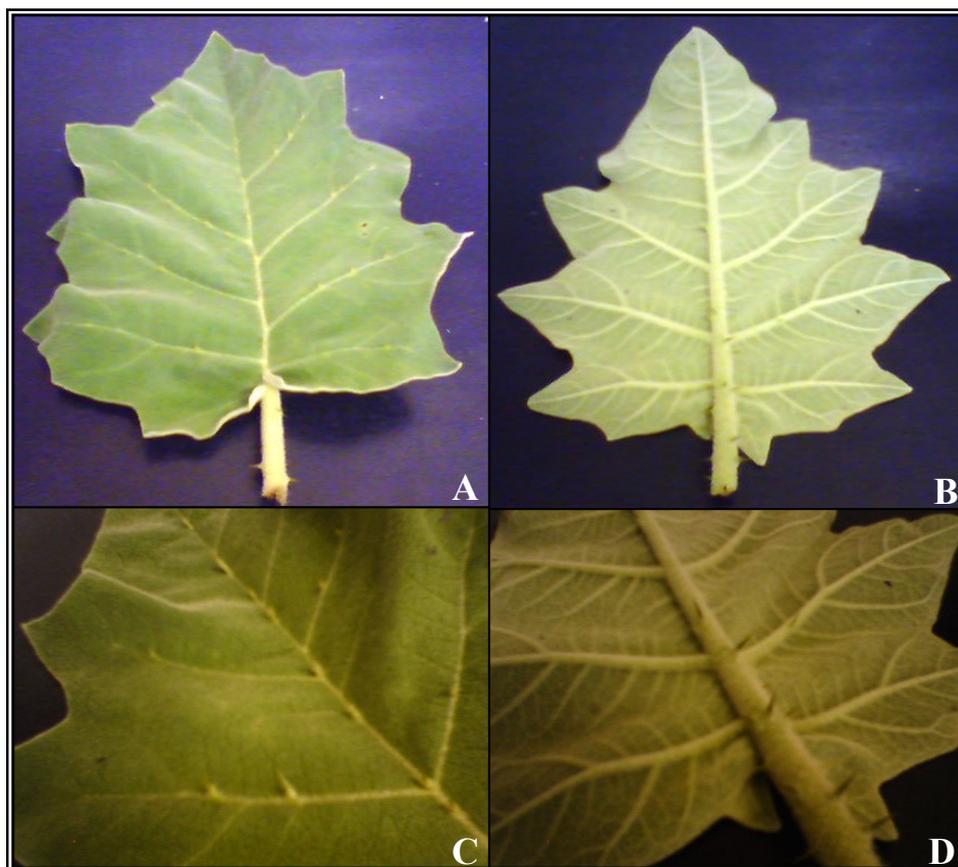


Figura 13. Morfologia foliar de *Solanum lycocarpum*. A- Aspecto geral da face ventral; B- Aspecto geral da face dorsal; C- Espinhos presentes nas nervuras da face ventral; D- Espinhos presentes nas nervuras da face dorsal.

O local de coleta das folhas de *S. lycocarpum* procedente da Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias MG, está localizado nas seguintes coordenadas geográficas: 18°13'57,7" S e 45°14'32,0" W (Figura 14).

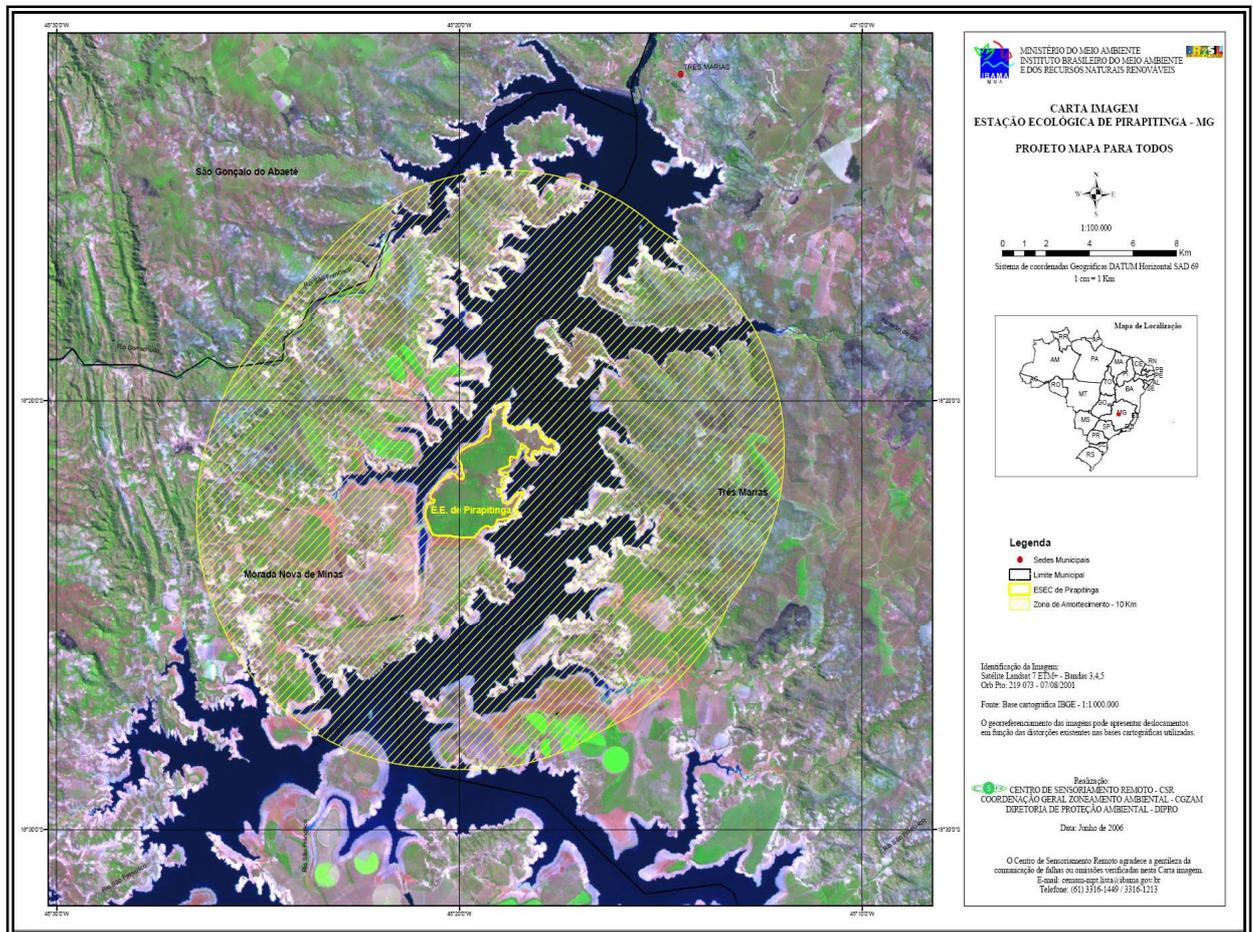


Figura 14. Carta imagem do local de coleta de *Solanum lycocarpum* – Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG. Fonte: (IBAMA - http://siscom.ibama.gov.br/mpt/MG/UC/ESEC_PIRAPITINGA_MG_A2.pdf).

Um dos arbustos de onde foram coletadas as folhas de *S. lycocarpum* procedente da Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG, pode ser verificada na Figura 15.



Figura 15. Hábito arbustivo de *Solanum lycocarpum* procedente da Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG. (Foto cedida pelo Dr. Yoshimi Sato).

O local de coleta das folhas de *S. lycocarpum* procedente do Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro RJ, está situado nas proximidades das seguintes coordenadas geográficas: 22°46'11"S 43°40'32"W (Figura 16).



Figura 16. Visão de satélite do local de coleta de *Solanum lycocarpum* – Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). A- Entrada principal do Campus Seropédica da UFRRJ; B- Ponto de coleta da planta. Fonte: (www.wikimapia.org).

Verifica-se na Figura 17 um dos arbustos de coleta das folhas de *S. lycocarpum* procedente do Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.



Figura 17. Hábito arbustivo de *Solanum lycocarpum* procedente do Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

3.3 Local de preparo dos extratos, realização dos bioensaios e da observação dos moluscos sobreviventes aos bioensaios

A pesagem da matéria vegetal e o preparo dos extratos foram realizados no Laboratório de Atividade Anti-helmíntica, sob responsabilidade do Professor Dr. Hécio Resende Borba.

Os bioensaios e as observações dos moluscos sobreviventes aos bioensaios foram realizados no Laboratório de Biologia e Ecologia de Helminthos, sob responsabilidade da Professora Dra. Solange Viana Paschoal Blanco Brandolini.

Ambos os laboratórios estão localizados no Pavilhão Hugo de Souza Lopes do Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Campus de Seropédica, RJ.

3.3.1. Preparação do extrato aquoso “a quente” de *Solanum lycocarpum* através do método da infusão

As folhas de *S. lycocarpum* previamente dessecadas a temperatura ambiente foram picotadas e pesadas para o preparo da infusão, em uma proporção de 300g de folha seca/3000 ml de água destilada. O material vegetal permaneceu contato com a água quente durante 15 minutos, tendo atingido uma temperatura de 90°C.

Em seguida, o recipiente contendo a infusão foi colocado sobre a bancada e tampado com uma placa de Petri, com a finalidade de evitar a evaporação e melhorar a extração dos princípios ativos, até atingir a temperatura ambiente. Posteriormente, o extrato foi filtrado com auxílio de um tecido (Voil). Este procedimento está ilustrado na Figura 18 e se constitui em uma adaptação da técnica de Leyton et al. (2005).

3.3.2. Preparação do extrato aquoso “a frio” de *Solanum lycocarpum* através do método de maceração estática

As folhas de *S. lycocarpum* previamente dessecadas a temperatura ambiente foram picotadas, pesadas e submetidas à maceração estática, em uma proporção de 200g de folha seca/2000 ml de água destilada. O recipiente contendo o macerado foi envolto com papel alumínio, para evitar exposição direta à luz, por um período de 24 horas e tampado com o

tecido (Voil) envolto por um elástico; sobre este conjunto foi colocada uma placa de Petri. (Adaptado de LORENZI & MATOS, 2008). Após esse período o macerado foi filtrado com auxílio de um tecido (Voil), está ilustrado na Figura 19.

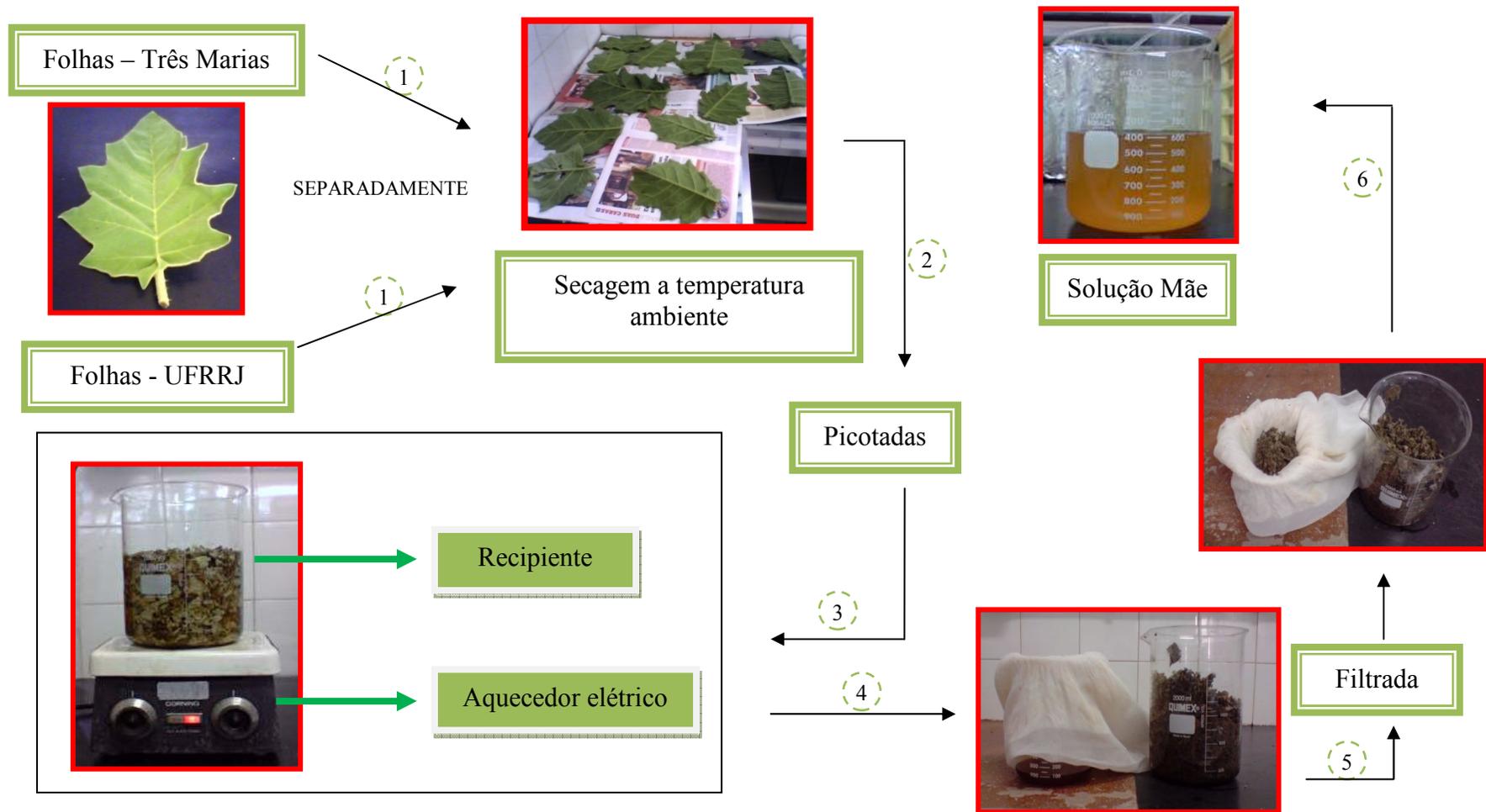


Figura 18. Procedimento utilizado na preparação dos extratos aquosos “a quente” de *Solanum lycocarpum*.

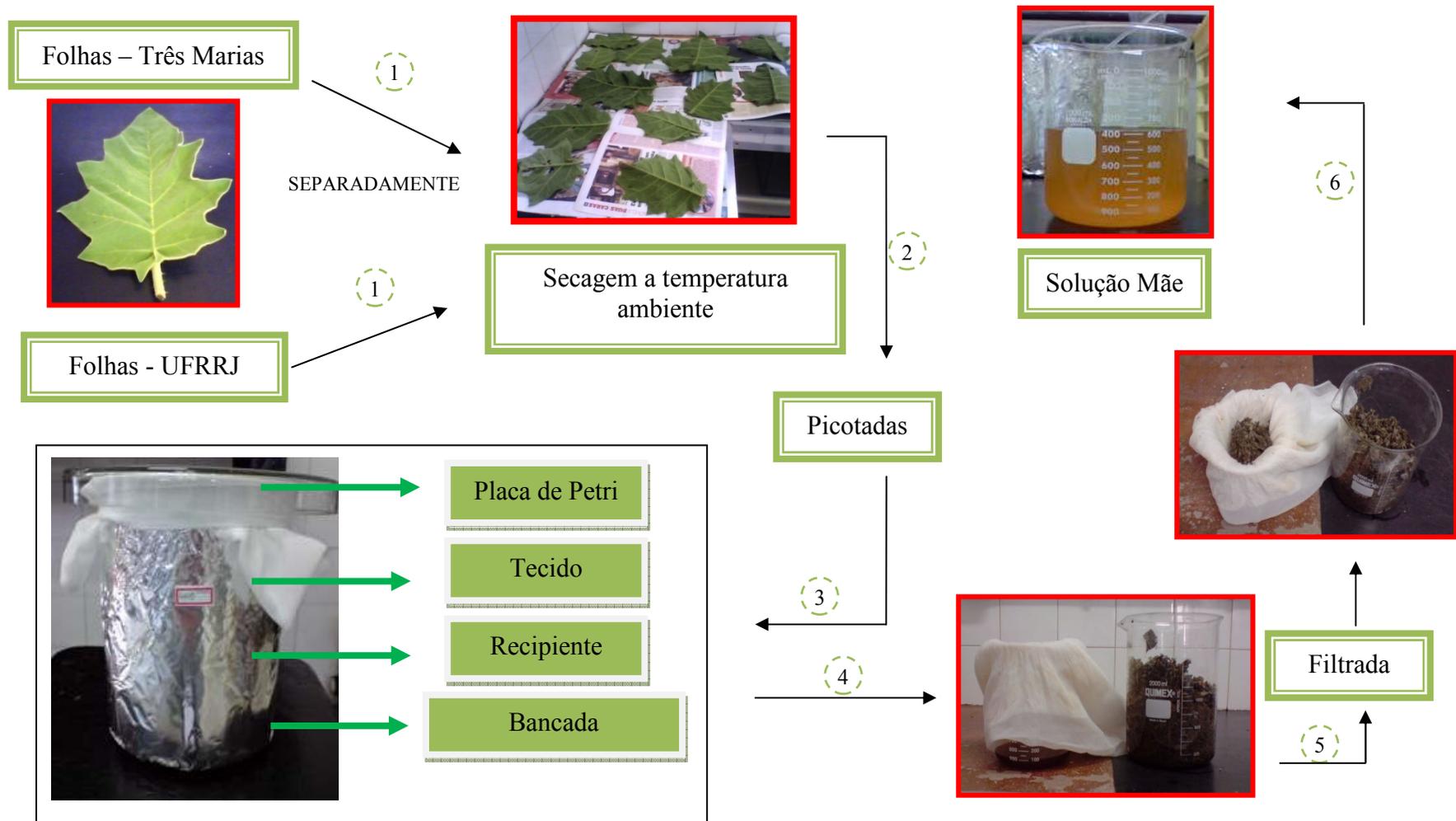


Figura 19. Procedimento utilizado no preparo do extrato aquoso “a frio” de *Solanum lycocarpum*.

O líquido resultante tanto da infusão quanto da maceração estática foi denominado de solução mãe, para ambas as localidades, a partir do qual foram preparadas as demais concentrações, conforme Figura 20.

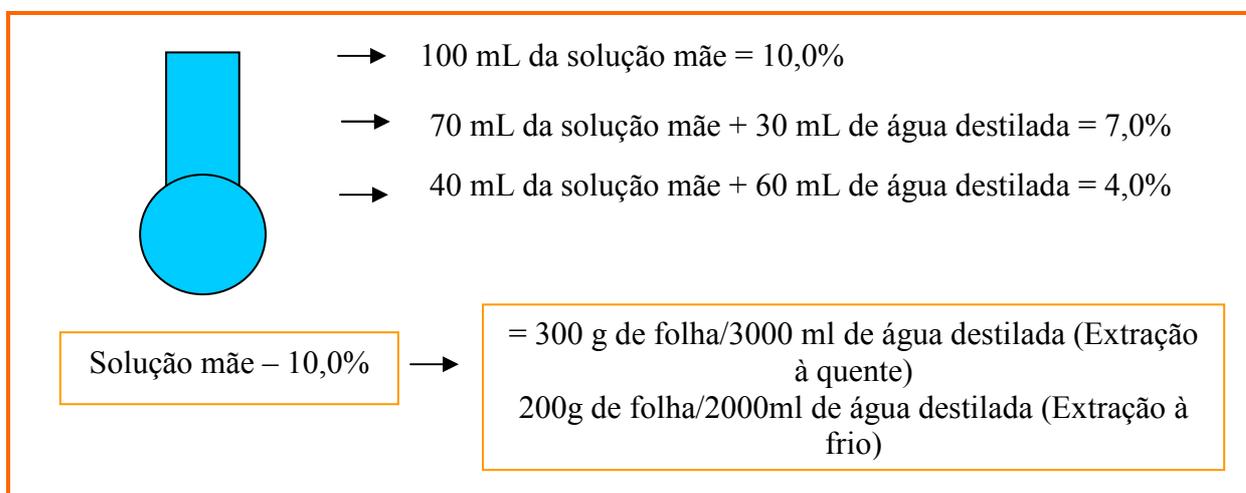


Figura 20. Preparação das concentrações utilizadas no bioensaio com *Solanum lycocarpum*.

Para melhor entendimento das tabelas e figuras, os extratos foram designados da seguinte forma:

SLFAqQ – TM (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, quente, Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG).

SLFAqF – TM (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, frio, Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG).

SLFAqQ – UFRRJ (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, quente, Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ).

SLFAqF – UFRRJ (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, frio, Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ).

Ao longo do trabalho podem ser atribuídos os seguintes termos: localidade de Três Marias e Campus Seropédica da UFRRJ, respectivamente, para as localidades: Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG e Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

3.4 Bioensaios com o molusco *Biomphalaria glabrata*

3.4.1 Avaliação moluscicida

A Organização Mundial de Saúde recomenda um método padrão para o *screening* da atividade moluscicida em laboratório, porém na prática é inviável devido a vários fatores, entre eles: local para manutenção dos moluscos, quantidade e qualidade da água (MARSTON & HOSTETTMANN, 1985). Os procedimentos adotados neste estudo foram baseados em uma adaptação do método de Marston & Hostettmann (1991) por Silva (2002) e com a

inclusão de uma nova metodologia, a observação dos moluscos sobreviventes aos bioensaios por 60 dias e da geração F1, desses sobreviventes, por 90 dias.

3.4.1.1 Material e procedimento para os testes moluscidas (Adaptado de MARSTON & HOSTETTMANN (1991) por SILVA (2002)).

1. Moluscos com 9-13 mm de diâmetro de concha.
2. Água desclorada
3. Provetas
4. Recipientes (copos de vidro) com capacidade para 125 ml.
5. Balões volumétricos
6. Foi preparada uma solução a 10,0% p/v, para as duas localidades de coleta da planta: Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias e Campus Seropédica, UFRRJ.
7. Foi utilizado um total de 24 recipientes por forma de extração, logo um total de 48 recipientes por localidade. Cada um com 5 moluscos Os bioensaios foram realizados em seis cópias onde foi utilizado um total de 120 moluscos por região fitogeográfica, sendo 30 moluscos por concentração.
8. Para realizar o bioensaio foram transferidos 125 mL de cada concentração dos extratos analisados obtidos pelas duas formas de extração para recipientes contendo cinco moluscos, por um período de 24h. Dessa forma, a relação foi sempre de 25 mL de solução por molusco.
9. Após 24 h os moluscos eram transferidos para uma placa de Petri para verificar se respondem aos estímulos provocados com espátulas e confirmação da mortalidade. Aqueles que não estavam mortos foram mantidos em recipientes contendo água desclorada e observados novamente após 48 e 72 h.
10. O controle foi feito, somente, com água desclorada. Os moluscos foram transferidos para um recipiente com 125 mL e 60 moluscos por localidade, sendo 30 moluscos por tipo de extração.

3.5 Manutenção dos moluscos sobreviventes aos bioensaios e da geração F1.

Os moluscos sobreviventes aos bioensaios foram separados por localidade de procedência da planta, método de extração e concentração dos extratos, conforme vericado na Figura 21.

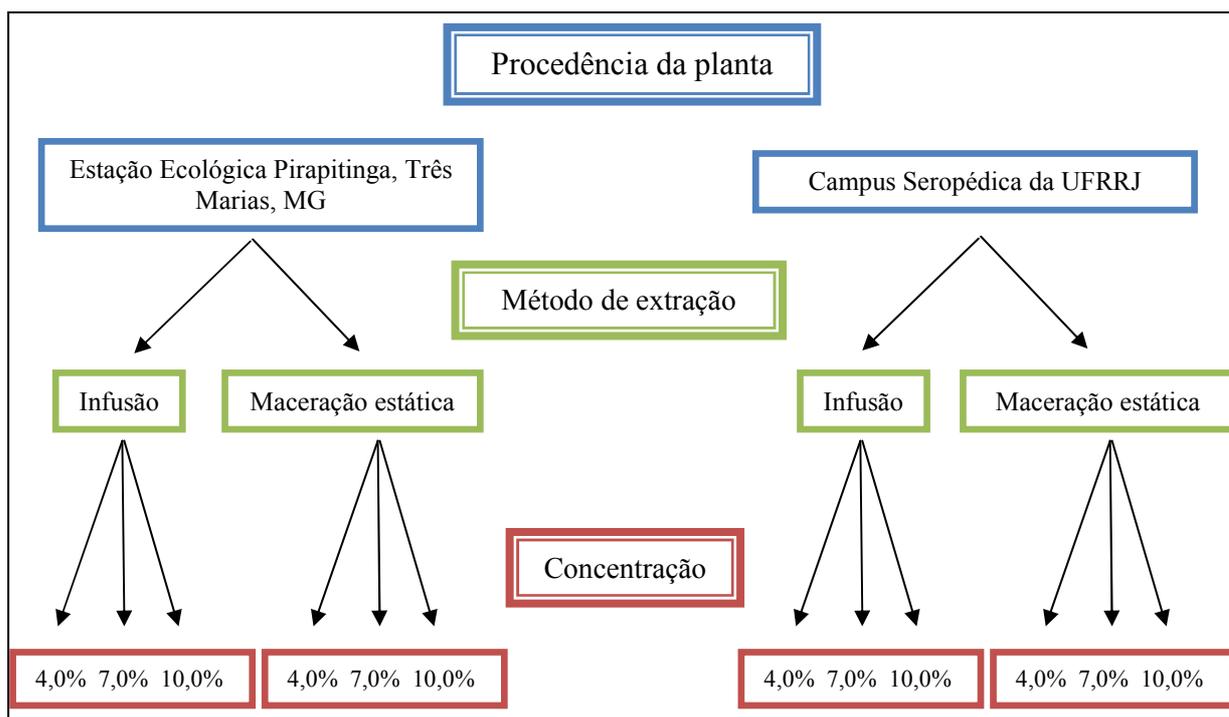


Figura 21. Procedimento para a separação dos moluscos sobreviventes aos bioensaios e da geração F1.

Em seguida foram transferidos para recipientes plásticos contendo água desclorada e mantidos sob temperatura ambiente. A limpeza desses aquários, bem como a alimentação dos moluscos e oferecimento do complemento alimentar foram realizados conforme descrito no item 3.1.

3.5.1 Observação dos aquários

Os moluscos sobreviventes foram observados semanalmente até completar um período de 60 dias. As observações semanais consistiam em verificar os seguintes parâmetros: mortalidade e reprodução. No parâmetro reprodução, eram quantificadas as massas ovígeras, estabelecendo-se o número total de ovos/massa ovígera e o percentual de eclodibilidade.

Os mesmos parâmetros foram utilizados na observação, por 90 dias, da geração F1 dos moluscos sobreviventes.

3.5.2 Protocolo para verificação dos moluscos mortos e contabilização das massas ovígeras

Os recipientes que acondicionavam os moluscos sobreviventes eram levados até a bancada e observados, separadamente, seguindo os procedimentos listados abaixo:

1. Primeiramente foi verificado o parâmetro mortalidade. Os moluscos eram transferidos para uma placa de Petri onde eram estimulados com espátulas para verificação de respostas aos estímulos, confirmando, assim, a morte. Procedendo-se a contagem dos moluscos mortos.

2. Em seguida, os moluscos vivos eram retirados dos recipientes plásticos, com o auxílio de uma pinça, e transferidos para outro recipiente contendo água desclorada. O recipiente onde estavam os moluscos sobreviventes, era então, observado com o auxílio de uma luminária de mesa, para a verificação de massas ovíferas e de eclosão dos moluscos.
3. Caso houvesse moluscos eclodidos, estes eram transferidos, com o auxílio de um pincel, para uma placa de Petri contendo água desclorada, sendo contabilizados e as anotações eram feitas.
4. Após a retirada de todos os moluscos eclodidos, a água dos recipientes que continham os moluscos sobreviventes era passada através de uma peneira de malha bem fechada. Este procedimento era repetido duas vezes. O que garantiu a retirada de todos os moluscos eclodidos, que não foram observados na bancada com o auxílio da luminária.
5. Os moluscos eclodidos eram transferidos da placa de Petri para recipientes plásticos e permaneciam separados dos moluscos sobreviventes. Dessa forma, era possível nas próximas verificações, averiguar quantos moluscos eclodidos morreram e quantos moluscos eclodiram naquela semana.
6. Em seguida, o recipiente que continha os moluscos sobreviventes, agora sem a água, era observado para verificação de massas ovíferas. Quando presentes, as massas ovíferas eram contabilizadas.
7. Caso o recipiente apresentasse massas ovíferas, os ovos contidos eram contabilizados. Este procedimento foi facilitado pela transparência do recipiente e pela utilização de uma luminária.
8. Após todos os procedimentos acima listados, o recipiente recebia, novamente, água desclorada e os moluscos sobreviventes retornavam ao mesmo recipiente.

Sendo assim, o protocolo de observação dos moluscos incluiu a contabilização de: moluscos vivos e mortos; massas ovíferas, ovos/massa ovígera, moluscos eclodidos, moluscos eclodidos que estavam mortos e moluscos eclodidos da semana.

3.6 Teste fitoquímico para identificação de saponina

O teste para identificação de saponina foi realizado no Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN), Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sob a responsabilidade do Dr. Mário Geraldo de Carvalho.

Para realizar o teste, foi feita uma adaptação da técnica descrita por Matos (2009), pois este autor trabalhou com extrato seco e no presente estudo foram utilizados extratos aquosos no estado líquido. Sendo assim, utilizou-se um funil de separação para colocar o extrato no volume de 10 ml adicionando 5 ml de clorofórmio, para a retirada de impurezas e de água. Como resultado deste procedimento houve a formação de duas fases. A fase que solubilizou em clorofórmio foi descartada, repetindo-se a adição de 5 ml de clorofórmio mais duas vezes.

Após a terceira passagem e o descarte da fase que continha o clorofórmio, o funil de separação com a solução foi agitado fortemente, por 2 a 3 minutos para a observação da formação de espuma. Segundo Matos (2009), esta espuma deve ser persistente e abundante, formando um colarinho, característica que indica a presença de saponina.

Devido, ao reduzido volume de extrato utilizado foi realizado um teste confirmatório para saponina. Este teste consistiu da adição de 2 ml de ácido clorídrico concentrado ao conteúdo do funil de separação, que é transferido para um recipiente, preparado anteriormente, deixando-o, pelo menos 1 hora em banho-maria, sem atingir a ebulição. Após este período o recipiente foi retirado do banho-maria e deixado sobre a bancada para resfriar. Em seguida, neutralizou-se a solução com uma base (hidróxido de sódio 1M), agitando-se novamente o recipiente. A presença de precipitado e a não formação de espuma quando os recipientes são agitados confirma a presença de saponina. Isso ocorre, pois o tratamento hidrolisa as saponinas, precipitando as agliconas (MATOS, 2009).

3.7 Análises Bioquímicas

Para a análise bioquímica, foram utilizados três moluscos, que sobreviveram ao bioensaio, de todos os extratos utilizados, a intervalos de 4, 30 e 60 dias onde foram separados para a coleta de hemolinfa, extraída através de punção da cavidade pericárdica.

Com o auxílio de uma agulha de insulina 0,38x13 BD Plastipak[®] foi obtido um pequeno orifício na concha do molusco, atingindo-se a cavidade pericárdica e com o auxílio de um capilar, coletou-se a hemolinfa, acondicionada em microtubos. Todo o procedimento foi realizado com o auxílio de um esteriomicroscópio. Os tubos de Eppendorf foram mantidos em banho de gelo durante a coleta da hemolinfa e armazenados a -10°C até a realização das análises, conforme verificado na Figura 21 (Adaptado de BEZERRA et al., 1999).

Em seguida, os moluscos foram dissecados, sem anestesia, e fixados em Dubosq-Brasil modificado (Etanol 80°GL-600 ml; Ácido acético glacial-150 ml e Formalina comercial-250 ml), para, posteriormente, serem processados histologicamente.

Após este período, as partes moles dos moluscos foram retiradas do interior das conchas, sob observação ao esteriomicroscópio, através de uma leve pressão suficiente para quebrar a concha sem prejudicar os tecidos do molusco, e com auxílio de pinças de ponta fina os fragmentos das conchas foram retirados e colocados à parte.

No entanto, em alguns extratos, devido ao elevado número de moluscos mortos durante o bioensaio, não foi possível a análise em todos os períodos, ou então, o número de três moluscos, não foi atingido.

A análise bioquímica incluiu a determinação das concentrações de glicose, ácido úrico e uréia de moluscos expostos aos extratos aquosos de *S. lycocarpum* das duas localidades de coleta obtidos pelos dois métodos de extração. Os resultados foram expressos em mmol/l e para determinar as concentrações foram utilizados kits de diagnóstico laboratorial Katal[®].

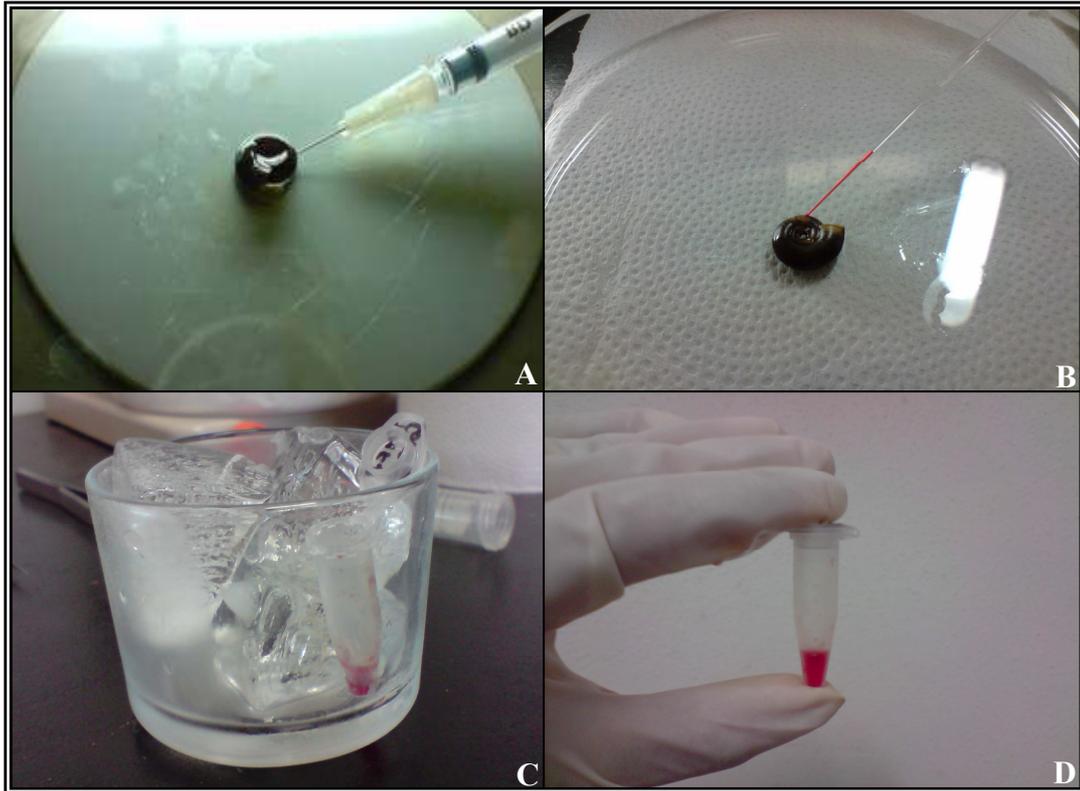


Figura 22. Procedimento para obtenção de hemolinfa. A. A concha era perfurada na altura da cavidade pericárdica. B. Punção cardíaca. C. Microtubo com hemolinfa no banho de gelo, durante toda a coleta. D. Volume final de hemolinfa obtido.

3.8 Análise Estatística

Os resultados obtidos com os extratos das localidades analisadas através dos dois métodos de extração foram expressos através de média \pm desvio-padrão e submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas, significativo quando ($P < 0,05$), quando a distribuição mostrava-se não normal, utilizava-se o Teste de Kruskal-Wallis, um teste não-paramétrico, ambos pelo programa GraphPad Instat[®] versão 3.0 (SAMPAIO, 2007).

Para verificar a relação de significância entre as concentrações utilizadas nos bioensaios e o percentual de mortalidade durante os bioensaios, utilizou-se o teste de regressão polinomial de primeira ordem, através do programa GraphPad Prism[®] versão 4.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeitos agudos dos extratos aquosos de *Solanum lycocarpum* sobre *Biomphalaria glabrata* através de métodos diferenciados de extração

Os resultados obtidos com os extratos aquosos de *S. lycocarpum* proveniente da Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG e do Campus Seropédica da UFRRJ, RJ através das duas formas de extração: a frio e a quente podem ser observados nas Figuras 23-26.

As observações realizadas durante os bioensaios demonstraram elevados percentuais de mortalidade nas primeiras 24 horas de observação. Evidenciando, dessa forma, a ação imediata dos extratos analisados.

Na Figura 23 estão apresentados os percentuais de mortalidade dos moluscos expostos aos extratos obtidos através do método de infusão (extração a quente) das duas áreas de coleta de *S. lycocarpum*. Elevados percentuais de mortalidade foram verificados com as concentrações de 10,0% e 7,0% nas primeiras 24 horas de observação. O extrato SLFAqQ-TM apresentou respectivamente, 96,67% e 93,33% de mortalidade e o extrato SLFAqQ-UFRRJ apresentou 100,0% de mortalidade para ambas as concentrações. Percentuais de mortalidade mais reduzidos foram verificados com a concentração de 4,0% para as duas áreas de coleta da planta.

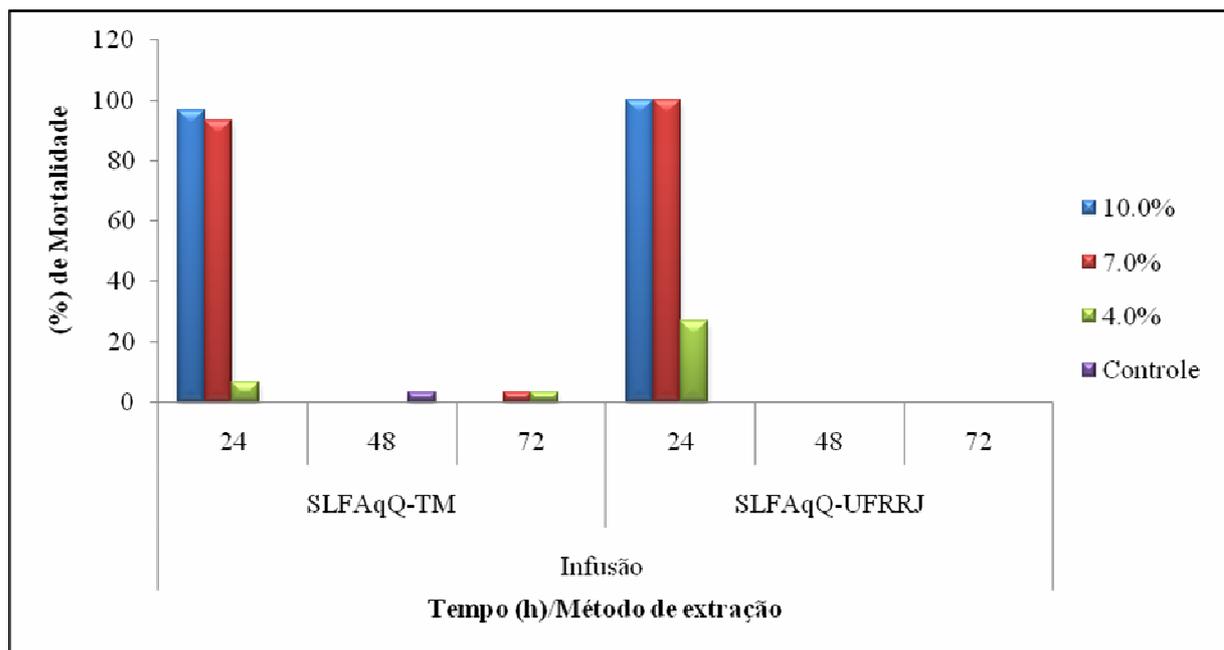


Figura 23. Percentual de mortalidade de *Biomphalaria glabrata* exposta aos extratos aquosos de *Solanum lycocarpum* obtidos pelo método de extração por infusão durante a realização do bioensaio. SLFAqQ-TM (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, quente – Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG) e SLFAqQ-UFRRJ (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, quente – Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ).

A Figura 24 apresenta os percentuais de mortalidade dos moluscos submetidos aos extratos aquosos obtidos pelo método de maceração estática (extração a frio) das duas áreas de coleta de *S. lycocarpum*. Foram verificados elevados percentuais de mortalidade nas primeiras 24 horas de observação nas três concentrações utilizadas no bioensaio. O extrato SLFAqF-TM determinou 100,0% de mortalidade para as concentrações de 10,0% e 7,0% e 90% de mortalidade com a concentração de 4,0%. O extrato SLFAqF-UFRRJ, também, determinou 100,0% de mortalidade para as concentrações de 10,0% e 7,0%, porém na concentração de 4,0% o percentual de mortalidade foi de 60,0%.

Com os resultados obtidos fica evidente a ação moluscicida dos extratos aquosos de *S. lycocarpum* analisados no presente estudo, conforme parâmetros estabelecidos por Kloos & Mccullough (1982) e WHO (1993).

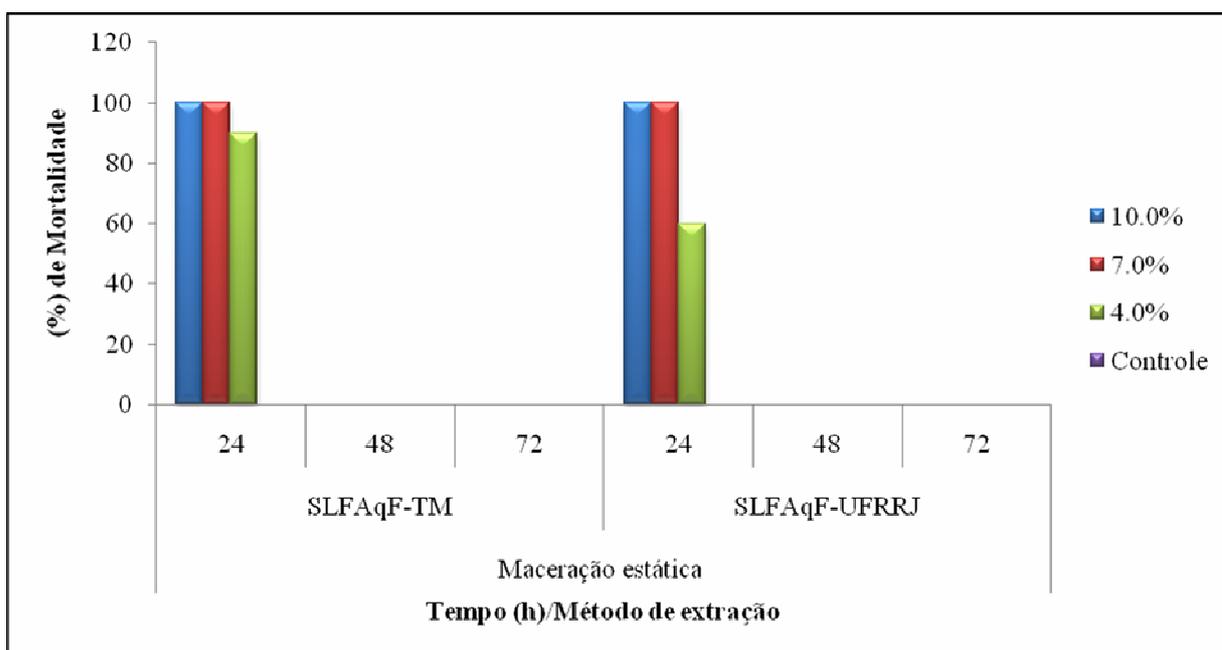


Figura 24. Percentual de mortalidade de *Biomphalaria glabrata* exposta aos extratos aquosos de *Solanum lycocarpum* obtidos pelo método de extração por maceração estática durante a realização do bioensaio. SLFAqF-TM (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, frio – Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG) e SLFAqF-UFRRJ (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, frio – Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ).

As Figuras 25 e 26 apresentam de forma comparativa, entre as duas áreas de coleta da planta, os percentuais de mortalidade dos moluscos submetidos aos extratos aquosos obtidos pelos dois métodos de extração: maceração estática e infusão.

A Figura 25 apresenta os percentuais de mortalidade dos moluscos submetidos aos extratos aquosos de *S. lycocarpum* produzidos por maceração estática (extração a frio) e por infusão (extração a quente) oriunda da localidade de Três Marias.

Nas primeiras 24 horas de observação verificou-se elevados percentuais de mortalidade nas concentrações de 10,0%, 7,0% e 4,0%. Através do método de extração, maceração estática, obteve-se os seguintes percentuais de mortalidade, 100,0% para as concentrações de 10,0% e 7,0% e 90,0% para a concentração de 4,0%.

Através da infusão verificou-se 96,67%, 93,33% e 6,67% de mortalidade, respectivamente, nas primeiras 24 horas de observação. No decorrer do bioensaio, somente a concentração de 4,0% apresentou 3,33% de mortalidade no período de 72 h de observação, totalizando 10,0% de mortalidade ao final do experimento.

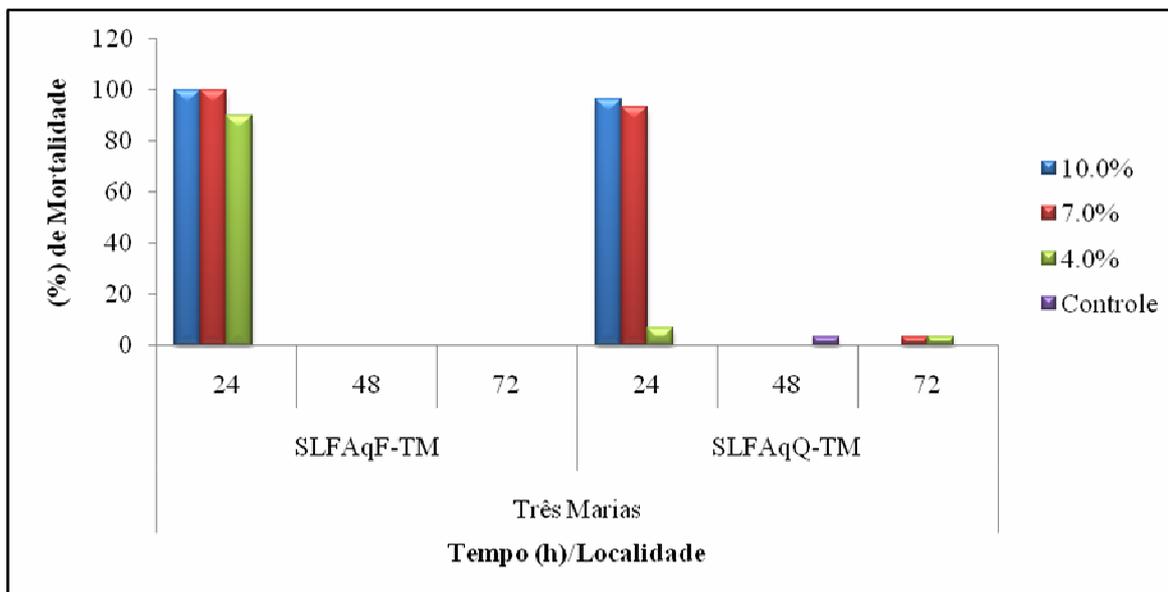


Figura 25. Percentual de mortalidade de *Biomphalaria glabrata* exposta aos extratos aquosos de *Solanum lycocarpum* coletada na Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG obtidos pelos métodos de extração por maceração estática e por infusão durante a realização do bioensaio. SLFAqF-TM (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, frio – Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG) e SLFAqQ – TM (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, quente – Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG).

Na Figura 26 estão apresentados os percentuais de mortalidade dos moluscos submetidos aos extratos aquosos de *S. lycocarpum* produzidos por maceração estática (extração a frio) e por infusão (extração a quente) oriunda da localidade do Campus de Seropédica da UFRRJ.

Elevados percentuais de mortalidade nas concentrações de 10,0%, 7,0% e 4,0%, foram verificados nas primeiras 24 horas de observação. No método de maceração estática, obteve-se 100,0% de mortalidade para as concentrações de 10,0% e 7,0% e 60,0% para a concentração de 4,0%.

Através da infusão, também, foi observado 100,0% de mortalidade para as concentrações de 10,0% e 7,0%, porém a concentração de 4,0% apresentou 26,67%, nas primeiras 24 horas de observação.

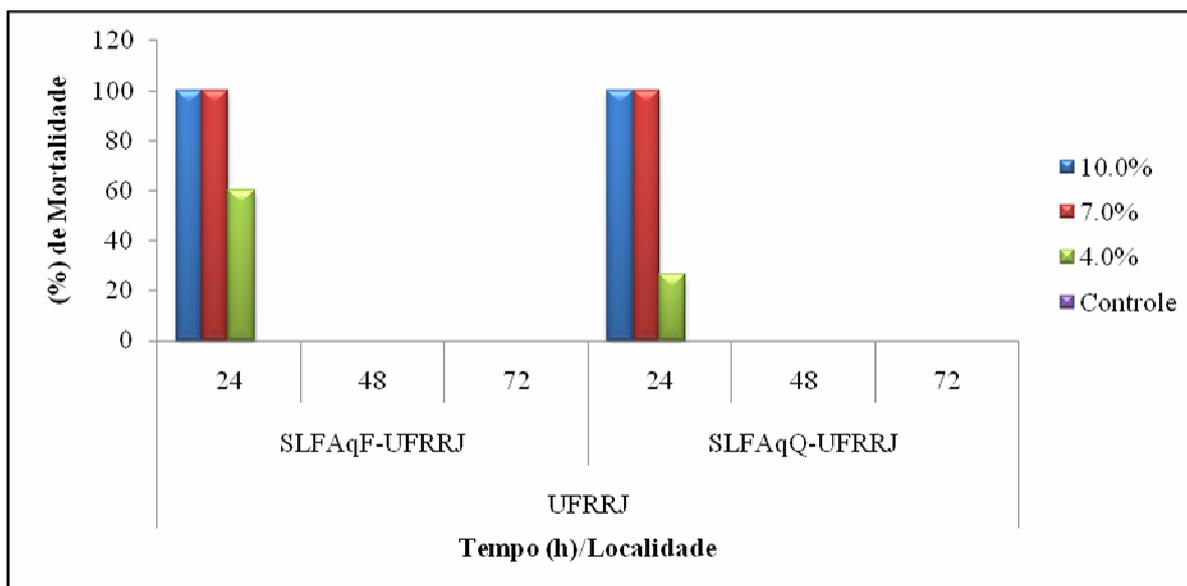


Figura 26. Percentual de mortalidade de *Biomphalaria glabrata* exposta aos extratos aquosos de *Solanum lycocarpum* coletada no Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ obtidos pelos métodos de extração por maceração estática e por infusão durante a realização do bioensaio. SLFAqF - UFRRJ (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, frio – Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ) e SLFAqQ – UFRRJ (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, quente – Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ).

A análise estatística demonstrou diferença significativa entre os percentuais de mortalidade obtidos com os extratos SLFAqF – UFRRJ e SLFAqF – TM, pelo método de maceração estática, com a concentração de 4,0%, nas primeiras 24 horas de observação, conforme verificado na Tabela 2.

Sendo assim, quando o método de extração utilizado foi a maceração estática, o extrato SLFAqF - TM se apresentou mais eficiente, determinando maior percentual de mortalidade.

Verificou-se, também, diferença significativa entre os percentuais de mortalidade obtidos com os extratos SLFAqQ –UFRRJ e SLFAqQ – TM, obtidos pelo método de infusão, na concentração de 4,0%, nas primeiras 24 horas de observação. Sendo assim, quando o método de extração foi a infusão, o extrato que determinou um maior percentual de mortalidade foi aquele obtido a partir da planta coletada no Campus Seropédica da UFRRJ.

Através da análise estatística realizada por localidade, comparando-se os métodos de extração, é possível evidenciar uma elevada diferença significativa nas primeiras 24 horas de observação, entre os seguintes extratos SLFAqF e SLFAqQ de ambas as localidades de coleta da planta, na concentração de 4,0%, conforme verificado na Tabela 2. Verifica-se assim, que o método de extração a “frio” apresentou os maiores percentuais de mortalidade em ambas as localidades de coleta da planta, quando comparado com o método de extração a “quente”.

Quando a análise estatística foi realizada por extrato, comparando-se as concentrações, observou-se uma diferença significativa de todas as concentrações utilizadas com o grupo controle, em todos os extratos utilizados, conforme verificado na Tabela 2.

Tabela 2. Percentual de mortalidade de *Biomphalaria glabrata* no bioensaio com os extratos aquosos de *Solanum lycocarpum**, por área de coleta, durante as primeiras 24 horas de observação, sob condições experimentais.

Concentração (%)	Percentual de mortalidade/Área de coleta			
	Campus Seropédica da UFRRJ, RJ		Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG	
	SLFAqF X ± DP	SLFAqQ X ± DP	SLFAqF X ± DP	SLFAqQ X ± DP
10,0	5,00 ± 0 ^{a,A}	5,00 ± 0 ^{a,A}	5,00 ± 0,000 ^{a,A}	4,83 ± 0,408 ^{a,A}
7,0	5,00 ± 0 ^{a,A}	5,00 ± 0 ^{a,A}	5,00 ± 0,000 ^{a,A}	4,66 ± 0,516 ^{a,A}
4,0	3,00 ± 1,673 ^{b,A}	1,33 ± 0,516 ^{b,B}	4,50 ± 0,836 ^{a,B}	0,33 ± 0,816 ^{b,A,C}
Controle	0 ^{b,c,A}	0 ^{b,c,A}	0 ^{b,A}	0 ^{b,c,A}

*SLFAqQ – UFRRJ (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, quente, Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ).

SLFAqF – UFRRJ (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, frio, Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ).

SLFAqQ – TM (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, quente, Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG).

SLFAqF – TM (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, frio, Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG).

Letras distintas indicam médias significativamente diferentes entre si. (P<0,05)

Letras minúsculas representam a comparação por extrato e letras maiúsculas entre os extratos.

Na realização do presente trabalho, envolvendo a utilização da mesma espécie vegetal procedente de localidades fitogeográficas distintas, observou-se uma ação diferenciada dos extratos aquosos de *S. lycocarpum* das duas áreas de coleta da planta, conforme Tabela 2. Os resultados obtidos encontram apoio no estudo realizado por Santos et al. (2002) que demonstraram a existência de variabilidade genética entre populações, de *S. lycocarpum* procedente de região de Mata Atlântica e de Cerrado.

As pressões de seleção são diferentes para os diversos ambientes, fazendo com que um genótipo que determine valor adaptativo superior num dado ambiente, possa proporcionar uma menor adaptação a outro (KASSEN & BELL, 2000).

Quando o isolamento geográfico impede o fluxo gênico, as populações tendem a ficar cada vez mais distantes geneticamente. Em plantas, essa situação pode muitas vezes ser acelerada em função de sua natureza sésil, tendo como consequência a adaptação local específica e o surgimento de metapopulações (GALLOWAY & FENSTER, 2000).

Uma espécie de ampla distribuição geográfica, como é o caso da lobeira, poderá originar populações geneticamente diferentes (VANDER-KLOET & HILL, 2000). Os resultados obtidos a partir da observação dos moluscos aos bioensaios com os extratos de *S. lycocarpum* procedente das duas áreas de coleta podem refletir uma influência das condições abióticas sobre a composição química da planta e consequentemente sobre seu potencial moluscicida.

Com exceção do extrato SLFAqQ-TM 4,0%, todos os outros extratos utilizados determinaram a morte dos moluscos durante os bioensaios, com extravasamento de hemolinfa. Esses resultados podem ser explicados por uma ação dos extratos sobre a permeabilidade dos tecidos dos moluscos.

O extravasamento de hemolinfa foi observado entre os moluscos que apresentaram os maiores percentuais de mortalidade nas primeiras 24 horas de observação. O único extrato onde não foi verificado o extravasamento, SLFAqQ-TM 4,0%, determinou apenas 6,67% de mortalidade no mesmo período. Novos ensaios deverão ser realizados para a verificação de uma possível relação entre o extravasamento de hemolinfa e os elevados percentuais de mortalidade.

Somente com o método de extração a frio, para ambas as localidades de coleta da planta, pode-se verificar o extravasamento de hemolinfa antes de completar as primeiras 24 horas de observação. O momento preciso deste efeito não foi determinado, já que o presente estudo não tinha por objetivo, analisar este parâmetro. Contudo, a constatação da hemolinfa extravasada no fundo do recipiente, ocorreu após 19 horas do início do bioensaio (Figura 27).



Figura 27. Recipientes contendo *Biomphalaria glabrata* exposta aos extratos aquosos da folha de *Solanum lycocarpum* durante a realização do bioensaio, onde se verificou o extravasamento de hemolinfa.

Além do extravasamento da hemolinfa, foi possível verificar, que todos os moluscos mortos durante os bioensaios, com os extratos obtidos através dos métodos de maceração estática, apresentavam retração total da massa cefalopodal e também a presença de muitas bolhas de ar próximo à abertura da concha. De acordo com BARBOSA (1995) na retração total a massa cefalopodal fica posicionada na metade do giro corporal da concha.

Essa retração em *B. glabrata* está relacionada a um comportamento de proteção contra as mudanças ambientais, tais como a seca, evitando assim a perda de água, conforme descrito por Olivier & Barbosa (1956) e Von Brandt et al. (1957).

A retração da massa cefalopodal, também é observada como resposta às substâncias tóxicas, dependendo de sua natureza e concentração (HARRY & ALDRICH, 1963; CHENG & SULLIVAN, 1973a; 1973b). Segundo Pieri & Jurberg (1981), essa ação também pode ser considerada como um mecanismo de proteção, pois com a retração total, há diminuição da área de contato da massa cefalopodal do molusco com a substância tóxica.

Programas que visam o controle dos hospedeiros intermediários do *S. mansoni* através da aplicação de substâncias moluscidas devem dar atenção especial a aspectos comportamentais dos moluscos (WHO, 1965).

Destaca-se a possibilidade dos moluscos escaparem da ação das substâncias através de comportamentos de proteção, capazes de contribuir para a sobrevivência, seja diminuindo a possibilidade do molusco ser atingido pela aplicação do produto ou pela redução dos efeitos tóxicos nos moluscos já atingidos (PARAENSE, 1972).

O fato da retração na concha em *B. glabrata* oferecer menor superfície relativa de contato com produtos tóxicos não significa necessariamente que este comportamento tenha, em si, um valor de sobrevivência; a menos que se realizem experimentos específicos em que, por exemplo, seja constatada maior taxa de mortalidade entre os indivíduos que não exibam o comportamento. Caso contrário, essa vantagem adaptativa deve ser considerada apenas uma suposição (PIERI & JURBERG, 1981).

A metodologia utilizada no presente estudo para a obtenção dos extratos, bem como as características observadas nos moluscos após a realização dos bioensaios assemelham-se ao trabalho realizado por Pinto & Almeida (1944). Estes autores utilizaram o caule do cipó-

timbó (*Serjania* sp.) para a obtenção dos extratos aquosos tanto através da técnica de infusão (extração a quente) quanto pela técnica de maceração estática por 24 horas (extração a frio).

Pinto & Almeida (1944) verificaram que o macerado do caule de *Serjania* sp. a frio causou a morte dos moluscos, verificando desprendimento de grande número de bolhas de ar pela abertura da concha, além dos moluscos se manterem retraídos, totalmente, para o interior da mesma. Resultados semelhantes foram obtidos no presente estudo.

De acordo com a Tabela 3, verifica-se que nas primeiras 24h de observação, concentraram-se em todos os extratos utilizados, os maiores percentuais de mortalidade, sendo este um dos critérios para que uma planta seja considerada moluscicida (MOTT, 1987).

Realizou-se a análise estatística do número de moluscos mortos por período de observação, com o objetivo de verificar a influência do tempo sobre a mortalidade.

Verificou-se diferença significativa entre o período de 24h com os de 48 e 72h, em todos os extratos utilizados, excetuando o extrato SLFAqQ-TM 4,0% onde o período de 24h apresentou diferença significativa, somente, com o período de 48h, mostrando-se, assim, equivalente ao período de 72h, conforme verificado na Tabela 3.

Tabela 3. Número de moluscos mortos durante os bioensaios com os extratos aquosos de *Solanum lycocarpum**, por período de observação, sob condições experimentais.

Número de moluscos mortos								
Tempo (h)	SLFAqQ - UFRRJ 4,0%	SLFAqF - UFRRJ 4,0%	SLFAqQ - TM 4,0%	SLFAqF - TM 4,0%	Controle quente-UFRRJ	Controle quente-TM	Controle frio-UFRRJ	Controle frio-TM
24	1,33 ± 0,516 ^a	3,00 ± 1,673 ^a	0,33 ± 0,816 ^a	4,50 ± 0,836 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
48	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^a	0,16 ± 0,408 ^a	0 ^a	0 ^a
72	0 ^b	0 ^b	0,16 ± 0,408 ^a	0 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a

*SLFAqQ – UFRRJ (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, quente, Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ).

SLFAqF – UFRRJ (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, frio, Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ).

SLFAqQ – TM (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, quente, Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG).

SLFAqF – TM (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, frio, Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG).

Letras distintas indicam médias significativamente diferentes entre si. (P<0,05)

A análise estatística pelo teste de regressão polinomial de 1ª ordem revelou uma relação positiva entre o percentual de mortalidade e as concentrações utilizadas no bioensaio, independente do método de extração utilizado, conforme pode ser verificado nas Figuras 28 – 31.

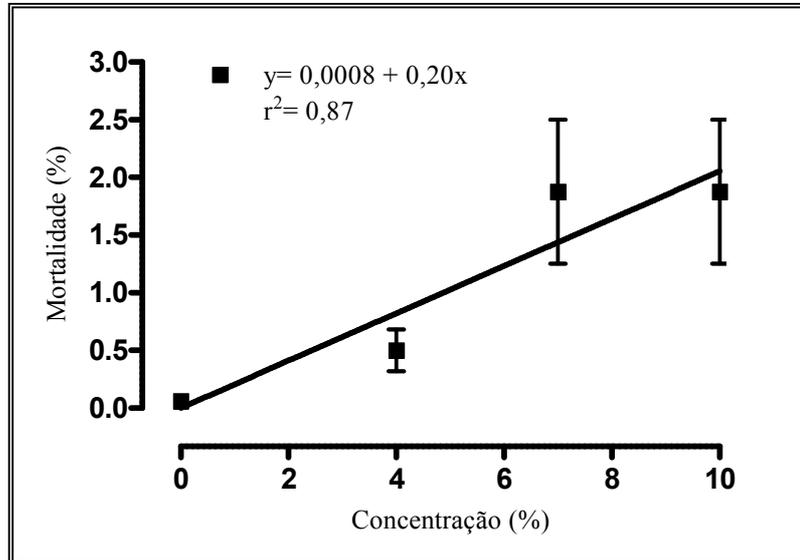


Figura 28. Relação entre o percentual de mortalidade de *Biomphalaria glabrata* submetida ao extrato SLFAqQ – UFRRJ (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, quente, Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ) e as concentrações utilizadas no bioensaio.

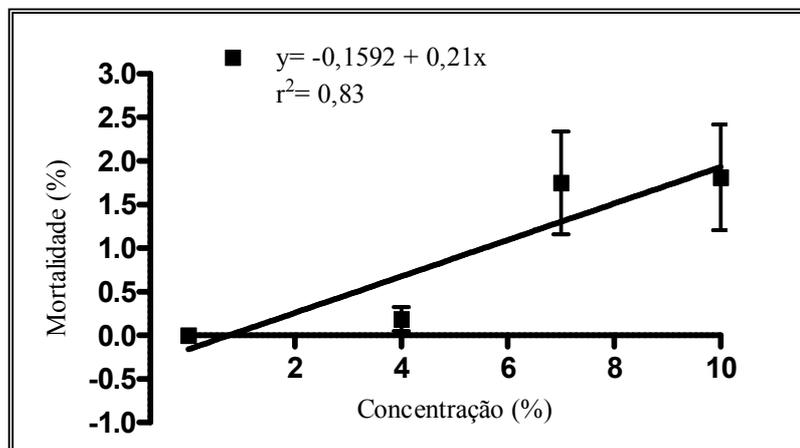


Figura 29. Relação entre o percentual de mortalidade de *Biomphalaria glabrata* submetida ao extrato SLFAqQ – TM (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, quente, Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG) e as concentrações utilizadas no bioensaio.

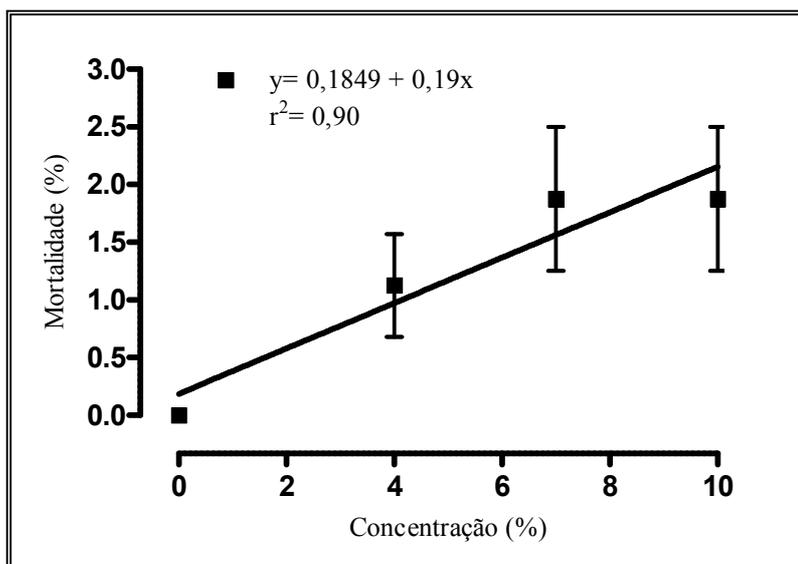


Figura 30. Relação entre o percentual de mortalidade de *Biomphalaria glabrata* submetida ao extrato SLFAqF – UFRRJ (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, frio, Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ) e as concentrações utilizadas no bioensaio.

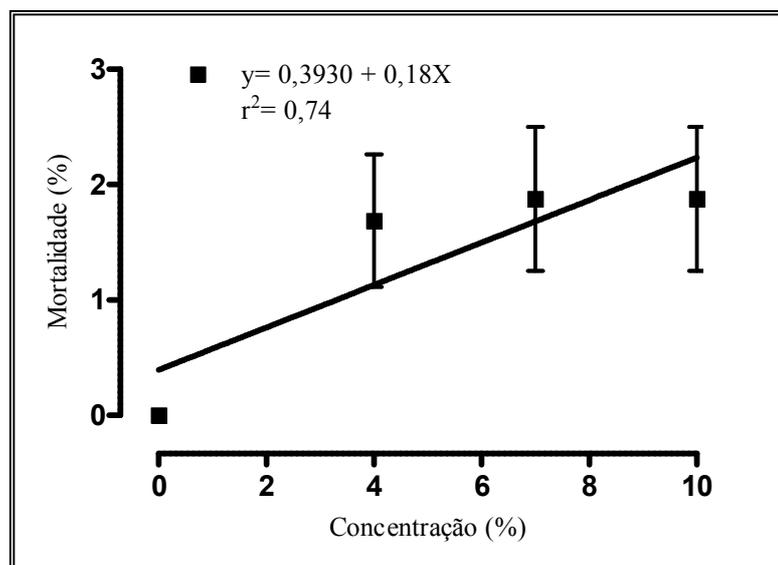


Figura 31. Relação entre o percentual de mortalidade de *Biomphalaria glabrata* submetida ao extrato SLFAqF – TM (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, frio, Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG) e as concentrações utilizadas no bioensaio.

Embora o teste de regressão tenha demonstrado uma relação positiva entre o percentual de mortalidade e as concentrações utilizadas no bioensaio, a análise estatística demonstrou que com o método de extração por infusão, os resultados obtidos com a concentração de 7,0% não diferiram significativamente daqueles obtidos com a concentração de 10,0%. E quando os extratos eram obtidos através da maceração estática, não havia

diferença significativa entre os resultados obtidos com a concentração de 4,0% e as concentrações de 7,0% e 10,0%, na localidade de Três Marias.

Em algum momento a relação crescente, entre concentração e mortalidade, deixou de existir estatisticamente. O que é interessante, pois os estudos de atividade moluscicida com produtos de origem vegetal preconizam a utilização da menor concentração letal.

A partir da observação da Tabela 2, verifica-se que o método de maceração estática é equivalente ao método de infusão nas concentrações de 10,0 e 7,0%, porém, na concentração de 4,0% o método de extração a frio, destacou-se, já que apresentou maior percentual de mortalidade, quando comparado com o método de extração a quente, para ambas as localidades de coleta da planta.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 2, a determinação da menor concentração letal (CL₉₀) para a localidade de Três Marias foi influenciada pelo método de obtenção dos extratos. Quando foi utilizada a maceração estática, a CL₉₀ foi de 4,0% e quando o método de extração utilizado foi a infusão, a CL₉₀ foi de 7,0%.

O mesmo, porém, não foi observado em relação à localidade Campus Seropédica da UFRRJ. Apesar da concentração de 4,0%, no método de maceração estática, ter determinado 60,0% de mortalidade dos moluscos, a análise estatística demonstrou uma diferença significativa com a concentração de 7,0%. Sendo assim, a CL₉₀ tanto com o método de extração a frio, quanto com a extração a quente foi de 7,0%.

O método de maceração estática é uma metodologia mais fácil de ser elaborada, comparando-se ao método de infusão, estando de acordo com as recomendações de Kloos & Mccullough (1982) e da WHO (1965) onde afirmam que o método de extração deve-se proceder da maneira mais simples.

O que pode ser explicado por Prista et al. (1990) que afirmam que o calor excessivo pode fazer com que algumas substâncias ativas se volatilizem ou se modifiquem, perdendo, assim, sua ação medicinal. Dessa forma, a água utilizada para o preparo dos extratos utilizados no presente estudo, pelo método de infusão, não chegou ao ponto de ebulição, para evitar a destruição dos ativos

Já o método de maceração estática, pela sua natureza, é uma técnica que não degrada ativos termolábeis (LORENZI & MATOS, 2008).

Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com aqueles obtidos por Xavier (2008). Esta autora, que utilizou nos bioensaios as concentrações de 2,5%, 5,0% e 10,0% de extratos aquosos, obtidos pelo método de infusão, de *S. lycocarpum* procedente das mesmas áreas de coleta, verificou um percentual de mortalidade dos moluscos superior a 90%, somente na maior concentração testada.

O trabalho de Leyton et al. (2005) é um dos poucos trabalhos encontrados, que utiliza extratos produzidos a partir das extrações a frio e a quente, utilizando *Lycopersicon esculentum* Mill., conhecida popularmente como tomateiro, apesar de não pertencer ao gênero *Solanum*, esta espécie vegetal encontra-se na família Solanaceae. Estes autores utilizaram o pó das folhas secas do tomateiro, para o preparo dos extratos aquosos a frio, obtidos por agitação durante quatro horas em água destilada, e a quente, obtido através de decocção durante 5 minutos, ambos na concentração de 10.000 ppm. Além dos extratos aquosos também foram utilizados extratos etanólicos e metanólicos na concentração de 200.000 ppm.

Leyton et al. (2005) observaram que os extratos aquosos não apresentaram diferença significativa entre as concentrações letais, quando comparado os métodos de extração. Diferentemente, do que foi observado neste presente estudo, com *S. lycocarpum* a CL₉₀ é alterada, dependendo do método de extração.

Segundo Leyton et al. (2005) os resultados obtidos com os extratos aquosos a frio e a quente não diferiram estatisticamente entre si, sendo considerados equivalentes. Quando

comparam os extratos aquosos com os metanólicos e etanólicos, verificaram que os extratos alcoólicos apresentavam uma eficácia três vezes maior do que os extratos aquosos.

Lopes (2005) utilizou em bioensaios com *S. lycocarpum*, extrato etanólico e frações glicoalcaloidais na concentração de 100 µg/ml, em ambos, não verificou atividade moluscicida. Diferentemente do trabalho de Lopes (2005), no presente estudo, verificou-se atividade moluscicida de extratos aquosos de *S. lycocarpum*, sem a utilização de solventes orgânicos. Os solventes orgânicos são removidos a partir da destilação em um rota vapor, sob pressão reduzida, e após essa evaporação os resíduos dos extratos são obtidos. No entanto, permanece a incerteza, de que resíduos dos solventes orgânicos possam agir sobre os moluscos. Na interpretação dos resultados algumas questões precisam ser consideradas, a ação foi de substâncias moluscicidas presentes no material vegetal utilizado, dos solventes ou do sinergismo de ambas? Para responder a estas perguntas, novos bioensaios deverão ser realizados.

Sendo assim, o presente estudo está de acordo com o que foi preconizado por Kloos & Mccullough (1982) que estabeleceram critérios para que uma planta seja considerada moluscicida, dentre as quais está que a extração deve ser feita da maneira mais simples e com solventes comumente disponíveis, de preferência a água.

Verificou-se a escassez de trabalhos científicos com *S. lycocarpum* para a verificação de atividade moluscicida. Plantas do gênero *Solanum* são conhecidas por produzir uma grande variedade de saponinas esteriodais e glicoalcalóides (FRIEDMAN et al., 1991).

De acordo com Silva et al. (2005) plantas que apresentavam alcalóides glicosilados como a solanosina possuem atividade moluscicida.

Sendo assim, este gênero se constitui uma importante fonte de pesquisa para o isolamento de substâncias bioativas, principalmente compostos que possam ser utilizados no controle da esquistossomose.

No trabalho de Wanyonyi et al. (2003) foi verificada a atividade moluscicida dos extratos metanólicos da baga de *Solanum aculeastrum* Dunal na concentração de 50 ppm, determinando uma taxa de mortalidade de 90,0%.

O trabalho realizado por Silva et al. (2005) envolveu a utilização de treze espécies de *Solanum* para a verificação da atividade moluscicida sobre *B. glabrata* através do método de maceração com metanol. Apenas, seis extratos apresentaram atividade moluscicida, com CL₅₀ entre 20 e 50 µg/ml. Embora Silva et al. (2005) e Mendes et al. (1984) tenham verificado a inatividade de *S. nigrum* L., Lopes (2005) verificou a atividade desta planta através da fração glicoalcaloidal, na concentração de 100 µg/ml, enquanto a concentração de 50 µg/ml apresentou-se inativa.

Silva et al. (2006) demonstraram que os extratos de *S. jabrense* utilizando suas partes aéreas, com solventes orgânicos, metanol, butanol e etanol apresentaram elevados percentuais de mortalidade, o que foi observado com *S. paludosum* utilizando as partes aéreas, com o solvente etanol e também, com *S. stipulaceum* onde foram utilizado os alcalóides do caule.

Silva et al. (2008) realizaram bio-monitoramento do extrato alcalóidico dos frutos verdes de *S. asperum*, fornecendo um novo alcalóide esteroidal, denominado solanandaina, juntamente com solasonina e solamargina. Como resultado, tanto o extrato alcalóidico como os glicoalcalóides isolados apresentaram um elevado potencial moluscicida.

O presente estudo, também, apresentou elevados percentuais de mortalidade dos moluscos submetidos a extratos da espécie *S. lycocarpum*, porém utilizando extratos aquosos, além de verificar a eficácia do método de extração a frio, quando comparado com o método de extração a quente.

4.2 Teste de verificação e confirmação de saponina nos extratos aquosos de *Solanum lycocarpum*

Todos os extratos utilizados nos bioensaios, com exceção do extrato SLFAqQ-TM 4,0%, determinaram a morte dos moluscos durante os bioensaios, com extravasamento de hemolinfa. Esses resultados podem ser explicados por uma ação dos extratos sobre a permeabilidade dos tecidos dos moluscos. Sendo assim, realizou-se o teste para a identificação de saponina.

Seguindo a metodologia descrita por Matos (2009) foi comprovada a presença de saponina nos extratos aquosos de *S. lycocarpum* utilizados no presente estudo. Durante a realização do teste verificou-se a formação de duas fases em todas as passagens de clorofórmio, ou seja, existiam substâncias que solubilizaram neste solvente, conforme Figura 32.



Figura 32. Funil de separação contendo amostra do extrato aquoso de *Solanum lycocarpum* evidenciando a formação de duas fases, após adição de clorofórmio.

Após a agitação do funil de separação, pode-se observar a presença de espuma e formação de colarinho, de acordo com a Figura 33. A quantidade de espuma não foi muito abundante devido à quantidade de extrato utilizado. Foram verificadas diferenças no resultado do teste com os extratos obtidos pelos métodos de maceração estática e infusão de ambas as áreas de coleta da planta. A formação de espuma no extrato a frio foi mais abundante, do que no extrato a quente, conforme a Figura 33.

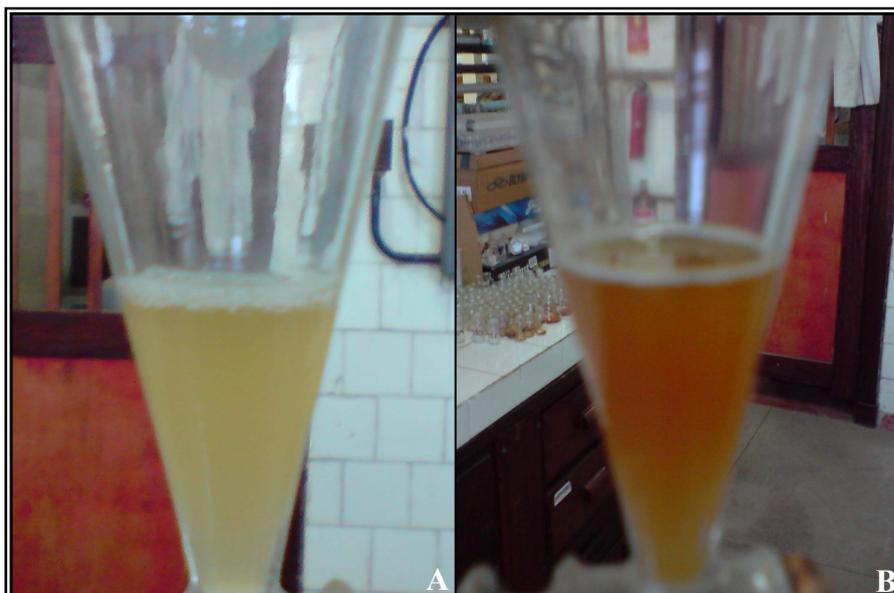


Figura 33. Formação de espuma, com colarinho nos extratos aquosos de *Solanum lycocarpum* após a realização do teste para detecção de saponina. A- Extrato submetido à extração a frio. B- Extrato submetido à extração a quente.

O teste confirmatório para saponina ratificou a presença desta substância. Segundo Matos (2009) ocorre a formação de precipitado com ausência de espuma, por ação do ácido clorídrico que rompe a ligação da aglicona com o açúcar, conforme observado na Figura 34. Desta forma, foi confirmada a presença de saponina em todos os extratos utilizados no presente estudo. Além da observação de características como: em solução aquosa formam espuma persistente e abundante, apresentam elevada solubilidade em água, desorganizam as membranas das células sanguíneas, caracterizando uma ação hemolítica; características encontradas principalmente no gênero *Solanum* (SIMÕES et al., 2004).

As saponinas são glicosídeos, este tipo de estrutura possui uma parte lipofílica e outra parte hidrofílica, o que determina a redução da tensão superficial da água e sua ação detergente e emulsificante. Portanto, os glicosídeos são substâncias polares e geralmente são solúveis em água (SIMÕES et al., 2004).

De acordo com Hostettman et al. (1982) sabe-se que certos tipos de saponinas esteroidais e triterpênicas possuem atividade moluscicida. Muitas espécies do gênero *Solanum* apresentam atividade moluscicida, devido à presença de saponinas esteroidais e glicoalcalóides, sendo substâncias importantes pela resistência natural das plantas contra agentes externos (FRIEDMAN et al., 1991).

Pinto & Almeida (1944) verificaram que o macerado do caule de *Serjania* sp. (Sapindaceae) a frio causou a morte dos moluscos em 2 minutos. Estes autores atribuíram os resultados obtidos à saponina, substância presente em ambos os extratos, além de quantificá-la em 14%.

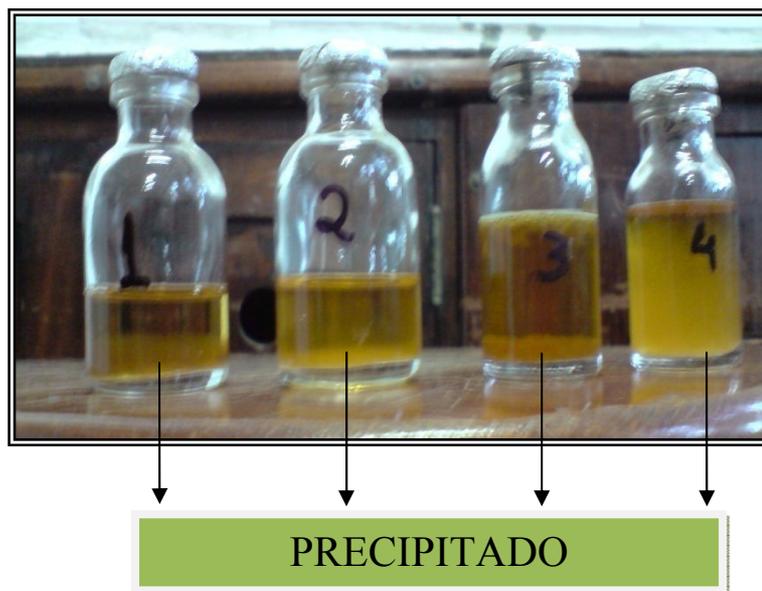


Figura 34. Teste confirmatório para saponina nos extratos aquosos de *Solanum lycocarpum*, com formação de precipitado. 1. SLFAqF-UFRRJ (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, frio, Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ); 2. SLFAqF-TM (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, frio, Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG); 3. SLFAqQ-UFRRJ (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, quente, Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ) e 4. SLFAqQ-TM (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, quente, Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG).

O extrato aquoso apresenta como vantagem, a ausência de lipídios e clorofila, além do baixo custo, porém como desvantagens apresentam a possibilidade de hidrólise, durante o processo extrativo, ou a hidrotermólise, no caso de extração a quente (SIMÕES et al., 2004).

No presente estudo foi verificado que o método de extração a frio apresentou os maiores percentuais de mortalidade na menor concentração, quando comparado com o método de extração a quente. Sendo assim, a hidrólise no extrato aquoso a frio, se ocorreu, não foi significativa para a ação dos extratos sobre os moluscos. Já os extratos a quente podem ter sofrido uma hidrotermólise, o que acarretaria a menor ação verificada deste extrato sobre os moluscos.

Sendo assim, a hidrotermólise poderia justificar a menor formação de espuma, verificada no teste para saponina, de acordo com a Figura 32, nos extratos a quente, ou seja, ocorreu uma instabilidade na estrutura lipofílica, denominada de aglicona ou sapogenina com a parte hidrofílica constituída por um ou mais açúcares, pois de acordo com Simões et al. (2004) essa estrutura determina a formação de espuma.

4.3 Efeitos crônicos verificados em *Biomphalaria glabrata* sobrevivente aos bioensaios com extratos aquosos de *Solanum lycocarpum* durante 60 dias de observação

4.3.1 Influência sobre a taxa de mortalidade dos moluscos

A Figura 35 apresenta o número de moluscos sobreviventes que morreram, ao longo dos 60 dias de observação. A mortalidade observada entre os moluscos do grupo controle

pode ser explicada como um fenômeno natural da espécie. Visto que o percentual de mortalidade verificado para este grupo, ao final dos 60 dias, foi muito menor (3,33%) quando comparado aos moluscos sobreviventes à exposição ao extrato SLFAqQ – TM, que apresentaram 20,0% de mortalidade. Contudo, a análise estatística não evidenciou diferença significativa entre os grupos testados ou destes com o grupo controle.

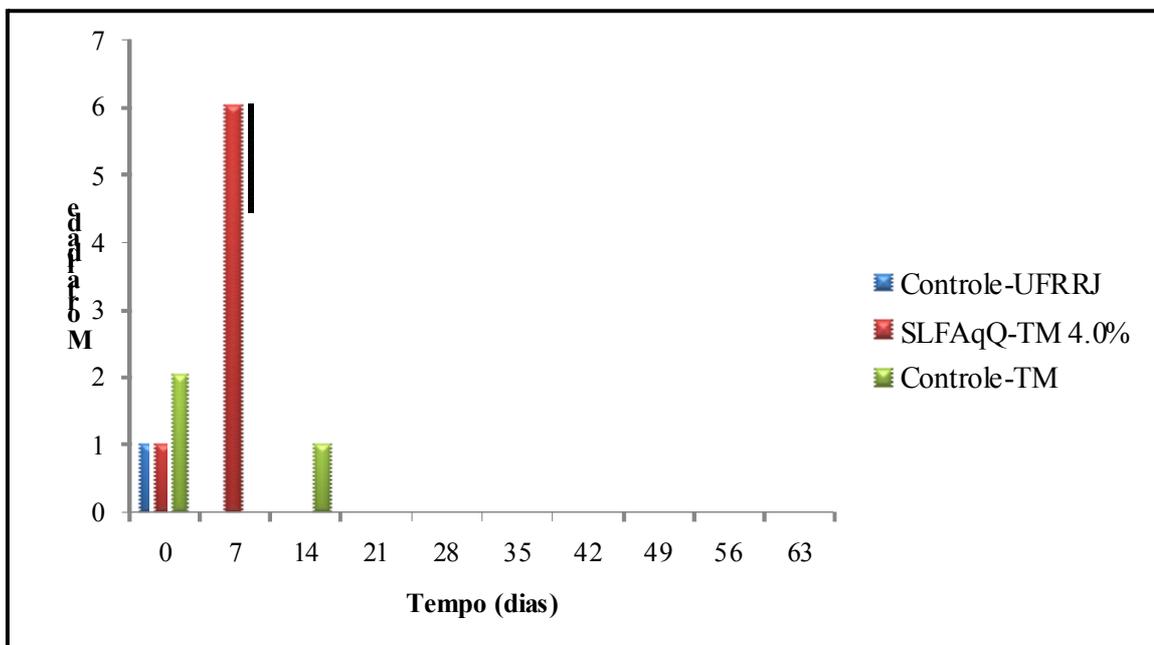


Figura 35. Mortalidade de *Biomphalaria glabrata* sobrevivente aos bioensaios com extratos aquosos de *Solanum lycocarpum* ao longo de 60 dias de observação sob condições experimentais.

4.3.2 Influência sobre a reprodução dos moluscos

As observações sobre a biologia reprodutiva dos moluscos, no que se refere ao número de massas ovíferas/molusco, número de ovos/molusco, número de ovos/massa ovígera, percentual de eclosão, percentual de sobrevivência dos moluscos eclodidos e moluscos eclodidos/número de ovos dos moluscos sobreviventes ao bioensaio, ao final dos 60 dias de observação estão apresentadas na Tabela 4.

Para os extratos SLFAqQ-TM 10,0%, SLFAqQ-TM 7,0%, SLFAqF-UFRRJ 4,0% e SLFAqF-TM 4,0% foram verificados números reduzidos ou nenhum molusco ao final dos 60 dias de observação. Isso ocorre devido às elevadas taxas de mortalidade observadas nos bioensaios e também às disseções que foram realizadas para um futuro trabalho histológico.

Ao analisar o número de massas ovíferas/molusco, verifica-se que o extrato SLFAqQ-TM 4,0% apresentou o maior número de massas ovíferas, seguido pelos extratos, SLFAqF-UFRRJ 4,0% e SLFAqQ-TM 7,0%, respectivamente. Consequentemente, o maior número de ovos/molusco, manteve-se nos extratos citados acima de acordo com a Tabela 4.

No entanto, o número de ovos/massa ovígera não seguiu o padrão destacado acima, pois o grupo de moluscos que apresentou o maior número de ovos/massa ovígera foi o submetido ao extrato SLFAqQ-UFRRJ 4,0%, que apresentou médias de massas ovíferas/molusco e número de ovos/molusco, bem abaixo dos extratos SLFAqQ-TM 4,0%,

SLFAqF-UFRRJ 4,0% e SLFAqQ-TM 7,0%. Ou seja, apesar do menor número de massas ovíferas, houve uma compensação com o aumento do número de ovos/massa ovígera. Em seguida, as maiores médias de número de ovos/massa ovígera, encontra-se nos extratos SLFAqQ-TM 4,0% e SLFAqF-UFRRJ 4,0%, respectivamente, conforme verificado na Tabela 4.

Apesar do extrato SLFAqQ-TM 4,0% ter apresentado uma das maiores médias de número de massas ovíferas/molusco, número de ovos/molusco e número de ovos/massa ovígera, seu percentual de eclosão, foi o menor, quando comparado com os demais grupos testados. Ocorrendo uma compensação no percentual de sobrevivência dos moluscos eclodidos, já que foi de 57,69%, como observado na Tabela 4.

De acordo com a Tabela 4, os moluscos submetidos ao extrato SLFAqF-UFRRJ 4,0%, mantiveram o padrão das maiores médias, sendo o grupo com o maior percentual de eclosão, 80,95%. No entanto, foi o grupo com o menor percentual de sobrevivência dos moluscos eclodidos (40,78%).

O segundo maior percentual de eclosão, foi dos moluscos submetidos ao extrato SLFAqF-TM 4,0% (71,0%) com elevado percentual de sobrevivência (80,23%), porém, dentre os grupos testados, foi o que apresentou a menor média de número de massas ovíferas/molusco e baixíssimas médias de número de ovos/molusco e número de ovos/massa ovígera, verificado na Tabela 4.

O grupo submetido ao extrato SLFAqQ-TM 10,0% apresentou um percentual de eclosão de 50,0%, além de 75,0% de sobrevivência, no entanto, foi o grupo testado que apresentou a menor média de ovos/moluscos e ovos/massa ovígera. O grupo de moluscos que foram testados com o extrato SLFAqQ-TM 7,0% apresentaram um percentual de eclosão de 39,0%, apesar de ter sido a terceira maior média do número de massas ovíferas/molusco e ovos/molusco. Seu percentual de sobrevivência, porém, foi alto, aproximadamente 85,0%, de acordo com a Tabela 4.

O grupo testado SLFAqQ-UFRRJ 4,0%, apresentou um percentual de eclosão baixo (25,46%), porém elevado percentual de sobrevivência (70,97%), observado na Tabela 4.

Verifica-se, que a biologia reprodutiva dos moluscos não segue um padrão, ou seja, quem colocou mais ovos, não será, obrigatoriamente, o grupo que apresentará o maior percentual de eclosão e o maior de sobrevivência. Isso ocorre, pois o molusco realiza o processo de compensação, para tentar suprir o estresse causado pelo extrato.

Diferentemente, todos os grupos controle seguem um mesmo padrão. Não foi observado um aumento no número de massas ovíferas ou aumento no número de ovos/massa ovígera, porém apresentaram um percentual de sobrevivência dos moluscos eclodidos bem elevado, chegando a 92,31%, no Controle-UFRRJ, de acordo com a Tabela 4. No entanto, ao analisar estatisticamente a produção de massas ovíferas/molusco, não foi verificada diferença significativa entre os resultados.

Segundo Barbosa (1960), *B. glabrata* quando submetida a condições de estresse, ou quando ameaçada, pode apresentar um aumento no número de massas ovíferas, como um mecanismo para garantir a sobrevivência da espécie. O mesmo foi relatado por Minchella (1985) que afirmou existir um processo de compensação da fecundidade, geralmente observado em casos de estresse fisiológico. Dessa forma, os resultados obtidos no presente estudo, podem representar uma resposta fisiológica dos moluscos a um meio inadequado, representado pelos extratos utilizados.

Tabela 4. Biologia reprodutiva de *Biomphalaria glabrata* sobrevivente aos bioensaios com extratos aquosos de *Solanum lycocarpum** ao final de 60 dias, sob condições experimentais.

Extratos utilizados*	Número de massas ovíferas/molusco**	Número de ovos/molusco**	Número de ovos/massas ovíferas**	(%) de eclosão	(%) de sobrevivência	Eclodidos/nº ovos**
SLFAqQ-UFRRJ 4,0%	0,53	6,85	15,11	25,46	70,97	0,157
Controle quente-UFRRJ	0,36	3,02	7,10	1,98	92,31	0,009
SLFAqQ-TM 10,0%	0,44	0,88	0,22	50,00	75,00	0,055
SLFAqQ-TM 7,0%	0,77	11,11	1,55	39,00	84,61	0,043
SLFAqQ-TM 4,0%	1,09	20,39	14,38	1,93	57,69	0,008
Controle quente-TM	0,38	3,72	5,60	1,71	83,33	0,002
SLFAqF-UFRRJ 4,0%	0,98	22,95	12,95	80,95	40,78	0,396
Controle frio- UFRRJ	0,38	3,18	2,89	7,18	55,77	0,066
SLFAqF-TM 4,0%	0,25	3,70	1,58	71,00	80,28	0,078
Controle frio-TM	0,22	1,36	7,30	18,31	72,13	0,065

*SLFAqQ – UFRRJ (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, quente, Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ).

SLFAqF – UFRRJ (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, frio, Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ).

SLFAqQ – TM (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, quente, Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG).

SLFAqF – TM (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, frio, Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG).

** Média das médias ao longo de 60 dias.

A análise estatística do número de ovos das massas ovígeras produzidas pelos moluscos sobreviventes aos bioensaios, realizada pelo Teste de Kruskal-Wallis, apresentou diferença significativa entre os extratos de *S. lycocarpum* procedente da Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, obtidos através da infusão nas concentrações de 10,0% e 4,0%. Resultados semelhantes foram verificados com o extrato obtido através da maceração estática na concentração de 4,0%, apresentando diferença significativa entre as localidades de procedência da planta. O mesmo foi verificado entre os extratos SLFAqQ-TM 4,0% e SLFAqF-TM 4,0%, conforme observado na Tabela 5.

Tabela 5. Número médio de ovos produzidos por *Biomphalaria glabrata* sobrevivente aos bioensaios com extratos aquosos de *Solanum lycocarpum** ao final de 60 dias de observação, sob condições experimentais.

Concentração (%)	Número de ovos/molusco dos sobreviventes			
	SLFAqQ - UFRRJ	SLFAqF - UFRRJ	SLFAqQ – TM	SLFAqF - TM
10,0	-	-	0,88 ± 2,667 ^a	-
7,0	-	-	11,11 ± 33,333 ^{a,b}	-
4,0	7,41 ± 6,762 ^{a,A}	22,95 ± 15,694 ^{a,A}	20,39 ± 16,548 ^{b,A}	3,70 ± 11,110 ^{a,B}
Controle	7,41 ± 6,762 ^{a,A}	3,18 ± 4,738 ^{a,A}	3,72 ± 6,638 ^{a,b,A}	1,36 ± 1,778 ^{a,A}

*SLFAqQ – UFRRJ (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, quente, Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ).

SLFAqF – UFRRJ (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, frio, Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ).

SLFAqQ – TM (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, quente, Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG).

SLFAqF – TM (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, frio, Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG).

Letras distintas indicam médias significativamente diferentes entre si. (P<0,05)

Letras minúsculas representam a comparação por extrato e letras maiúsculas entre os extratos.

A análise estatística pelo Teste de Kruskal-Wallis do número de ovos por massas ovígeras evidenciou uma diferença significativa, somente entre as concentrações de 10,0% e 4,0% do extrato SLFAqQ-TM, conforme observado na Tabela 6.

Tabela 6. Número médio de ovos/massa ovígera de *Biomphalaria glabrata* sobrevivente aos bioensaios com extratos aquosos de *Solanum lycocarpum** aos bioensaios ao final de 60 dias, sob condições experimentais.

Concentração (%)	Número de ovos/massa ovígera dos moluscos sobreviventes			
	SLFAqQ - UFRRJ	SLFAqF - UFRRJ	SLFAqQ - TM	SLFAqF - TM
10,0	-	-	0,22 ± 0,667 ^a	-
7,0	-	-	1,55 ± 4,677 ^{a,b}	-
4,0	15,11 ± 15,563 ^{a,A}	9,62 ± 15,093 ^{a,A}	14,382 ± 10,174 ^{b,A}	1,587 ± 4,760 ^{a,A}
Controle	7,10 ± 6,058 ^{a,A}	2,98 ± 5,501 ^{a,A}	5,60 ± 5,439 ^{a,b,A}	7,30 ± 14,062 ^{a,A}

*SLFAqQ - UFRRJ (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, quente, Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ).

SLFAqF - UFRRJ (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, frio, Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ).

SLFAqQ - TM (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, quente, Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG).

SLFAqF - TM (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, frio, Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG).

Letras distintas indicam médias significativamente diferentes entre si. (P<0,05)

Letras minúsculas representam a comparação por extrato e as letras maiúsculas entre os extratos.

A análise comparativa entre as duas localidades de procedência da planta, no método de extração através da infusão, demonstrou semelhança entre os resultados. Já que os moluscos submetidos tanto ao extrato SLFAqQ-TM 4,0% quanto ao extrato SLFAqQ-UFRRJ 4,0%, apresentaram elevados percentuais de sobrevivência dos moluscos eclodidos.

Em ambos os casos, provavelmente os moluscos mais aptos sobreviveram, de acordo com a Teoria da Evolução: “é o processo pelo qual certa condição “favorável” torna-se cada vez mais comum de uma geração para a seguinte” (DESSEN, 2001).

O mesmo não é observado no método de maceração estática, verifica-se que o extrato SLFAqF-UFRRJ 4,0%, apesar do elevado percentual de eclosão, o percentual de sobrevivência ficou abaixo dos 50,0%. Diferentemente no SLFAqF-TM 4,0% verificou-se elevados percentuais de eclosão e sobrevivência.

No entanto, quando a comparação se dá entre os métodos de extração, verificam-se diferenças entre os resultados. O extrato SLFAqQ-TM 4,0% conforme citado anteriormente, apresenta baixo percentual de eclosão, porém um elevado percentual de sobrevivência, já o extrato SLFAqF-TM 4,0% apresentou elevados percentuais de eclosão e de sobrevivência. O mesmo pode ser verificado na localidade do Campus Seropédica da UFRRJ, o extrato SLFAqF-UFRRJ 4,0% que apresentou o terceiro maior número de ovos/massa ovígera, apresentou o maior percentual de eclosão, ou seja, o esforço de colocar os ovos foi compensado, porém não totalmente, pois seu percentual de sobrevivência ficou abaixo dos 41,0%. O contrário pode ser observado no SLFAqQ-UFRRJ 4,0%.

Através da análise estatística do número de moluscos eclodidos/número de ovos ratificam-se as diferenças acima citadas. Há diferença significativa entre os métodos de extração utilizados, quando comparados pela localidade de procedência da planta, Campus

Seropédica da UFRRJ, na concentração de 4,0%. Resultados significativos, também, foram observados entre as localidades de procedência de *S. lycocarpum*, quando comparadas pelo método de maceração estática, na concentração de 4,0%, conforme verificado na Tabela 7.

Tabela 7. Número médio de moluscos eclodidos/número de ovos de *Biomphalaria glabrata* sobrevivente aos bioensaios com extratos aquosos de *Solanum lycocarpum** ao final de 60 dias, sob condições experimentais.

Concentração (%)	Número de moluscos eclodidos/nº de ovos dos moluscos sobreviventes			
	SLFAqQ - UFRRJ	SLFAqF - UFRRJ	SLFAqQ – TM	SLFAqF - TM
10,0	-	-	0,055 ± 0,166 ^a	-
7,0	-	-	0,043 ± 0,130 ^a	-
4,0	0,119 ± 0,187 ^{a,A}	0,396 ± 0,284 ^{a,B}	0,007 ± 0,019 ^{a,A,B,C}	0,078 ± 0,236 ^{a,A,C}
Controle	0,009 ± 0,010 ^{a,A}	0,066 ± 0,085 ^{a,A}	0,002 ± 0,002 ^{a,A}	0,065 ± 0,054 ^{a,A}

*SLFAqQ – UFRRJ (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, quente, Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ).

SLFAqF – UFRRJ (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, frio, Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ).

SLFAqQ – TM (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, quente, Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG).

SLFAqF – TM (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, frio, Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG).

Letras distintas indicam médias significativamente diferentes entre si. (P<0,05)

Letras minúsculas representam a comparação por extrato e letras maiúsculas entre os extratos.

4.4. Alterações bioquímicas apresentadas por *Biomphalaria glabrata* exposta aos extratos aquosos de *Solanum lycocarpum* nos períodos de 4, 30 e 60 dias após a realização dos bioensaios

4.4.1 Alterações nos níveis de glicose

A variação nos níveis de glicose verificada com os moluscos submetidos aos extratos aquosos de *S. lycocarpum* procedente da localidade de Três Marias está apresentada nas Tabelas 8 e 9.

Na Tabela 8 são comparados os níveis de glicose dos moluscos submetidos aos extratos aquosos, obtidos através do método de infusão para o período de observação de 4 dias. Já na Tabela 9 são comparados os níveis de glicose de diferentes períodos de observação, com extratos na concentração de 4,0%, além dos referidos controles.

Foram utilizados nos bioensaios dois grupos controle para a mesma localidade de coleta da planta, sendo um para o método de extração a frio e o outro para o método de extração a quente, não havendo diferença de metodologia para ambos. Devido a um erro experimental, o grupo controle do bioensaio com o extrato obtido pelo método de infusão, da localidade de Três Marias foi desconsiderado nas análises bioquímicas realizadas com 4 dias de observação. Para os demais períodos de observação os grupos controle foram mantidos.

Para os moluscos submetidos ao extrato SLFAqF-TM 4,0%, só foi possível realizar a coleta de hemolinfa no período de 4 dias de observação, devido ao grande número de moluscos mortos durante o bioensaio, sendo assim, os grupos controle de 30 e 60 dias, referente a este extrato não foram expressos.

De acordo com a Tabela 8, a análise estatística dos níveis de glicose na hemolinfa dos moluscos demonstrou, no período de 4 dias de observação, diferença significativa entre os extratos SLFAqQ-TM 10,0% e 7,0%, e entre a concentração de 10,0% e 4,0% do mesmo extrato.

Verificou-se, também, diferença significativa, no extrato SLFAqQ-TM 4,0%, porém em diferentes períodos observação, entre 4 dias e 60 dias e, entre 30 e 60 dias. Com o extrato SLFAqQ-TM 4,0% no período de 60 dias apresentou diferença significativa com o grupo controle do mesmo período, como verificado na Tabela 9.

Os moluscos submetidos ao extrato SLFAqF-TM 4,0% no período de 4 dias de observação apresentaram $24,94 \pm 4,215$ mmol/l de glicose enquanto o grupo controle $36,22 \pm 11,751$ mmol/l. Esses resultados quando analisados estatisticamente não apresentaram diferença significativa entre si.

De acordo com Thompson & Lee (1986) o conteúdo de glicose na hemolinfa de *B. glabrata* é precisamente regulado. Mello-Silva (2005) utilizou *B. glabrata* sobrevivente ao bioensaio com os extratos aquosos de *E. splendens* var. *hislopii*, coletando a hemolinfa após 48h de observação. Esta autora verificou que o látex na concentração de 0,4 mg/l determinava um aumento na concentração de glicose. Assim como, Ferreira (2006) utilizando a casca de *Stryphnodendron polyphyllum* (Martius, 1837) sobre *B. glabrata* verificou um aumento significativo nos níveis de glicose entre o grupo controle e os grupos tratados nas concentrações de 25 e 50mg/l.

No presente estudo foram verificados níveis elevados de glicose na hemolinfa dos moluscos sobreviventes aos bioensaios com as maiores concentrações do extrato SLFAqQ-TM. Diferenças significativas foram verificadas entre períodos de observação e também, do grupo testado com o grupo controle. Evidenciando, assim como no trabalho de Mello-Silva (2005) uma quebra da homeostase dos níveis glicêmicos, também observado por Livingstone & Zwaan (1983) e Liebsch & Becker (1990) em moluscos sob jejum.

Mello-Silva et al. (2006) testaram o extrato aquoso de *S. malacoxylon* sobre *B. glabrata*, realizando a coleta de hemolinfa nos períodos de 24h, 48h e 72h, não sendo verificada diferença significativa nos níveis de glicose, apesar do extrato de *S. malacoxylon* ter reduzido os níveis de glicose na hemolinfa.

Apesar do presente trabalho não ter apresentado como objetivo a dosagem de glicogênio, os resultados obtidos com a quantificação de glicose, permitem supor que em resposta ao estresse causado pela exposição aos extratos aquosos de *S. lycocarpum* houve uma aceleração da glicogenólise (quebra do glicogênio) o que acarretaria a elevação dos níveis glicêmicos, de acordo com Pinheiro (1996) e Lira et al. (2000).

Lira et al. (2000) verificaram uma diminuição no conteúdo de proteínas totais em *Bradybaena similaris* (Ferussac, 1821) sob condições de jejum, o que indica que o molusco estava utilizando as proteínas, para suprir suas necessidades energéticas, reduzindo assim os depósitos de carboidratos. No entanto, um aumento no conteúdo de proteínas totais foi observado no décimo dia de inanição. Segundo Pinheiro (1996) há uma grande redução da concentração de glicogênio da glândula digestiva. Esse aumento é devido, provavelmente, à liberação de proteínas dos tecidos do molusco, que podem ter sofrido lesões provocadas pela inanição (LIRA et al., 2000).

Tabela 8. Concentração de glicose na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* exposta aos extratos aquosos de *Solanum lycocarpum**, obtidos pelo método de infusão, procedente da localidade de Três Marias, no período de 4 dias de observação, sob condições experimentais.

Concentração (%)	Concentração de glicose (mmol/l) X ± DP
SLFAqQ – TM 10,0	36,08 ± 4,748 ^a
SLFAqQ – TM 7,0	18,20 ± 2,666 ^b
SLFAqQ – TM 4,0	21,03 ± 3,432 ^b

*SLFAqQ-TM (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, quente, Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG); Letras distintas indicam médias significativamente diferentes entre si. (P<0,05). O grupo controle quente de 4 dias de observação não consta na Tabela, pois foi descartado.

Tabela 9. Concentração de glicose na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* exposta aos extratos aquosos de *Solanum lycocarpum**, obtidos pelo método de infusão, procedente da localidade de Três Marias, nos períodos de 4, 30 e 60 dias de observação, sob condições experimentais.

Concentração (%)/tempo pós exposição	Concentração de glicose (mmol/l) X ± DP
SLFAqQ – TM 4,0/4 dias	21,03 ± 3,432 ^a
SLFAqQ – TM 4,0%/30 dias	33,24 ± 3,415 ^a
Controle quente/30 dias	37,923 ± 0,856 ^a
SLFAqQ – TM 4,0%/60 dias	50,13 ± 4,212 ^b
Controle quente/60 dias	33,97 ± 4,064 ^c

*SLFAqQ-TM (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, quente, Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG); Letras distintas indicam médias significativamente diferentes entre si, (P<0,05), no mesmo período de observação e no mesmo extrato. O grupo controle quente de 4 dias de observação não consta na Tabela, pois foi descartado.

As alterações nos níveis de glicose dos moluscos submetidos aos extratos aquosos de *S. lycocarpum* procedente de da localidade do Campus Seropédica da UFRRJ, pode ser verificada na Tabela 10.

A análise dos níveis de glicose na hemolinfa dos moluscos submetidos aos extratos apresenta diferença significativa, somente, entre os extratos SLFAqQ-UFRRJ 4,0 e SLFAqF-UFRRJ 4,0%, no período de 4 dias, o que pode ser explicado pela quebra da homeostase dos níveis glicêmicos (LIVINGSTONE & ZWAAN, 1983).

Tabela 10. Concentração de glicose na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* exposta aos extratos aquosos de *Solanum lycocarpum** procedente da localidade do Campus Seropédica da UFRRJ, nos períodos de 4, 30 e 60 dias de observação, sob condições experimentais.

Concentração (%)/tempo pós exposição	Concentração de glicose (mmol/l) X ± DP
SLFAqQ – UFRRJ 4,0/4dias	6,52 ± 0,980 ^a
Controle quente/4 dias	4,27 ± 2,475
SLFAqQ – UFRRJ 4,0%/30 dias	3,45 ± 2,457
Controle quente/30 dias	5,55 ± 0,889
SLFAqQ – UFRRJ 4,0%/60 dias	5,84 ± 1,405
Controle quente/60 dias	6,50 ± 5,235
SLFAqF – UFRRJ 4,0%/4 dias	18,97 ± 1,853 ^b
Controle frio/4 dias	4,01 ± 0,896
SLFAqF – UFRRJ 4,0%/30 dias	5,35 ± 4,830
SLFAqF – UFRRJ 4,0%/60 dias	5,84 ± 1,405

*SLFAqQ–UFRRJ (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, quente, Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ);

SLFAqF–UFRRJ (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, frio, Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ);

Somente as análises significativas serão mostradas na Tabela, onde letras distintas indicam médias significativamente diferentes entre si. (P<0,05).

4.4.2 Alterações nos níveis de uréia e ácido úrico

A Tabela 11 apresenta a variação nos níveis de uréia e ácido úrico dos moluscos submetidos aos extratos aquosos de *S. lycocarpum* procedente da localidade de Três Marias.

Conforme mencionado no item 4.4.1 devido a um erro experimental, o grupo controle quente, da localidade de Três Marias foi desconsiderado nas análises bioquímicas realizadas com 4 dias de observação. Para os demais períodos de observação o controle quente foi mantido.

Para os moluscos submetidos ao extrato SLFAqF-TM 4,0%, só foi possível realizar a coleta de hemolinfa no período de 4 dias observação, devido ao grande número de moluscos mortos durante o bioensaio, sendo assim, os grupos controle de 30 e 60 dias, referente a este extrato não foram expressos.

Nos níveis de uréia verificou-se uma diferença significativa entre os extratos: SLFAqQ-TM 10,0% e 7,0% e entre a concentração de 7,0% e a concentração de 4,0% do mesmo extrato, no período de 4 dias de observação. Verificou-se, também, diferença entre

extratos da mesma localidade, período e concentração, porém obtidos através de métodos diferenciados de extração, como o extrato SLFAqQ-TM 4,0% e SLFAqF-TM 4,0%, ambos com 4 dias de observação. Além do extrato SLFAqF-TM 4,0% de 4 dias e o grupo controle.

A análise estatística da variação nos níveis de ácido úrico na hemolinfa de *B. glabrata* exposta aos extratos aquosos de *S. lycocarpum* não evidenciou diferença significativa entre os resultados obtidos.

A utilização de substratos alternativos tais como proteínas e aminoácidos livres em substituição aos carboidratos já escassos, pode ocorrer devido a alguma situação de estresse. Como consequência desta utilização, ocorre uma elevação dos conteúdos de produtos nitrogenados de degradação: uréia, ácido úrico e amônia (PINHEIRO, 2007).

De acordo com Becker & Schmale (1975) os produtos nitrogenados indicam, dependendo da sua quantidade, a atividade do metabolismo de proteínas. A aceleração do metabolismo de proteínas pode ser observada em uma situação de estresse, como por exemplo, o aumento da taxa de reprodução.

Becker & Schmale (1978) verificaram que *B. glabrata* submetida à inanição e dessecação, apresentou um aumento na concentração de uréia. Resultados semelhantes foram obtidos por Ferreira (2006) que utilizou a casca de *Stryphnodendron polyphyllum* (Martius, 1837) sobre *B. glabrata* verificando um aumento significativo nos níveis de uréia entre os grupos expostos a 50mg/l e 25mg/l.

Quando *B. glabrata* está infectada ou sob condições de jejum e estivação, a produção de amônia cai aproximadamente 22,0% ou permanece constante. No entanto, a excreção de uréia aumenta de quatro a cinco vezes. Já os níveis de ácido úrico nos rins e nos tecidos ficam muito baixos ou encontram-se abaixo dos limites detectáveis (STANISLAWSKI & BECKER, 1979).

Resultados semelhantes foram obtidos no presente estudo, onde houve um aumento significativo no conteúdo de uréia nos moluscos submetidos aos extratos.

Nesta situação, observa-se uma mudança do amoniotelismo para uma combinação de amoniotelismo – ureotelismo, durante o período de estresse fisiológico, como uma tentativa de desintoxicar os aminoácidos ou a amônia produzida durante o período de estresse (BISHOP et al., 1983).

A uréia é um metabólito menos tóxico, quando comparado ao ácido úrico, sendo facilmente eliminado, já que o molusco habita em um meio rico em água (BECKER, 1980).

Schmale & Becker (1977) encontraram níveis mais elevados de enzimas do ciclo da uréia nos tecidos dos moluscos submetidos a estresse, quando comparados com os moluscos alimentados. A perda de nitrogênio aumentou durante os estresses metabólicos, resultando do aumento da biossíntese da uréia, através da ativação da via do ciclo da uréia (BISHOP et al., 1983). Ou seja, em situações de estresse, há aceleração do ciclo da uréia, como mecanismo de detoxicação do molusco.

Tabela 11. Concentração de uréia e ácido úrico na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* exposta aos extratos aquosos de *Solanum lycocarpum** procedente da localidade de Três Marias, nos períodos de 4, 30 e 60 dias de observação, sob condições experimentais.

Concentração (%) /tempo pós exposição	Análise bioquímica (mmol/l)	
	Uréia X ± DP	Ácido úrico X ± DP
SLFAqQ – TM 10,0/4 dias	123,53 ± 23,892 ^a	2,02 ± 0,142
SLFAqQ – TM 7,0/4 dias	679,36 ± 128,55 ^b	1,64 ± 0,336
SLFAqQ – TM 4,0/4 dias	81,950 ± 32,735 ^{a,c,C}	1,37 ± 0,427
SLFAqQ – TM 4,0%/30 dias	148,60 ± 28,418	1,483 ± 0,530
Controle quente/30 dias	266,69 ± 41,190	1,41 ± 0,502
SLFAqQ – TM 4,0%/60 dias	202,23 ± 89,699	3,10 ± 0,877
Controle quente/60 dias	479,74 ± 127,88	1,64 ± 0,177
SLFAqF – TM 4,0%/4 dias	56,92 ± 28,485 ^{A,D}	1,96 ± 0,160
Controle frio/4 dias	278,48 ± 86,513 ^B	1,84 ± 0,319

*SLFAqQ–TM (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, quente, Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG);

SLFAqF–TM (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, frio, Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG).

Somente as análises significativas estão demonstradas na Tabela, onde letras distintas indicam médias significativamente diferentes entre si. (P<0,05). Letras minúsculas representam a comparação por extrato (SLFAqQ-TM) no período de 4 dias; letras maiúsculas comparam o extrato através do método de maceração estática, e as letras (C e D) comparam os métodos de extração, dos extratos na concentração de 4,0% com 4 dias de observação.

As alterações nos níveis de uréia e ácido úrico dos moluscos submetidos aos extratos aquosos de *S. lycocarpum* procedente da localidade do Campus Seropédica da UFRRJ, pode ser verificada na Tabela 12. Não foi evidenciada diferença significativa entre as concentrações de uréia, nem de ácido úrico.

Tabela 12. Concentração de uréia e ácido úrico na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* exposta aos extratos aquosos de *Solanum lycocarpum** procedente da localidade do Campus Seropédica da UFRRJ, nos períodos de 4, 30 e 60 dias de observação, sob condições experimentais.

Concentração (%)/tempo pós exposição	Análise bioquímica (mmol/l)	
	Uréia X ± DP	Ácido úrico X ± DP
SLFAqQ – UFRRJ 4,0/4 dias	19,14 ± 12,608	0,44 ± 0,401
Controle quente/4 dias	161,55 ± 178,22	0,23 ± 0,030
SLFAqQ – UFRRJ 4,0%/30 dias	12,56 ± 6,475	0,08 ± 0,081
Controle quente/30 dias	35,30 ± 45,925	0,28 ± 0,144
SLFAqQ – UFRRJ 4,0%/60 dias	12,56 ± 6,475	0,74 ± 0,478
Controle quente/60 dias	8,37 ± 8,486	0,28 ± 0,144
SLFAqF – UFRRJ 4,0%/4 dias	81,38 ± 24,241	0,87 ± 0,147
SLFAqF – UFRRJ 4,0%/30 dias	49,07 ± 58,576	0,54 ± 0,266
SLFAqF – UFRRJ 4,0%/60 dias	30,52 ± 23,340	2,29 ± 2,245
Controle frio/4 dias	59,840 ± 38,102	0,95 ± 0,215

*SLFAqQ–UFRRJ (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, quente, Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ);

SLFAqF–UFRRJ (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, frio, Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ);

As análises não estão demonstradas na Tabela, pois não foram significativas.

4.5 Efeitos crônicos verificados na geração F1 de *Biomphalaria glabrata* sobrevivente aos bioensaios com extratos aquosos de *Solanum lycocarpum* ao final de 90 dias de observação

4.5.1 Influência sobre a taxa de mortalidade dos moluscos da geração F1

A análise estatística do número de moluscos mortos da geração F1, ao final dos 90 dias de observação, realizada através do Testes de Kruskal-Wallis, verificada na Tabela 13, demonstrou que há diferença significativa entre os resultados obtidos a partir dos moluscos sobreviventes aos extratos SLFAqQ e SLFAqF na concentração de 4,0% da localidade do Campus Seropédica da UFRRJ com seus respectivos grupos controle.

A análise por extrato, comparando-se as localidades de procedência da planta, na concentração de 4,0%, demonstrou diferença significativa, somente no método de extração por infusão.

Tabela 13. Número médio de moluscos mortos da geração F1 de *Biomphalaria glabrata* obtida a partir dos moluscos sobreviventes aos bioensaios com extratos aquosos de *Solanum lycocarpum** ao final de 90 dias sob condições experimentais, sob condições experimentais.

Concentração (%)	Número de moluscos mortos da geração F1			
	SLFAqQ - UFRRJ	SLFAqF - UFRRJ	SLFAqQ - TM	SLFAqF - TM
4,0	11,167 ± 17,471 ^{a,A}	42,000 ± 118,810 ^{a,A,B}	0,916 ± 1,881 ^{a,B}	0,8333 ± 1,193 ^{a,A,B}
Controle	0,166 ± 0,577 ^{b,A}	0,667 ± 1,231 ^{b,A}	0 ^{a,A}	0,583 ± 1,165 ^{a,A}

*SLFAqQ – UFRRJ (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, quente, Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ).

SLFAqF – UFRRJ (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, frio, Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ).

SLFAqQ – TM (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, quente, Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG).

SLFAqF – TM (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, frio, Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG).

Letras distintas indicam médias significativamente diferentes entre si. (P<0,05)

Letras minúsculas representam a comparação por extrato e letras maiúsculas entre os extratos.

4.5.2 Influência sobre a reprodução dos moluscos da geração F1

Na Tabela 14 pode ser verificada a biologia reprodutiva dos moluscos da geração F1 ao final dos noventa dias de observação, analisando-se os seguintes parâmetros: massas ovíferas/molusco, ovos/molusco, ovos/massa ovígera, percentual de eclosão, percentual de sobrevivência dos moluscos eclodidos e o número de moluscos eclodidos/número de ovos.

O número de massas ovíferas da geração F1 foi bem menor quando comparada com o número de massas ovíferas dos moluscos sobreviventes.

De todos os grupos testados somente os moluscos sobreviventes aos bioensaios com os extratos SLFAqQ-TM na concentração de 10,0% e na concentração de 7,0%, produziram massas ovíferas, das quais originou-se a geração F1, conforme observado na Tabela 14.

Na Tabela 14 verifica-se que o extrato SLFAqQ-TM 10,0% foi o grupo exposto que apresentou a maior média de massas ovíferas/molusco, ovos/molusco, ovos/massa ovígera e o maior percentual de eclosão (80,33%). Consequentemente apresentou a maior média de moluscos eclodidos/número de ovos. No entanto, o percentual de sobrevivência dos moluscos eclodidos (geração F2), foi de aproximadamente 33,0%.

Já os moluscos da geração F1 obtida através dos moluscos sobreviventes ao extrato SLFAqQ-TM 7,0% apresentaram baixíssimas médias de massas ovíferas/molusco, ovos/molusco e ovos/massa ovígera. Além disso, não foi verificada a eclosão ao longo dos 90 dias de observação, como verificado na Tabela 14.

A geração F1 obtida a partir dos moluscos sobreviventes aos bioensaios com todos os extratos utilizados na concentração de 4,0%, não produziram massas ovíferas, ao longo dos 90 dias de observação, de acordo com a Tabela 14.

Os moluscos dos grupos controle apresentaram médias semelhantes, sendo que um deles apresentou a maior média de massas ovíferas/molusco, o que não acarretou a maior média de ovos/molusco, nem de ovos/massas ovíferas.

Somente um dos grupos, Controle frio-TM, não apresentou moluscos eclodidos. Os demais grupos controle apresentaram 100,0% e 50,0% de sobrevivência da geração F2 conforme observado na Tabela 14.

Tabela 14. Biologia reprodutiva da geração F1 de *Biomphalaria glabrata* sobrevivente aos bioensaios com extratos aquosos de *Solanum lycocarpum** ao final de 90 dias de observação, sob condições experimentais.

Extratos utilizados*	Massas ovíferas/molusco**	Ovos/molusco**	Ovos/massas ovíferas**	(%) de eclosão	(%) de sobrevivência	Eclodidos/nº ovos**
SLFAqQ-UFRRJ 4,0%	0	0	0	0	0	0
Controle quente-UFRRJ	0,075	1,404	3,100	0,80	100	0,0006
SLFAqQ-TM 10,0%	0,642	20,860	9,464	80,33	32,77	0,7178
SLFAqQ-TM 7,0%	0,007	0,06	1,041	0	0	0
SLFAqQ-TM 4,0%	0	0	0	0	0	0
Controle quente-TM	0,125	1,225	4,014	5,44	50	0,0208
SLFAqF-UFRRJ 4,0%	0	0	0	0	0	0
Controle frio-UFRRJ	0,016	0,166	2,282	2,98	50	0,005
SLFAqF-TM 4,0%	0	0	0	0	0	0
Controle frio-TM	0,010	0,08	1,875	0	0	0

*SLFAqQ – UFRRJ (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, quente, Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ).

SLFAqF – UFRRJ (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, frio, Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ).

SLFAqQ – TM (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, quente, Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG).

SLFAqF – TM (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, frio, Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG).

** Média das médias ao longo de 90 dias.

De acordo com a Tabela 15, a análise estatística demonstrou uma diferença significativa entre o número de massas ovíferas/molusco produzidas pela geração F1 obtida a partir dos moluscos sobreviventes ao extrato SLFAqQ-TM entre as concentrações de 10,0%, 7,0%, 4,0% e do grupo controle. Não havendo diferença entre os resultados obtidos com a geração F1 obtida a partir dos demais moluscos sobreviventes.

Tabela 15. Número de massas ovíferas/molusco produzidos pela geração F1 obtida a partir de *Biomphalaria glabrata* sobrevivente aos bioensaios com extratos aquosos de *Solanum lycocarpum** ao final de 90 dias, sob condições experimentais.

Concentração (%)	Número de massas ovíferas/molusco			
	SLFAqQ - UFRRJ	SLFAqF - UFRRJ	SLFAqQ - TM	SLFAqF - TM
10,0	-	-	0,642 ± 0,868 ^a	-
7,0	-	-	0,007 ± 0,018 ^b	-
4,0	0 ^{a,A}	0 ^{a,A}	0 ^{b,A}	0 ^{a,A}
Controle	0,075 ± 0,154 ^{a,A}	0,016 ± 0,027 ^{a,A}	0,125 ± 0,191 ^{b,A}	0,010 ± 0,019 ^{a,A}

*SLFAqQ - UFRRJ (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, quente, Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ).

SLFAqF - UFRRJ (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, frio, Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ).

SLFAqQ - TM (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, quente, Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG).

SLFAqF - TM (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, frio, Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG).

Letras distintas indicam médias significativamente diferentes entre si. (P<0,05)

Letras minúsculas representam a comparação por extrato e letras maiúsculas entre os extratos.

A Tabela 16 apresenta a análise estatística do número de ovos/molusco. Verificou-se que houve diferença significativa, somente, entre os resultados obtidos com a geração F1 obtida a partir dos moluscos sobreviventes ao extrato SLFAqQ-TM, nas concentrações de 10,0%, 7,0 e 4,0%.

Tabela 16. Número de ovos/molusco produzidos pela geração F1 obtida a partir de *Biomphalaria glabrata* sobrevivente aos bioensaios com extratos aquosos de *Solanum lycocarpum** ao final de 90 dias, sob condições experimentais.

Concentração (%)	Número de ovos/molusco			
	SLFAqQ - UFRRJ	SLFAqF - UFRRJ	SLFAqQ – TM	SLFAqF - TM
10,0	-	-	20,860 ± 21,340 ^a	-
7,0	-	-	0,060 ± 0,133 ^b	-
4,0	0 ^{a,A}	0 ^{a,A}	0 ^{b,A}	0 ^{a,A}
Controle	1,042 ± 2,437 ^{a,A}	0,166 ± 0,0278 ^{a,A}	1,225 ± 1,708 ^{a,b,A}	0,085 ± 0,230 ^{a,A}

*SLFAqQ – UFRRJ (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, quente, Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ).

SLFAqF – UFRRJ (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, frio, Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ).

SLFAqQ – TM (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, quente, Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG).

SLFAqF – TM (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, frio, Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG).

Letras distintas indicam médias significativamente diferentes entre si. (P<0,05)

Letras minúsculas representam a comparação por extrato e letras maiúsculas entre os extratos.

Quando a análise estatística do número de ovos é feita pela quantidade de massas ovígeras presentes, observa-se que a diferença só ocorre entre a concentração de 10,0% e 4,0% do extrato SLFAqQ-TM, conforme verificado na Tabela 17.

Tabela 17. Número de ovos/massa ovígera produzidos pela geração F1 de *Biomphalaria glabrata* obtida a partir dos moluscos sobreviventes aos bioensaios com extratos aquosos de *Solanum lycocarpum** ao final de 90 dias, sob condições experimentais.

Concentração (%)	Número de ovos /massa ovígera			
	SLFAqQ - UFRRJ	SLFAqF - UFRRJ	SLFAqQ – TM	SLFAqF - TM
10,0	-	-	9,464 ± 11,776 ^a	-
7,0	-	-	1,042 ± 2,491 ^{a,b}	-
4,0	0 ^{a,A}	0 ^{a,A}	0 ^{b,A}	0 ^{a,A}
Controle	3,100 ± 7,597 ^{a,A}	2,283 ± 4,169 ^{a,A}	4,014 ± 5,366 ^{a,b,A}	1,875 ± 4,411 ^{a,A}

*SLFAqQ – UFRRJ (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, quente, Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ).

SLFAqF – UFRRJ (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, frio, Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ).

SLFAqQ – TM (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, quente, Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG).

SLFAqF – TM (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, frio, Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG).

Letras distintas indicam médias significativamente diferentes entre si. (P<0,05)

Letras minúsculas representam a comparação por extrato e letras maiúsculas entre os extratos.

Assim como verificado nos parâmetros: massas ovígeras/moluscos e número de ovos tanto por molusco quanto por massa ovígera, a diferença significativa encontra-se apenas entre os resultados obtidos com a geração F1 obtida a partir dos moluscos sobreviventes ao bioensaio com o extrato SLFAqQ-TM, entre a concentração de 10,0% e as demais concentrações, conforme verificado na Tabela 18. Os resultados obtidos demonstram que, neste caso, não foi observado o processo de compensação no parâmetro da eclosão. Contudo, pode ter ocorrido alguma alteração genética em seu processo reprodutivo, já que houve influência do extrato na geração seguinte.

Tabela 18. Número de moluscos eclodidos/número de ovos da geração F1 de *Biomphalaria glabrata* obtida a partir dos moluscos sobreviventes aos bioensaios com extratos aquosos de *Solanum lycocarpum** ao final de 90 dias, sob condições experimentais.

Concentração (%)	Número de moluscos eclodidos/número de ovos			
	SLFAqQ - UFRRJ	SLFAqF - UFRRJ	SLFAqQ – TM	SLFAqF - TM
10,0	-	-	0,717 ± 1,225 ^a	-
7,0	-	-	0 ^b	-
4,0	0 ^{a,A}	0 ^{a,A}	0 ^b	0 ^{a,A}
Controle	0,0006 ± 0,002 ^{a,A}	0,005 ± 0,017 ^{a,A}	0,020 ± 0,049 ^{b,A}	0 ^{a,A}

*SLFAqQ – UFRRJ (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, quente, Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ).

SLFAqF – UFRRJ (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, frio, Campus Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ).

SLFAqQ – TM (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, quente, Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG).

SLFAqF – TM (*Solanum lycocarpum*, folha, aquoso, frio, Estação Ecológica de Pirapitinga, Três Marias, MG).

Letras distintas indicam médias significativamente diferentes entre si. (P<0,05)

Letras minúsculas representam a comparação por extrato e letras maiúsculas entre os extratos.

O mais interessante é que os moluscos da geração F1, obtida a partir dos sobreviventes ao extrato SLFAqF-UFRRJ 4,0%, que apresentaram o maior percentual de eclosão, não resultou em elevados percentuais de sobrevivência dos moluscos eclodidos. Sendo estes, os moluscos que apresentaram o segundo maior número de massas ovíferas/molusco e o terceiro maior número de ovos/massa ovígera.

O que refletiu na geração F1, pois tanto o método de extração quanto a localidade de procedência da planta, influenciaram a sobrevivência dos moluscos eclodidos. O método de maceração estática determinou uma maior taxa de mortalidade, se comparado ao método de infusão. Isso ocorre, quando a localidade de estudo é o Campus Seropédica da UFRRJ na concentração de 4,0%.

Os resultados obtidos no presente estudo encontram apoio em Oliveira-Filho (2003). Segundo este autor, durante o crescimento da geração F1 de *B. tenagophila* exposta ao endossulfan (inseticida) de forma continuada, os moluscos recém eclodidos apresentaram maior suscetibilidade, o que resultou em elevados percentuais de mortalidade. Isto porque, os embriões, protegidos no interior dos ovos e pela massa que os envolve, são menos suscetíveis que os moluscos adultos e os recém-eclodidos.

Os moluscos da geração F1 obtida a partir dos sobreviventes dos bioensaios com os extratos SLFAqQ-TM 10,0% e 7,0% e SLFAqF-TM 4,0% que apresentaram número reduzido de massas ovíferas e ovos, apresentaram elevados percentuais de sobrevivência, neste caso pode-se dizer que houve uma interferência expressa na forma de compensação da fecundidade na eclosão.

Souza (1992) utilizou extratos hexânicos de *Anacardium occidentale* L. (castanha-de-caju) sobre *B. glabrata*, verificando uma redução de 2,5 a 7 vezes do número de massas

ovíferas/molusco e de 40,6 a 55,4% do número médio de ovo/molusco, quando comparado com o grupo controle.

Analogamente, Mello-Silva (2005) também avaliou a biologia reprodutiva de *B. glabrata* sobrevivente ao bioensaio utilizando a CL₅₀ de *E. splendens* var. *hislopii* analisando-os por cinco semanas. Quando analisou o número total de massas ovíferas, verificou que ocorreu uma redução de 52,01% do grupo tratado para o grupo controle, o mesmo foi observado quando a comparação foi feita pelo número de massas ovíferas/molusco, apresentando uma redução de 25,14%. Tanto o número de ovos/molusco, quanto o número de ovos/massa ovígera apresentaram redução quando comparados ao grupo controle, porém até a terceira semana. No entanto, a partir da quarta semana houve um aumento no número de ovos, em ambos os grupos.

Neste caso, ocorreu o processo de compensação da fecundidade, pois o número de massas ovígera foi reduzido, porém, o número de ovos por massa ovígera aumentou. Seria um processo de maior eficiência energética (MINCHELLA, 1985).

Mello-Silva (2005) observou diferença significativa no número médio de moluscos eclodidos entre o grupo testado e controle, que apresentaram durante todo o período de observação maior eclodibilidade do que os tratados.

O trabalho de Corrêa (2006) também avaliou a biologia reprodutiva de *B. glabrata* após 24h de observação, em bioensaios com a casca do caule de *Pterodon emarginatus* Vogel, *Magonia pubescens* St. Hil. e *Croton urucurana* Baill. O pó destas espécies foi submetido, separadamente, por percolação com etanol por 72h, por duas vezes consecutivas.

O extrato de *M. pubescens* nas concentrações de 100, 50, 25 e 12,5 ppm, não influenciaram a eclosão das massas ovíferas, porém os extratos de *P. emarginatus* e *C. urucurana* ambos na concentração de 100 ppm, apresentaram um aumento no número de massas ovíferas durante as oito semanas de observação, quando comparados com o grupo controle (CORRÊA, 2006).

Alguns trabalhos expõem as massas ovíferas dos moluscos diretamente ao extrato, o que normalmente requer uma maior concentração do mesmo, para que possa ser verificada sua ação.

Um exemplo é o trabalho de Leyton et al. (2005) que verificaram que soluções de concentração de até 1000ppm, obtidas a partir dos extratos aquosos a quente e a frio de *L. esculentum*, não demonstraram efeito sobre as desovas de *B. glabrata*.

Elevadas concentrações dos extratos, também, foram necessárias para as desovas de *B. glabrata* expostas a *Euphorbia cotinifolia* L., aproximadamente 20 vezes superiores as utilizadas para moluscos adultos (PEREIRA et al., 1978). Assim como Schall et al. (1998) que verificaram que para atingir 100,0% de mortalidade das massas ovíferas de *B. glabrata* seria necessário uma concentração de 1500 ppm, e apenas 0,2 ppm para moluscos recém-eclodidos, à semelhança dos adultos.

Corrêa (2006) expôs as massas ovíferas por 24h aos extratos de *M. pubescens* e *P. emarginatus* nas concentrações de 50, 25 e 12,5 ppm, verificando que não houve influência sobre a eclosão, pois 100,0% dos moluscos eclodiram, porém houve 100,0% de mortalidade dos recém-eclodidos.

A dificuldade de ação dos extratos sobre as massas ovíferas, também, foi verificado por Rouquayrol et al. (1973). Estes autores verificaram que os extratos orgânicos de *Pithecelobium multiflorum* Bent. eram menos ativos sobre as massas ovíferas do que sobre os moluscos adultos de *B. glabrata*.

Segundo Joosse & van Elk (1986), quando os moluscos são submetidos a condições de estresse, podem apresentar alterações nas suas vias metabólicas, desencadeando, como por exemplo, uma alteração em seu processo reprodutivo.

Vários estudos demonstraram as alterações na função reprodutiva de moluscos infectados com larvas de trematódeos, geralmente o processo de castração parasitária, que por definição de Baudoin (1975) é: “a destruição dos tecidos da gônada dos parasitos”, classificando-a em direta, onde há uma interferência direta sobre as gônadas dos moluscos ou indireta, onde há o desvio de nutrientes, que seriam utilizados para o desenvolvimento e manutenção das gônadas ou por ação de hormônios.

A relação *B. glabrata* - *S. mansoni*, pode produzir um aumento do número de massa ovígeras, no início do processo de infecção, para compensar, o número reduzido de massas ovígeras produzidas durante o desenvolvimento do parasito (MINCHELLA, 1985).

Thornhill et al. (1986), também, estudaram a relação *B. glabrata* – *S. mansoni* e verificaram um aumento significativo no número médio de ovos nos períodos de 14 a 21 e 22 a 28 dias de infecção, e também, um aumento do número de ovos por massa ovígera.

Oliveira-Filho (2003) investigou os efeitos de reconhecidos moluscidas (sulfato de cobre, hidróxido de trifetil estanho, niclosamida e *Euphorbia milli*, que foram testados nas concentrações sub-letais, sobre o desenvolvimento embrionário de *B. glabrata*, após exposição de 4 dias e observação contínua de 6 dias.

A exposição à niclosamida não ocasionou malformações embrionárias, sendo letal para os embriões em CL₅₀ inferior ao do sulfato de cobre e para o látex. Os grupos expostos ao sulfato de cobre e trifetil estanho, apresentaram poucas malformações e efeitos embriofetais. O látex de *E. milli* foi praticamente desprovido de efeito embriofetal nas primeiras 24h, mas um expressivo efeito teratogênico, induzindo malformações nos embriões em concentrações a partir de 1mg/L, sendo a partir de 10mg/L notadas em 100,0% dos indivíduos vivos (OLIVEIRA-FILHO, 2003).

Oliveira-Filho (2003) realizou também, um estudo para avaliar os efeitos crônicos de substâncias químicas de comprovada presença no ambiente aquático (endossulfan – inseticida, nonilfenol etoxilado - intermediário na indústria química: emulsificantes, dispersantes, detergentes, e atrazina - herbicida) sobre a sobrevivência e a reprodução de *B. tenagophila*, através de exposição contínua e descontinuada, visando a reversibilidade dos efeitos, após sua retirada.

O endossulfan, apresentou um efeito inibitório sobre a reprodução de *B. tenagophila* na concentração de 0,1 mg/L. No entanto, cessada a exposição, ou seja, geração F1 não exposta, houve uma aparente efeito rebote, quanto aos parâmetros relacionados à fecundidade (ovos/indivíduo e massas ovígeras/indivíduo). O que sugere, não somente que a inibição foi revertida como há também uma estimulação compensatória (OLIVEIRA-FILHO, 2003).

Diferentemente, do trabalho de Oliveira-Filho (2003), no presente estudo, foi utilizada somente a exposição descontinuada, ou seja, sem a presença do extrato ao longo dos 90 dias de observação, somente, os moluscos da geração F0 foram submetidos aos extratos. Não sendo verificada irreversibilidade dos parâmetros da fecundidade da geração F1. Já que os moluscos que foram submetidos a todos os extratos na concentração de 4,0% não apresentaram massas ovígeras ao longo dos 90 dias de observação, conforme Tabela 13. Ou seja, o efeito inibitório prosseguiu da geração F0 para a geração F1. Estudos posteriores deverão ser realizados para maior detalhamento da ação dos extratos sobre a fisiologia reprodutiva dos moluscos.

Ao testar o nonilfenol etoxilado, Oliveira-Filho (2003) verificou na geração F1 um aumento significativo de malformações no grupo exposto à maior concentração (1,0 mg/L), não havendo eclosão dos embriões malformados ao final do período de observação de 10 dias

De acordo com Oliveira-Filho (2003) a geração F0, quando submetida, ao nonilfenol etoxilado nas concentrações de 0,1 e 1,0 mg/L, apresentou redução da fecundidade, expressa no número de ovos e massas ovígeras/molusco. Czech et al. (2001) observou uma diminuição

significativa do número de massas ovíferas de caramujos da espécie *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758) expostos à concentração de 0,1 mg/L do 4-nonilfenol.

No presente estudo, os únicos moluscos que produziram massas ovíferas foram aqueles da geração F1 obtida a partir dos moluscos sobreviventes aos bioensaios com os extratos SLFAqQ-TM nas concentrações de 10,0% e 7,0%. No entanto, apesar de apresentarem um elevado percentual de eclosão, o percentual de sobrevivência na concentração de 10,0% foi de aproximadamente 33,0%. Já na concentração de 7,0%, apesar da presença de massas ovíferas, não houve moluscos eclodidos, ao longo dos 90 dias de observação, conforme verificado na Tabela 10.

Analogamente ao presente estudo, Oliveira-Filho (2003) verificou que a exposição da geração F0 à atrazina na menor concentração (0,1mg/L) resultou uma média de ovos maior do que a do grupo controle. Ou seja, pode ter ocorrido um processo compensatório, pois embora o grupo tenha tido número menor de desovas por indivíduo, essa diferença foi compensada pela maior média de ovos por desova (OLIVEIRA-FILHO, 2003).

Oliveira-Filho (2003) verificou que a exposição continuada, tem um efeito na biologia reprodutiva da geração F1, que tiveram a fecundidade reduzida e o comprometimento no desenvolvimento dos embriões nas suas desovas.

No entanto, quando a reprodução da geração F1 teve sua exposição descontinuada, Oliveira-Filho (2003) não verificou diferença significativa em todos os parâmetros analisados em relação ao grupo controle, o que se mostrou contrário aos resultados obtidos no presente estudo, pois este apresentou influência dos extratos aquosos de *S. lycocarpum*, de forma descontinuada após 24h de observação dos moluscos sobreviventes aos bioensaios, sobre a geração F1.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que alguns extratos não apresentaram influência sobre a formação das massas ovíferas pela geração F1, o que seria considerado como efeito ovicida, mas, sim sobre a eclodibilidade. Estes resultados podem sugerir um efeito teratogênico, conforme observado por Oliveira-Filho et al. (1999), com moluscos expostos ao látex de *E. milli*.

De acordo com (BANTLE, 1995), o desenvolvimento do embrião é considerado uma das etapas mais suscetíveis aos efeitos adversos de substâncias químicas, pois durante esse período, os processos realizados para gerar um organismo multicelular, são sensíveis e perturbáveis.

Para maior esclarecimento da ação biológica apresentada pelos extratos utilizados no presente estudo, torna-se necessária a realização de novos ensaios biológicos que permitam melhor avaliar a atividade moluscicida de *S. lycocarpum*. Assim como também, detalhamento da composição química e seus mecanismos de ação.

5 CONCLUSÕES

- Os extratos aquosos de *Solanum lycocarpum* procedentes de ambas as localidades de coleta da planta apresentaram atividade moluscicida.
- A utilização de amostras de planta da mesma espécie, porém de localidades diferentes, possibilita avaliar a influência de fatores abióticos, sobre os constituintes químicos da planta e conseqüentemente sobre seu potencial moluscicida.
- A utilização de métodos diferenciados de extração influenciou a determinação da CL₉₀, somente em uma das localidades de coleta da planta, tendo o método de maceração estática determinado a menor CL₉₀, quando comparado ao método de infusão.
- O método de extração “a frio”- maceração estática se mostrou equivalente ao método tradicional de infusão nas maiores concentrações, sendo o mais eficiente na menor concentração testada, na localidade de Três Marias.
- A observação dos moluscos sobreviventes aos bioensaios e da geração F1 possibilita avaliar parâmetros como a reprodução, quando se objetiva o controle das espécies, sendo necessária a inclusão desta metodologia nos protocolos para testes moluscicidas.
- Os indivíduos recém-eclodidos da geração F1 foram mais suscetíveis ao efeito letal das substâncias investigadas, provavelmente um efeito teratogênico, com prováveis malformações. Assim, como o parâmetro mortalidade da geração F1, sendo o efeito inibitório passado da geração F0 para a geração F1.
- Foi verificado efeito sobre a produção de massas ovíferas da geração F1, na concentração de 4,0% em ambas as localidades de coleta com os métodos de extração utilizados.
- Os extratos aquosos de *S. lycocarpum* causaram alterações nos níveis de glicose, uréia e ácido úrico da hemolinfa dos moluscos, apenas de uma das localidades de coleta da planta. Os moluscos podem ter degradado as reservas energéticas através da glicogenólise, além de possivelmente ter alterado os níveis de proteínas totais na hemolinfa, causando alteração na excreção dos produtos nitrogenados, necessário para a sobrevivência do molusco.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABÍLIO, F. J. P. **Aspectos bio-ecológicos da fauna malacológica, com ênfase a *Melanoides tuberculata* Müller, 1774 (Gastropoda: Thiaridae) em corpos aquáticos do Estado da Paraíba.** 1997. 150f. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

ABÍLIO, F. J. P. **Gastrópodes e outros invertebrados bentônicos do sedimento litorâneo e associado à macrófitas aquáticas em açudes do semi-árido paraibano, nordeste do Brasil.** 2002. 179f. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

AGRA, M. F. New Species of *Solanum* subgenus *Leptostemonum* (Solanaceae) from Chapada da Diamantina, Bahia, Brazil. **Novon**, v. 9, n. 3, p. 292-295. 1999.

ALVES, C. C. F.; AVES, J. M.; SILVA, T. M. S.; CARVALHO, M. G. de.; NETO, J. J. Atividade alelopática de alcalóides glicosilados de *Solanum crinitum* Lam. **Floresta e Ambiente**, v. 10, n.1, p. 93-97, 2003.

AMORIM, J. P. Infecção experimental e natural de murídeos pelo *Schistosoma mansoni* [nota prévia]. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 5, p. 219-222, 1953.

AMORIM, J. P.; PESSOA, S. B. Experiência de alguns vegetais como moluscocida. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 14, p. 255-260, 1962.

ANIMAL PICTURE Figura de *Oxymycterus*. **Animal Picture**. Disponível em: <<http://www.animalpicturesarchive.com/WebImg/073/1208856833-t.jpg>>. Acesso em 4 Jan. 2010.

ANTUNES, C.M.F.; MILLWARD, A.R.; KATZ, N.; COELHO, P.M.Z.; PELLEGRINO, J. Role of *Nectomys sqamipes* in the epidemiology of *Schistosoma mansoni* infection. **Experimental Parasitology**, v. 34, p. 181–188, 1973.

ARCHIBALD, R. G. The use of fruit of tree *Balanites aegyptiaca* in the control of Schistosomiasis in the Sudan. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 27, n. 2, p. 207-211, 1933.

BANTLE, J. A. A developmental toxicity assay using frog embryos. In: RAND, G. M. **Fundamentals of aquatic toxicology: Effects, environmental fate, and risk assessment.** Washington: Taylor & Francis, 1995.p. 207-230.

BARBOSA, F. S. Alguns aspectos das relações hospedeiro-parasito entre as fases larvárias do trematódeo *Schistosoma mansoni* e o molusco *Australorbis glabratus*. **Boletim da Fundação Gonçalo Muniz**, v. 15, p. 1-44, 1960.

BARBOSA, F. S. Natural infection with *Schistosoma mansoni* in small mammals trapped in the course of a schistosomiasis control project in Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 58, n. 2, p. 405-407, 1972.

- BARBOSA, F. S. **Tópicos em Malacologia Médica**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1995. 314p.
- BARBOSA, F. S.; BARBOSA, I.; ARRUDA, F. *Schistosoma mansoni*: natural infection of cattle in Brazil. **Science**, v. 138, n. 3542, p. 831, 1962.
- BARBOSA, F. S.; DOBBIN, Jr. J. E.; COELHO, M. V. Infestação natural de *Rattus rattus frugivorus* por *Schistosoma mansoni* em Pernambuco. **Publicações Avulsas do Instituto Ageu Magalhães**, v. 2, p. 43-46, 1953.
- BARBOSA, F. S.; MELLO, D. A. Ação moluscicida de plantas. **Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas**, v. 2, p. 364-366, 1969.
- BARBOSA, F. S.; OLIVIER, L. Studies on the snail vectors of bilharziasis mansoni in the North-Eastern Brazil. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 18, n. 5-6, p. 895-908, 1958.
- BAUDOIN, M. Host castration as a parasitic strategy. **Evolution**, v. 29, n. 2, p. 335-352, 1975.
- BECKER, W. Metabolic interrelationships of parasitic trematodes and molluscs, especially *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. **Zeitschrift fur Parasitenkunde**, v. 63, n. 2, p. 101-111, 1980.
- BECKER, W.; SCHMALE, H. The nitrogenous products of degradation – ammonia, urea, and uric acid – in the hemolymph of the snail *Biomphalaria glabrata*. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v. 51A, n. 2, p. 407-411, 1975.
- BECKER, W.; SCHMALE, H. The ammonia and urea excretion of *Biomphalaria glabrata* under different physiological conditions: starvation, infection with *Schistosoma mansoni*, dry keeping. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v. 59, n. 1, p. 75-79, 1978.
- BEZERRA, J. C. B.; KEMPER, A.; BECKER, W. Profile of organic acid concentrations in the digestive gland and hemolymph of *Biomphalaria glabrata* under estivation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 6, p. 779-784, 1999.
- BISHOP, S. H.; ELLIS, L. L.; BURCHAM, S. M. Amino acid metabolism in molluscs. In: HOCHACHKA, P. W. **The mollusca: Metabolic biochemistry and molecular biomechanics**, vol. 1. New York: Academic Press, 1983. p. 243-327.
- BLOGSPOT. Figura de *Holochilus brasiliensis* **Blogspot**. Disponível em: <http://4.bp.blogspot.com/_WrdzfkHDxmQ/SJE6tkICJI/AAAAAAAAABzw/mp1zOfj7hww/s400/rato+de+junc+o.jpg> e Figura de *Nectomys squamipes* Disponível em : <http://3.bp.blogspot.com/_WrdzfkHDxmQ/SJE642S6MI/AAAAAAAAABz4/DaDCHaFSDDE/s400/rato+dag+ua.jpg>. Acesso em: 4 Jan. 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Controle da Esquistossomose: Diretrizes técnicas**. 2ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 1998. 70p.:il.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 5ed. Brasília: FUNASA, 2002. 842p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica**: Diretrizes técnicas: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE). 2ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007. 178p.: il. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

CAMPOS, J. M. **O eterno plantio**: um reencontro com a natureza. São Paulo: Pensamento, 1994. 250 p.

CARIBÉ, J.; CAMPOS, J. M. **Plantas que Ajudam o Homem**: guia Prático para a Época Atual. 5 ed. Cultrix/Pensamento, São Paulo, 1991. 321p.

CARTER, S. A preliminary classification of *Euphorbia* subgenus *Euphorbia*. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 81, n. 2, p. 368-379, 1994.

CARVALHO, O. S.; ANDRADE, R. M.; CORTES, M. I. N. Ciclo vital do *Schistosoma mansoni* através do *Holochilus brasiliensis* (Desmaret), em ambiente semi-natural (Trematoda: Schistosomatidae; Rodentia: Cricetidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 10, p. 235-247, 1976.

CARVALHO, O. S.; CALDEIRA, R. L. Identificação morfológica de *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni*. Belo Horizonte: Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, 2004 CD. (Série Esquistossomose; n. 6).

CHENG, T. C.; LEE, F. O. Glucose levels in the mollusk *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*. **Journal of invertebrate pathology**, v. 18, n. 3, p. 395-399, 1971.

CHENG, T. C.; SULLIVAN, J. T. The effect of copper on the heart rate of *Biomphalaria glabrata* (Molluca: Pulmonata). **Comparative General Pharmacology**, v. 4, n.13, p. 37-41, 1973a.

CHENG, T. C.; SULLIVAN, J. T. A comparative study of the effects of two copper compounds on the respiration and survival of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata). **Comparative General Pharmacology**, v. 4, n. 16, p. 315-320, 1973 b.

CHENG, T. C.; SULLIVAN, J. T. Mode of entry, action and toxicity of copper molluscicides. In: **Molluscicides** in Schistosomiasis Control. London: Academic Press, 1974, p. 89-153.

CHIANG, P. K. Glycogen metabolism in the snail, *Biomphalaria glabrata*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 58B, n. 1, p. 9-12, 1977.

CHRISTIE, J. D.; FOSTER, W. B.; STAUBER, L. A. ¹⁴C uptake by *Schistosoma mansoni* from *Biomphalaria glabrata* exposed to ¹⁴C-glucose. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 23, n. 3, p. 297-302, 1974.

CIPOLLINI, M. L. Secondary metabolites of vertebrate-dispersed fruits: evidence for adaptive functions. **Revista Chilena de História Natural**, v. 73, n. 3, p. 421-440. 2000.

COELHO, P. M. Z.; LIMA, W. S.; NOGUEIRA, R. H. G. *Schistosoma mansoni*: on the possibility of Indisn buffalo (*Bubalus bubalis*) being experimentally infected. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 22, n. 3, p. 157-158, 1989.

COELHO, P. M. Z.; NOGUEIRA, R. H. G.; LIMA, W. S.; CUNHA, M. C. *Schistosoma mansoni*: experimental bovine Schistosomiasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 24, n. 6, p. 374-377, 1982.

CORREA, L. R.; PARAENSE, W. L. Susceptibility of *Biomphalaria amazonica* to infection with two strains of *Schistosoma mansoni*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 13, n. 6, p. 387-390, 1971.

CORRÊA, M, C, R. **A avaliação das plantas *Pterodon emarginatus* Vogel 1837, *Magonia pubescens* St. Hil, e *Croton urucurana* Baill 1864, sobre *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e cercaricida sobre *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907).** 2006. 85f. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical – Universidade Federal Goiás, Goiânia, Goiás.

CRONQUIST, A. **An integrate system of flowering plants.** New York: Columbia University Press, 1981.

CZECH, P., WEBER, K.; DIETRICH, D. R. Effects of endocrine modulating substances on reproduction in the hermaphroditic snail *Lymnaea stagnalis* L. **Aquatic Toxicology**, v. 53, n. 2, p. 103-114, 2001.

DALL'-AGNOL, R.; VON-POSER, G. L. The use of complex polysaccharides in the management of metabolic diseases: the case of *Solanum lycocarpum* fruits. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 1-2, p. 337-341, 2000.

DANNEMANN, R. D. A.; PIERI, O. S. Emigration from the water and lamella formation by *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) from different localities in the endemic areas of schistosomiasis in Brazil. **Journal of Medical and Applied Malacology**, v. 5, p. 31-37, 1993.

DESSEN, E. M. B. O processo de evolução. In: RAVEN, P. H; EVERT, R. F; EICHHORN, S, E. **Biologia Vegetal**. 6e. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 228-251.

DIAS, L. C. S.; ÁVILA-PIRES, F. D.; PINTO, A. C. M. Parasitological and ecological aspects of Schistosomiasis mansoni in the Valley of the Paraíba do Sul river (São Paulo State, Brazil). I. Natural infection of Small mammals with *Schistosoma mansoni*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n. 5, p. 496-500, 1978.

DOMÍNIO PÚBLICO. Formas de ação para o controle da esquistossomíase mansônica. Disponível em: <<http://www.dominiopublico.gov.br/download/imagem/ea000157.jpg>> Acesso em: 18 de Out 2009.

DUNCAN, J. A review of the development and application of molluscicides in schistosomiasis control. In: CHENG, T. C. **Molluscicides in Schistosomiasis Control.** London: Academic Press, 1974. p. 9-40.

DUNCAN, J. The biochemical and physiological basis of the mode of action of molluscicides. In: MOTT, K. E. **Plant molluscicides**. London: Academic Press, 1987. p. 27-44.

FAVRE, T. C.; PIERI, O. S.; BARBOSA, C. S. Aspectos malacológicos e epidemiológicos envolvidos na transmissão da esquistossomose em Pernambuco. In: SANTOS, B. dos. S.; PIMENTA, A. D.; THIENGO, S. C.; FERNANDEZ, M. A.; ABSALÃO, R. S. **Tópicos em Malacologia – Ecos do XVII EBRAM**. Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Malacologia, 2007. p.267-276.

FERREIRA, C. S. **Análise bioquímica e equilíbrio ácido-base em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni* (Sambom, 1907), sob a exposição ao *Stryphnodendron polyphyllum* (Martius, 1837), planta moluscicida do Cerrado brasileiro**. 2006. 106f. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás.

FRIEDMAN, M.; RAYBURN, J. R.; BANTLE, J. A. Developmental toxicology of potato alkaloids in the frog embryo teratogenesis assay-Xenopus (FETAX). **Food and Chemical Toxicology**, v. 29, n. 8, p. 537-547, 1991.

GALLOWAY, L. F.; FENSTER, C. B. Population differentiation in an annual legume: local adaptation. **Evolution**, v. 54, n. 4, p. 1173-1181, 2000.

GRASSELLI, C. S. M.; PARREIRAS, J. F. M.; MONTEIRO, J. B. R.; COSRA, N. M. B. Uso do amido dos frutos da lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) por indivíduos diabéticos: relato de casos. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 16, n. 1, p. 34-37. 2001.

HARRY, H. W.; ALDIRICH, D. V. The distress syndrome in *Taphisus glabratus* (Say), as a reaction to toxic concentrations of inorganic ions. **Malacologia**, v. 1, n. 2, p. 283-389, 1963.

HOSTETTMANN, K.; KIZU, H. & TOMIMORI, T. - Molluscicidal properties of various saponins. **Planta Médica**, v. 44, p. 34-35, 1982.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Carta imagem Estação Ecológica de Pirapitinga, MG**. Disponível em : <http://siscom.ibama.gov.br/mpt/MG/UC/ESEC_PIRAPITINGA_MG_A2.pdf> Acesso em: 20/Dez 2009.

JOOSSE, J.; VAN ELK, R. *Trichobilharzia ocellata*: physiological characterization of giant growth, glycogen depletion, and absence of reproductive activity in the intermediate snail host, *Lymnaea stagnalis*. **Experimental Parasitology**, v. 62, n. 1, p. 1-13, 1986.

JORNAL DE UBERABA. Cientistas buscam em vermes a cura da asma e da alergia. **Jornal de Uberaba**, Minas Gerais, 6 set. 2005. Disponível em: <<http://www.jornaldeuberaba.com.br/?MENU=CadernoB&SUBMENU=Saude&CODIGO=223>>. Acesso em: 21 Dez. 2009.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOG, E. A.; STEVENS, P. F. **Plant Systematics: a phylogenetic approach**. Massachusetts: Sinauer Associates, 1999. 464p.

KAROUM, KJ. O.; AMIN, M. A. Domestic and wild animals naturally infected with *Schistosoma mansoni* in the Gezira irrigate scheme. **The Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 2, p. 83-90, 1985.

KASSEN, R.; BELL, G. The ecology and genetics of fitness in *Chlamydomonas* x The relationship between genetic correlation and genetic distance. **Evolution**, v. 54, n. 2, p. 425-432, 2000.

KAWAZOE, U.; PINTO, A. C. M. Importância epidemiológica de alguns animais silvestres na esquistossomose mansônica. **Revista de Saúde Pública**, v. 17, n. 5, p. 345-366, 1983.

KEELING, M. J.; WILSON, H. B.; PACALA, S. W. Reinterpreting space, time lags, and functional responses in ecological models. **Science**, v. 290, n. 5497, p. 1758-1761, 2000.

KERK, G. J. M. van der; LUIJTEN, J. G. A. Organotin compounds III: biocidal properties of organotin compounds. **Journal of Applied Chemistry**, v. 4, n. 4, p. 314-321, 1954.

KERK, G. J. M. van der; LUIJTEN, J. G. A.; EGMOND, J. C. van; NOLTES, J. G. Progress in organotin chemistry. **Chimia**, v. 16, n. 1, p. 36-42, 1962.

KIESECKER, J. M. Synergism between trematode infection and pesticide exposure: A link to amphibian limb deformities in nature? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 15, p. 9900-9904, 2002.

KLOOS, H. & MCCULLOUGH, F. S. Plant Molluscicides. **Planta Medica**, v. 46, p. 195-209, 1982

KOSKELLA, B.; LIVELY, C. M. Advice of the rose: experimental coevolution of a trematode parasite and its snail host. **Evolution International Journal of Organic Evolution**, v. 61, n. 152-159, 2007.

KRISTT, A. C.; LIVELY, C. M.; LEVRI, E. P.; JOKELA, J. Spatial variation in susceptibility to infection in a snail-trematode interaction. **Parasitology**, v. 121, n. 4, p. 295-401, 2000.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Savier, 1985. 725p.

LEYTON, V.; HENDERSON, T. O.; MASCARA, D.; KAWANO, T. 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.

LIEBSCH, M.; BECKER, W. Comparative glucose tolerance studies in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*: influence of starvation and infection with the trematode *Schistosoma mansoni*. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 160, n. 1, p. 41-50, 1990.

LIRA, C. R. S.; GOMES, E. M.; CHAGAS, G. M.; PINHEIRO, J. Influência do jejum severo sobre o conteúdo de proteínas totais e de amônio na hemolinfa de *Bradybaena similaris* (Fèrussac) (Mollusca, Gastropoda, Xanthonychidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 17, n. 4, p. 907-913, 2000.

LIVINGSTONE, D. R.; DE ZWAAN, A. Carbohydrate metabolism of gastropods. In: HOCHACHKA, P. W. **The mollusca: Metabolic biochemistry and molecular biomechanics**, vol. 1. New York: Academic Press, 1983. p. 177-242.

LOMBARDI, J. A.; MOTTA Jr., J. C. Seed dispersal of *Solanum lycocarpum* St. Hil. (Solanaceae) by the maned wolf, *Chrysocyon brachyurus* Illiger (Mammalia, Canidae). **Ciência e Cultura**, v. 45, n. 2, p. 126-127. 1993.

LOPES, G. **Biomonitoramento dos extratos brutos e das frações glicoalcaloidais de seis espécies do gênero *Solanum*, frente à *Artemia salina* e ao caramujo *Biomphalaria glabrata* e reações com o alcalóide solasodina de *Solanum crinitum***. 2005. 89f. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Química Orgânica – Departamento de Química – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2 ed. Vol. II. Instituto Plantarum, 2002, 384p.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. de. A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. 2 ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008, 544p.

MAHMOUD, A. A. Schistosomiasis (bilharziasis): from antiquity to the present. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 18, n. 2, p. 207-218, 2004.

MARSTON, A.; HOSTETTMAN, K. Plant Molluscicides. **Phytochemistry**, v. 24 n. 4, p. 639-652, 1985.

MARSTON, A.; HOSTETTMAN, K. Assays for molluscicidal cercaricidal, schistotomicidal and piscicidal activities. In: **Methods in Plants Biochemistry** (Dey, P. M. and Harbone, J. B. eds). London: Academic Press, v. 6, p. 153-178, 1991.

MARTINS, A. V.; MARTINS, G.; BRITO, R. S. Reservatórios silvestres do *Schistosoma mansoni* no Estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 7, n. 2, p. 259-265, 1955.

MATOS, F. J. de. A. Introdução à fitoquímica Experimental. 3ed. Editora Universidade Federal do Ceará, 2009, 48p.

MELLO-SILVA, C. C. **Controle alternativo e alterações fisiológicas em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), hospedeiro intermediário de *Schistosoma mansoni* Sambom, 1907 pela ação do látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B (Euphorbiaceae)**. 2005. 85f. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

MELLO-SILVA, C. C.; LIMA, M.; PINHEIRO, J.; BEZERRA, J. C. B.; RODRIGUES, M. L. A. Alterações fisiológicas em *Biomphalaria glabrata* tratada com extrato bruto de *Solanum malacoxylon*. **Ciência Animal**, v. 16, n. 2, p. 61-70, 2006.

MENDES, N. M.; PEREIRA, J. P.; SOUZA, C. P.; OLIVEIRA, M. L. L. Ensaio preliminares em laboratório para verificar a ação moluscicida de algumas espécies da flora brasileira. **Revista de Saúde Pública de São Paulo**, v. 18, p. 348-354, 1984.

- MEULEMAN, E. A. Host-parasite interrelationships between the freshwater pulmonate *Biomphalaria pfeifferi* and trematode *Schistosoma mansoni*. **Netherlands Journal of Zoology**, v. 22, n. 4, p. 355-427, 1971.
- MILLWARD DE ANDRADE, R.; CARVALHO, O. S.; CORTES, M. I. N. Ciclo vital do *Schistosoma mansoni* através do *Holochilus brasiliensis* (Desmaret), em ambiente semi-natural. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**, v. 10, p. 235-247, 1976.
- MINCHELLA, D. J. Host life-history variation in response to parasitism. **Parasitology**, v. 90, n.1, p. 205-216, 1985.
- MODENA, C. M.; COELHO, P. M. Z.; BARBOSA, F. S.; LIMA, W. S. Transmission of *Schistosoma mansoni* under experimental conditions using the bovine-*Biomphalaria glabrata*-model. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 35, n. 1, p. 11-16, 1993.
- MODENA, C. M.; LIMA, W. S.; COELHO, P. M. Z. Wild and domesticated animals as reservoirs of *Schistosoma mansoni* in Brazil. **Acta Tropica**, v. 108, n. 2-3, p. 242-244, 2008.
- MODENA, C. M.; LIMA, W. S.; COELHO, P. M. Z.; BARBOSA, F. S. Aspectos epidemiológicos da esquistossomose mansoni em bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 46, n. 6, p. 481-488, 1991.
- MOHAMED, A. M.; ISHAK, M. M. Growth rate and changes in tissue carbohydrates during schistosome infection of the snail *Biomphalaria alexandrina*. **Hydrobiologia**, v. 76, n. 1-2, p. 17-21, 1981.
- MOTIDOME, M.; LEEKNING, M.; GOTTLIEB, O. R. A química de solanáceas brasileiras. I. A presença de solamargina no juá e na lobeira. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 42, (Suppl.), p. 375-376. 1970.
- MOTT, K. E. **Plant Molluscicides**. New York: Wiley, 1987. 326p.
- NELSON, G. S. Schistosoma infections as zoonoses in Africa. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 54, n. 4, p. 301-316, 1960.
- NOLAN, M. O.; BOND, H. W.; MANN, E. R. Results of laboratory screening tests of chemical compounds for molluscicidal activity. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 2, n. 4, p. 716-752, 1953.
- OCAMPO, E. M.; COELHO, P. M. Z.; LIMA, W. S.; NOGUEIRA, R. H. G. *Schistosoma mansoni*: infecção experimental em suínos (*Sus scrofa*). **Arquivo Escola Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, v. 33, n. 3, p. 467-470, 1981.
- OLIVEIRA, S. C. C. **Alelopatia em *Solanum lycocarpum* St. Hil. (Solanaceae)**. 2003. 78f. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Botânica – Departamento de Botânica – Instituto de Ciências Biológica - Universidade de Brasília, Brasília.

OLIVEIRA FILHO, A. T.; OLIVEIRA, L. C. A. Biologia floral de uma população de *Solanum lycocarpum* St. Hil. (Solanaceae) em Lavras, MG. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 11, n. 1-2, p. 23-32, 1988.

OLIVEIRA-FILHO, E. C. **Efeitos de substâncias químicas sobre a reprodução de moluscos de água doce: estudos com caramujos do gênero *Biomphalaria***. 2003. 139f. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação da Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

OLIVEIRA-FILHO, E. C., DE-CARVALHO, R. R.; PAUMGARTTEN, F. J. R. The influence of environmental factors on the molluscicidal activity of *Euphorbia milii* latex. **Journal of Environmental Science and Health Part B - Pesticides, Food And Agricultural Wastes**, v. 34, n. 2, p. 289-303, 1999.

OLIVER, L.; BARBOSA, F. S. Observations on vectors of Schistosomiasis mansoni kept out of water in the laboratory. **Journal of Parasitology**, v. 42, n. 3, p. 277-286, 1956.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **O controle da esquistossomose: segundo relatório do comitê de especialistas da OMS**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 1994. 110p. (Technical Reports Series, 830).

OSNAS, E. E.; LIVELY, C. M. Parasite dose, prevalence of infection and local adaptation in a host-parasite system. **Parasitology**, v. 128, n. 2, p. 223-228, 2004.

OVASKAINEN, O.; CORNELL, S. J. Space and stochasticity in population dynamics. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 34, p. 12781-12786, 2006.

PARAENSE, W. L. - Fauna planorbídica do Brasil. In: LACAZ, C. S.; BARUZZI, R. G.; SIQUEIRA Jr, W. **Introdução à geografia médica do Brasil**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda. e Editora da Universidade de São Paulo, 1972. p. 213-239.

PARAENSE, W. L. Susceptibility of *Biomphalaria peregrina* from Brazil e Ecuador to two strains of *Schistosoma mansoni*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 15, n. 3, p. 127-130, 1973.

PARAENSE, W. L. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. **Arquivo Museu Nacional RJ**, v. 55, p. 105-128. 1975.

PARAENSE, W. L.; CORREA, L. R. Further experiments on susceptibility of *Biomphalaria amazonica* to *Schistosoma mansoni*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 80, n. 3, p. 259-262, 1985.

PEREIRA, J. P.; SOUZA, C. P.; MENDES, N. M. Propriedades moluscicidas da *Euphorbia cotinifolia* L. **Revista Brasileira de Pesquisa Médica e Biológica**, v. 11, p. 345-351, 1978.

PIERI, O. S.; JURBERG, P. Aspectos etológicos na sobrevivência dos caramujos vetores da esquistossomose ao tratamento com moluscicidas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 76, n. 1, p. 47-55, 1981.

PIERI, O. S.; THOMAS, J. D. Induction of morphological, behavioural and physiological changes in a polymorphic population of *Biomphalaria glabrata* by an environmental factor of predictive value. **Journal of Medical and Applied Malacology**, v. 4, p. 43-56, 1992.

PINHEIRO, J. Influence of starvation on the glycogen and galactogen contents in the snail *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Mollusca, Gastropoda). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 39, n. 2, p. 349-357, 1996.

PINHEIRO, J. Alterações fisiológicas nas interações entre larvas de trematódeos e seu primeiro hospedeiro intermediário: os moluscos. In: SANTOS, S. B.; PIMENTA, A. D.; THIENGO, S. C.; FERNANDEZ, M. A.; ABSALÃO, R. S. **Tópicos em Malacologia: Ecos do XVIII Encontro Brasileiro de Malacologia**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Malacologia, 2007. p. 315-326.

PINHEIRO, J.; AMATO, S. B. *Eurytrema coelomaticum* (Digenea, Dicrocoeliidae): the effect of infection on carbohydrate contents of its intermediate snail host, *Bradybaena similaris* (Gastropoda, Xanthonychidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 3, p. 407-410, 1994.

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

PITCHFORD, R. J. A checklist of definitive hosts exhibiting evidence of the genus *Schistosoma* Weinland, 1858 acquired naturally in Africa and the Middle East. **Journal of Helminthology**, v. 51, n. 3, p. 229-252, 1977.

PIVA, N.; BARROS, P. R. C. Infecção natural de animais silvestres e domésticos pelo *Schistosoma mansoni* em Sergipe. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 18, p. 221-233, 1966.

POULIN, R. Are there general laws in parasite ecology? **Parasitology**, v. 134, n. 6, p. 763-776, 2007.

PRATA, A. Esquistossomose mansônica. In: **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 885-904. 1987

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. M. R. **Técnicas farmacêuticas e farmácia galênica**. Vol 2. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian, 1990. 518p.

REY, L. **Parasitologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, 2008. 883p.

ROUQUAYROL, M. Z.; SOUZA, M. P.; MATOS, F. J. A. Actividad molusquicida Del *Pithecelobium multiflorum*. **Boletín de La Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 70, p. 170-171, 1973.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados: Uma abordagem funcional-evolutiva**, 7ed. São Paulo: Roca, 2005. 1145p.

SÁ, R. C. S. E.; VIREQUE, A. A.; REIS, J. E. P.; GUERRA, M. O. Evaluation of the toxicity of *Solanum lycocarpum* in the reproductive system of male mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, n. 1-2, p. 283-287, 2000.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 3ed. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2007. 264p.

SANTOS, M. O. de; COELHO, A. D. F.; MONTANARI, R. M.; PINTO, E. S. da.; VICCINI, L. F. Variabilidade genética entre populações de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. HIL.). **Floresta e Ambiente**, v. 9, n. 1, p. 158-164, 2002.

SCHALL, V. T.; VASCONCELLOS, M. C.; DE SOUZA, C. P.; BAPTISTA, D. F. The molluscicidal activity of Crown of Christ (*Euphorbia splendens* var. *hislopii*) latex on snails acting as intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 1, p. 7-10, 1998.

SCHMALE, H.; BECKER, W. Studies on the urea cycle of *Biomphalaria glabrata* during normal feeding activity, in the starvation and with infection of *Schistosoma mansoni*. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v. 58, n. 4, p. 321-330, 1977.

SILVA, J. A. de.; SILVA, D. B. da.; JUNQUEIRA, N. T. V.; ANDRADE, L. R. M. de. **Frutas nativas dos cerrados**. Brasília: EMBRAPA, 1994. 166p.

SILVA, M. J.; SOUSA, M. P.; ROUQUAYROL, M. Z. Atividade moluscicida de plantas do Nordeste Brasileiro (II). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 52, p. 117-123, 1971.

SILVA, T. M. S. de. **Estudo Químico de Espécies de *Solanum***. 2002. 300f. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Química Orgânica – Departamento de Química – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

SILVA, T. M. S.; BATISTA, M. M.; CAMARA, C. A.; AGRA, M. F.; Molluscicidal activity of some Brazilian *Solanum* spp. (Solanaceae) against *Biomphalaria glabrata*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 99, n. 4, p. 419-425, 2005.

SILVA, T. M. S.; CAMARA, C. A.; AGRA, M. F.; CARVALHO, M. G.; FRANA, M. T.; BRANDOLINI, S. V. P. B.; PASCHOAL, L. S.; BRAZ-FILHO, R. Molluscicidal activity of *Solanum* species of the Northeast of Brazil on *Biomphalaria glabrata*. **Fitoterapia**, v. 77, n. 6, p. 449-452, 2006.

SILVA, T. M. S.; CAMARA, C. A.; FREIRE, K. R. L.; SILVA, T. G. da.; AGRA, M. de. F.; BHATTACHARYYA, J. Steroidal Glycoalkaloids and Molluscicidal Activity of *Solanum asperum* Rich, Fruits. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 5, p. 1048-1052, 2008.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004. 1102p.

SOUSA, M. P.; ROUQUAYROL, M. Z. Atividade moluscicida de plantas do nordeste brasileiro. **Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas**, v. 7, p. 388-393, 1974.

SOUSA, M. P.; ROUQUAYROL, M. Z.; SILVA, M. J. M. Atividade moluscicida de plantas do nordeste brasileiro. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 51, p. 1-9, 1970.

SOUZA, C. P. de. O uso da casca da castanha do caju, *Anacardium occidentale*, como moluscicida alternativo. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, n. 5, p. 459-466, 1992.

SOUZA, C. P. de.; CUNHA, R. C. P.; ANDRADE, Z. A. Development of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria tenagophila*, *Biomphalaria straminea* and *Biomphalaria glabrata*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 37, n. 3, p. 201-206, 1995a.

SOUZA, C. P. de.; JANNOTTI-PASSOS, L. K.; FREITAS, J. R. de. Degree of host-parasite compatibility between *Schistosoma mansoni* and their intermediate molluscan hosts in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, n. 1, p. 5-10, 1995b.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para a identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. 640p.

SPARG, S. G., VAN STADEN, J.; JAGER, A. K. Efficiency of traditionally used South African plants against schistosomiasis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, n. 1-2, p. 209-214, 2000.

STANISLAWSKI, E.; BECKER, W. Influences of semi-synthetic diets, starvation and infection with *Schistosoma mansoni* (Trematoda) on the metabolism of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda). **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v. 63, n. 4, p. 527-533, 1979.

THÉRON, A. Early and late shedding patterns of *Schistosoma mansoni* cercariae: ecological significance in transmission to human and murine hosts. **The Journal of Parasitology**, v. 70, n. 5, p. 652-655, 1984.

THÉRON, A.; POINTIER, J. P. Ecology, dynamics, genetics and divergence of trematode population in heterogeneous environments: the model of *Schistosoma mansoni* in the insular focus of Guadeloupe. **Research and Reviews in Parasitology**, v. 55, p. 49-64, 1995.

THIENGO, S. C.; FERNANDEZ, M. A.; MATTOS, A. C. de. Dispersão do molusco introduzido *Melanooides tuberculatus* (Muller, 1774) (Gastropoda; Thiaridae) no Brasil. In: SANTOS, S. B.; PIMENTA, A. D.; THIENGO, S. C.; FERNANDEZ, M. A.; ABSALÃO, R. S. **Tópicos em Malacologia**: Ecos do XVIII Encontro Brasileiro de Malacologia. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Malacologia, 2007. p. 101-106.

THOMAS, J. D. The snail hosts of shistosomiasis: some evolutionary and ecological perspectives in relation to control. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, n. 2, p. 195-204, 1995.

THOMPSON, S. N.; LEE, R. K. W. Comparison of starvation and infection by *Schistosoma mansoni* on tissue viability and the ³¹P NMR spectrum of *Biomphalaria glabrata*. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 72, n. 3, p. 417-421, 1986.

THORNHILL, J. A.; JONES, J. T.; KUSEL, J. R. Increased oviposition and growth in immature *Biomphalaria glabrata* after exposure to *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, v. 93, n. 3, p. 443-450, 1986.

VANDER-KLOET, S. P.; HILL, N. M. Bacca quo vadis: regeneration niche differences among seven sympatric vaccinium species on headlands. **Seed Science Research**, v. 10, n. 1, p. 89-97, 2000.

VAN ELK, R.; JOOSSE, J. The UDP-galactose 4-epimerase of the albumen gland of *Lymnaea stagnalis* and the effects of photoperiod, starvation and trematode infection on its activity. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v. 70, p. 45-52, 1981.

VASCONCELLOS, M. C.; AMORIM, A. Molluscicidal action of the látex of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B. ("Christ's Crown") (Euphorbiaceae) against *Lymnaea columella* (Say, 1817) (Pulmonata: Lymnaeidae), intermediate host of *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 (Trematode: Fasciolidae). 1- Test in laboratory. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 557-563, 2003a.

VASCONCELLOS, M. C.; AMORIM, A. Molluscicidal action of the látex of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B. ("Christ's Crown") (Euphorbiaceae) against *Lymnaea columella* (Say, 1817) (Pulmonata: Lymnaeidae), intermediate host of *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 (Trematode: Fasciolidae). 2- Limited field-testing. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 557-563, 2003b.

VASCONCELLOS, M. C.; SCHALL, V. T. Latex of "Coroa de Cristo" (*Euphorbia splendens*): an effective molluscicide. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 4, p. 475-476, 1986.

VON BRANDT, T.; McMAHON, P.; NOLAN, M. O. Physiological observations on starvation and desiccation of the snail *Australorbis glabratus*. **Biological Bulletin**, v. 113, n. 1, p. 89-102, 1957.

XAVIER, V. B. Avaliação moluscicida de extratos vegetais e verificação de efeitos tardios sobre *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Pulmonata, Planorbidae). 2008. 71f. Monografia de conclusão de curso, Curso de Graduação em Ciências Biológicas – Departamento de Biologia Animal – Instituto de Biologia – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

WAGNER, V. A. The possibility of eradicating *Billarzia* by extensive planting of tree *Balanites*. **South African Medical Journal**, v. 10, n. 1, p. 10-11. 1936.

WANYONYI, A. W.; CHHABRA, S. C.; MKOJI, G.; NJUE, W.; TARUS, P. K. Molluscicidal and antimicrobial activity of *Solanum aculeastrum*. **Fitoterapia**, v. 74, n. 3, p. 298-301, 2003.

WEINBACH, E. C. The effect of pentachlorophenate on oxidate phosphorylation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 210, n. 2, p. 545-550, 1954.

WEINBACH, E. C.; NOLAN, M. O. The effect of pentachlorophenate on the metabolism of the snail *Australorbis glabratus*. **Experimental Parasitology**, v. 5, n. 3, p. 276-284, 1956.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Moluscicide screening and evaluation, **Bulletin World Health Organization**, v. 33, p. 565-581, 1965.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Reports of the Scientific Working Group on Plant Molluscicides and Guidelines for Evaluation of Plant Molluscicide**. Geneva: World Health Organization, (TDR/SCH-SWE (4)/83.3), 1983.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. The control of Schistosomiasis: Second Report of the Who Expert Committee, World Health Organization, Geneva. **Who Technical Report Series**, n. 830, 86p, 1993.