

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

TESE

ALTERAÇÕES REPRODUTIVAS E FISIOLÓGICAS EM *Bradybaena similaris* (FÉRUSSAC, 1821) (BRADYBAENIDAE), *Leptinaria unilamellata* (D'ORBIGNY, 1835) e *Subulina octona* (BRUGÜIÈRE, 1789) (SUBULINIDAE) EXPOSTAS AO EXTRATO AQUOSO DE *Solanum paniculatum* LINNÉ e *Solanum lycocarpum* (A.S.T.-HIL) (SOLANACEAE)

LIDIANE CRISTINA DA SILVA

2013



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

**ALTERAÇÕES REPRODUTIVAS E FISIOLÓGICAS EM *Bradybaena similis*
(FÉRUSSAC, 1821) (BRADYBAENIDAE), *Leptinaria unilamellata* (D' ORBIGNY,
1835) e *Subulina octona* (BRUGÜÏÈRE, 1789) (SUBULINIDAE) EXPOSTAS AO
EXTRATO AQUOSO DE *Solanum paniculatum* (A.S.T.-HILL) e *Solanum lycocarpum*
LINNÉ (SOLANACEAE)**

LIDIANE CRISTINA DA SILVA

Sob a Orientação do Professor
Dr. Jairo Pinheiro da Silva
E Co- orientação da Professora
Dr^a Elisabeth Cristina de Almeida Bessa

Tese submetida como requisito parcial para
obtenção do grau de **Doutora em Ciências** no
curso de Pós-graduação em Ciências
Veterinárias, Área de concentração:
Parasitologia Veterinária

Seropédica, RJ

2013

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

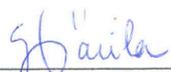
LIDIANE CRISTINA DA SILVA

Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Parasitologia Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora**, em Ciências Veterinárias.

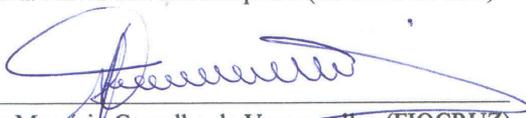
TESE APROVADA EM 26/02/2013.

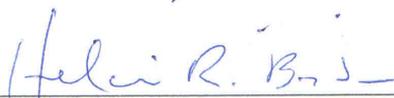

Dr. Jairo Pinheiro da Silva (UFRRJ) (orientador)


Dra. Elisabeth Cristina de Almeida Bessa (UFJF) (co-orientadora)


Dra. Stefane D'Ávila (UFJF)


Dra. Flávia Oliveira Junqueira (UNILESTE-MG)


Dr. Maurício Carvalho de Vasconcelos (FIOCRUZ)


Dr. Hécio Resende Borba (UFRRJ)

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Jairo Pinheiro da Silva, meu orientador pela confiança e por acreditar no meu trabalho. Por aceitar me orientar mesmo desenvolvendo grande parte do trabalho em Juiz de Fora. Gostaria de demonstrar todo o respeito e gratidão que tenho por você e sempre lhe levarei em meu coração.

À Dra. Elisabeth Bessa, Universidade Federal de Juiz de Fora, que foi um exemplo sempre. Pela confiança de me deixar ver como é o outro lado, o lado do orientador. Com certeza é o maior aprendizado que levo para minha vida profissional. Pela amizade desses anos de trabalho.

Ao Dr. Maury Pinto de Oliveira (*in memoriam*) por ter deixado para mim e tantos outros que virão o exemplo de amor à pesquisa. Sua dedicação foi meu maior exemplo.

À Profa. Dra. Sthefane D'Ávila, Universidade Federal de Juiz de Fora, que foi uma inspiração e um exemplo.

À Dra. Flávia Oliveira Junqueira, pela amizade, confiança, apoio e orientação na redação da dissertação que facilitou em muito a redação dessa tese.

À amiga Maria Alice Allemand, pela amizade e paciência nesses oito anos de convivência diária. Todas as alegrias e conquistas ficarão sempre em nossos corações. Viva ao Museu Prof. Maury Pinto de Oliveira!

Aos meus pais, que possibilitaram tudo isso! A minha mãe, obrigada por ter acreditado e lutado por mim, e comigo.

Ao meu irmão César, pelo carinho e torcida durante todos os anos que ficamos distantes. Sei que muitas vezes não estive ao seu lado, mas sempre pedi a proteção divina para você.

Às minhas avós, que mesmo em muitos momentos não entendiam minhas escolhas, mas que sempre explodem de orgulho. Ao meu avô, que infelizmente não verá a defesa....

A Tia Zilda, minha maior incentivadora. Sempre amiga! Muito obrigada.

As Tias Nenha e Janaina, por cada vez que me convenceram de parar um pouquinho e ir para casa. Ao meu primo Diego, que sempre foi meu irmão pela torcida!

À amiga Msc. Liliane Meireles pela amizade incondicional. Sobretudo por estar comigo durante a caminhada. Infelizmente não pude ter sua companhia durante todo o processo de doutorado, mas nossa parceria jamais será desfeita, está apenas de férias. E nossa amizade nem a distância nem o tempo diminuirá!

À amiga Tércia Vargas pela amizade e pela contribuição para meu crescimento como pessoa e pesquisadora. Por tantos projetos que desenvolvemos, por tantos projetos que ficaram na mesa do bar. Juntas, dominaremos o mundo!

À amiga Evelyn, minha filha loura! Todo meu carinho.

À amiga Fabíola, que nunca se cansa de trabalhar, obrigada pela confiança e amizade.

Aos amigos Vítor e Vinícius pela disponibilidade de me ajudar sempre que precisei. Obrigada pela amizade!

Às meninas da republica, Sarah, Gabriela, Patrícia e Monique por todas as horas de boas conversas. Adoro vocês...

Ao meu marido, Alexandre, que participou de tudo! Que coletou plantas, que passou horas alimentando moluscos e fazendo minha arte gráfica... Obrigada pela dedicação e por entender que moluscos precisam de comida no Carnaval, Natal, Aniversários....

Principalmente, obrigada por me amar tanto, eu também te amo muito!

À Deus, pela força concedida durante todos os momentos de realização desta tese.

BIOGRAFIA

Lidiane Cristina da Silva, filha de José Sávio da Silva e Maria Elizabete de Oliveira Silva, natural de Bias Fortes/MG, nascida em 30 de março de 1982.

Iniciou o curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Juiz de Fora no ano de 2004, onde foi bolsista de extensão e desenvolveu trabalhos de iniciação científica no Museu de Malacologia Prof. Maury Pinto de Oliveira.

Graduando-se no ano de 2007 e ingressou no Curso de Pós-graduação em Comportamento e Biologia Animal, Universidade Federal de Juiz de Fora a nível de mestrado, que foi concluído em fevereiro de 2009. Nesse mesmo ano ingressou no Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

RESUMO

SILVA, Lidiane Cristina. **Alterações reprodutivas e fisiológicas em *Bradybaena similaris* FÉRUSSAC, 1821 (Bradybaenidae), *Leptinaria unilamellata* (D' Orbigny, 1835) e *Subulina octona* (Brugüière, 1789) (Subulinidae) expostas ao extrato aquoso de *Solanum paniculatum* (A.St. Hill) e *Solanum lycocarpum* (Solanaceae).** 2013. 129 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2013.

Moluscos terrestres são importantes elos no ciclo de vida de helmintos, pois atuam como hospedeiros intermediários de diversas espécies. Muitas vezes a continuidade do ciclo de vida de parasitos é dependente da relação com os hospedeiros moluscos. Desse modo, o controle das populações de moluscos diminui as chances de infecção e continuidade do ciclo biológico do parasito. Assim foram objetivos desse estudo avaliar a ação moluscicida do extrato aquoso de *S. paniculatum* e *S. lycocarpum* e calcular as concentrações letal e subletal sobre três espécies de moluscos terrestres hospedeiras de parasitos, *B. similaris*, *L. unilamellata* e *S. octona*. Também foram avaliadas as alterações na fecundidade e no metabolismo de carboidratos através da análise da concentração de glicose e atividade da desidrogenase láctica na hemolinfa, o conteúdo de glicogênio na glândula digestiva e massa cefalopediosa e conteúdo de galactogênio na glândula de albúmen de moluscos expostos à concentração subletal de ambas as plantas durante 72 horas, em intervalos de 24 horas. Avaliou-se também a concentração de proteínas totais, ácido úrico e ureia dos animais expostos à concentração subletal de ambas as plantas durante mesmos intervalos. Foi verificada a redução da concentração de glicogênio na glândula digestiva das três espécies com elevação da concentração de glicose na hemolinfa e glicogênio na massa cefalopediosa indicando que a intoxicação provocada pelos extratos alterou a regulação glicêmica dos animais. Houve também o aumento significativo da atividade da lactato desidrogenase principalmente nos moluscos expostos à CL₅₀ de *S. paniculatum* nas primeiras 24 horas após a exposição, demonstrando que nesse período houve aceleração do metabolismo anaeróbico possivelmente devido aos efeitos da intoxicação. A redução da fecundidade dos moluscos expostos pode estar relacionada ao direcionamento das reservas para a desintoxicação e sobrevivência dos animais. Os resultados demonstram, portanto, que os extratos de ambas as plantas promoveram alterações fisiológicas nos moluscos, as quais refletiram negativamente na fecundidade, havendo um processo de castração parcial dos moluscos pelo desvio de nutrientes que seriam destinados à atividade reprodutiva. Houve redução da concentração de proteínas totais nas *B. similaris* e *L. unilamellata*. Esse resultado pode estar relacionado aos princípios ativos presentes nos extratos, principalmente os taninos que se ligam a proteínas causando sua inativação ou à utilização dessas como fontes de energia. Também foi observado que exposição aos extratos causou um desvio do padrão excretor de uricotélico para ureotélico na espécie *B. similaris* e provocou o acionamento das duas rotas excretoras de modo a reduzir os efeitos tóxicos dos extratos nas espécies *L. unilamellata* e *S. octona*. Pode-se concluir que os extratos de *S. paniculatum* e *S. lycocarpum* apresentaram efeito moluscicida e provocaram alterações metabólicas consideráveis que culminaram na redução da fecundidade e mortalidade dos moluscos.

Palavras-chave: Extrato vegetal, carboidratos, fecundidade, moluscicida, produtos nitrogenados.

ABSTRACT

SILVA, Lidiane Cristina. **Reproductive and physiological alterations in *Bradybaena similaris* FÉRUSSAC, 1821 (Bradybaenidae), *Leptinaria unillamelata* (D' Orbigny, 1835) and *Subulina octona* (Brugüière, 1789) (Subulinidae) exposed to the aqueous extract of *Solanum paniculatum* (A.St.-Hill) and *Solanum lycocarpum* (Solanaceae).** 2013. 129p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2013.

Land snails are important as intermediate hosts in the life cycle of several helminths species. In most cases, continuation of parasites life cycle is dependent of its relation with snail hosts. In this way, the control of snail's population reduces the chance of infection and continuation of biological cycle of parasites. Thus, the aim of this study was to evaluate the moluscicidal effect of the aqueous extract of *S. paniculatum* and *S. lycocarpum* and calculate the lethal and sublethal concentrations in three land snails species that participate in parasites life cycle, *B. similaris*, *L. unillamelata* and *S. octona*. It were also evaluated alteration in fecundity and in carbohydrates metabolism by analysis of glucose concentrations and by the activity of lactate dehydrogenase in hemolymph, glycogen content in digestive gland and cephalopodial mass and galactogen content in albumen gland of snails exposed to sublethal concentrations of both plants during 72 hours, with 24 hours intervals. The content of total proteins, uric acid and urea were also evaluated. It was verified a reduction in glycogen concentration of digestive gland of the three species with an increasing in glucose levels in hemolymph and glycogen of cephalopodial mass indicating that the intoxication caused by the extracts changed the glycemie regulation in animals. There was also a significantly increasing in lactate dehydrogenase activity, mainly in snails exposed to the LC₅₀ of *S. paniculatum* in the first 24 hours after exposure, showing acceleration of anaerobic metabolism in this period, probably due to intoxication effects. The reduction in fecundity in exposed snails can be related to the utilization of energetic reserves to detoxification and survival of animals. Therefore, results demonstrate that the extracts of both plants caused physiological alterations in snails, that has negatively reflects in fecundity, with a process of partial castration of snails by a deviation of nutrients that would be allocated to reproduction. It was observed a reduction in total proteins content in *B. similaris* and *L. unillamelata*. This result can be related to the active principles presents in extracts, mostly tannins that can bound to proteins causing its inactivation or the allocation of it as energy source. It was also observed that the exposure to the extracts caused a deviation in uricotelic pattern to ureotelic in *B. similaris* and provoked the activation of both excretory routes in order to reduce the toxic effects of extracts in *L. unillamelata* and *S. octona*. It is possible to conclude that the aqueous extracts of *S. paniculatum* and *S. lycocarpum* presented moluscicidal effect and provoked metabolic alteration that culminated in reduction of fecundity and mortality of snails.

Key Words: Carbohydrate, fecundity, molluscicide, nitrogen products, vegetal extracts

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. Introdução..... | 1 |
| 2. Revisão de Literatura..... | 3 |
| 2.1. Controle de Moluscos..... | 3 |
| 2.2. Moluscos..... | 4 |
| 2.2.1. <i>Bradybaena similaris</i> | 4 |
| 2.2.2. <i>Leptinaria unilamellata</i> | 7 |
| 2.2.3. <i>Subulina octona</i> | 9 |
| 2.3. As espécies Vegetais..... | 11 |
| 2.3.1. Gênero <i>Solanum</i> | 11 |
| 2.3.2. <i>Solanum paniculatum</i> L. | 11 |
| 2.3.3. <i>Solanum lycocarpum</i> Ast. Hill | 12 |
| 2.3.4. Compostos químicos presentes em solanáceas e sua atividade biocida..... | 13 |
| 2.3.4. Alterações reprodutivas e metabólicas em moluscos expostos à extratos vegetais..... | 16 |
| 3. Objetivos..... | 24 |
| 4. Capítulo 1. Prospecção fotoquímica dos extratos aquosos de <i>Solanum paniculatum</i> Ast. Hill e <i>Solanum lycocarpum</i> Linné (Solanaceae) e determinação da concentração letal (CL₉₀) e concentração sub-letal (CL₅₀) sobre moluscos terrestres..... | 20 |
| Resumo..... | 21 |
| Abstract..... | 22 |
| 4.1. Introdução..... | 23 |
| 4.2. Material e Métodos..... | 23 |
| 4.3. Resultados..... | 26 |
| 4.4. Discussão..... | 37 |
| 4.5. Referências Bibliográficas..... | 39 |
| 5. Capítulo 2. Alterações reprodutivas e no metabolismo de carboidratos de <i>Bradybaena similaris</i> (FÈRUSSAC, 1821), <i>Leptinaria unilamellata</i> (D' Orbigny, 1835) e <i>Subulina octona</i> (Brugüière, 1789) EXPOSTAS À CL₅₀ DE <i>Solanum paniculatum</i> Linné e <i>Solanum lycocarpum</i> Ast. Hill..... | 44 |
| Resumo..... | 45 |
| Abstract..... | 46 |
| 5.1. Introdução..... | 47 |
| 5.2. Material e Métodos..... | 48 |
| 5.3. Resultados..... | 50 |
| 5.4. Discussão | 71 |
| 5.5. Referências Bibliográficas..... | 74 |
| 6. Capítulo 3. Alterações no conteúdo de proteínas totais e compostos nitrogenados de excreção em <i>Bradybaena similaris</i> (FÈRUSSAC, 1821), <i>Leptinaria unilamellata</i> (D' Orbigny, 1835) e <i>Subulina octona</i> (Brugüière, 1789) expostas à CL50 de <i>Solanum paniculatum</i> Linné e <i>Solanum lycocarpum</i> Ast. Hill..... | 78 |

| | |
|--------------------------------------|----|
| Resumo..... | 79 |
| Abstract..... | 80 |
| 6.1. Introdução..... | 81 |
| 6.2. Material e Métodos..... | 82 |
| 6.3. Resultados..... | 83 |
| 6.4. Discussão..... | 94 |
| 6.5. Referencias Bibliográficas..... | 95 |

7. Capítulo 4. Atividade moluscicida da CL₅₀ DE *Solanum paniculatum* e *Solanum lycocarpum* (Solanaceae) sobre diferentes fases de desenvolvimento das espécies *Bradybaena similaris*, *Leptinaria unilamellata* e *Subulina octona*.....

99

| | |
|--------------------------------------|-----|
| Resumo | 100 |
| Abstract..... | 101 |
| 7.1. Introdução..... | 102 |
| 7.2. Material e Métodos..... | 102 |
| 7.3. Resultados..... | 104 |
| 7.4. Discussão..... | 108 |
| 7.5. Referências Bibliográficas..... | 110 |
| 8. Conclusões..... | 114 |
| 9. Considerações Finais | 115 |
| 10. Referencias Bibliográficas..... | 116 |
| 11. Anexos..... | 129 |

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

| | |
|--|----|
| Figura 1. <i>Bradybaena similaris</i> , visão geral do animal..... | 4 |
| Figura 2. <i>Leptinaria unilamellata</i> , visão geral do animal..... | 7 |
| Figura 3. <i>Subulina octona</i> , visão geral do animal..... | 10 |
| Figura 4. As espécies <i>Solanum paniculatum</i> e <i>Solanum lycocarpum</i> . (A): <i>S. paniculatum</i> , visão geral da planta; (B): Detalhe das folhas, flores e frutos de <i>S. paniculatum</i> ; (C): <i>S. lycocarpum</i> , visão geral da planta; (D): detalhe das folhas, flores e frutos de <i>S. lycocarpum</i> | 12 |

Capítulo I

| | |
|--|----|
| Figura 4.1. <i>Bradybaena similaris</i> exposta ao extrato aquoso de folhas de <i>Solanum paniculatum</i> . (a): <i>B. similaris</i> exposta ao extrato aquoso de <i>S. paniculatum</i> ; (b): <i>B. similaris</i> exposta ao extrato aquoso de <i>S. paniculatum</i> com destaque do comportamento de fuga dos moluscos..... | 28 |
| Figura 4.2. <i>Subulina octona</i> exposta aos extratos aquosos de folhas de <i>Solanum paniculatum</i> e de frutos de <i>Solanum lycocarpum</i> . (A): exposta aos dois extratos aquosos (B): exposta ao extrato aquoso de <i>S. lycocarpum</i> , com destaque do comportamento de fuga dos moluscos..... | 29 |
| Figura 4.3. <i>Leptinaria unilamellata</i> expostas aos extratos aquosos (a): <i>L. unilamellata</i> exposta ao extrato aquoso de <i>Solanum lycocarpum</i> (b): <i>Leptinaria unilamellata</i> exposta ao extrato aquoso de <i>Solanum paniculatum</i> , em destaque a produção excessiva de muco..... | 30 |
| Figura 4.4. Moluscos mortos após a exposição ao extrato de <i>Solanum paniculatum</i> . (A): <i>Bradyabena similaris</i> ; (B): <i>Subulina octona</i> ; (C) <i>Leptinaria unilamellata</i> | 31 |
| Figura 4.5. Teste para determinação do índice afrosimétrico (A): Espuma persistente formada no extrato aquoso de folhas de <i>Solanum paniculatum</i> (seta indicando tubo com 1cm de espuma); (B): Espuma persistente formada no extrato de frutos de <i>Solanum lycocarpum</i> | 32 |
| Figura 4.6. (A): Reação colorimétrica mostrando a presença de taninos no extrato aquoso de folhas de <i>Solanum paniculatum</i> ; (B): Reação colorimétrica mostrando a presença de taninos no extrato aquoso de frutos de <i>Solanum lycocarpum</i> ; (C): Reação colorimétrica mostrando a presença de taninos condensados no extrato aquoso de <i>S. paniculatum</i> ; (D): Reação colorimétrica mostrando a presença de taninos no extrato aquoso de <i>S. lycocarpum</i> ; (E): Reação colorimétrica mostrando a presença de flavonóides no extrato aquoso de <i>S. paniculatum</i> ; (F): Reação colorimétrica mostrando a presença de | |

| | |
|--|----|
| flavonóides no extrato aquoso de <i>S. lycocarpum</i> | 33 |
| Figura 4.7. Curva concentração resposta aos extratos extrato aquoso das partes aéreas de <i>Solanum paniculatum</i> e frutos de <i>Solanum lycocarpum</i> . (A): <i>S. paniculatum</i> sobre <i>Bradybaena similaris</i> ; (B): <i>S. lycocarpum</i> sobre <i>B. similaris</i> | 36 |
| Figura 4.8. Curva concentração resposta aos extratos extrato aquoso das partes aéreas de <i>Solanum paniculatum</i> e frutos de <i>Solanum lycocarpum</i> . (A): <i>S. paniculatum</i> sobre <i>Leptinaria unilamellata</i> ; (B): <i>S. lycocarpum</i> sobre <i>L. unilamellata</i> | 37 |
| Figura 4.9. Curva concentração resposta aos extratos extrato aquoso das partes aéreas de <i>Solanum paniculatum</i> e frutos de <i>Solanum lycocarpum</i> . (A): <i>S. paniculatum</i> sobre <i>Subulina octona</i> ; (B): <i>S. lycocarpum</i> sobre <i>S. octona</i> | 38 |
| Capítulo II | |
| Figura 5.1. Conteúdo de galactose (g/dL) na glândula de albúmen de moluscos expostos à CL ₅₀ do extrato aquoso de <i>Solanum paniculatum</i> durante 72 horas. (A) <i>Bradybaena similaris</i> , (B) <i>Leptinaria unilamellata</i> e (C) <i>Subulina octona</i> | 53 |
| Figura 5.2. Concentração de glicose (mg/dL) na hemolinfa de moluscos expostos à CL ₅₀ do extrato aquoso de <i>Solanum paniculatum</i> durante 72 horas. (A) <i>Bradybaena similaris</i> , (B) <i>Leptinaria unilamellata</i> e (C) <i>Subulina octona</i> | 55 |
| Figura 5.3. Concentração de glicogênio (g/dL) na glândula digestiva de moluscos expostos à CL ₅₀ do extrato aquoso de <i>Solanum paniculatum</i> durante 72 horas. (A) <i>Bradybaena similaris</i> , (B) <i>Leptinaria unilamellata</i> e (C) <i>Subulina octona</i> | 56 |
| Figura 5.4. Concentração de glicogênio (g/dL) na massa cefalopediosa de moluscos expostos à CL ₅₀ do extrato aquoso de <i>Solanum paniculatum</i> durante 72 horas. (A) <i>Bradybaena similaris</i> , (B) <i>Leptinaria unilamellata</i> e (C) <i>Subulina octona</i> | 58 |
| Figura 5.5. Atividade da desidrogenase láctica (LDH) (μmol de NADH/L de hemolinfa/minuto) na hemolinfa de moluscos expostos à CL ₅₀ do extrato aquoso de <i>Solanum paniculatum</i> durante 72 horas. (A) <i>Bradybaena similaris</i> , (B) <i>Leptinaria unilamellata</i> e (C) <i>Subulina octona</i> | 59 |
| Figura 5.6. Conteúdo de galactose (g/dL) na glândula de albúmen de moluscos expostos à CL ₅₀ do extrato aquoso de <i>Solanum lycocarpum</i> durante 72 horas. (A) <i>Bradybaena similaris</i> , (B) <i>Leptinaria unilamellata</i> e (C) <i>Subulina octona</i> | 62 |
| Figura 5.7. Concentração de glicose (mg/dL) na hemolinfa de moluscos expostos à CL ₅₀ do extrato aquoso de <i>Solanum lycocarpum</i> durante 72 horas. | |

(A) *Bradybaena similaris*, (B) *Leptinaria unilamellata* e (C) *Subulina octona*..... 64

Figura 5.8. Concentração de glicogênio (g/dL) na glândula digestiva de moluscos expostos à CL₅₀ do extrato aquoso de *Solanum lycocarpum* durante 72 horas. (A) *Bradybaena similaris*, (B) *Leptinaria unilamellata* e (C) *Subulina octona*..... 66

Figura 5.9. Concentração de glicogênio (g/dL) na massa cefalopediosa de moluscos expostos à CL₅₀ do extrato aquoso de *Solanum lycocarpum* durante 72 horas. (A) *Bradybaena similaris*, (B) *Leptinaria unilamellata* e (C) *Subulina octona*..... 68

Figura 5.10. Atividade da desidrogenase láctica(LDH) (μ mol de NADH/L de hemolinfa/minuto) na hemolinfa de moluscos expostos à CL₅₀ do extrato aquoso de *Solanum paniculatum* durante 72 horas. (A) *Bradybaena similaris*, (B) *Leptinaria unilamellata* e (C) *Subulina octona*..... 69

Capítulo III

Figura 6.1. Concentração de proteínas totais (mg/dL) na hemolinfa de moluscos expostos à CL₅₀ do extrato aquoso de *Solanum paniculatum* durante 72 horas. (A) *Bradybaena similaris*, (B) *Leptinaria unilamellata* e (C) *Subulina octona*..... 84

Figura 6.2. Concentração ácido úrico (mg/dL) na hemolinfa de moluscos expostos à CL₅₀ do extrato aquoso de *Solanum paniculatum* durante 72 horas. (A) *Bradybaena similaris*, (B) *Leptinaria unilamellata* e (C) *Subulina octona*..... 86

Figura 6.3. Concentração ureia (mg/dL) na hemolinfa de moluscos expostos à CL₅₀ do extrato aquoso de *Solanum paniculatum* durante 72 horas. (A) *Bradybaena similaris*, (B) *Leptinaria unilamellata* e (C) *Subulina octona*..... 87

Figura 6.4. Concentração de proteínas totais (mg/dL) na hemolinfa de moluscos expostos à CL₅₀ do extrato aquoso de *Solanum lycocarpum* durante 72 horas. (A) *Bradybaena similaris*, (B) *Leptinaria unilamellata* e (C) *Subulina octona*..... 89

Figura 6.5. Concentração ácido úrico (mg/dL) na hemolinfa de moluscos expostos à CL₅₀ do extrato aquoso de *Solanum lycocarpum* durante 72 horas. (A) *Bradybaena similaris*, (B) *Leptinaria unilamellata* e (C) *Subulina octona*..... 91

Figura 6.6. Concentração ureia (mg/dL) na hemolinfa de moluscos expostos à CL₅₀ do extrato aquoso de *Solanum lycocarpum* durante 72 horas. (A) *Bradybaena similaris*, (B) *Leptinaria unilamellata* e (C) *Subulina octona*..... 92

LISTA DE TABELAS

Revisão Bibliográfica

| | |
|--|---|
| Tabela I- Espécies de helmintos parasitos e seus hospedeiros intermediários..... | 8 |
|--|---|

Capítulo I

| | |
|---|----|
| Tabela I: Massa de tanino em <i>Solanum paniculatum</i> e <i>Solanum lycocarpum</i> (média \pm desvio padrão), rendimento da reação e taninos totais no extrato e planta (%)..... | 32 |
|---|----|

| | |
|--|----|
| Tabela II: Concentração letal (CL ₉₀) e sub-letal (CL ₅₀) (%) do extrato aquoso das partes aéreas de <i>Solanum paniculatum</i> e frutos de <i>Solanum</i> | 33 |
|--|----|

Capítulo II

| | |
|--|----|
| Tabela I – Fecundidade média semanal (número de ovos/moluscos vivos) de <i>Bradybaenasimilaris</i> exposta ao extrato aquoso das folhas de <i>Solanum paniculatum</i> durante 24, 48 e 72 horas..... | 50 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| Tabela II – Fecundidade média semanal (número de jovens/moluscos vivos) de <i>Leptinaria unilamellata</i> exposta ao extrato aquoso de folhas de <i>Solanum paniculatum</i> durante 24, 48 e 72 horas..... | 51 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| Tabela III – Fecundidade média semanal (número de ovos/moluscos vivos) de <i>Subulina octona</i> exposta ao extrato aquoso de folhas de <i>Solanum paniculatum</i> durante 24, 48 e 72 horas..... | 51 |
|---|----|

| | |
|--|----|
| Tabela IV – Fecundidade média semanal (número de jovens/moluscos vivos) de <i>Subulina octona</i> exposta ao extrato aquoso de folhas de <i>Solanum paniculatum</i> durante 24, 48 e 72 horas..... | 52 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| Tabela V– Fecundidade média semanal (número de ovos/moluscos vivos) de <i>Bradybaena similaris</i> exposta ao extrato aquoso dos frutos de <i>Solanum lycocarpum</i> durante 24, 48 e 72 horas..... | 60 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| Tabela VI– Fecundidade média semanal (número de jovens/moluscos vivos) de <i>Leptinaria unilamellata</i> exposta ao extrato aquoso das folhas de <i>Solanum lycocarpum</i> durante 24, 48 e 72 horas..... | 60 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| Tabela VII – Fecundidade média semanal (número de ovos/moluscos vivos) de <i>Subulina octona</i> exposta ao extrato aquoso de folhas de <i>Solanum paniculatum</i> durante 24, 48 e 72 horas..... | 61 |
|---|----|

| | |
|--|----|
| Tabela VIII – Fecundidade média semanal (número de jovens/moluscos vivos) de <i>Subulina octona</i> exposta ao extrato aquoso das folhas de <i>Solanum lycocarpum</i> durante 24, 48 e 72 horas..... | 61 |
|--|----|

Capítulo IV

| | |
|--|-----|
| Tabela I. Percentual de eclosão para espécies <i>Bradybaena similaris</i> e <i>Subulina octona</i> expostos à CL ₅₀ do extrato aquoso das folhas de <i>Solanum paniculatum</i> durante 72 horas..... | 104 |
| Tabela II. Percentual de mortalidade de jovens recém eclodidos das espécies <i>Bradybaena similaris</i> , <i>Leptinaria unilamellata</i> e <i>Subulina octona</i> expostos à CL ₅₀ do extrato aquoso das folhas de <i>Solanum paniculatum</i> durante 72 horas..... | 105 |
| Tabela III. Percentual de mortalidade de jovens pré-adultos das espécies <i>Bradybaena similaris</i> , <i>Leptinaria unilamellata</i> e <i>Subulina octona</i> expostos à CL ₅₀ do extrato aquoso das folhas de <i>Solanum paniculatum</i> durante 72 horas..... | 105 |
| Tabela IV. Percentual de eclosão para espécies <i>Bradybaena similaris</i> e <i>Subulina octona</i> expostos à CL ₅₀ do extrato aquoso das folhas de <i>Solanum lycocarpum</i> durante 72 horas..... | 106 |
| Tabela V. Percentual de mortalidade de jovens recém eclodidos das espécies <i>Bradybaena similaris</i> , <i>Leptinaria unilamellata</i> e <i>Subulina octona</i> expostos à CL ₅₀ do extrato aquoso das folhas de <i>Solanum lycocarpum</i> durante 72 horas..... | 106 |
| Tabela VI. Percentual de mortalidade de jovens pré-adultos das espécies <i>Bradybaena similaris</i> , <i>Leptinaria unilamellata</i> e <i>Subulina octona</i> expostos à CL ₅₀ do extrato aquoso das folhas de <i>Solanum lycocarpum</i> durante 72 horas..... | 107 |

1 INTRODUÇÃO

O filo Mollusca apresenta-se como o segundo maior filo zoológico, sendo superado em número de espécies apenas por Insecta (VALENTINE, 2004). Os gastrópodes pulmonados apresentam grande diversidade, sendo estimada a existência de mais de 30.000 espécies, distribuídas por uma ampla variedade de habitats (HELLER, 2001).

A grande distribuição na natureza se deve principalmente à capacidade adaptativa desses animais que apresentam uma série de estratégias fisiológicas e comportamentais que garantiram a colonização de habitats variados (STOREY, 2002). Porém, a degradação desses habitats acabou por aproximar esses animais das comunidades humanas nas quais provocam prejuízos econômicos em plantações e hortas residenciais.

Assim como é grande a diversidade de espécies, muito diversas também são as relações ecológicas desses animais com outros grupos, onde se destaca a estreita relação com helmintos parasitos (WEBSTER et al., 2007), e a obrigatoriedade de um molusco nos ciclos biológicos dos trematódeos digenéticos. Desse modo, o controle das populações de moluscos é uma estratégia eficiente para o controle das populações de certos parasitos (D'ÁVILA et al., 2004; CATHANHEDE, et al., 2010).

Os moluscidas sintéticos utilizados atualmente apresentam uma elevada toxidez ao ambiente (GASPAROTTO et al., 2005), muitos são à base de metaldeído que é uma substância tóxica para outras espécies de animais. A niclosamida é o único moluscida sintético recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 2002), todavia, o seu alto preço, alto custo operacional, danos ambientais (BRASIL, 2008) e dificuldade de formulação (WHO, 1965) dificultam a sua utilização.

Diante das limitações desses moluscidas tem-se pesquisado intensivamente produtos de origem vegetal que sejam capazes de promover o controle de populações de moluscos. Porém, vale ressaltar que as principais pesquisas com moluscidas vegetais no Brasil têm como foco principal o controle de moluscos aquáticos hospedeiros dos trematódeos *Schistosoma mansoni* (Sambom, 1907) e *Fasciola hepatica* (Linné, 1758) (JURBERG et al. 1989, MENDES et al., 1997. SCHALL et al, 1998; VASCONCELOS & SCHALL, 1986; VASCONCELOS & AMORIM, 2003a,b), sendo ainda necessários estudos que enfatizem o controle de moluscos terrestres (SILVA et al., 2012).

Segundo a OMS (WHO, 1965; 1992) para que um extrato vegetal possa ser utilizado são necessárias algumas características tais como biodegradabilidade dos princípios ativos, baixo custo, abundância de cultivo, fácil aplicação, extração aquosa, baixa toxidez a organismos não-alvos e concentração de 100 mg/L. Entretanto, tais recomendações foram propostas para o controle de espécie dulciaquícolas não sendo encontradas recomendações específicas para o controle de moluscos terrestres.

Além da formulação também é necessária a elaboração de protocolos de aplicação de moluscidas sobre espécies terrestres já que essas, bem como a difusão de substâncias e modo de absorção são diferenciadas nos ambientes aquático e terrestre. Do mesmo modo, são distintas as estratégias comportamentais e fisiológicas de moluscos terrestres.

As espécies *Bradybaena similaris* (Fèrussac, 1821), *Leptinaria unilamellata* (d'Orbigny, 1935) e *Subulina octona* (Brugüière, 1789) atuam como hospedeiros de vários parasitos de interesse veterinário. Na literatura é possível encontrar importantes informações acerca do ciclo de vida dessas espécies como período reprodutivo, taxa de crescimento, alterações desses fatores biológicos básicos devido a interferências experimentais de fatores abióticos como umidade e temperatura e bióticos como competição. Também são encontrados trabalhos referentes a alterações fisiológicas provocadas por infecção por parasitos e situações estressantes como jejum e estivação. Essas informações fornecem subsídios importantes para o desenvolvimento de estudos sobre o controle dessas espécies (LEAHY, 1984; ARAÚJO,

1989; ARAÚJO & KELLER, 1993; ARAÚJO & BESSA, 1995; PINHEIRO & AMATO, 1994; ALMEIDA & BESSA, 2000; LIRA et al. 2000; SOUZA et al. 2000; ALMEIDA & BESSA, 2001a,b; D'ÁVILA et al., 2004; CARVALHO et al., 2008; CARVALHO et al., 2009).

A família Solanaceae reúne plantas com grande variedade de princípios ativos e é verificado o uso de muitas espécies na medicina popular, bem como seu emprego como biocida natural. As espécies *Solanum paniculatum* Linné (jurubeba) e *Solanum lycocarpum* A.S.t.-Hil (lobeira) foram apontadas como biocidas naturais, com bioatividade comprovada contra fungos, bactérias, ácaros repelente de insetos e moluscos aquáticos (MEDINA & RITCHIE, 1980; ALZERRECA et al., 1981; KLOOS & McCULLOUGH, 1982; ODYEK et al., 1992, BEKKOUCHE et al., 2000; SILVA et al. 2005; WEI et al., 2002; XAVIER et al. 2010).

As duas espécies apresentam como metabólitos secundários vários grupos químicos dos quais se destaca a presença de flavonóides, saponinas e taninos que estão relacionados ao seu efeito moluscicida (CANTANHEDE et al., 2010; LOPES et al.; 2011).

Além da letalidade imediata dos moluscos, a intoxicação por extratos vegetais também pode interferir diretamente no metabolismo dos animais causando a redução da sua fecundidade (MELLO-SILVA et al., 2006; 2007; 2010). Além disso, o efeito residual pode interferir nas proles geradas causando retardo no início da reprodução (SILVA et al., 2012). Esse fato pode se tornar uma eficiente forma de controle, pois refletirá na redução da densidade populacional futura e menor oportunidade para infecção por parasitos.

Os objetivos da presente estudo foram avaliar as alterações reprodutivas, no metabolismo de carboidratos, proteínas totais e compostos nitrogenados de excreção dos moluscos das espécies *B. similaris* e *L. unilamellata* expostos à CL₅₀ dos extratos aquosos de folhas de *S. paniculatum* e de frutos de *S. lycocarpum* durante 24, 48 e 72 horas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os moluscos terrestres apresentam uma grande diversidade de relações com outros seres vivos das quais se destaca a participação desses animais no ciclo biológico de parasitos. Nesse sentido, ressalta-se a relação entre moluscos e termatodeos que muitas vezes é uma relação obrigatória, ou seja, é necessário um hospedeiro molusco para desenvolvimento do parasito (WEBSTER et al., 2007). Além disso, os moluscos terrestres também causam prejuízos consideráveis em plantações, principalmente em culturas de subsistência o que muitas vezes torna necessário o seu controle (D'ÁVILA et al., 2004; CATHANHEDE, et al., 2010).

2.1. Controle de Moluscos

Os moluscicidas sintéticos são utilizados principalmente em programas de controle da esquistossomose. Atualmente, apenas uma substância sintética, a niclosamida (2,5-dicloro-4-nitrosalicilanilida), é indicada pela Organização Mundial de Saúde como moluscicida (WHO) (WHO, 2002). Entretanto, alguns moluscicidas sintéticos ainda são comercializados e utilizados embora apresentem elevada toxicidade ao ambiente por serem à base de metaldeídos, substâncias medianamente tóxicas para outras espécies de animais (GASPAROTTO et al., 2005). Todavia, a preocupação com o desenvolvimento de resistência dos caramujos a essas substâncias sintéticas comerciais (SOUZA & MENDES, 1991), a sua baixa seletividade, o desequilíbrio ecológico local e alto custo contribuíram para a intensificação da procura por substâncias facilmente biodegradáveis como é o caso de muitas substâncias de origem vegetal (JURBERG, 1889). Desse modo, o uso de moluscicidas de origem vegetal tem sido recomendado pela OMS principalmente devido aos menores impactos ambientais (WHO, 1983).

Os primeiros registros de atividade moluscicida de vegetais foi observado acidentalmente para *Balanites aegyptia* Linné (Balanitaceae) sobre *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Panorbidae) (ARCHIBALD, 1933). Segundo o autor, os frutos dessa espécie, ao caírem na água diminuíam as populações de moluscos. No Brasil, os primeiros estudos foram conduzidos para controle de *B. glabrata* utilizando-se as plantas *Serjania spp.* (cipó-timbó) e de frutos de *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae) (saboneteira, sabão) (PINTO & ALMEIDA, 1944).

Deste então já foram estudadas aproximadamente 1421 espécies vegetais no mundo (BAPTISTA et al., 1994), sendo que no Brasil aproximadamente 360 foram testadas quanto a atividade moluscicida (JURBERG et al., 1989). Dentre os trabalhos realizados no Brasil sobre a atividade moluscicida, várias plantas foram testadas com a finalidade de verificar sua ação moluscicida sobre espécies aquáticas (AMORIN & PESSOA, 1962; ROUQUAYROL et al., 1972; KLOOS & McCULLOUGH, 1987; MENDES et al., 1984; MENDES et al., 1992).

Entretanto, existem muitos pré-requisitos para que uma determinada planta possa ser utilizada como moluscicida. As espécies vegetais devem ser abundantes e apresentar desenvolvimento contínuo, os princípios ativos devem ser solúveis preferencialmente em água (SILVA et al. 2003). Além disso, os extratos devem ser de fácil preparação e aplicação, não apresentar toxicidade ao homem, a fauna e a flora e ser ativo em baixas concentrações em todas as fases de desenvolvimento do molusco (JURBERG et al., 1989; WHO, 1965).

Dos trabalhos realizados com moluscicidas vegetais pode-se destacar as espécies *Phytolacca dodecandra* L'Her. (Phytolaccaceae), *Croton macrostachys* Hochst. ex A.Rich *Jatropha curcas* Linné (Euphorbiaceae), *Ambrosia marítima* Linné (Asteraceae), *Anacardium occidentale* Linné (Anacardiaceae) (KLOOS & MCCULLOUGH 1987; JURBERG et al. 1989, SOUZA et al. 1992; MOLGAARD et al., 2000), *Punica*

granatum Linné (Lythraceae) e *Canna indica* Linné (Cannaceae) (TWAJ et al., 1988; TRIPATHS & SINGH, 2000), *Nerium indicum* (SINGH & SINGH, 1998) dentre outras.

No Brasil, a espécie *Euphorbia splendens* var. *hislopii* Bojer ex Hook (Euphorbiaceae) tem sido extensivamente estudada por ter apresentado os resultados mais promissores no controle de *B. glabrata* (SCHALL et al. 1991; SCHALL et al. 1992; VASCONCELLOS & SCHALL 1986; VASCONCELOS & AMORIM 2003a,b; MELLO-SILVA et al; 2007; 2010; 2011). Vale ressaltar, entretanto, que a maioria dos estudos é conduzida para o controle de espécies aquáticas dos gêneros *Biomphalaria* e *Lymnaea* sendo poucos os estudos realizados para controle de populações de moluscos terrestres, não sendo encontrados na literatura protocolos de aplicação e recomendação de dosagens para esses animais (SILVA et al, 2012).

Porém, é importante considerar as diferenças existentes entre o ambiente aquático e terrestre em termos de biodisponibilidade das substâncias ativas do extrato. O substrato por si funciona uma barreira que tende a diminuir o contato dos animais com o produto (SILVA et al., 2012). As estratégias comportamentais exibidas pelos moluscos terrestres como enterramento e comportamento de fuga (HYMAN, 1967; NASCIMENTO et al., 2006), e fisiológicas como a estivação e produção de epifragma (SOUTH, 1982) também dificultam a ação dos moluscicidas. Assim, esses aspectos justificam a utilização de protocolos de aplicação e de concentração de produtos distintas para moluscos aquáticos e terrestres.

2.2. Moluscos

2.2.1. *Bradybaena similaris*

Filo: Mollusca

Classe: Gastropoda

Sub-classe: Pulmonata

Ordem: Stylommatophora

Família: Bradybaenidae

Gênero: *Bradybaena*

Bradybaena similaris (Férussac, 1821)

Bradybaena similaris (Férussac, 1821) (Figura 1) é um gastrópode originário da Ásia, que atualmente apresenta ampla distribuição geográfica, sendo sua introdução em muitas regiões do mundo, fruto do comércio de plantas (ALMEIDA & BESSA, 2001a). No Brasil é encontrado nos estados do Amapá, Bahia, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Paraná e Rio grande do Sul (MORRETES, 1949; OLIVEIRA et al. 1971). Porém, segundo Araújo (1989) essa espécie pode ser encontrada em todos os estados brasileiros, sendo as populações mais abundantes nos períodos chuvosos.

Araújo (1989) descreve a espécie como de pequeno porte, medindo entre 10 e 15 mm. Sua concha é heliciforme, com cinco a seis voltas. As suturas são evidentes embora não sejam muito profundas. A presença de uma linha de coloração castanha que se estende por toda volta corporal é uma característica marcante da espécie. As linhas de crescimento são mais pronunciadas na volta corporal, dando um aspecto levemente rugoso à superfície da concha. O umbílico é aberto, com os bordos se abrindo amplamente e não é muito profundo. A abertura da concha é semilunar, com os bordos refletidos e sem ornamentações



Figura 1. *Bradybaena similaris*, visão geral do animal. (—=10 mm)
Fonte: Autora

Essa espécie tem sido foco de muitos estudos devido sua importância econômica já que atua como praga de agrícola (ARAÚJO, 1989; PICORAL & THOMÉ, 1989). Também apresenta relevante potencial parasitológico sendo registradas infecções naturais por várias espécies de parasitos, com destaque para aqueles causadores de enfermidades em animais de criação e companhia (ALICATA, 1940; ARAÚJO, 1989; PINHEIRO & AMATO, 1994; RAMBO et al., 1997) (Tabela I).

Além disso, *B. similaris* tem sido utilizada como modelo experimental para o estudo do desenvolvimento de parasitos com foco variados destacando-se a rota de migração de parasitos e esclarecimento do ciclo intra-hospedeiro intermediário (BRANDOLINI & AMATO, 2001).

Os primeiros registros de manutenção de *B. similaris* em laboratório foram realizados por Loreiro (1960), sendo os primeiros estudos sobre a morfologia do sistema reprodutor dessa espécie realizados por OLIVEIRA *et al.* (1971). Araújo (1989) realizou a descrição do sistema paleal, rádula e sistema reprodutor além de descrever alguns detalhes de seu comportamento da espécie.

É uma espécie ovípara, com reprodução aparentemente contínua durante o ano apesar de ser mais significativa no período de verão (LEAH, 1984; ALMEIDA & BESSA, 2001a). O tempo necessário para início da atividade reprodutiva em condições de laboratório foi de 78 dias (ALMEIDA & BESSA, 2001a). Esses autores também verificaram que *B. similaris* se reproduz por autofecundação, sendo o tempo para início da oviposição de 109 dias. Segundo Carvalho et al. (2009) é uma espécie *r*-estrategista, com longevidade média individual de 144 (15-488) dias em condições laboratoriais, com fecundidade variando de 0 a 398 ovos durante o período adulto.

Leahy (1984) estudou aspectos da biologia e comportamento de *B. similaris* descrevendo o comportamento reprodutivo e de construção de ninhos para oviposição. Esse autor também descreve os primeiros registros sobre período de incubação e eclodibilidade para essa espécie. Esses estudos foram complementados por Almeida & Bessa (2001) que verificaram que a autofecundação causa redução do sucesso reprodutivo.

Almeida & Bessa (2000) observaram efeito negativo do aumento da densidade populacional sobre o crescimento e reprodução de *B. similaris*. Resultados contrários foram observados por Oliveira et al. (2008). Esses autores verificaram relação positiva entre o aumento da densidade e fecundidade (número de ovos/molusco). Além disso, observaram que o conteúdo de galactogênio na glândula de albúmen não foi influenciado pela densidade.

Pinheiro & Amato (1994) observaram redução acentuada dos depósitos de glicogênio na glândula digestiva de *B. similaris* infectada por *Eurytrema coelomaticum* Giard & Billet, 1882. Esses autores identificaram que também houve redução da concentração de glicose na hemolinfa. Pinheiro (1993) mostrou que a infecção por esse parasito causou redução da fecundidade da espécie e Pinheiro (1996) registrou que as alterações no metabolismo de carboidratos em *B. similaris* em estivação são similares aos resultados obtidos quando os moluscos foram infectados por *E. coelomaticum*.

Alterações metabólicas relacionadas à estivação nessa espécie foram estudadas por Lira et al. (2000). Esses autores observaram aumento da concentração de proteínas totais na hemolinfa de *B. similaris* em estivação relacionando esse resultado à lesões teciduais ocasionadas pelas alterações fisiológicas. Pinheiro et al. (2001) verificaram aumento da atividade das aminotransferases (L-aspartato:2-oxaglutarato aminotransferase (E.C.2.6.1.1) (GOT) and L-alanina:2-oxoglutarato aminotransferase (E.C.2.6.1.2) (GPT) corroborando os resultados encontrados por Lira et al. (2000).

Souza et al. (2000) estudaram a alteração na concentração nos produtos nitrogenados de degradação, ácido úrico e ureia, em *B. similaris* infectada com *E. coelomaticum* e em estivação. Tais autores verificaram que durante o estudo houve aumento acentuado de ureia na hemolinfa dos moluscos em estivação enquanto foi observado redução desse produto nitrogenado para os moluscos infectados. Em relação ao conteúdo de ácido úrico, esses autores observaram a ocorrência de uma correlação positiva entre a concentração desse produto e tempo de infecção. Entretanto, não verificaram relação entre a concentração de ácido úrico e tempo em estivação.

Alguns trabalhos investigaram o uso de extratos vegetais e produtos sintetizados como alternativas de controle de *B. similaris*. Santos (2005) e Ferreira et al. (2010) estudaram o efeito moluscicida da cafeína e do timol sobre diferentes estágios ontogenéticos bem como o efeito ovicida, verificando que ambos os produtos apresentaram atividade moluscicida e ocasionaram a redução da sobrevivência de adultos, jovens de trinta dias e recém eclodidos.

Arévalo et al (2006) demonstraram o efeito fagoinibidor do ácido salicílico (AS) sobre *B. similaris*. Esses autores registraram que além da redução da ingestão de alimento com AS, a preferência por alimento isento do ácido salicílico. Os resultados encontrados mostraram que além redução do consumo de alimento o que pode minimizar os prejuízos ocasionados pelo hábito alimentar, pode levar os animais a morte por inanição.

Nascimento et al. (2006) demonstraram efeito moluscicida do extrato aquoso das folhas de *Allamanda cathartica* Linné (Apocynaceae) sobre a fase jovem de *B. similaris* após 24 horas de exposição. O extrato não apresentou letalidade para a fase adulta, porém mostrou-se repelente. Lustrino et al. (2009) observaram que o extrato aquoso das sementes da mesma planta mostrou-se letal para adultos de *B. similaris* 48 horas após a exposição. Esses autores também verificaram alterações nos depósitos de carboidratos na glândula digestiva, massa cefalopediosa e glândula de albúmen.

2.2.2. *Leptinaria unilamellata*

Filo: Mollusca

Classe: Gastropoda

Sub-classe: Pulmonata

Ordem: Stylommatophora

Família: Subulinidae

Gênero: *Leptinaria*

Leptinaria unilamellata (d'Orbigny, 1937)

Leptinaria unilamellata (d'Orbigny, 1937) (Figura 2) é uma espécie restrita a região tropical da América do Sul (SIMONE, 2006) e pode ser encontrada em locais úmidos, enterrada no solo, sob pedras e serrapilheira (ARAÚJO, 1982; CARVALHO et al., 2009; ALMEIDA & MOTA, 2011a). No Brasil, *L. unilamellata* ocorre nos estados do Mato Grosso, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Minas Gerais, Bahia, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Pernambuco (ARAÚJO, 1982; DUTRA, 1988). É uma espécie com comprovada participação no ciclo biológico de helmintos (Tabela I).

Essa espécie apresenta concha pequena e oval, espiralada com 5 a 6, 5 voltas. A superfície da concha mostra as linhas de crescimento não muito marcadas, suturas bem evidentes, mas não muito profundas. A volta corporal com comprimento equivalente a pouco mais que as demais. Abertura é ovalada com peristoma cortante, bordo não refletido e desprovido de dentes ou lamelas no bordo externo. Bordo columelar com uma lamela lisa, triangular, baixa e projetada para a abertura. Bordo parietal com uma lamela transversal à abertura e situada a meia distância entre término da lamela columelar e a inserção da última volta (ARAÚJO & KELLER, 1993). Esses autores também realizaram a re-descrição da câmara paleal e sistema reprodutor de *L. unilamellata*.

A atuação de *L. unilamellata* no ciclo biológico de parasitos foi primeiramente relatada por DUARTE (1977) que verificou a participação da espécie no ciclo de *Posthannostomum galinum* Witenberg, 1923. A participação de *L. unilamellata* no ciclo desse parasito também é relatada por Amato & Bezerra (1989). Araújo & Keller (1993) confirmam a participação desse molusco no ciclo biológico de *Paratanaisia bragai* Santos, 1934 (Tabela I).



Figura 2. *Leptinaria unilamellata*, visão geral do animal. (—=10 mm)

Fonte: Autora

Tabela I- Espécies de helmintos parasitos e seus hospedeiros intermediários.

| Parasito | Hospedeiro intermediário | Referência |
|--|--|---|
| NEMATODA | | |
| <i>Angiostrongylus costaricensis</i> Morera & Céspedes, 1971 | <i>Bradybaena similis</i> | THIENGO et al., 1995 ; RAMBO et al. 1997 ; TEIXEIRA et al, 1993 |
| <i>Angiostrongylus cantonensis</i> (Chen, 1935) | <i>B. similis</i> <i>Subulina octona</i> | VARGAS et al. 1992 |
| <i>Angiostrongylus vasorum</i> (Baillet) | <i>S. octona</i> | BESSA & ARAÚJO, 2000 |
| <i>Aelurostrongylus abstrusus</i> (Railliet, 1898) | <i>B. similis</i> ; <i>Leptmaria unillamelata</i> <i>S. octona</i> | ARAÚJO, 1982; ARAÚJO, 1989; |
| <i>Muellerius minutissimus</i> Megnin, 1878 | <i>B. similis</i> ; <i>L. unillamelata</i> <i>S. octona</i> | ARAÚJO, 1982 |
| TREMATODA | | |
| <i>Eurytrema coelomaticum</i> Giard & Billet, 1882 | <i>B. similis</i> | BASH, 1965; ARAÚJO, 1989; PINHEIRO & AMATO, 1995 |
| <i>Eurytrema pancreaticum</i> (Janson, 1889) | <i>B. similis</i> <i>L. unillamelata</i> | KOZUTSUMI & ITAGAKI, 1989 |
| <i>Postharmostumum galinum</i> Witenberg, 1923 | <i>B. similis</i> ; <i>L. unillamelata</i> <i>S. octona</i> | ALICATA, 1940; DUARTE, 1977; 1980; AMATO & BEZERRA, 1989 |
| <i>Brachylaemus mazanti</i> Travassos, 1929 | <i>B. similis</i> ; <i>L. unillamelata</i> <i>S. octona</i> | ARAÚJO, 1982 |
| <i>Platynosomum illiciens</i> (Braun, 1901) Kossak, 1910 | <i>S. octona</i> | ARAÚJO, 1982 |
| CESTODA | | |
| <i>Paratanaisia bragai</i> Santos, 1934 | <i>S. octona</i> <i>L. unillamelata</i> | BRANDOLINI et al. 1997. BRANDOLINI & AMATO, 2006 ARAÚJO & KELLER (1993) |
| <i>Davania proglotina</i> | <i>S. octona</i> | ARAÚJO, 1982 |
| <i>Railletina bonini</i> | <i>S. octona</i> | ARAÚJO, 1982 |

Almeida & Bessa (2001b) demonstraram que a espécie pode alcançar comprimento médio de concha de 11,09±1,08 (8,02-12,8) em condições de laboratório. Esses autores também verificaram que o tempo mínimo para alcance da maturidade de indivíduos criados em grupos foi de 74 dias e quando isolados e 72 dias. Em ambos os tratamentos os autores verificaram redução do crescimento após o início da atividade reprodutiva indicando o padrão indeterminado de crescimento.

Zilch (1959/1960) sugeriu que *L. unillamelata* exibe a viviparidade como estratégia reprodutiva. ARAÚJO & KELLER (1993) relataram a presença de ovos no útero desta espécie, mas não encontraram ovos nos terrários. Dutra (1988) relatou a ocorrência de liberação de jovens e classificou a espécie como ovovivípara, incluída em um estágio intermediário à viviparidade. Almeida & Bessa (2001b) verificaram apenas a liberação de jovens. Carvalho et al. (2009) demonstraram a não existência de uma ligação entre o parental e o embrião o que comprovando o sistema ovovivíparo de reprodução.

De acordo com Carvalho et al. (2009) a história de vida de *L. unilamellata* é caracterizada por grande longevidade, fase juvenil curta com maturidade sexual precoce com muitos eventos reprodutivos(1-49) ao longo da vida sendo produzidos entre 5 e 376 indivíduos ao longo do período reprodutivo.

A espécie apresenta comportamento noturno, incluindo comportamentos reprodutivos como oviposição. Durante o dia os moluscos permaneceram enterrados no substrato ou sob recipiente de alimento. Além disso, foi relatado um significativo comportamento agregativo (ALMEIDA & BESSA, 2001b).

Segundo ALMEIDA & BESSA (2000) o aumento da densidade populacional influenciou negativamente o crescimento dessa espécie, porém, não afetou sua fecundidade.

Brandolini & Gomes (2002) investigaram a influência de dietas variadas (reação para aves em crescimento, ração de codorna, vegetais e a combinação de ração e vegetais) sobre o crescimento da concha, reprodução e taxa de mortalidade de *L. unilamellata*. As autoras verificaram que os animais alimentados com a ração de codorna atingiram maior comprimento de concha e que aqueles alimentados com ração de codorna e vegetais se reproduziram mais e os nos grupos alimentados apenas com vegetais o percentual de mortalidade foi mais elevado. Além disso, foi observado nesse estudo a preferência dos animais por alimentos mais macios. Os alimentos mais duros (cenoura e repolho) apenas foram consumidos na ausência de outros.

Devido as suas características biológicas citadas anteriormente essa espécie tem sido utilizada como modelo para vários estudos, sobretudo em testes experimentais de infecção.

Em relação ao controle dessa espécie, Afonso-Neto (2003) testou a atividade moluscicida do látex das espécies *Euphorbia cotinifolia* L., *Euphorbia milii* desMoul. var. *splendens* (Bojer ex Hook) Ursch & Leandri e *Euphorbia tirucalli* L. A autora observou que *E. splendens* promoveu elevada ação moluscicida sobre a espécie *L. unimellata* nas diluições do látex em água na proporção de 1:10 e 1:100.

2.2.3. *Subulina octona*

Filo: Mollusca

Classe: Gastropoda

Sub-classe: Pulmonata

Ordem: Stylommatophora

Família: Subulinidae

Gênero: *Subulina* Bruguière, 1792

Subulina octona (Brugüière, 1789)

Pertencente à família Subulinidae, *Subulina octona* (Brugüière, 1789) (Figura 3) é espécie possivelmente exótica, com origem asiática (SIMONE, 2006). Atualmente encontra-se amplamente distribuída pelo território, sendo sua presença registrada nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Minas Gerais, Pará, Amapá, Bahia, Amazonas, Rio Grande do Sul, Rondônia e Paraná (ARAÚJO & BESSA, 1995; AGUDO-PADRÓN, 2008).

Essa espécie participa como hospedeiro intermediário de helmintos e está relacionada à transmissão desses parasitos de animais de criação e de companhia (Tabela 1). Além disso, essa espécie é considerada praga de hortaliças (HERBERT, 2010).

Subulina octona possui concha oval, espiralada (BESSA & ARAÚJO, 1995; D'ÁVILA & BESSA, 2005a, b), com número de voltas variado de chegando a 10,5 voltas em condições de laboratório (SANTOS, 2012). O primeiro estudo sobre a morfologia corporal foi

realizada por Lanzieri (1966) que descreveu algumas características do trato reprodutor da espécie.

O comprimento da concha relatado para *S. octona* na relatado na literatura é variável. Bessa & Araújo (1995) verificaram um tamanho médio de 17,6mm (máximo de 19,8mm) para moluscos com idade de 120 dias em condições de laboratório, com padrão indeterminado de crescimento. Esses autores relataram também que indivíduos com comprimento entre 9 e 13,5mm apresentavam-se maduros, sendo possível verificar ovos no interior do corpo dos animais por transparência da concha. Segundo Tryon & Pilsbry (1906 *apud* BESSA & ARAÚJO, 1995a), a reprodução de *S. octona* começa antes que a concha atinja 2/3 do tamanho máximo da espécie.



Figura 3. *Subulina octona*, visão geral do animal. (—=10 mm)

Fonte: Autora

Subulina octona é uma espécie hermafrodita simultânea capaz de realizar autofecundação e a descrição do sistema reprodutor foi realizada por BESSA & ARAÚJO (1995a). Esses autores também verificaram que a idade média para a primeira oviposição foi de 43 dias (mínimo de 38 e máximo de 50), independente da densidade em que os moluscos foram criados, com posturas contendo de 1 a 9 ovos.

D'Ávila & Bessa (2005a) em estudo sobre a influência do substrato no desenvolvimento de *S. octona* proveniente de Juiz de Fora-MG, verificaram que, criados em terra vegetal em grupos de 35 indivíduos, estes moluscos levaram em média 59,17 dias (mínimo 48 dias, máximo 69 dias) para o alcance da maturidade sexual, com 11,46mm (mínimo 8mm, máximo 14mm) de comprimento da concha.

Essa espécie tem sido registrada como um bom modelo para estudos de várias áreas devido suas características biológicas como ciclo de vida curto, elevado potencial reprodutivo, maturidade sexual precoce e período de incubação curto (BESSA & ARAÚJO, 1993; BESSA & ARAÚJO, 1995; D'ÁVILA et al., 2005a, b). Desses trabalhos destacam-se os estudos morfométricos (ALMEIDA & MOTA, 2011b), parasitológicos (BESSA et al. 2000).

Quanto ao efeito moluscicida, Santos (2005) e Ferreira et al. (2009) demonstraram o efeito moluscicida do timol e da cafeína sobre ovos, fases juvenis e adultos.

Nascimento (2008) testou extratos aquosos de *Furcraea foetida* (L.) (Agavaceae) sobre *S. octona* com a presença e ausência de substrato, os resultados mostraram uma maior ação moluscicida dos grupos em potes com a ausência de substrato.

Souza (2012) demonstrou a ação moluscicida de *Bindens pilosa* L. e *Mikania glomerata* Spreng em concentrações inferiores a 10%. A autora sugere que as concentrações utilizadas em moluscos terrestres mais altas do que para aquáticos, visto a menor biodisponibilidade para os primeiros.

2.3. As espécies Vegetais

2.3.1. Gênero *Solanum*

O gênero *Solanum* é considerado um dos maiores dentre as Angiospermas compreendendo aproximadamente 1500 espécies (SILVA et al., 2007). É amplamente distribuído no Brasil e é recebe o *status* de planta invasora, ocupando os mais diversos tipos de ambientes, desde lavouras a terrenos baldios e margens de rodovias. À semelhança do que ocorre com outras invasoras, caracteriza-se por apresentar capacidade de colonização rápida de ambientes abertos (inclusive antrópicos) e reprodução predominantemente autogâmica, o que lhe confere alta uniformidade genética em nível populacional (ASSUNÇÃO et al., 2006; SILVA et al., 2007).

Este gênero produz uma grande variedade de esteróides saponinas e glicoalcalóides que são importantes na defesa natural das plantas. Além de alcalóides, os flavonóides (SILVA et al. 2003) e taninos (MESIA-VELA et al., 2002, OLIVEIRA et al., 2006; LÔBO et al, 2010) constituem grupos de substâncias frequentemente encontrados.

A presença de esteróides alcalóides solasodina, o qual é potencialmente um importante material para a síntese de hormônios esteróides, é característico do gênero *Solanum* (SILVA et al., 2007). Muitos glicoalcalóides exibem dois principais tipos de atividade biológica que reflete sua “dupla” natureza química: uma atividade anti-acetilcolinesterase, remanescente de alguns alcalóides, e propriedades típicas de membrana, semelhante a algumas saponinas (SILVA et al., 2005).

Compostos esteróides têm sido isolados destas espécies como jurubebina, jubebina, e solanina; e as resinas jupebina e jupebenina. As saponinas foram identificadas também nas raízes destas espécies como isojuripidina, isojurubidine, isopaniculidina e jurubidina, a qual é um esteróide de açúcar livre, obtido via hidrólise ácida do glicosídeo jurubina, também isolado das raízes de *S. paniculatum* (MESIA-VELA et al. 2002).

2.3.2. *Solanum paniculatum* L.

Solanum paniculatum L. (Solanaceae) (Figura 4A e 4B), conhecida popularmente como “jurubeba” ou “jurubeba-verdadeira” é uma espécie vegetal do tipo arbusto ereto, 1,5-1,7m de altura, caule e ramos com acúleos cônicos, folhas alternas, lâmina largo-ovóide ou lanceolada, inflorescências ramificadas, multiflores, flores com pétalas estrelada-retácea, alva ou lilás e fruto tipo baga.

Pode ser encontrada em todo território brasileiro onde é amplamente utilizada pela medicina tradicional como tônico, antitérmico, tratamento de disfunções gástricas. Suas raízes e frutos são popularmente recomendados como um purgante, para tratar icterícia, hepatite e distúrbios intestinais. A planta é um componente de várias formulações farmacêuticas incluindo: xaropes, infusões ou decocções (2%), extratos etanólicos, tinturas e elixir. A infusão de flores (0,3%) é indicada para bronquite e tosse; as raízes maceradas (6%) para artrite e que dos frutos (16%) para anemia. A decocção das folhas é empregada para tratar parasitas intestinais, mas também indicada para desordens estomacais (MESIA-VELA et al. 2002; BOTION et al. 2005).

A composição química de *S. paniculatum* ainda não é totalmente compreendida, mas muitas substâncias têm sido isoladas da planta, como por exemplo, alcalóides, saponinas, taninos (MESIA-VELA et al. 2002; ROCHFORT et al., 2008). Outras análises fitoquímicas realizadas já identificaram no extrato etanólico da raiz dessa espécie a presença de taninos flobabênicos (taninos condensados ou catéquicos), antocianidinas, flavanonas; flavanonóis e/ou xantonas, livres e seus heterosídeos triterpenóides pentacíclicos e saponinas (MESIA-VELA et al. 2002).



Figura 4. As espécies *Solanum paniculatum* e *Solanum lycocarpum*. (A): *S. paniculatum*, visão geral da planta; (B): Detalhe das folhas, flores e frutos de *S. paniculatum*; (C): *S. lycocarpum*, visão geral da planta; (D): detalhe das folhas, flores e frutos de *S. lycocarpum*.

2.3.3. *Solanum lycocarpum* A.S.t. Hil

Solanum lycocarpum (Figura 4C e 4D) é uma árvore de pequeno porte, 2 a 7 metros de altura, tronco retorcido, muitos espinhos, galhos esparsos. As folhas medem cerca 20 cm, tomentosas e com espinhos, bordas lobadas. A flor tem coloração roxa em forma de estrela com miolo amarelo. O fruto é redondo, duro, verde mesmo quando maduro, liso, com até 15 cm de diâmetro (DALL'AGNOL & VON POSER, 2000).

Essa espécie é popularmente conhecida como “lobeira” ou “fruta-do-lobo”, é típica do Cerrado brasileiro, mas pode ser encontrada em todo território brasileiro. Acredita-se que seu nome vulgar se deva ao fato de se constituir um alimento consumido pelo lobo-guará (CRUZ, 1982; DALL'AGNOL & VON POSER, 2000).

Sua utilização na medicina popular deve-se à atividade hipoglicemiante de seus frutos. Também é utilizada para diminuição de níveis de colesterol, como sedativo, diurético, antiepilético e antiespasmódico (OLIVEIRA JR. et al., 2003, MARUO, et al., 2003; YOSHIKAWA et al., 2007).

Conforme verificado para o gênero, *S. lycocarpum* apresenta grande variedade de compostos químicos. Schwarz et al. (2007) verificaram que o conteúdo de alcalóides presente

nos frutos de *S. lycocarpum* foi de 1.85% e, dentre esses, 0.06% corresponde a solamargina e 0.09% a solasonina.

Nakamura et al. (2008) isolaram cinco novas saponinas esteroidais dos frutos de *S. lycocarpum*. Especialmente nas áreas relacionadas com a ciência dos alimentos, toxicologia, e farmacologia, os glicoalcalóides esteroidais e suas agliconas têm recebido atenção especial. A solasodina é uma potencial matéria- prima como protótipo na produção de medicamentos esteróides, assim como os seus triglicosídeos solasonina e solamargina (CHEN & MILLER, 2001; EANES et al., 2008).

2.3.4. Compostos químicos presentes em solanáceas e sua atividade biocida

Tanto a espécie *S. paniculatum* quanto *S. lycocarpum*, bem como várias outras do gênero *Solanum* tem sua atividade biocida atribuída a princípios ativos como saponinas, flavonóides e taninos principalmente. Tais compostos são importantes na defesa química dos vegetais frente à herbivoria (FRIEDMAN et al., 1991).

Geralmente esses compostos estão distribuídos em todo o vegetal, mas a quantidade pode variar de acordo com as estações do ano, principalmente devido à variação de temperatura e pluviosidade (SOUZA et al., 2003; CASTRO et al., 2005; SANTOS et al., 2006). É observável também o deslocamento de princípios ativos durante o desenvolvimento da planta (LAWRENCE et al.2003; ALVES et al., 2010; PARRA-GARCÉS et al., 2010).

2.3.4.1. Saponinas

Alguns estudos relacionam a atividade moluscicida de solanáceas á presença de saponinas. Esses princípios ativos são capazes de interferir efetivamente na estrutura celular e reações metabólicas que explicam a mortalidade (LEMMICH et al., 1995; BRUSTOLIN & CORTEZ, 2000; VINAUD et al., 2008).

Quimicamente as saponinas são heterósidos de genina esteróide ou triterpênica, possui uma parte com característica lipofílica (triterpeno ou esteróide) e outra parte hidrofílica (açúcares) (SCHENKEL et al., 2003). As saponinas esteroidais e triterpênicas apresentam distribuição diferenciada no reino vegetal. As esteroidais neutras são encontradas quase que exclusivamente em monocotiledôneas enquanto as triterpênicas encontram-se predominantemente em dicotiledôneas (SIMÕES et al., 2010).

A principal propriedade das saponinas consiste em reduzirem a tensão superficial da água, característica que justifica sua ação detergente, emulsificante, e a formação de espuma persistente. Esta característica é a mais comum dessa classe, razão da qual deriva seu nome (do latim *sapone* = sabão) (SIMÕES et. al., 2010). O comportamento anfifílico e a capacidade de formar complexos com esteróides, proteínas e fosfolípídeos de membranas são responsáveis por um grande número de propriedades biológicas para essas substâncias, destacando-se a ação sobre membranas celulares, alterando a sua permeabilidade, ou causando sua destruição, essas propriedades podem justificar sua ação hemolítica e moluscicida (SCHENKEL et al., 2003).

Vários trabalhos demonstram a atividade moluscicida de saponinas extraídas de plantas. Saponinas isoladas de extrato etanólico da casca dos frutos de *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae) demonstrou uma pronunciada atividade moluscicida ($LC_{100}/ 24 h = 3 mg/L$) contra as espécies *Bulinus glabosus* (Morelet, 1866) (Planorbidae) e *B. glabrata* (LEMOS et al., 1992).

Duas saponinas isoladas do extrato etanólico submetidos a partição em acetato de etila de *Swartzia langsdorffii* Raddi (Leguminosae) apresentaram atividade antifúngica para fungos

patogênicos humanos *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans* (MARQUI et al., 2008).

Desde a descoberta de saponinas com potencial moluscicida isoladas de *Phytolacca dodecandra* L'Hér (Phytolaccaceae) essa classe de compostos tem merecido uma atenção especial (THILBORG et al., 1996). Lemmich et al., (1995) obtiveram resultados positivos quanto ao efeito moluscicida para *B. glabrata* expostos ao extrato etanólico de *Catunaregam nilótica* (Stapf) Tirveng. (Rubiaceae) obtendo uma CL₅₀ de 3ppm. Após a análise cromatográfica do extrato foram identificadas quatro saponinas, que foram relacionadas à mortalidade dos moluscos.

O extrato metanólico bruto de *Gymnema sylvestre* R. Br. (Asclepiadaceae) foi fracionado e a fração metanólica desempenhou uma maior atividade moluscicida sobre *B. glabrata* e a essa atividade foi atribuída à presença de compostos hemolíticos evidenciados por cromatografia de camada delgada, supostamente saponinas (BRUSTOLIN & CORTEZ, 2000).

Treyvaud et al., (2000) evidenciaram a atividade moluscicida dos extratos metanólicos e aquosos de *P. dodecandra*, que contém 25% de saponinas nas bagas secas, à 200µg/ml e 25µg/ml respectivamente após 24 horas de exposição para *B. glabrata*.

2.3.4.2. Taninos

Os taninos também podem ser encontrados em solanáceas. São compostos químicos secundários de origem natural que se caracterizam devido a presença de uma estrutura fenólica (polifenóis), sendo solúveis em água (SIMÕES et al., 2010). Esse termo é largamente utilizado para designar qualquer grande composto polifenólico contendo suficientes grupos hidroxila para formar complexos fortes com proteínas e outras macromoléculas, promovendo sua precipitação (NETO & CAETANO, 2005). São metabolizados pelas plantas e apresentam função de defesa encontrada em quase todas as famílias botânicas e são promissores para estudos sobre biocidas (CANTANHEDE et al., 2010).

O efeito moluscicida de plantas taníferas foi comprovado por Schaufebberger & Hostettmann (1983), que retirando o componente químico, tanino, dos extratos, verificou que estes não mais apresentaram efeito moluscicida.

Marston & Hostettmann (1985) demonstraram que plantas como *Krameria triandra* Ruiz & Pav. (Krameriaceae), *Hammamelis virginiana* Linné (Hamamelidaceae) e *Quercus* sp. ricas em taninos, apresentaram efeito moluscicida. Os autores enfatizaram que os taninos poderão constituir uma classe promissora de produtos naturais com efeito tóxico.

A atividade moluscicida do extrato etanólico de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. (Mimosoideae) sobre *B. glabrata* foi atribuída à presença de taninos condensados (BEZERRA, 2002).

A complexação entre taninos e proteínas é considerada a base da sua atividade biológica para o controle de insetos-praga, fungos, bactérias e de suas propriedades farmacológicas (AERTS et al., 1999).

2.3.4.3. Flavonoides

Os flavonóides representam uma importante classe de polifenóis, forma um grupo diversificado entre os produtos de origem natural, presente em relativa abundância entre os metabólitos secundários. São representados por 10 classes estruturais: antocianina, leucoantocianina, flavonol, flavona, glicoflavonóide, biflavonóide, chalcona, aurona, flavanona e isoflavona (HARBORNE, 1976; 1994). A maioria dos representantes dessa classe possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, e duas fenilas ligadas por uma

cadeia de três carbonos entre elas. Os flavonóides de origem natural apresentam-se, frequentemente, oxigenados onde um grande número ocorre conjugado com açúcares, desta forma conjugada são conhecidos como heterosídeos. Os heterosídeos são geralmente solúveis em água e em alcoóis diluído (SIMÕES et al., 2010), as auronas, geralmente são encontradas nessa forma. Diversas funções são atribuídas a essa classe entre elas, proteção dos vegetais contra insetos-praga, fungos e bactérias (SIMÕES et al., 2010).

Os flavonóides de maneira geral são identificados por reação colorimétrica com substâncias básicas onde apresentam coloração amarela que pode variar com a intensidade (MOUCO et al., 2003). Já as chalconas e auronas são identificadas devido a mudança da coloração amarela que passa à vermelha em meio alcalino. (SIMÕES et al., 2010).

Estudo de revisão de atividade moluscicida de espécies vegetais indica essa classe como uma das responsáveis por tal efeito (CANTANHEDE et al., 2010).

Lopes et al. (2011) verificou a atividade moluscicida do extrato hidroalcoólico das folhas de *Caryocar brasiliense* Camb. sobre *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Planorbidae). A análise fitoquímica desta planta constatou dentre outros princípios ativos, a presença de flavonóides, mais especificamente os grupos flavononas e flavononóis.

O extrato hidroalcoólico de *Sapindus Saponaria* L. (Sapindaceae) foi avaliado quanto ao seu efeito moluscicida apresentando resultados positivos à 200ppm. Estudos fitoquímicos apontaram a presença de alto teor de flavonóides e saponinas (TSUZUKI, et al., 2004).

2.3.4.4. Atividade de *Solanum paniculatum* e *Solanum lycocarpum*

A atividade biocida de *S. paniculatum* está descrita na literatura. Lôbo et al. (2010) demonstram a atividade de extratos etanólicos dessa contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Esses autores sugeriram que essa atividade é consequência da presença de alcalóides e taninos presentes na planta. Do mesmo modo, Nascimento et al. (2006) demonstraram o efeito inibitório do crescimento da bactéria *Ralstonia solanacearum* exposta ao extrato metanólico (85%) de raízes de *S. paniculatum*.

Cordeiro (2008) demonstrou que o extrato etanólico de *S. paniculatum* atividade anti-helmintica *in vitro* efetiva, impedindo o desenvolvimento celular dos ovos de helmintos gastrintestinais e dificultando a motilidade larval, provocando a inanição e conseqüente morte das larvas infectantes.

O extrato metanólico de *S. paniculatum* mostrou-se ativo ($CL_{50}=953,9$ µg/ml para as partes aéreas e $CL_{50}=823,2$ µg/ml para os frutos), embora não tenha demonstrado atividade moluscicida contra *B. glabrata* (SILVA et al. 2005).

Silva et al. (2005) avaliaram o efeito moluscicida do extrato metanólico de 13 espécies de solanáceas do nordeste brasileiro das quais apenas sete foram ativas sobre *B. glabrata* (concentração 100µg de extrato seco/mL. Dentre as espécies não ativas encontra-se *S. paniculatum*.

Xavier et al. (2010) observaram que concentrações de 10% do extrato aquoso de *S. lycocarpum* resultaram em significativa mortalidade de *B. glabrata*. Esses autores também relatam que a exposição ao extrato reduziu a sobrevivência dos moluscos, sendo um indicativo de efeito residual. Além disso, os autores mostraram que a região geográfica onde foi coletado o material influenciou o percentual de mortalidade. A rota metabólica dos vegetais sofre influencia de vários fatores abióticos. Assim, essa pode ser redirecionada, devido aos estímulos decorrentes do ambiente no qual a planta se encontra, ocasionando a biossíntese de diferentes compostos e variações quantitativas ds compostos formados (MORAIS, 2009).

2.3.4. Alterações reprodutivas e metabólicas em moluscos expostos à extratos vegetais

Vários são os estudos que investiga os efeitos reprodutivos e fisiológicos em moluscos expostos a moluscicidas sintético e extratos vegetais. Entretanto, a maioria dos trabalhos sobre moluscicidas do gênero *Solanum* demonstram a atividade letal não ressaltando os efeitos fisiológicos e biológicos (WANYONYI et al., 2003; SILVA et al. 2005a,b; ARAÚJO et al., 2010; CHINEDU et al. 2011). Todavia, as alterações na fisiologia dos animais, bem como a redução da atividade reprodutiva devem ser levadas em consideração nas estratégias de controle, pois contribuem para o controle populacional, minimizando os prejuízos e econômicos e a oportunidade de infecção por parasitos.

Mello-Silva et al. (2006) utilizando uma dose subletal de 0,16 g de *Solanum malacoxylon* (Sendtner) (Solanaceae) sobre *B. glabrata* e constataram alterações no metabolismo de carboidratos, o que levou a diminuição das reservas de glicogênio nos tecidos. Esses autores também demonstraram o aumento da concentração de proteínas totais e ácido úrico na hemolinfa dos moluscos o que indica a degradação dessa como fonte de produção de energia devido a intoxicação dos animais.

Mello-Silva et al. (2007) demonstraram que o látex de *E. splendens* var. *hislopii* reduziram a fecundidade de *B. glabrata*, enquanto Mello-Silva et al. (2010) verificaram a redução de reservas de carboidratos dessa espécie exposta ao látex da mesma planta e infectados com *S. mansoni* ao longo de quatro semanas. Esses autores sugerem que esse declínio de reservas energéticas possa levar a redução da reprodução da espécie. Os mesmos autores verificaram intensa redução de proteínas na hemolinfa dos moluscos indicando que essas foram utilizadas como fonte de energia (MELLO-SILVA et al., 2011).

Extrato aquosos de semente de *A. cathartica*, em diferentes concentrações, provocaram alterações nos depósitos de carboidratos da espécie *B. similis* (LUSTRINO et al., 2009). Os autores sugeriram que tais alterações, podem limitar a capacidade reprodutiva futura da espécie.

Nascimento (2008) demonstrou que o extrato aquoso de *F. foetida* não ocasionou alterações do crescimento e da fecundidade de *S. octona*, embora tenha sido verificada alta mortalidade.

Foi observado que a fecundidade de *Lymnaea acuminata* (Pfeiffer, 1855) (Lymnaeidae) foi eficientemente reduzida pela exposição a urina de bovinos e sua combinação com extratos de plantas (*Allium sativum* Linné, (Liliaceae), *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae); *Annona squamosa* Linné, (Annonaceae), *Ferula asafoetida* Regel (Apiaceae)) (TRIPATHI, et al., 2010). Segundo os autores a redução encontrada deve-se a inibição da atividade da alcalino-fosfatase no ovotestis do molusco. Esses autores também verificaram a redução da taxa de eclosão e da sobrevivência de juvenis.

Hasheesh et al (2011) desenvolveram estudo no qual verificaram a ação moluscicida, ovicida e sobrevivência de jovens de *Biomphalaria alexandrina* das plantas *Asparagus densiflorus* (Kunth) (Asparagaceae) e *Oreopanax guatemalensis* (Araliaceae) e do fungicida Difenconazole®. Também foram avaliadas alterações no crescimento e reprodução e alterações bioquímicas através da análise de concentração de proteínas totais, albumina, atividade das enzimas aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase fosfatase ácida e fosfatase alcalina. Os autores verificaram redução da taxa de eclosão, sobrevivência e crescimento dos moluscos, assim como alterações na atividade enzimática e redução do conteúdo de proteínas totais e da albumina. Os autores sugerem que as alterações bioquímicas foram resultantes da intoxicação e contribuíram para a redução da fecundidade e mortalidade.

Mello-Silva et al. (2011) demonstrou alterações aumento da excreção de ácido úrico e redução do conteúdo de proteínas totais em *B. glabrata* exposta ao látex de *E. splendens*. Os

autores sugeriram que as proteínas podem ser utilizadas como fonte secundária de energia gerando aumento na produção de compostos nitrogenados devido a intoxicação.

Souza (2012) demonstrou que a concentração subletal (CL₅₀) dos extratos aquosos de *Bidens pilosa* Linné e *Mikania glomerata* Sprengel provocaram redução da fecundidade, do crescimento e da taxa de eclosão de *S. ootona*. Essa autora demonstrou também que o tempo de exposição pode intensificar os efeitos do moluscicida acentuando o efeito residual no organismo do molusco.

Silva et al. (2012) verificaram que aplicações sucessivas da CL₅₀ do extrato aquoso de *S. paniculatum* ocasionou castração parcial de adultos de *S. ootona* e alterações na sobrevivência, no tempo para alcance da maturidade sexual e tamanho da concha na maturidade sexual de jovens provenientes de parentais expostos ao extrato indicando que o efeito residual foi capaz de alterar a geração subsequente à aplicação.

3 OBJETIVO GERAL

Os objetivos desse estudo foram avaliar o efeito moluscicida dos extratos aquosos de folhas de *Solanum paniculatum* e frutos de *Solanum lycocarpum* através da determinação das concentrações letais (CL₉₀) e sub-letal (CL₅₀) desses extratos e verificar as alterações reprodutivas, no metabolismo de carboidratos, na concentração de proteínas totais e produtos nitrogenados de excreção (ácido úrico e ureia) nos moluscos terrestres *Bradyabena similis*, *Leptinatia unilamellata* e *Subulina octona*.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Confirmar a presença de saponinas, e calcular o índice afrosimétrico (índice de espuma) nos extratos aquosos de folhas de *S. paniculatum* e de frutos *S. lycocarpum*;
2. Confirmar a presença de taninos, identificar taninos condensados e calcular a massa de taninos nos extratos aquosos de folhas de *S. paniculatum* e de frutos *S. lycocarpum*, bem como na planta;
3. Confirmar a presença de flavonóides nos extratos aquosos de folhas de *S. paniculatum* e de frutos *S. lycocarpum*;
4. Determinar a concentração letal (CL₉₀) e subletal (CL₅₀) dos extratos aquosos de folhas de *Solanum paniculatum* e de frutos *Solanum lycocarpum* sobre as espécies *B. similis*, *L. unilamellata* e *S. octona*;
5. Verificar alterações na fecundidade de *B. similis*, *L. unilamellata* e *S. octona* expostas à CL₅₀ dos extratos aquosos de folhas de *S. paniculatum* e de frutos *S. lycocarpum*;
6. Verificar alterações no metabolismo de carboidratos com base na concentração de glicose na hemolinfa, de glicogênio na glândula digestiva e massa cefalopediosa, de galactogênio na glândula de albúmen e na atividade da desidrogenase láctica (LDH) de *B. similis*, *L. unilamellata* e *S. octona* expostas à CL₅₀ dos extratos aquosos de folhas de *S. paniculatum* e de frutos *S. lycocarpum*;
7. Avaliar alterações na concentração de proteínas totais na hemolinfa de *B. similis*, *L. unilamellata* e *S. octona* expostas à CL₅₀ dos extratos aquosos de folhas de *S. paniculatum* e de frutos *S. lycocarpum*;
8. Determinar alterações nas concentrações de ácido úrico e ureia na hemolinfa de *B. similis*, *L. unilamellata* e *S. octona* expostas à CL₅₀ dos extratos aquosos de folhas de *S. paniculatum* e de frutos *S. lycocarpum*;
9. Avaliar a atividade moluscicida sobre jovens recém eclodidos e pré-adultos de *B. similis*, *L. unilamellata* e *S. octona* expostas à CL₅₀ dos extratos aquosos de folhas de *S. paniculatum* e de frutos *S. lycocarpum*, bem como o efeito ovicida dos extratos.

CAPÍTULO 1

PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS AQUOSOS DE *Solanum paniculatum* LINNÉ E *Solanum lycocarpum* A.S.t. HILL (SOLANACEAE) E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO LETAL (CL₉₀) E CONCENTRAÇÃO SUB-LETAL (CL₅₀) SOBRE MOLUSCOS TERRESTRES

Prospecção fitoquímica dos extratos aquosos de *Solanum paniculatum* Linné e *Solanum lycocarpum* Ast. Hill (Solanaceae) e determinação da concentração letal (CL₉₀) e concentração sub-letal (CL₅₀) sobre moluscos terrestres

RESUMO

O objetivo desse estudo foi determinar a concentração letal (CL₉₀) e sub-letal (CL₅₀) dos extratos aquosos de *S. paniculatum* e *S. lycocarpum* sobre as espécies *B. similaris*, *L. unillamelata* e *S. octona*. Além disso, foi realizada a prospecção fitoquímica para confirmar a presença de saponinas, taninos e flavonóides nos extratos. Verificou-se o índice de espuma de 500 para *S. paniculatum* e <100 para *S. lycocarpum*. Foi observada a presença de taninos condensados, sendo a massa de taninos totais encontrada de $4,45 \text{ mg} \pm 0,43$ e $2,58 \pm 0,47$ para *S. paniculatum* e *S. lycocarpum*, respectivamente. A reação colorimétrica foi positiva para flavonóides em ambos os extratos. As CL₉₀ de *S. paniculatum* foram de 4,5%, 6,6% e 5,9% e as de *S. lycocarpum* foram 1,6%, 1,8% e 3,92% para *B. similaris*, *L. unillamelata*, e *S. octona*, respectivamente. As CL₅₀ de *S. paniculatum* foram 4,5%, 4,4% e 1,46% e 1,42%, 0,9% e 0,9% para *B. similaris*, *L. unillamelata*, e *S. octona*, respectivamente. Para *S. lycocarpum* as CL₅₀ foram 1,69% para *B. similaris* e 0,9 para as demais espécies de moluscos. Os resultados obtidos demonstram que ambas as plantas apresentaram atividade moluscicida com doses inferiores a 10%. Todos os grupos químicos determinados no presente estudo já foram identificados nas plantas trabalhadas e apresentam atividade biocida, inclusive moluscicida. Os resultados encontrados demonstram que as duas espécies são potencialmente promissoras para o controle de moluscos terrestres.

Palavras- Chave: extrato vegetal, flavonóides, moluscicida, molusco terrestre, saponinas, taninos.

ABSTRACT

The aim of the present study was to determinate the lethal concentration (LC₉₀) and sublethal (LC₅₀) of the aqueous extracts of *S. paniculatum* and *S. lycocarpum* on the species *B. similaris*, *L. unilamellata* and *S. octona*. It was also realized the phytochemical screening to confirm the presence of saponins, tannins and flavonoids in the extracts. We verified a foam index of 500 to *S. paniculatum* and <100 to *S. lycocarpum*. It was observed the presence of condensed tannins, being the mass of total tannins of $4.45 \text{ mg} \pm 0.43$ and 2.58 ± 0.47 to *S. paniculatum* and *S. lycocarpum*, respectively. The colorimetric reaction was positive to flavonoids. The LC₉₀ of *S. paniculatum* were 4.5%, 6.6% and 5.9% and to *S. lycocarpum* were 1.6%, 1.8% and 3.92% to *B. similaris*, *L. unilamellata* and *S. octona*, respectively. The LC₅₀ of *S. paniculatum* were 4.5%, 4.4% and 1.46% and 1.42%, 0.9% and 0.9% to *B. similaris*, *L. unilamellata* and *S. octona*, respectively. Para *S. lycocarpum* as CL₅₀ foram 1,69% para *B. similaris* e 0,9 para as demais espécies de moluscos. To *S. lycocarpum* the LC₅₀ were 1.69% for *B. similaris* and 0.9 for all other snails' species. The obtained results demonstrated that both plants presented molluscicidal activity in doses lower than 10%. All chemical groups determinate in the present study were already identified in the studied plants and presents biocide activity, including against snails. This result demonstrates that both plant species are potentially promising in the control of land snails.

Key words: Molluscicide, flavonoids, saponin, tannin, vegetal extract.

4.1 INTRODUÇÃO

Moluscos terrestres apresentam estreita relação com helmintos causadores de enfermidades em animais de criação e de companhia e em humanos (ARAÚJO & BESSA, 1993; PINHEIRO & AMATO, 1994). Desse modo, muitas vezes é recomendado o controle de populações de moluscos como forma eficiente de combate as populações de parasitos (D'ÁVILA et al. 2004).

A busca por moluscidas de origem vegetal vem sendo feita desde meados do século XX principalmente a menor toxidez e biodegradabilidade de muitos desses compostos (JURBERG et al. 1989). Todavia, atualmente no Brasil, os principais estudos sobre moluscidas vegetais visam o controle de moluscos aquáticos do gênero *Biomphalaria*, sendo incipientes os trabalhos que investigam o controle de moluscos terrestres.

Muitas plantas da flora brasileira são promissoras para utilização no controle de pragas devido à riqueza de compostos bioativos (BRITO & BRITO, 1993). Considerando a importância da descoberta de novas substâncias que apresentem potencial atividade moluscida, várias espécies vegetais vêm sendo testadas (JURBERG et al. 1988; JURBERG et al. 1989; SINGH et al., 1996; NASCIMENTO et al., 2006; SILVA et al, 2006). Além disso, muitas plantas utilizadas na medicina popular podem apresentar propriedades biocida e farmacológicas, sem causar riscos à saúde humana.

Nesse contexto, destaca-se a família Solanaceae, que apresenta espécies com variados níveis de toxidez, desde as muito tóxicas e as medicinais como *Solanum paniculatum* Linné e *Solanum lycocarpum* A.S.t. Hil SILVA et al, 2006). Ambas apresentam inúmeras aplicações na medicina popular e são amplamente distribuídas no Brasil (LORENZI, 1999; MESIAVELA, et al., 2002; SILVA et al. 2007).

A toxidez de uma substância, seja ela sintética ou natural, é dada por sua letalidade. A letalidade é calculada pela relação dose-resposta/concentração-resposta e representa a relação entre o grau de resposta do sistema biológico e a quantidade da substância administrada. Essa relação é utilizada em toxicologia experimental de modo a estabelecimento de compostos bioativos (KLAASEN & WATKINS III, 2012).

As concentrações letal (CL_{90}) e sub-letal (CL_{50}) são definidas como a concentração de uma substância química que provoca a morte de 90% e 50%, respectivamente, de um grupo de animais expostos, em um tempo definido. Essas concentrações são frequentemente utilizadas para demonstração da eficiência de moluscidas e também para a avaliação do efeito de determinado moluscida sobre os aspectos biológicos e fisiológicos dos animais (WHO, 1965).

Ainda não são registrados na literatura protocolos experimentais para teste de moluscidas em moluscos terrestres, sendo as recomendações da Organização Mundial de Saúde se aplicam apenas a experimentação para organismos aquáticos (WHO, 1965). Alguns estudos existentes com moluscos terrestres se baseiam na imersão dos moluscos na substância moluscida e tendem a mascarar os efeitos de letalidade e fisiológicos (NASCIMENTO et al., 2006; FERREIRA et al., 2009). Desse modo, a elaboração de uma metodologia clara, concisa e aplicável torna-se necessário para a padronização de testes com moluscidas para moluscos terrestres.

Foi objetivou-se desse estudo desenvolver um protocolo experimental para testes toxicológicos e calcular as CL_{50} e CL_{90} dos extratos aquosos de *S. paniculatum* e *S. lycocarpum* sobre indivíduos adultos das espécies *B. similis*, *L. unilamellata* e *S. octona*. Além disso, foi confirmada a presença de saponinas, flavonóides e taninos nos extratos. Para saponinas e taninos foi feita a quantificação.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Local dos experimentos

Os experimentos foram realizados no laboratório de Biologia de Moluscos Prof. Arnaldo dos Santos Coelho, Museu de Malacologia Prof. Maury Pinto de Oliveira, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora (UFJF), Minas Gerais, Brasil (Latitude: 21.7642, Longitude: 43.3496 21° 45' 51" Sul, 43° 20' 59" Oeste; Altitude: 873m).

4.2.2. Criação e manutenção dos moluscos

Os moluscos utilizados nesse estudo foram obtidos de criações matrizes no referido laboratório. Os animais foram coletados no município de Juiz de Fora, e foram utilizados animais nascidos em laboratório. Após o nascimento, os moluscos foram criados em terrários de polietileno de 1000 mL de capacidade (14cm de diâmetro e 9cm de profundidade) desde o nascimento, em densidades de 10 animais por terrário contendo terra vegetal esterilizada e umedecia (SILVA *et al.*, 2008) até o registro das primeiras oviposições e/ou jovens nos terrários.

Durante esse período os animais foram alimentados com uma mistura de ração para aves em crescimento e carbonato de cálcio na proporção 3:1, oferecidas em recipiente plástico *ad libitum* e repostas em dias alternados (BESSA & ARAÚJO, 1995). Em dias alternados também foi feito o re-umedecimento do substrato.

4.2.3. Obtenção e identificação e preparação do material vegetal

As folhas de *S. paniculatum* foram coletadas no Bairro São Pedro, Juiz de Fora, Minas Gerais (elevação: 873m; 21°46.301' e 43°22.372') e os frutos de *S. lycocarpum* no bairro Nossa Senhora Aparecida, Bias Fortes, Minas Gerais (elevação: 763; 21°46,301"S e 43°22,372" W). O material vegetal foi identificado no Herbário Leopoldo Krieger, Universidade Federal de Juiz de Fora.

Foram selecionadas folhas jovens (com até 20 cm de comprimento) e frutos jovens (com até 10 cm de diâmetro), sem lesões mecânicas provocadas por insetos. As folhas de *S. paniculatum* foram lavadas em água de torneira e secas em temperatura ambiente durante duas semanas (adaptada de NETO & CAETANO, 2005) numa temperatura média de 24 ± 5°C). Após secagem, o material vegetal foi triturado em liquidificador doméstico e armazenado em potes de polietileno hermeticamente vedados sob refrigeração (4°C). Os frutos de *S. lycocarpum* foram utilizados frescos.

4.2.4. Preparação dos Extratos

O material vegetal triturado foi pesado em balança analítica (modelo Bosch SAE 200) nas concentrações estabelecidas para cada teste. Os extratos aquosos foram feitos por maceração estática a frio em água destilada por 24 horas. Após esse período as suspensões foram filtradas e utilizadas à porção aquosa para os testes.

4.2.5. Análise de saponinas e taninos

A identificação de saponinas nos extratos e a determinação do índice de espuma foram realizadas de acordo com WHO (1992). Para cada amostra foi feito um decocto com 2g da planta seca em 10 mL de água destilada por 3 minutos. Após o resfriamento e filtração da

solução extrativa foi adicionado 5 mL dos extratos em um tubo de ensaio e agitou-se energeticamente por 15 segundos, após esse tempo deixou-se em descanso por 15 minutos. A identificação de saponinas foi realizada baseada na formação de espuma persistente após o tempo de repouso e adição de 3 gotas de ácido clorídrico.

Para a análise semi-quantitativa realizou-se um decocto com 1g da planta seca em 100 mL de água destilada por 30 minutos. Após esse tempo as suspensões foram filtradas e utilizadas à parte aquosa para os testes. Utilizou-se 10 tubos de ensaio (16cm de altura e 16mm de diâmetro) enumerados de 1 a 10 onde foram adicionados em cada um quantidades crescentes de extrato e completado o volume com água destilada para 10 mL (WHO, 1992; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). Após completar o volume de cada tubo, esses foram tampados e agitados energeticamente por 15 segundos e deixados em repouso por 15 minutos. Após esse tempo foi anotado o volume de solução extrativa presente no tudo onde houve a formação de 1 cm de espuma. O cálculo para o índice de espuma ou afrosímetro foi realizado conforme equação 1.

$$\left[I=1000/a \right]$$

Equação 1: Índice afrosimétrico. I= índice de espuma ou afrosímetro; a = volume de solução extrativa presente no tudo onde houve a formação de espuma persistente de 1cm (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

Para confirmação da presença de taninos nos extratos de *S. paniculatum* e *S. lycocarpum* foi realizado o teste com decocto com 5g do vegetal seco em 100 mL de água destilada por 30 minutos seguido por uma filtração simples. Foi feita uma solução de gelatina (Merck) à 2,5% em água destilada (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). Utilizou-se para os testes dois tubos de ensaio, ao primeiro adicionaram-se 2 mL de solução extrativa e cinco gotas de solução de gelatina, ao segundo tubo foi adicionado apenas 2 mL da solução extrativa para o teste em branco.

Para diferenciação das classes de taninos foi realizado o teste colorimétrico com cloreto férrico (FeCl₃), para isso utilizou-se o mesmo decocto do vegetal citado anteriormente. Foram utilizados dois tubos de ensaio, ao primeiro adicionaram-se dois mL da solução extrativa, 10 mL de água destilada e 5 gotas de cloreto férrico a 2% e ao segundo foi adicionada apenas a solução extrativa e água destilada na mesma quantidade sendo este o teste em branco.

Para identificação e quantificação de taninos condensados foi utilizado o método de Stiasny proposto por Doat (1978). Nesse, foi feito um decocto com 10g do vegetal em 250 mL de água destilada por 30 minutos. Após resfriamento, as suspensões foram filtradas. Uma alíquota desse extrativo de 100 mL foi transferida para um béquer de 500 mL e em seguida foram adicionados 15 mL do reativo de Stiasny (5 mL de ácido clorídrico concentrado e 10 mL de formaldeído neutralizado). Após esse procedimento a solução final foi mantida em repouso por 24 horas. Nessas condições os taninos condensados formam complexos insolúveis, que foram separadas por filtração simples.

Após a filtração, o precipitado foi seco em estufa a 101±2 até atingir peso constante, e em seguida foi pesado em balança analítica obtendo assim o número de Stiasny (quantidade em g de taninos condensado na alíquota). Para esse teste as análises foram feitas em triplicata.

Para obter a porcentagem de taninos condensados na solução determinou-se primeiramente o teor de sólidos totais presentes no extrato pelo teor de princípio ativo total extraído no extrato bruto. Para a determinação da massa total de princípio ativo extraído foi

utilizado o resíduo gerado no decocto da reação anterior da seguinte forma: a massa do resíduo gerado após a extração foi levada à estufa e seca a 101 ± 2 e após três pesagens sem variação de massa foi efetuado o seguinte cálculo de acordo com a equação 2.

$$\left[\text{MET} = \text{MI} - \text{MF} \right]$$

Equação 2: Massa de resíduo gerado após extração. MET= massa de extrativo total; MI= massa inicial do vegetal; MF=massa final (seca) do vegetal após extração (DOAT, 1978).

A porcentagem de extrativos totais foi calculada de acordo com a equação 3.

$$\left[\% \text{TET} = (\text{MET} / \text{MI}) \cdot 100 \right]$$

Equação 3: Percentual de extrativos totais. TET= teor de extrativo total; MET= massa de extrativo total; MI= massa inicial (DOAT, 1978).

Após pesar o precipitado formado obtêm-se a massa de taninos condensados na alíquota (n° de Stiasny). Para a obtenção do percentual de taninos no extrativo utiliza-se a equação 4.

$$\left[\% \text{TTC} = (\text{n}^\circ \text{ de Stiasny} / \text{MET}) \cdot 100 \right]$$

Equação 4: Percentual de taninos no extrato. TTC= teor de taninos condensados no extrato total; n° de Stiasny= massa de tanino condensado no extrativo; MET= massa de extrativo total (DOAT, 1978).

O teor de taninos condensados na planta é calculado pela equação 5.

$$\left[\% \text{TTCP} = (\text{TTC} \times \text{TET}) / 100 \right]$$

Onde:

Equação 5: Percentual de taninos condensados no vegetal. TTCP= teor de taninos condensados no vegetal; TTC= teor de taninos condensados no extrato total; TET= teor de extrativos total (DOAT, 1978).

4.2.5. Estabelecimento da concentração máxima e mínima

Previamente ao cálculo da CL₅₀ e CL₉₀ foram realizados testes pilotos para determinar a concentração do extrato aquoso de cada planta capaz de provocar de 100% de mortalidade dos moluscos de cada espécie através de tentativa-erro, estabelecendo previamente a concentração de 10% como a limite. Para esses testes foram utilizados 15 moluscos adultos para cada concentração testada. A concentração mínima foi aquela que não causou mortalidade dos moluscos.

Após o estabelecimento da concentração que provocasse 100% de mortalidade, foram feitas diluições em intervalos regulares de modo a estabelecer as concentrações máxima e mínima para posterior cálculo das concentrações letal e subletal. Para *S. paniculatum* foram realizados testes com as concentrações entre 1% e 10% com intervalos de 1% em testes com as três espécies. Para *S. lycocarpum* foram utilizadas concentrações iniciais de 0,5% a 4,5% com intervalos regulares de 0,5%.

Foi estabelecida a concentração máxima de 8% de *S. paniculatum* para as três espécies. A concentração máxima de *S. lycocarpum* foi de e 2% para *S. octona* e *L. unilamellata* e 4% para *B. similaris*. As concentrações mínimas encontradas para *S. paniculatum* foram 1% para *S. octona* e *L. unilamellata* e 4% para *B. similaris* e para *S. lycocarpum* foi de 0,5% para as três espécies.

4.2.6. Cálculo das concentrações sub-letal (CL₅₀) e letal (CL₉₀)

Para cada concentração foram utilizados 30 moluscos distribuídos em grupos (10 moluscos/grupo), para cada uma das diluições anteriormente mencionadas. Os moluscos utilizados para os grupos controles foram distribuídos da mesma forma.

Os moluscos foram expostos aos extratos através de contato dérmico direto. Para tal exposição, os moluscos foram distribuídos em terrários de polietileno (500 mL de capacidade) e aplicado sobre eles 8 mL de extrato com uma seringa. Para os grupos controles foram adicionados a mesma quantidade de água destilada.

Após esse período de exposição os moluscos foram transferidos para terrários de igual dimensão contendo como substrato terra vegetal esterilizada (120°C/1hora) e vedado com tecido de algodão e elástico. Os moluscos foram alimentados durante o período de recuperação. Ao final do período de recuperação moluscos mortos foram contabilizados e os dados foram utilizados para análise.

4.2.7. Condições para realização dos experimentos

Os experimentos foram realizados sob temperatura ($23 \pm 2,0$ °C), umidade relativa do ar (86 ± 3 %) e fotoperíodo naturais.

4.2.8. Análise estatística dos dados

As concentrações sub-letais foram calculadas através da análise Probit utilizando o software BioStat 2008, versão 2.5 com nível de significância de 5%. As concentrações letais foram obtidas de pela regressão linear da relação concentração-resposta originada pela análise Probit. Para a comparação entre a massa de taninos, rendimento e concentração de taninos no extrativo e na planta foi utilizado o teste t de Student-Newman-Keuls.

4.3 RESULTADOS

4.3.1. Análise fitoquímica do extrato aquoso de folhas de *Solanum paniculatum* e de frutos de *Solanum lycocarpum*

As figuras 4.1, 4.2 e 4.3 mostram os moluscos das três espécies no momento da aplicação dos extratos. Foi possível verificar a exibição de comportamentos de fuga e liberação de muco devido ao contato com os extratos. Foi observada nos moluscos mortos a

exposição parcial ou total da massa cefalopédica como pode ser observado na Figura 4.4A-C.

Foi confirmada a presença de saponinas nos extratos (Figura 4.5A e 4.5B). Para *S. paniculatum* o índice de espuma encontrado foi igual a 500, e para *S. lycocarpum* foi <100. A Figura 4.5 A mostra a espuma persistente mais evidente no extrato de *S. paniculatum*.

Observou-se também a presença de taninos condensados em ambos os extratos (Figura 4.6A-D). A massa de taninos na planta, o rendimento e a massa de taninos totais no extrato e na planta podem ser observados na Tabela I. O teste t mostrou que o conteúdo de taninos no extrato de *S. paniculatum* é significativamente maior que o de *S. lycocarpum* ($t=4,31$; $p<0,007$).

A reação colorimétrica indicou a presença de flavonóides, porém não foram realizados testes específicos para qualificação desses (Figura 4.6 E-F).

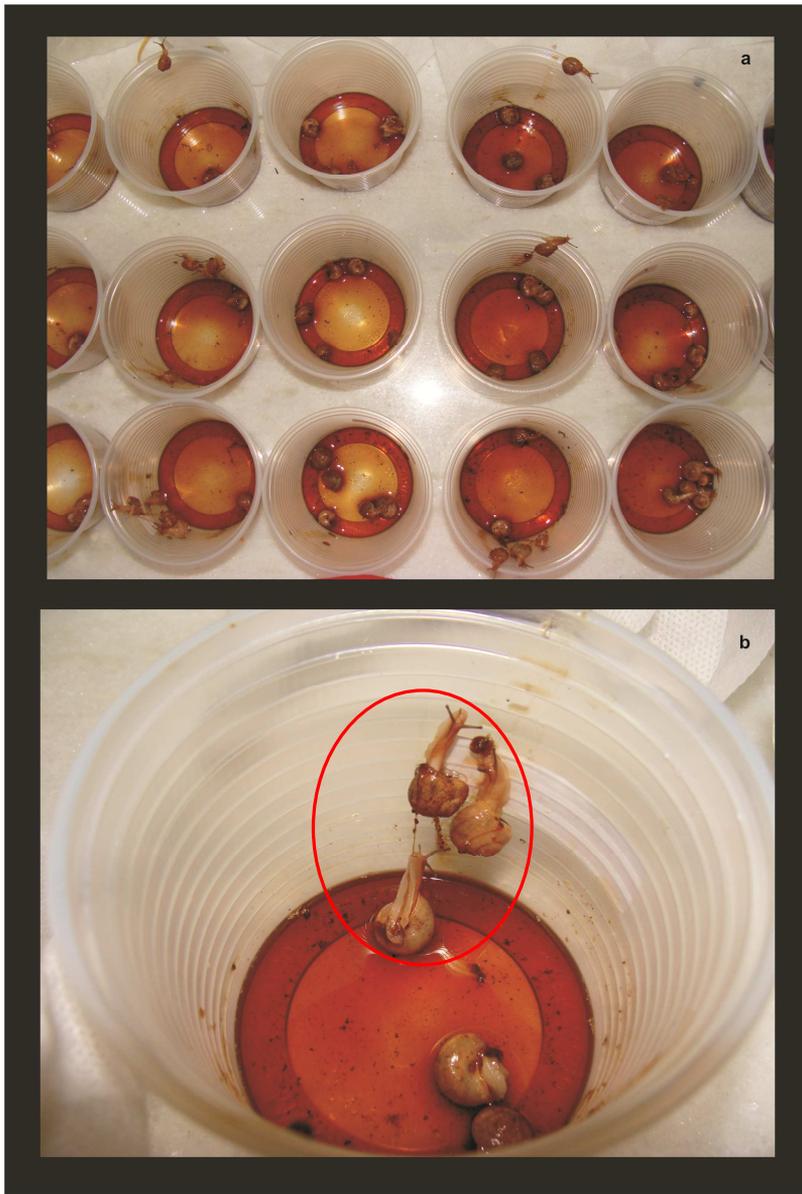


Figura 4.1. *Bradybaena similaris* exposta ao extrato aquoso de folhas de *Solanum paniculatum*. (a): *B. similaris* exposta ao extrato aquoso de *S. paniculatum*; (b): *B. similaris* exposta ao extrato aquoso de *S. paniculatum* com destaque do comportamento de fuga dos moluscos.



Figura 4.2. *Subulina octona* exposta aos extratos aquosos de folhas de *Solanum paniculatum* e de frutos de *Solanum lycocarpum*. (A): exposta aos dois extratos aquosos (B): exposta ao extrato aquoso de *S. lycocarpum*, com destaque do comportamento de fuga dos moluscos.

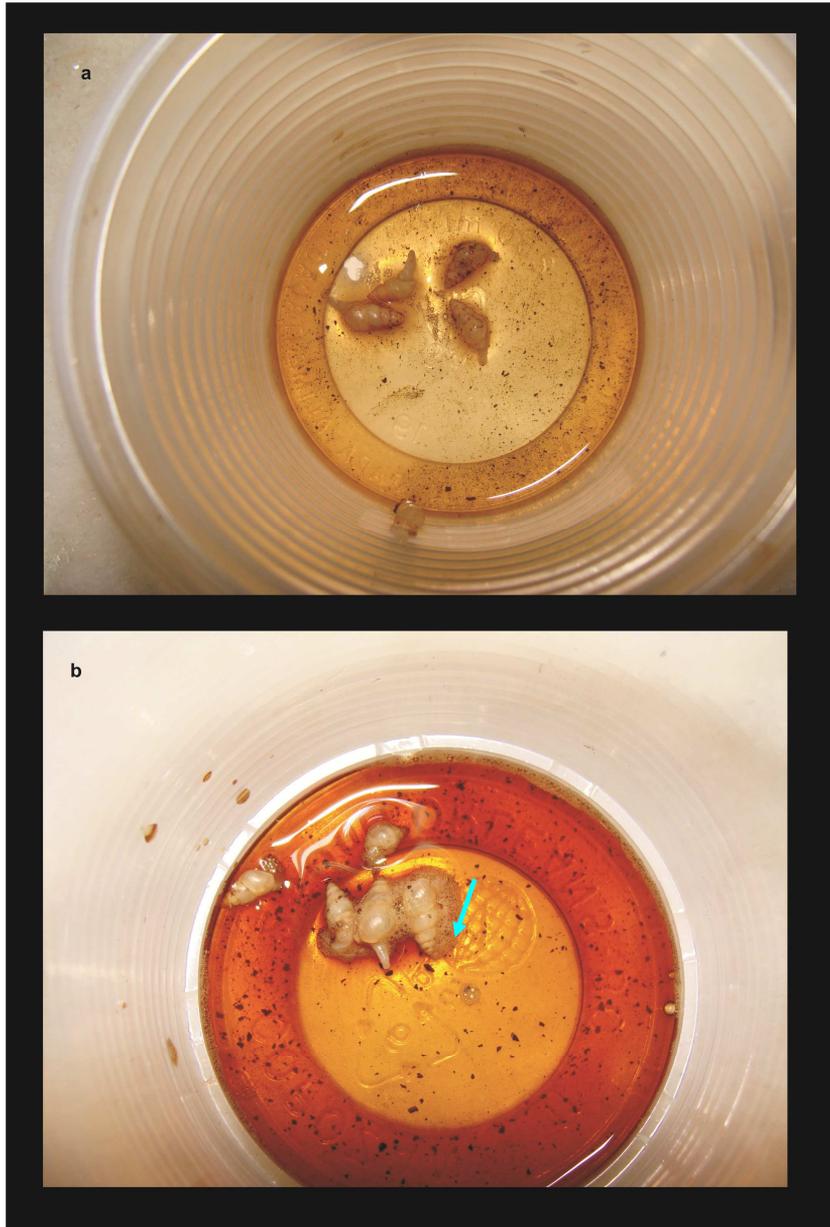


Figura 4.3. *Leptinaria unilamellata* expostas aos extratos aquosos (a): *L. unilamellata* exposta ao extrato aquoso de *Solanum lycocarpum* (b): *Leptinaria unilamellata* exposta ao extrato aquoso de *Solanum paniculatum*, em destaque a produção excessiva de muco.

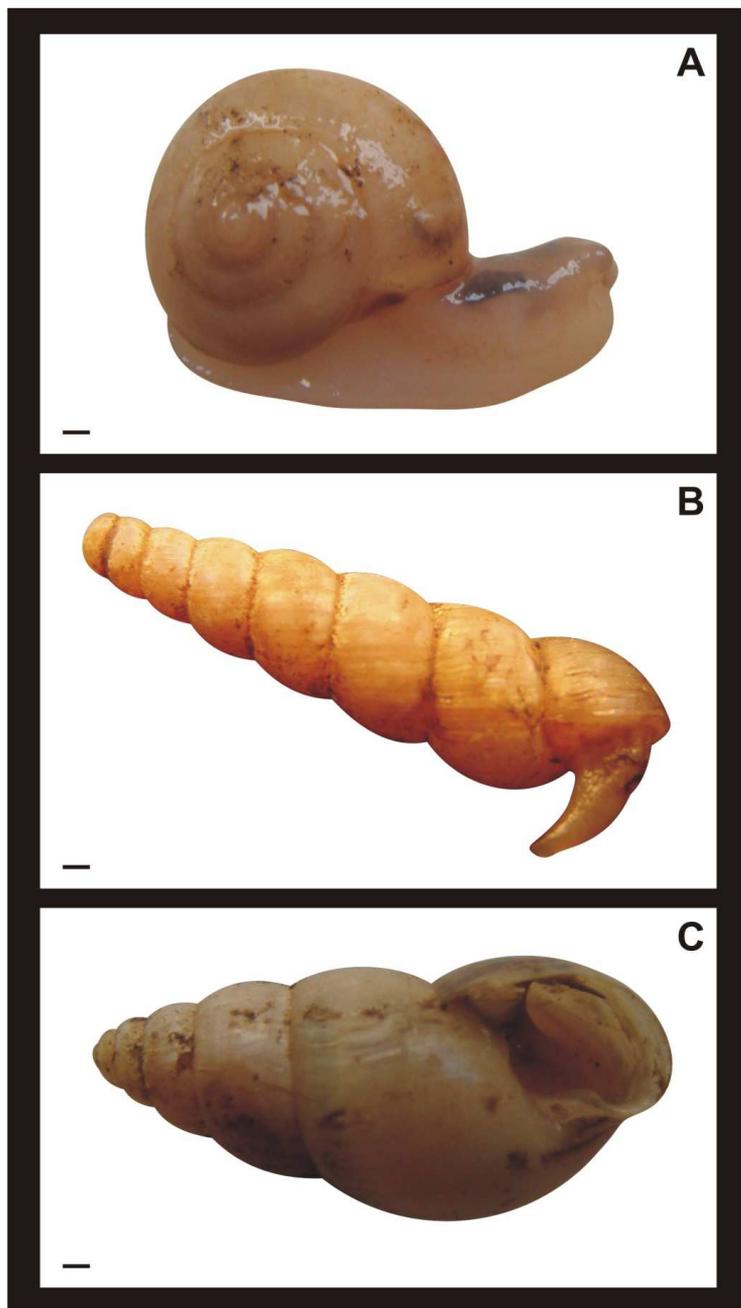


Figura 4.4. Moluscos mortos após a exposição ao extrato aquoso de folhas de *Solanum paniculatum*. (A): *Bradyabena similaris*; (B): *Subulina octona*; (C) *Leptinaria unilamellata*. (—= 10mm)



Figura 4.5. Teste para determinação do índice afrosimétrico (A): Espuma persistente formada no extrato aquoso de folhas de *Solanum paniculatum* (seta indicando tubo com 1cm de espuma); (B): Espuma persistente formada no extrato de frutos de *Solanum lycocarpum*.

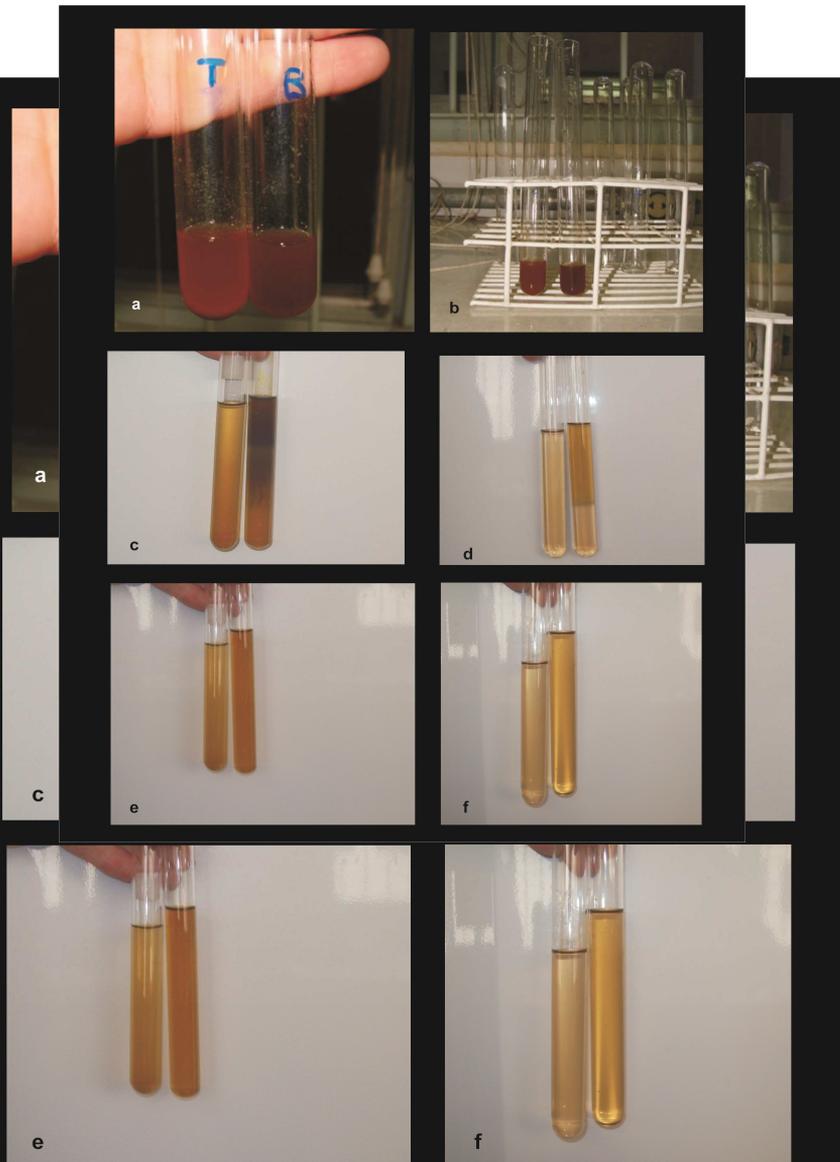
Tabela I: Massa de tanino em *Solanum paniculatum* e *Solanum lycocarpum* (média \pm desvio padrão), rendimento da reação e taninos totais no extrato e planta (%).

| | Massa de tanino na planta (g*100-1) | Rendimento total do extrato (%) | Taninos totais no extrato (%) | Taninos totais na planta (%) |
|----------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| <i>Solanum paniculatum</i> | 4,45 \pm 0,43 ^a | 44, 50 \pm 4.32 ^a | 5,15 \pm 2,41 ^a | 3,0 \pm 0,38 |
| <i>Solanum lycocarpum</i> | 2,58 \pm 0,47 ^b | 19, 79 \pm 0.47 ^b | 6,92 \pm 1,80 ^b | 4,28 \pm 0,38 |

* Letras diferentes indicam diferença estatísticas (p<0,05)

4.3.2. Cálculo da concentração letal (CL₉₀) e Sub-bletal (CL₅₀) do extrato aquoso de folhas de *Solanum paniculatum* e de frutos de *Solanum lycocarpum*

Ambas as plantas exibiram atividade moluscicida com concentrações inferiores a 105. As curvas concentração-resposta dos extratos aquosos de *S. paniculatum* e *S. lycocarpum* podem ser observadas nas figuras 4.7 (A-B), 4.8 (A-B) e 4.9 (A-B). As concentrações letais e sub-letais de cada extrato para as espécies de moluscos estão demonstradas na Tabela II.



Fi
fo
ly
ex
Fl

so de
anum
os no
; (F):

T

partes

aéreas de *Solanum paniculatum* e frutos de *Solanum lycocarpum* para as espécies *Bradybaena similaris*, *Leptinaria unilamellata* e *Subulina octona*.

| Moluscos | <i>Solanum paniculatum</i> | | <i>Solanum lycocarpum</i> | |
|--------------------------------|----------------------------|----------------------|---------------------------|----------------------|
| | CL ₉₀ (%) | CL ₅₀ (%) | CL ₉₀ (%) | CL ₅₀ (%) |
| <i>Bradybaena similaris</i> | 5,18 | 4,5 | 1,96 | 1,59 |
| <i>Leptinaria unilamellata</i> | 6,6 | 4,4 | 1,8 | 0,9 |
| <i>Subulina octona</i> | 5,9 | 1,46 | 3,92 | 0,9 |

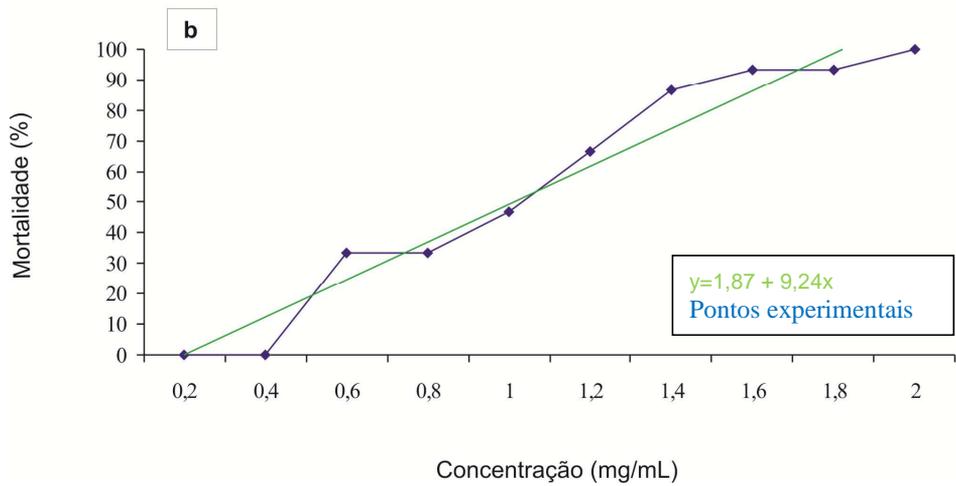
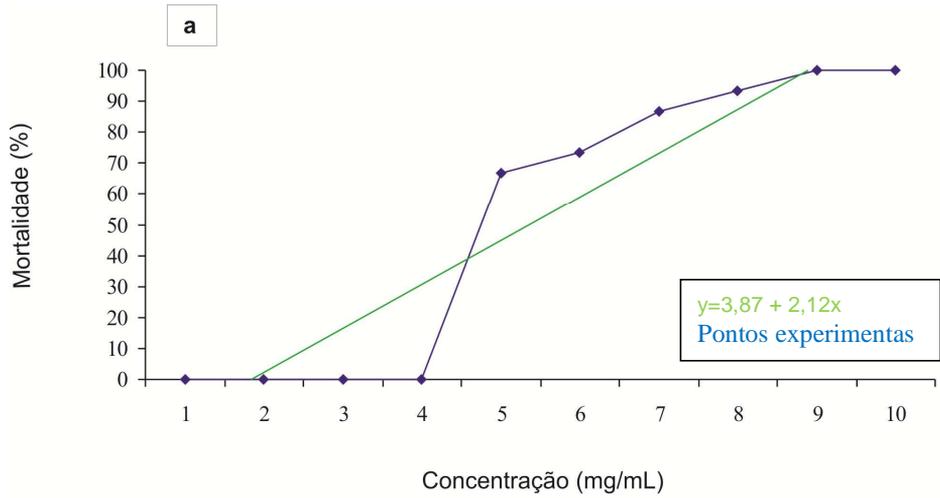


Figura 4.7. Curva concentração resposta aos extratos aquosos das folhas de *Solanum paniculatum* e frutos de *Solanum lycocarpum*. (A): *S. paniculatum* sobre *Bradybaena similis*; (B): *S. lycocarpum* sobre *B. similis*.

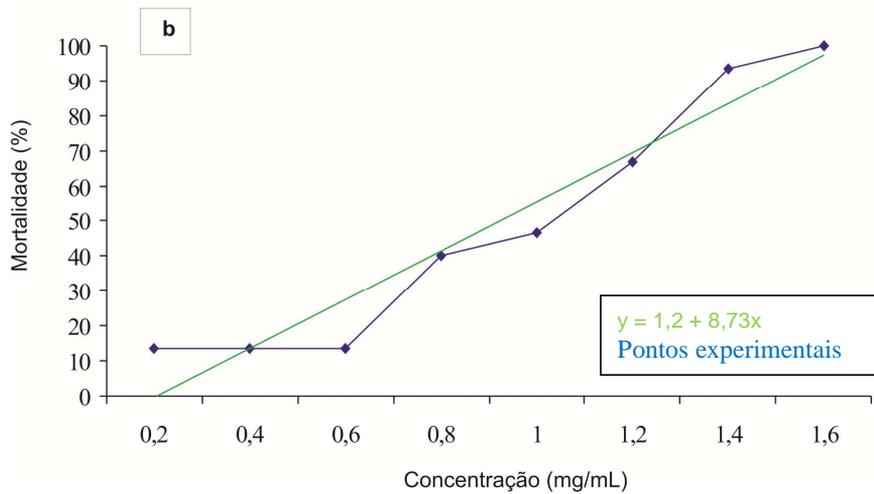
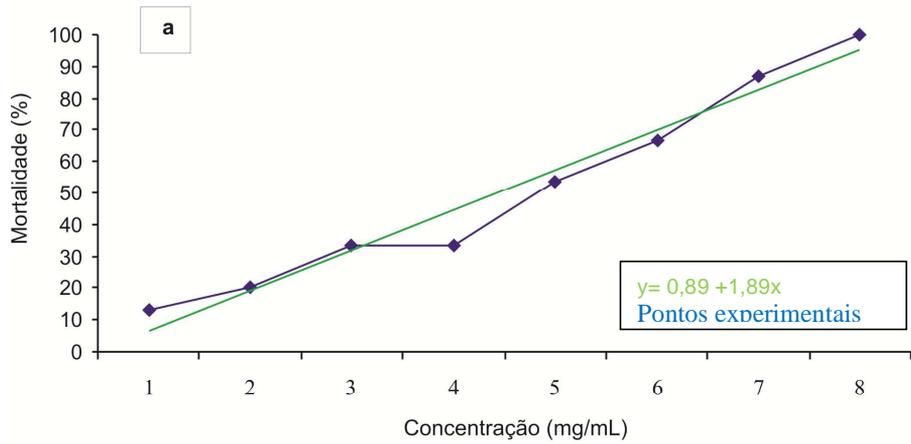


Figura 4.8. Curva concentração resposta aos extratos aquosos das folhas de *Solanum paniculatum* e frutos de *Solanum lycocarpum*. (A): *S. paniculatum* sobre *Leptinaria unilamellata*; (B): *S. lycocarpum* sobre *L. unilamellata*.

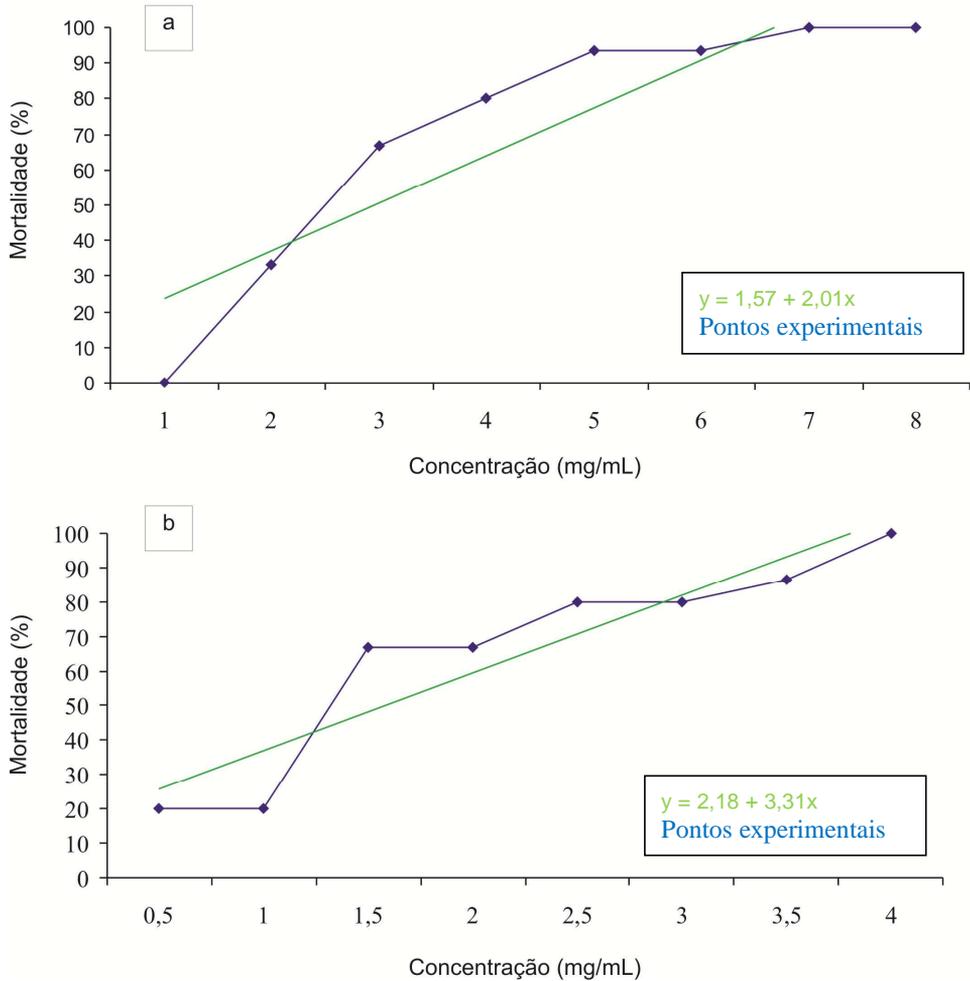


Figura 4.9. Curva concentração resposta aos extratos aquosos das folhas de *Solanum paniculatum* e frutos de *Solanum lycocarpum*. (A): *S. paniculatum* sobre *Subulina octona*; (B): *S. lycocarpum* sobre *S. octona*.

4.4 DISCUSSÃO

Para que um produto possa ser utilizado como moluscicida, espera-se que ele seja efetivo em doses baixas, de baixo custo, biodegradável e não tóxico para humanos (WHO, 1983; MARSTOM et al, 1996; RAO & SINGH, 2000). Para o controle de espécies de moluscos aquáticos transmissores do *Schistosoma mansoni* (Sambom, 1907), a Organização Mundial de Saúde indica que os produtos utilizados devam apresentar-se ativos em concentrações inferiores a 100 ppm (WHO, 1983), porém não foram encontradas indicações de limite de concentração para o controle de moluscos terrestres. Desse modo, considerou-se nesse estudo a concentração máxima inferior ou igual a 10% como concentração letal efetiva.

É importante considerar as diferenças existentes entre os ambientes aquático e terrestre em termos de exposição, difusão de substâncias e absorção dessas pelos animais, o que justifica a utilização de concentração mais elevada para animais terrestres. Além disso, as estratégias comportamentais exibidas pelos moluscos terrestres como enterramento (HYMAN, 1967; GIOKAS, 2005) e fisiológicas como a estivação (STOREY, 2000) dificultam a ação dos moluscicidas. O substrato pode atuar como uma barreira e diminuir o contato dos animais com o produto. A biodisponibilidade do moluscicida para moluscos aquáticos é maior devido à facilidade de dispersão e homogeneização dessas substâncias em água e devido às necessidades fisiológicas do molusco nesse sistema. Embora esses moluscos apresentem mecanismos de escape que muitas vezes lhe garantem a sobrevivência (JURBERG, 1988) esses sempre ficarão presentes sobre a atmosfera desse sistema permanecendo em contato com o moluscicida. Diferentemente dos aquáticos, os moluscos terrestres podem dispersar mais facilmente para outras regiões do terrário onde a concentração do moluscicida esteja mais baixa inclusive nas paredes do terrário permanecendo sobre este por algum tempo, diminuindo desta forma o contato direto com a solução.

Em relação ao comportamento dos moluscos durante a exposição aos extratos foi observado que a espécie *B. similaris* exibiu o comportamento de deslocamento vertical após a aplicação dos extratos, ou seja, o deslocamento para as paredes dos terrários. Esse comportamento é comum para a espécie sendo as paredes do terrário, sítios de repouso para essa espécie (JUNQUEIRA et al.; 2003) e pode ser compreendido como um comportamento de fuga. Porém observou-se que os animais permaneceram ativos, com a exposição da massa cefalopodia durante todo o período de exposição o que pode ocasionar um gasto desnecessário de energia. *Subulina octona*, apresentou um comportamento anormal de deslocamento para as paredes dos terrários. Normalmente, esse molusco permanece enterrado ou sobre o substrato completamente retraído no interior na concha. Para a espécie *L. unilamellata* foi registrado grande liberação de muco e o animal permaneceu em contato com os extratos durante todo o período.

Os resultados encontrados são semelhantes aos observados por Nascimento et al. (2008) que verificou deslocamento vertical em *S. octona* após a aplicação de *Furcraea foetida* Linné (Agavaceae) e Nascimento et al (2006) que verificaram intenso comportamento de fuga em *B. similaris* exposta a *Allamanda cathartica* Linné (Apocynaceae). É importante observar o comportamento dos moluscos para a formulação da dosagem, técnica e horário de aplicação. A fácil dispersão dos animais para regiões onde é concentração do moluscicida é mais baixa e o horário de atividade podem interferir a eficiência do controle.

O gênero *Solanum* apresenta grande diversidade de metabólitos secundários sendo taninos, saponinas e flavonóides os compostos mais citados e possivelmente responsáveis pela atividade biocida. Muitos trabalhos realizados com espécies desse gênero mostram que esses princípios são encontrados em concentrações variando de alta a moderada (ZHOU et al, 2006; CHINEDU et al, 2011; CHINTHANA & ANANTHI, 2012).

Não foram encontradas referências sobre o índice afrosimétrico para as plantas pesquisadas. CHINEDU et al. (2011) verificaram a presença significativa de saponinas em *Solanum aethyopicum* Linné e em *Solanum macrocarpum* Linné, porém não fizeram referência ao índice afrosimétrico.

Lôbo et al. (2010) verificaram a presença de taninos, saponinas, flavononas, flavonóis, xantonas, flavanois, chanconas e auronas no extrato etanólico de *S. paniculatum* e observaram a intensa ação anti-bacteriana desse extrato. Santos & Dantas (2008) verificaram a presença de saponina e glicoalcalóides no extrato de *S. paniculatum*, mas não relataram presença de tanino e flavonóides. Silva et al. (2005) verificaram que os extratos de raízes, partes aéreas e frutos de *S. paniculatum* foram inativos nas concentrações de 10µL, 50 µL e 100 µL sobre *B. glabrata*. Esses autores não verificaram presença de alcalóides, glicoalcalóides e alcalinas. Mahato et al. (1982) identificaram a presença de sapogeninas esteroidais no extrato dessa planta e relacionaram a atividade moluscicida a esse grupo químico. Araújo et al. (2010) verificaram a presença de taninos e saponinas no extrato *S. lycocarpum*, porém não registraram a presença de flavonóides diferente do que foi encontrado nesse estudo.

Na relação concentração-resposta houve uma distribuição dos pontos que satisfazem uma curva sigmoidal. Essa variação ocorre provavelmente devido à variabilidade genética dos indivíduos onde um grande número de indivíduos são sensíveis à concentrações intermediárias que geralmente é encontrada em estudos para pesticidas.

Observou-se também que as relações concentração-resposta obtidas para cada planta foram semelhantes, bem como foi semelhante à concentração de taninos. A presença desses dois compostos, que são altamente solúveis em água (SIMÕES et al. 2010), provavelmente está relacionada a toxidez dos extratos para as três espécies de moluscos. Entretanto a concentração de saponinas foi cerca de 5 vezes maior em *S. paniculatum* do que em *S. lycocarpum*. A diferença observadas na mortalidade provocada pelos dois extratos podem estar relacionadas concentrações distintas dos dois compostos (taninos e saponinas) constatados nesse estudo.

A atividade moluscicida de taninos e saponinas foi verificada anteriormente sobre moluscos aquáticos (LEMMICH et al., 1995; THILBORG et al., 1996; BRUSTOLIN & CORTEZ, 2000; TREYVAUD et al., 2000). O provável mecanismo de ação das saponinas relaciona-se a sua capacidade de lisar células (CUNHA & ROQUE, 2005) e complexar com esteróides, razão pela qual apresenta ação antifúngica e hipocolesterolemiantes (SIMÕES et al., 2010).

Diferentemente das saponinas, os taninos são polifenóis com vários grupamentos hidroxila, o que os tornam capazes de complexar com proteínas provocando sua precipitação e consequentemente sua inativação (AERTS et al. 1999), essa característica pode explicar seu mecanismo de ação. A complexação entre taninos e proteínas é uma característica dessa classe de compostos que justifica suas propriedades farmacológicas e biológica para o controle de insetos-praga, fungos, bactérias (SIMÕES et al., 2010) e moluscicida (LEMMICH, et al., 1995; BILIA et al., 2000). Entretanto ainda não foram encontrados estudos referentes ao mecanismo de ação dessas substâncias sobre moluscos moluscicidas.

Flavonóides de maneira geral atuam inibindo o sistema desintoxicante do molusco. SILVA (2007) verificou alterações na enzima do Citocromo P₄₅₀ no molusco terrestre *Cantareus aspersus* (Müller) (Helicidae) exposto a folhas de fumo, *Nicotiana tabacum* (Solanaceae). Essa enzima faz parte de uma antiga família de proteínas com ampla distribuição em bactérias, plantas e animais, atuando nos processos de desintoxicação degradando vários xenobióticos e transformando-os em moléculas de fácil excreção (SILVIA, 2007).

As moléculas sobre a qual essas enzimas atuam podem ser de origem endógena ou exógena como drogas e pesticidas. A atividade dos Citocromos P₄₅₀ referente aos agentes

tóxicos tem por objetivo facilitar a excreção destes compostos pela inserção de um átomo de oxigênio molecular. SILVA (2007) relacionou o dano ocorrido a essa enzima à presença de flavonóides nos extratos de *N. tabacum* e verificou que houve um acúmulo de xenobióticos na glândula digestiva de *C. aspersus*. Assim, a presença dessa classe química nos extratos utilizados nesse estudo pode estar relacionada à mortalidade dos moluscos.

De acordo com McCullough *et al.* (1980) a intoxicação dos moluscos pelo moluscicida provoca a ruptura do equilíbrio osmótico do molusco que está sob controle neuro-hormonal, baseado nesse conhecimento são dois os mecanismos que demonstram a morte dos moluscos. O primeiro é a retração da massa cefalopodia na concha com a liberação de hemolinfa e o segundo é a projeção anormal do animal para fora da concha. No presente estudo foi verificado ambas as situações nos animais mortos, porém a projeção da massa foi mais comum nas espécies *B. similaris*, *L. unilamellata* e *S. octona* do que a retração.

A exposição dos moluscos a substâncias tóxicas causa estresse fisiológico nesses animais ocorrendo frequentemente uma diminuição das reservas de carboidratos (MELLO-SILVA *et al.*, 2006; 2007; 2011; OLIVEIRA, 2007). Como segunda fonte de energia, esses utilizam as proteínas como processo compensatório (SCHMALE & BECKER, 1977). Mello-Silva *et al.* (2011) demonstraram o aumento dos níveis de proteínas e ácido úrico na hemolinfa de moluscos expostos a soluções moluscicidas, o que indica a degradação dessa como fonte de energia.

Entretanto, as proteínas podem precipitar após complexar com os taninos tornando-se desta forma indisponíveis para os moluscos. Além da complexação de taninos e proteínas, esses também podem se ligar a polissacarídeos, podendo também deixá-los indisponível ao animal, levando-o à morte. A presença de complexos tanino proteína-condensado e tanino carboidrato-condensado em fezes de ruminantes foi relatada na literatura (BEELEN *et al.*, 2008), evidenciando a inutilização dessas macromoléculas como fonte de energia a partir da complexação.

Pode-se concluir com esse estudo que *S. paniculatum* e *S. lycocarpum* apresentaram resultados satisfatórios para o controle de moluscos terrestres com dose letal inferior a 10%. Aliado a isso, a ampla distribuição desses vegetais e facilidade de obtenção das partes utilizadas insere-os como vegetais promissores a serem utilizados como moluscicidas. Estudos que enfatizem os mecanismos de ação dos princípios ativos desses vegetais em moluscos ainda são necessários para total esclarecimento dos efeitos verificados nesse estudo.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AERTS, T.J.; BARRY, T.N. & MCNABB, W.C. Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *In*. PANSERA, M.R.; SANTOS, A.C.A., PAESE, K.; WASUAM, R.; ROSSATO, M.; ROTA, L.D.; PAULETTI, G.F.; SERAFINI, L.A. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no nordeste do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n.1, p. 17-22, 2003.

ARAÚJO, J.L.B; BESSA, E.C.A. Moluscos de importância econômica do Brasil. II Subulinidae, *Subulina octona* (Bruguière) (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata, Stylommatophora). **Revista Brasileira de Zoologia**, v.10, p.497, 1993.

ARAÚJO, M.G.F.; CUNHA, W.R.; VENEZIANI, R.C.S. Estudo fitoquímico preliminar e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de extrato obtido de frutos de

Solanum lycocarpum A. St.-Hill (Solanaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 2, p.205-209, 2010.

BESSA, E.C.A.; RAÚJO, J.L.B. Oviposição, tamanho de ovos e medida do comprimento da concha em diferentes fases do desenvolvimento de *Subulina octona* (Bruguière) (Pulmonata, Subulinidae) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.2, p.647-654, 1995.

BEELEN, P.M.G.; FILHO, J.M.P.; BEELEN, R.N. Avaliação de taninos condensados em plantas forrageiras. **Associação Brasileira de Zootecnistas**. 26 a 30 de maio de 2008. João Pessoa, PB – UFPB/ABZ. 2008.

BILIA, A.R.; BRACA, A. MENDEZS, J.; MOREHI, I. Molluscicidal and piscicidal activities of Venezuelan Chrysobalanaceae plants. **Life Sciences**, v. 66, n. 4, p. 53-59, 2000.

BRITO, A.R.M.S.; BRITO, A.A.S. Forty years of Brazilian medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 39, n.1, p. 53–67, 1993.

BRUSTOLIN, A.; CORTEZ, D.A.G. Avaliação da atividade moluscicida da *Gymnema sylvestre* R. Br., (Asclepiadaceae). **Acta Scientiarum**, v. 22, p.605-608, 2000.

CHINEDU, S.N.; OLASUMBO, A.C.; EBOJI, O.K.; EMILOJU, O.C.; ARINOLA, O.K. & DANIA, D.I. Proximate and phytochemical analyses of *Solanum aethiopicum* L. and *Solanum macrocarpon* L. fruits. **Research Journal of Chemical Sciences**, v.1, p.63-71, 2011.

CHINTHANA, P.; ANANTHI, T. Protective Effect of *Solanum nigrum* and *Solanum trilobatum* Aqueous Leaf. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v.4, p.72-74, 2012.

CUNHA, A.P.; ROQUE, O.R. Esteróis e triterpenos: ácidos biliares, precursores da vitamina D e fitosteróides, cardioprotetores, hormonas esteróides, matérias-primas de núcleo esteróide usadas em sínteses parciais e saponósidos. In: CUNHA A.P., Farmacognosia e fitoquímica. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, p. 432-482, 2005.

D'ÁVILA, S.; DIAS, R.J.P.; BESSA, E.C.A.; DAEMON, E. Resistência à dessecação em três espécies de moluscos terrestres: aspectos adaptativos e significado para o controle de helmintos. **Revista Brasileira de Zoociências**, v.6, p.115-127, 2004.

DOAT, J. Les Tanins dans les bois Tropicaux. **Revue Bois et Florêt des Tropiques. Nogent**, n. 182: p37-35, 1978.

EMMICH, E.; CORNETT, C.; FURU, P.; JORSTIAN, C.L.; KNUDSEN, A.D.; OLSEN, C.E.; SALIH, A.; THILBORG, S.T. Molluscicidal saponins from *Catunaregam nilotica*. **Phytochemistry**, v. 39, n. 1, 63-68, 1995.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, Métodos Gerais. PP. 59-284 Agência Nacional de Vigilância Sanitária 5ª Edição, Brasília, 545p. 2010.

FERREIRA, P.; SOARES G.L.G.; D'ÁVILA S. & E.C.A. BESSA. The influence of caffeine and thymol on the survival, growth and reproduction of *Subulina octona* (Brugiière, 1789) (Mollusca, Subulinidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, p.945-952, 2009.

GIOKAS, S., PAFILIS, P.; VALAKOS, H. Ecological and physiological adaptations of the land snail *Albinaria caerulea* (Pulmonata, Clausillidae). **Journal of Molluscan Studies**, v.71, p.15-29, 2005.

HYMAN, L.H. 1967. **The invertebrates: Mollusca I**. Vol. VI. New York: MC Graw-Hill Book Company.

JUNQUEIRA, F.O.; D'ÁVILA, S.; BESSA, E.C.A.; PREZOTO, F. Relação entre idade e ritmo de atividade em *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Mollusca, Xanthonychidae) em condições de laboratório. **Revista de Etologia**, v. 5, n.1, p. 41-46, 2003.

JURBERG, P.; BARBOSA, J.V.; ROTENBERG, L. The role of behavior in the survival of *Biomphalaria glabrata* em bioassays with the plant molluscicide *Phytolacca dodecandra*. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83 n.1, p.41-46, 1988.

JURBERG, P., VASCONCELLOS, M.C; MENDES, N.M. Plantas empregadas como moluscicidas: Uma visão crítica. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.84(1), p. 76- 83, 1989.

KLAASEN, C.D. & J.B. WATKINS III. 2012. **Fundamentos em Toxicologia**. Editora AMGH, São Paulo. 415p.

LÔBO, K.M.S.; ATHAYDE, A.C.R.; SILVA, A.M.A.; RODRIGUES, F.F.G.; LÔBO, I.S.; BEZERRA, D.A.C.; COSTA, J.G.M. Avaliação da atividade antibacteriana e prospecção fitoquímica de *Solanum paniculatum* Lam. E *Operculina hamiltonii* (D.Don) D. F. Austin & Staples, do semi-árido paraibano. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, p.227-233, 2010.

LORENZI, H. 1999. **Árvores Brasileiras. Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**, v.2. Nova Odessa, Plantarum. 354p. 1999.

MCCULLOUGH, F.S.GAYRAL, P.H. DUNCAN, J.; CHRISTIE, J.D. Molluscicides in schistosomiasis control. Bulletin of the World Health Organization, v.58, n. 5, 681-689. 1980. MAHATO, S.B.; GANGULY, A.N.; SAHU, N.P. Steroid saponins. Phytochemistry, v. 21, p. 959-978, 1982.

MARSTON, A.; DUDAN, G.; GUPTA, M.P; SOIS, P.N.; CORREA, M.D.; HOSTETTMAN, K. Screening of Panamanian plants for molluscicidal activity. **International Journal of Pharmacology**, v. 34, p.15-18, 1996.

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

MELLO-SILVA, C. C.; VASCONCELLOS M.C.; PINHEIRO J, M. L. A RODRIGUES. Physiological changes in *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Pulmonata: Planorbidae) caused

by sub-lethal concentrations of the latex of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B (Euphorbiaceae). **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, p.3-8, 2007.

MESIA-VELA, S.; SANTOS, M.T., SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; LAPA, A.J. *Solanum paniculatum* L. (Jurubeba): Potent inhibitor of gastric acid secretion in mice. **Phytomedicine**, v. 9, p.508-514, 2002.

NASCIMENTO, C.A.A.; ARÉVALO, E. AFONSO-NETO, I.S.; BESSA, E.C.A.; SOARES, G.L.G. Efeito do extrato aquoso de folhas de *Allamanda cathartica* L. (Apocynaceae) sobre *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Mollusca, Bradybaenidae) em condições de laboratório. *Revista Brasileira de Zoociências*, v. 8, n. 1, p. 77-82, 2006.

NASCIMENTO, C.A.A. Influência de *Furcraea foetida* (L.) Haw sobre a sobrevivência, crescimento, reprodução e comportamento de *Subulina octona* (Bruguière, 1789) (Mollusca, Subulinidae). **Dissertação de mestrado em Comportamento e Biologia Animal**. Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora, MG. 2008.

NETO, P.A.S. P; CAETANO, L.C. Plantas Medicinais: Do Popular ao Científico. Editora EDUDAL, Maceió, 90p, 2005.

OLIVEIRA, C.S. Alterações nos depósitos de glicogênio e conteúdo de glicose na hemolinfa de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca: Gastropoda) hospedeiro intermediário de *Angiostrongylus*, exposta ao látex de coroa-se-cristo *Euphorbia splendens* var. *hilopii*. **Dissertação de mestrado em Ciência Veterinárias**, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 55p. 2007.

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

RAO, I.G.; SINGH., D.K. Effect of single and binary combinations of plant-derived molluscicides on reproduction and survival of the snail *Achatina fulica*. **Environmental Contamination and Toxicology**, v.39, p.486-493, 2000.

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

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

SILVA, T.M.S.; CÂMARA, C.A.; AGRA, M.F.; CARVALHO, M.G.; FRANA, M.T.; BRANDOLINE, 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, p.449-452, 2006.

SILVA, L.C.; MEIRELES, L.M.O.; JUNQUEIRA, F.O.; BESSA, E.C.A. Development and reproduction in *Bulimulus tenuissimus* (Mollusca, Bulimulidae) in laboratory. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 25, n.2, p.220-223, 2008.

SILVA, N. F. S., COGO, J., WIEPIESKI, C. C. P., LAVERDE JR. Bioensaio de atividade moluscicida adaptado para a avaliação de extratos de plantas medicinais. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, v.11, n.2, p.179-181, 2008

SILVIA, F.R. 2007. Genotoxicidade ocasionada pelas folhas do fumo (*Nicotina tabacum*) expostos ou não a agrotóxicos, em *Cantareus aspersus*. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RG. Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/10963/000600913.pdf?sequence=1>. Acesso em Dezembro de 2011.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6^o edição. UFRGS. p. 634-712. 2010.

SINGH, A.; SINGH, D.K.; MISHRA, T.N.; AGARWAL, R.A. Molluscicides of plant origin. **Biologic Agriculture and Horticulture**, v.13, p.205-252, 1996.

THILBORG, S.T.; CORNETT, C.; LEMMICH, E. Investigations of molluscicidal saponins from the Endod plant *Phytolacca dodecandra*. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.404, p.151-164, 1996.

TREYVAD, V.; MARSTON, A.; DYATMIKO, W.; HOSTETTMANN, K. Molluscicidal saponins from *Phytolacca icosandra*. **Phytochemistry**, v.55, p.603-609, 2000.

ZHOU, X.; HE, X. WANG, G.; GAO, H.; ZHOU, G.; YE, W.; YAO, X. Steroidal saponins from *Solanum nigrum*. **Journal of Natural Products**, v.69, n.8, 1158-1163, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Memoranda: molluscicide screening and evaluation. **Bulletin World Health Organization**, v.33, p.567-576, 1965.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Quality control methods for medicinal plant materials**. Genebra: WHO/Pharm/92.559, p. 33-35, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Reports Of The Scientific Group On Plant Moluscicide. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 61. p. 927-929. 1983.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Specifications and evaluations for public health pesticides**. World Health Organization, Geneva, 24 p. 2002.

Format

CAPÍTULO 2

ALTERAÇÕES REPRODUTIVAS E NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS DE *Bradybaena similaris* (FÈRUSSAC, 1821), *Leptinaria unilamellata* (D'ORBIGNY, 1835) E *Subulina octona* (BRUGÜIÈRE, 1789) EXPOSTAS À CL₅₀ DE *Solanum paniculatum* L. E *Solanum lycocarpum* A.S.t.-HIL

Alterações reprodutivas e no metabolismo de carboidratos de *Bradybaena similaris* (Fèrussac, 1821), *Leptinaria unilamellata* (D' Orbigny, 1835) e *Subulina octona* (Brugüière, 1789) EXPOSTAS À CL₅₀ DE *Solanum paniculatum* Linné e *Solanum lycocarpum* A.S.t.-Hil

RESUMO

O objetivo desse estudo foi verificar os efeitos da CL₅₀ dos extratos aquosos de *S. paniculatum* e *S. lycocarpum* sobre a fecundidade e o metabolismo de carboidratos de *B. similaris*, *L. unilamellata* e *S. octona*. Para tanto, moluscos adultos de cada espécie foram expostos à CL₅₀ dos extratos aquosos de ambas as plantas durante 24, 48 e 72 horas. A fecundidade média (número ovos (ou jovens)/ molusco vivo). Foi verificada a redução significativa da fecundidade dos moluscos das espécies *B. similaris* e *L. unilamellata* expostos aos dois extratos. Em *S. octona* não foi verificada a redução de número de ovos, porém observou-se que o número de jovens produzidos foi maior quando expostos aos extratos que o controle. Houve movimentação das reservas de carboidratos evidenciados pelo aumento da glicose livre na hemolinfa e de glicogênio na massa cefapedia com concomitante redução deste na glândula digestiva e também redução de galactogênio na glândula de albúmen quando os moluscos foram expostos aos extratos. Houve também o aumento significativo da atividade da lactato desidrogenase principalmente nos moluscos expostos à CL₅₀ de *S. paniculatum* nas primeiras 24 horas após a exposição, demonstrando que nesse período houve aceleração do metabolismo anaeróbio possivelmente devido aos efeitos da intoxicação. A redução da fecundidade dos moluscos expostos pode estar relacionada ao direcionamento das reservas para a desintoxicação e sobrevivência dos animais. Os resultados demonstram, portanto, que os extratos de ambas as plantas promoveram alterações fisiológicas nos moluscos, as quais refletiram negativamente na fecundidade, havendo um processo de castração parcial dos moluscos pelo desvio de nutrientes que seriam destinados à atividade reprodutiva.

Palavras- Chave: carboidratos, fecundidade, moluscicida, molusco terrestre.

ABSTRACT

The aim of the present study was to verify the effects of LC₅₀ of aqueous extract of *S. paniculatum* and *S. lycocarpum* on fecundity and carbohydrate metabolism of *B. similaris*, *L. unilamellata* and *S. octona*. For the assays, adult snails of each species were exposed to the LC₅₀ of the extracts of both plants during 24, 48 and 72 hours. It was observed a significantly reduction in fecundity of *B. similaris* and *L. unilamellata* exposed to both extracts. It was evidenced a reallocation of carbohydrates by an increase of free glucose in hemolymph and glycogen in cephalopodial mass with a reduction of it in digestive gland and of galactogen in albumen gland after the exposure to the extracts. It also occurred a significantly increase in the activity of lactate dehydrogenase in snails exposed to LC₅₀ of *S. paniculatum* in the first 24 hours after exposure, demonstrating an acceleration in anaerobic metabolism probably due to the intoxication. The reduction in snail's fecundity after exposure can be related to the redirection of the energy reserves to detoxification and survival of snails. Therefore, the results showed that both plant extracts provoked physiological alterations in snails, with adverse effects in fecundity, with a process of partial castration by the deviation of nutrients that would be used in reproduction efforts.

Key words: carbohydrate, fecundity, molluscicide, land snail.

5.1 INTRODUÇÃO

As espécies *Bradybaena similaris* (Fèrussac, 1821), *Leptinaria unilamellata* (D'Orbigny, 1835) e *Subulina octona* (Brugüiere, 1789), destacam-se por atuar como hospedeiro de helmintos e por ser uma importante praga de vegetais principalmente para hortas domiciliares (ARAÚJO, 1989; PINHEIRO & AMATO, 1994; ARAÚJO & BESSA, 1995). Nesse contexto o controle das populações dessas espécies de moluscos torna-se uma eficiente estratégia para o controle de populações de parasitos e para a redução de prejuízos econômicos.

Além disso, são espécies cujas características biológicas como tempo para atingir a maturidade, estratégias reprodutivas, fecundidade e tempo de vida, entre outros, estão bem descritas na literatura o que as torna bons modelos para testes com moluscidas (ALMEIDA & BESSA, 2000; 2001 a,b; D'ÁVILA & BESSA, 2005 a,b; CARVALHO et al., 2008; 2009).

Os moluscidas atualmente empregados apresentam limitações quanto à especificidade, ao custo e toxidez (JURBERG et al. 1989). Além disso, a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1965, 1983) incentiva as pesquisas de substâncias de origem vegetal para o controle desses animais. No Brasil, as pesquisas com moluscidas vegetais se concentram no controle de espécies dulciaquícolas hospedeiras do *Schistosoma mansoni* (Sambom, 1907) e *Fasciola hepática* L. 1758 (JURBERG et al. 1989; MENDES et al., 1997; SCHALL et al, 1998; VASCONCELOS & SCHALL, 1996; VASCONCELOS & AMORIM, 2003a,b). Muito pouco tem se estudado em relação ao controle de moluscos terrestres.

Espécies da flora brasileira se destacam em pesquisas de grupos com atividade farmacológica. Muitas plantas utilizadas na medicina popular contra infecções e parasitoses que fornecem um bom indicativo de propriedade biocida sem riscos à saúde humana (BRITO & BRITO, 1993). A família Solanaceae reúne espécies com variados níveis de toxidez, destacando *Solanum paniculatum* Linné e *Solanum lycocarpum* A.S.t.-Hil que apresenta aplicação em fitoterapia e apresentam atividade bactericida, fungicida e moluscida comprovadas (ZHOU et al, 2006; CHINEDU et al, 2011; BHAGYASHREE & JOGEN CHANDRA, 2012; CHINTHANA & ANANTHI, 2012; XAVIER et al., 2010).

Além da letalidade imediata dos moluscos, a intoxicação por extratos vegetais pode interferir diretamente no metabolismo dos animais causando a redução da fecundidade dos animais por atuarem diretamente na redução da síntese de reservas energéticas e mobilizando as reservas existentes para a desintoxicação do animal (MELLO-SILVA et al., 2007; 2010). Esse fato pode se tornar uma eficiente forma de controle, pois refletirá na redução da densidade populacional futura. O controle de molusco não deve ser entendido como o extermínio de populações de determinada área, mas sim como tentativa de manutenção das populações em equilíbrio de modo a reduzir os impactos negativos por elas causados.

Foi objetivo desse estudo, verificar as alterações reprodutivas provocadas pela exposição à CL₅₀ dos extratos aquosos de *S. paniculatum* e *S. lycocarpum* sobre indivíduos adultos das espécies *B. similaris*, *L. unilamellata* e *S. octona*. Foram avaliadas as alterações no metabolismo de carboidratos através da análise da concentração de glicose na hemolinfa, conteúdo de glicogênio na glândula digestiva e massa cefalopodia, conteúdo de galactogênio na glândula de albúmen e atividade da desidrogenase láctica (LDH) (E.C. 1.1.1.27/1.1.1.28) nos moluscos expostos.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. Local dos experimentos

Todos os animais utilizados nesse estudo foram criados no laboratório de Biologia de Moluscos Prof. Arnaldo dos Santos Coelho, Museu de Malacologia Prof. Maury Pinto de Oliveira, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, onde também foram realizados os experimentos de biologia reprodutiva. As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Biofísica, Departamento de Ciências Fisiológicas Instituto de Biologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, município de Seropédica, Rio de Janeiro.

5.2.2. Criação e manutenção dos moluscos

Os moluscos foram criados em terrários de polietileno de 1000 mL de capacidade desde o nascimento, em densidades de 10 animais por terrário contendo terra vegetal esterilizada e umedecida (SILVA et al., 2008) até o registro das primeiras oviposições e/ou jovens nos terrários.

Durante período experimental, inclusive os períodos precedentes aos testes, os animais foram alimentados com uma mistura de ração para aves em crescimento e carbonato de cálcio na proporção 3:1, oferecidas em recipiente plástico *ad libitum* e reposta em dias alternados (ARAÚJO & BESSA, 1995).

5.2.3. Obtenção e preparação do material vegetal e dos extratos

A coleta e acondicionamento do material vegetal, bem como a preparação dos extratos aquosos foram realizados conforme descrito no Capítulo I.

5.2.4. Condições dos experimentos

Todos os testes foram realizados em condições naturais de temperatura e umidade relativa do ar e fotoperíodo. A temperatura média da localidade de estudo durante o período foi de $23^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ e de umidade $82\% \pm 5\%$.

5.2.5. Análise das alterações na fecundidade de adultos de *Bradybaena similis*, *Leptinaria unilamellata* e *Subulina octona* expostos à CL_{50} de *Solanum paniculatum* e *Solanum lycocarpum*

Para avaliar as alterações na fecundidade 90 moluscos de cada espécie, distribuídos em grupos de 10 moluscos/grupo foram expostos por contato dérmico direto a 8mL de cada extrato durante 24, 48 e 72 horas, sendo que para cada período foram feitas três repetições. Para a exposição os animais foram acondicionados no centro de terrários plásticos de 500 mL de capacidade e os extratos aplicados diretamente sobre eles com uma seringa. Grupos controles com mesmo número de moluscos foram acondicionados em terrários semelhantes e receberam a mesma quantidade de água destilada.

Após cada período de exposição, foi feita a verificação da mortalidade e os moluscos sobreviventes foram transferidos para outros terrários contendo terra vegetal esterilizada e umedecida como substrato (SILVA et al, 2008) e foram alimentados conforme (BESSA & ARAÚJO, 1995) durante 30 dias.

Durante esse período, foi realizada a quantificação do número de posturas e ovos produzidos pelos moluscos expostos e não expostos aos extratos. A fecundidade média foi expressa em número médio de ovos/molusco vivo para cada período de exposição.

2.2.6. Alterações no metabolismo de carboidratos de *Bradybaena similis*, *Leptinaria unilamellata* e *Subulina octona* expostos à CL₅₀ de *S. paniculatum* e *Solanum lycocarpum*

As alterações no metabolismo de carboidratos foram verificadas através de determinações das concentrações de glicose e atividade da LDH na hemolinfa, glicogênio nos tecidos da glândula digestiva e massa cefalopediosa, e galactogênio da glândula de albúmen dos moluscos expostos à CL₅₀ dos extratos de *S. paniculatum* e *S. lycocarpum* durante 24, 48 e 72 horas.

Para avaliar as alterações na concentração de glicose moluscos adultos de cada espécie (60 animais da espécie *B. similis*, 120 animais da espécie *L. unilamellata* e 120 da espécie *S. octona*) foram expostos aos extratos segundo metodologia mencionada e durante 24, 48 e 72 horas. O mesmo número de moluscos de cada espécie recebeu água destilada e ficaram expostos durante os mesmos períodos.

A cada intervalo de exposição foi coletada hemolinfa através de punção cardíaca. A concentração de glicose foi determinada pela adição de 10ml de soro ao meio contendo solução tampão fosfato de sódio 0,05M, pH 7,45, aminoantipirina 0,03mM, 15mM de p-hidroxibenzoato de sódio e um mínimo de 12kU de glucose oxidase e 0,8kU de peroxidase por litro.e as absorbâncias foram lidas em 510nm contra branco de reação e utilizando padrão de D-glicose 100mg/dL (Doles Reagentes®). Leituras espectrofotométricas foram realizadas com três repetições e os resultados expressos em mg/dL (Doles®).

Também foi coletada hemolinfa para determinação da atividade da LDH através da exposição do mesmo número de moluscos e procedimentos citados anteriormente. A atividade da LDH foi determinada pela adição de 25µL de hemolinfa a 1mL de substrato contendo solução 0,1M de lactato, 0,005M de o-fenantrolina em Tris 0,2M pH 8,8, e uma gota de solução 0,012M de sulfato de ferro amoniacal, sendo a mistura incubada a 37°C por 2 minutos. Após este tempo, foi adicionada uma gota da solução contendo 130mg de NAD e 4mg de fenazinametasulfato, sendo novamente misturado e incubado a 37°C por 5 minutos. Após este período foi adicionado 1mL da solução estabilizadora de ácido clorídrico 0,5M. A leitura da absorvância foi feita em espectrofotômetro em 510nm contra o branco de reação e utilizando solução padrão de LDH contendo 350U.I/L de LDH. Os resultados foram expressos em 1µmol de NADH/L de hemolinfa/minuto.

Para análise de glicogênio e galactogênio os moluscos foram retirados das conchas e dissecados em solução fisiológica sob microscópio estereoscópio para obtenção da glândula de albúmen, glândula digestiva e massa cefalopediosa. Foram utilizados 60 animais da espécie *B. similis*, 240 animais da espécie *L. unilamellata* e 240 da espécie *S. octona* que foram expostos segundo procedimentos citados anteriormente. Mesmo número de animais de cada espécie foi exposto à água destilada.

Os tecidos de cada órgão foram pesados individualmente em balança analítica (Bosch SAE200) (magnificância=10⁻⁴g), acondicionados em recipientes plásticos, e mantidos em banho de gelo durante o procedimento, evitando desse modo a degradação enzimática dos carboidratos. Foi obtido um “pool” de tecidos com um grama de peso fresco, o qual foi processado para qualificação e quantificação dos polissacarídeos.

Para obtenção dos precipitados de glicogênio e galactogênio, os tecidos da glândula digestiva, glândula de albúmen e massa cefalopediosa foram homogeneizados em frascos de Potter-Elvehjen contendo ácido tricloro acético (TCA) 10 % na proporção de 10ml de TCA:

1g de tecido e centrifugados a 1935xg durante cinco minutos. Após a centrifugação, foi feita a filtragem do sobrenadante em papel filtro qualitativo e o sobrenadante filtrado foi aquecido em banho-maria a 40°C durante cinco minutos. Adicionou-se ao sobrenadante etanol gelado (na proporção de 2ml etanol:1ml sobrenadante) permanecendo a mistura em banho de gelo por 15 minutos e centrifugado novamente a 17300xg durante 10 minutos (PINHEIRO & GOMES, 1994).

Os precipitados obtidos foram submetidos a hidrólise ácida a quente (ácido clorídrico [HCl] 1mol/L a 100°C por 30 minutos) e posterior quantificação espectrofotométrica, através da técnica do 3,5 dinitrosalicilato (3,5 DNS) (SUMNER, 1925), com leitura de absorbância em comprimento de onda de 535nm. Os resultados foram calculados pela Lei de Lambert-Beer com base em, pelo menos, três leituras coerentes e expressos em miligramas de glicose ou miligramas de galactose por grama de tecido, peso fresco.

2.2.7. Análise dos dados

Para a comparação entre a fecundidade, concentração de carboidratos (glicose, glicogênio e galactogênio) e atividade da LDH foi utilizado o teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey do programa Bioestat, versão 5.0. O teste de Regressão Linear Simples foi utilizado para avaliar a relação entre os resultados encontrados e o tempo de exposição aos extratos.

5.3 RESULTADOS

5.3.1. Efeitos da exposição ao extrato aquoso das folhas de *Solanum paniculatum*

5.3.1.1. Fecundidade

A fecundidade de *B. similaris* exposta à CL₅₀ do extrato de *S. paniculatum* foi significativamente menor que de moluscos não expostos (p<0,05). Considerando o tempo total de observação, a redução da fecundidade foi de 75%, 93% e 79% para os grupos expostos durante 24, 48 e 72 horas, respectivamente. A fecundidade média semanal dos moluscos expostos ao extrato aquoso das folhas de *S. paniculatum* pode ser observada na Tabela I.

Tabela I – Fecundidade média semanal (número de ovos/moluscos vivos) de *Bradybaena similaris* exposta ao extrato aquoso das folhas de *Solanum paniculatum* durante 24, 48 e 72 horas.

| Semanas | Tempo de exposição (horas) | | | | | |
|------------------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | 24 | | 48 | | 72 | |
| | Controle | Exposto | Controle | Exposto | Controle | Exposto |
| 1 | 8,3 ± 5,4 ^a | 4,7 ± 3,3 ^b | 7,0 ± 3,9 ^a | 0,0 | 11,1 ± 4,3 ^a | 0,9 ± 1,2 ^b |
| 2 | 6,6 ± 2,4 ^a | 0,0 | 8,7 ± 2,5 ^a | 2,5 ± 3,5 ^b | 6,3 ± 2,6 ^a | 3,5 ± 2,6 ^b |
| 3 | 6,3 ± 3,5 ^a | 0,9 ± 1,2 ^b | 6,8 ± 1,8 ^a | 0,5 ± 0,7 ^b | 6,9 ± 2,6 ^a | 2,6 ± 2,0 ^b |
| 4 | 6,4 ± 2,5 ^a | 2,5 ± 1,5 ^b | 5,5 ± 3,3 ^a | 0,0 | 8,1 ± 4,0 ^a | 0,0 |
| Média mensal ± Desvio Padrão | 6,9 ± 3,40 ^a | 2,0 ± 1,50 ^b | 7,0 ± 2,87 ^a | 0,75 ± 1,05 ^b | 8,1 ± 3,40 ^a | 1,8 ± 1,45 ^b |

* Letras diferentes indicam diferença significativa entre moluscos expostos e controle em cada intervalo de exposição (ANOVA, p<0,05).

A fecundidade de *L. unilamellata* foi reduzida em 98% quando exposta à CL₅₀ do extrato aquoso das folhas de *S. paniculatum* durante 24 horas. Além disso, para esse grupo apenas foi observada atividade reprodutiva na segunda semana pós-exposição (Tabela II). Os moluscos expostos por 48 e 72 não se reproduziram, sendo verificada mortalidade total dos animais na terceira e segunda semana pós-exposição para cada intervalo de exposição, respectivamente (Tabela II).

Tabela II – Fecundidade média semanal (número de jovens/moluscos vivos) de *Leptinaria unilamellata* exposta ao extrato aquoso de folhas de *Solanum paniculatum* durante 24, 48 e 72 horas.

| Semanas | Tempo de observação (horas) | | | | | |
|---------------------------------|-----------------------------|------------------------|------------|---------|-----------|---------|
| | 24 | | 48 | | 72 | |
| | Controle | Exposto | Controle | Exposto | Controle | Exposto |
| 1 | 5,00 ± 0,80 | 0,0 | 4,50 ± 1,5 | 0,0 | 1,5 ± 0,3 | 0,0 |
| 2 | 3,30 ± 0,50 ^a | 1,0 ± 1,4 ^b | 5,00 ± 2,0 | 0,0 | 3,5 ± 1,5 | * |
| 3 | 2,90 ± 1,10 | 0,0 | 4,00 ± 2,0 | * | 2,5 ± 1,2 | * |
| 4 | 2,90 ± 1,20 | 0,0 | 4,10 ± 1,1 | * | 2,0 ± 1,0 | * |
| Média mensal ± Desvio Padrão | 3,50±0,90 ^a | 0,25±0,35 ^b | 4,40±1,65 | 0,0 | 2,38±1,00 | 0,0 |

¹Letras diferentes indicam diferença significativa entre exposto e controle nos em cada intervalo de exposição (ANOVA, p<0,05). * Mortalidade dos grupos experimentais.

Na primeira semana pós-exposição não foram verificadas ovipostura de *S. octona* exposta ou extrato. A partir da segunda semana, os moluscos não expostos iniciaram o oviposição que foi mantida até o fim das observações. Para os moluscos expostos apenas foi observada atividade reprodutiva na segunda semana quando expostos ao extrato durante 24 horas e na terceira quando durante 48 e 72 horas (Tabela III). Não foi observada diferença estatística entre o número médio semanal de ovos produzidos por moluscos expostos e não expostos (p>0,05), porém analisando-se a fecundidade média mensal foi observada redução significativa para os moluscos expostos à CL₅₀ do extrato de *S. paniculatum* (p<0,05) (Tabela III).

A análise do número de jovens liberados também mostrou que a exposição à CL₅₀ de *S. paniculatum* não reduziu significativamente a fecundidade (p>0,05) nos intervalos de tempo avaliados em relação ao grupo controle (Tabela IV).

Comparando-se o número médio de ovos e jovens produzidos por cada grupo (expostos e controle) em cada intervalo foi verificado que a exposição ao extrato ocasionou um aumento da retenção de ovos no útero e liberação de jovens formados (p<0,05) (Tabelas III e IV).

Tabela III – Fecundidade média semanal (número de ovos/moluscos vivos) de *Subulina octona* exposta ao extrato aquoso de folhas de *Solanum paniculatum* durante 24, 48 e 72 horas.

| Semanas | Tempo de observação (horas) | | | | | |
|---------------------------------|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|
| | 24 | | 48 | | 72 | |
| | Controle | Exposto | Controle | Exposto | Controle | Exposto |
| 1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 2 | 4,3±3,4 ^{a,A} | 1,0±0,8 ^{a,A} | 1,3 ± 0,5 ^A | 0,0 | 0,5 ± 0,3 ^A | 0,0 |
| 3 | 3,0± 2,9 ^A | 0,0 | 1,4± 0,9 ^{a,A} | 3,0±2,2 ^{a,A} | 4,75± 3,0 ^{a,A} | 3,0±1,4 ^{a,A} |
| 4 | 1,1± 0,8 ^A | 0,0 | 1,3±0,5 ^A | 0,0 | 0,70 ± 0,5 ^A | 0,0 |
| Média mensal ± Desvio Padrão | 2,0 ± 1,8 ^a | 0,25 ± 0,2 ^b | 1,0± 0,5 ^a | 0,75±0,55 ^b | 1,5±0,95 ^a | 0,75±0,35 ^b |

¹Letras diferentes indicam diferença significativa entre exposto e controle nos em cada intervalo de exposição (ANOVA, p<0,05).

Tabela IV – Fecundidade média semanal (número de jovens/moluscos vivos) de *Subulina octona* exposta ao extrato aquoso de folhas de *Solanum paniculatum* durante 24, 48 e 72 horas.

| Semanas | Tempo de observação (horas) | | | | | |
|---------------------------------|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| | 24 | | 48 | | 72 | |
| | Controle | Exposto | Controle | Exposto | Controle | Exposto |
| 1 | - | 0,35±0,5 ^{a,A} | 2,5±1,9 ^{a,A} | 1,7±2,4 ^{a,A} | 1,0 ±0,0 | 0,0 |
| 2 | 13,0±4,3 ^{a,f} | 5,5±1,7 ^{a,A} | 3,5±1,7 ^{a,A} | 1,7±1,2 ^{a,A} | 4,5± 3,7 | 0,0 |
| 3 | 3,7±1,9 ^{a A} | 13,0±4,3 ^{a,A} | 11,7±3,4 ^{a,A} | 10,0±7,8 ^{a,A} | 16,3±6,0 ^{a,A} | 9,0±6,4 ^{a,A} |
| 4 | 3,0±1,5 ^{a A} | 2,7±0,9 ^{a,A} | 8,0±4,6 ^{a,A} | 2,5±3,3 ^{a,A} | 8,7± 0,9 ^a | 2,0±2,8 ^{a,A} |
| Média mensal ± Desvio Padrão | 4,9±1,9 | 5,4±1,9 | 6,4±2,9 | 6,4± 2,9 | 7,6 ±1,0 | 2,7±2,3 |

¹ Letras diferentes indicam diferença significativa entre exposto e controle nos em cada intervalo de exposição (ANOVA, p<0,05). * Mortalidade dos grupos experimentais.

5.3.1.2. Concentração de galactogênio na glândula de albúmen

Houve redução significativa do conteúdo de galactogênio na glândula de albúmen de *B. similaris* em decorrência da exposição à CL₅₀ do extrato de *S. paniculatum* (Figura 5.1A). Quando expostos houve redução de 19% em 24 horas, porém não essa redução não foi significativa (p>0,05). Em 48 a redução foi de 175% (Q=5,7; p<0,05) e 72 horas de 89% (Q=7,14; p<0,01) (Figura 5.1A). Não foi observada correlação entre a redução no conteúdo de galactogênio e tempo de exposição a CL₅₀ de *S. paniculatum* (F=0,48; p=0,62; r²=0,32).

Ao contrário do observado para a primeira espécie, a concentração de galactogênio na glândula de albúmen de *L. unilamellata* manteve-se mais elevada na glândula de albúmen dos moluscos expostos ao extrato em todos os intervalos (p<0,01) (Figura 5.1B). O percentual de elevação foi de 110%, 176% e 100% para 24, 48 e 72 horas, respectivamente. Não houve correlação entre o conteúdo de galactogênio e o tempo de exposição à *S. paniculatum* (F=0,008; p=0,94; r²=0,008).

Em *S. octona* foi verificado que nas primeiras 24 horas pós-exposição o conteúdo de galactogênio foi mais elevado (19%), porém não diferiu do controle (F=4,20; p=0,10). Em 48 horas, entretanto, houve aumento significativo (17%) da concentração de galactogênio (Q=5,08; p<0,05) e o contrário foi observado em 72 horas, quando houve redução significativa da concentração desse polissacarídeo (32%) na glândula de albúmen (Q=53,00; p<0,01) (Figura 5.1 C).

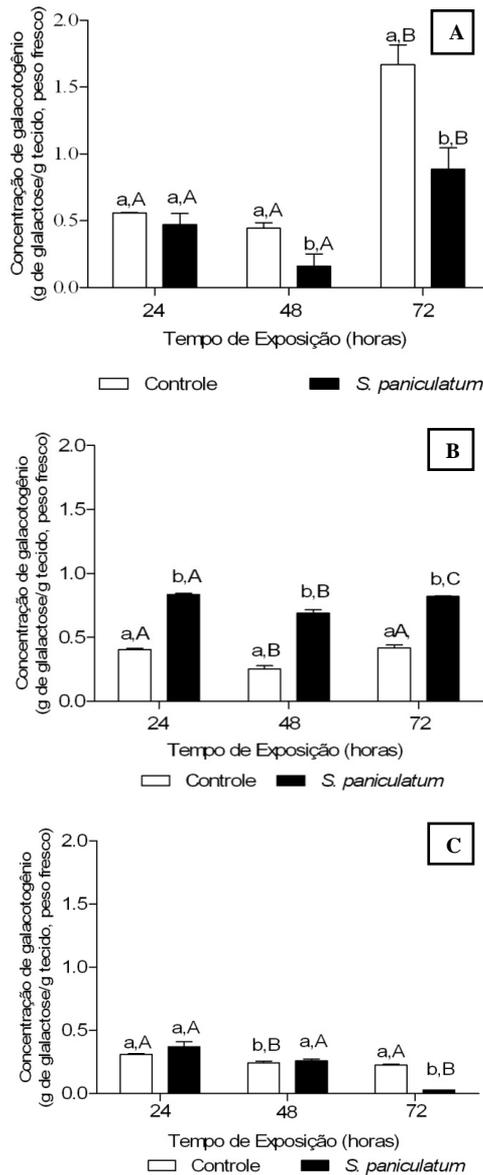


Figura 5.1. Conteúdo de galactose (g/dL) na glândula de albúmen de moluscos expostos à CL₅₀ do extrato aquoso de *Solanum paniculatum* durante 72 horas. (A) *Bradybaena similaris*, (B) *Leptinaria unilamellata* e (C) *Subulina octona*. *Letras maiúsculas entre moluscos do grupo controle e exposto ao longo do tempo e minúsculas indicam diferença entre controle e expostos em cada intervalo de exposição (p<0.05).

5.3.1.3. Concentração de glicose na hemolinfa dos moluscos

A concentração de glicose na hemolinfa de *B. similaris* exposta à CL₅₀ de *S. paniculatum* mostrou-se 51% mais elevada em 24 (Q= 3,76; p<0,05) e 32% em 48 horas pós-aplicação (F= 2,0; p=0,23). Após 72 horas de exposição houve redução de 122% (Q= 3,75; p<0,05) (Figura 5.2A). Não houve correlação entre a variação na concentração de glicose e tempo de exposição (F=0,11; p=0,79; r²=0,10).

Foi observado aumento significativo da concentração de glicose na hemolinfa de *L. unilamellata* exposta ao extrato em 48 (Q=5,26; p<0,05) e 72 horas (Q=4,80; p<0,05), exceto quando no intervalo de 24 horas de exposição onde o aumento da concentração não diferiu do controle (F=3,96; p=0,12) (Figura 5.2 B). O percentual de aumento da concentração de glicose foi de 22%, 83% e 62% quando os moluscos foram expostos durante 24, 48 e 72 horas, respectivamente. Também não foi observada correlação entre a concentração de glicose na hemolinfa e o tempo de exposição à CL₅₀ de *S. paniculatum* (F=0,05; p=0,85).

Houve redução da concentração de glicose na hemolinfa dos moluscos da espécie *S. octona* expostos ao extrato de *S. paniculatum*, sendo essa redução significativa em 48 horas (Q=7,65; p<0,01) e 72 horas (Q=7,43; p<0,05) (Figura 5.2 C). O percentual de redução 18%, 63% e 61% em 24, 48 e 72 horas, respectivamente. Não foi observada correlação entre tempo de exposição e a variação na concentração de glicose (F=6,1; p=0,25; r²=0,86).

5.3.1.4. Concentração de glicogênio na glândula digestiva dos moluscos

A exposição à *S. paniculatum* ocasionou redução de 78,70% na concentração de glicogênio na glândula digestiva de *B. similaris* após 48 (Q=66,0; p<0,05) e de 96,60% em 72 horas (Q=37,8; p<0,05). Nas primeiras 24 horas pós-exposição foi observado aumento de 7% na concentração de molusco expostos, porém esse aumento não foi significativo (F=0,89; p=0,59) (Figura 5.3A). Houve redução significativa ao longo dos intervalos de exposição (p<0,05), sendo verificada uma correlação negativa entre concentração de glicogênio na glândula digestiva e tempo de exposição (F=540,0; p=0,02; r²=0,99).

Em *L. unilamellata* foi verificada redução de 44,5% na concentração de glicogênio na glândula digestiva nas primeiras 24 horas de exposição (Q=132,0; p<0,01) (Figura 5.3 B). Quando expostos durante 48 horas não houve alteração da concentração de glicogênio em relação aos moluscos não expostos (p>0,05). A exposição ao extrato dessa planta também reduziu significativamente a concentração de glicogênio em 72 horas (Q=11,7; p<0,01) (Figura 5.3B).

A concentração de glicogênio na glândula digestiva de *S. octona* sofreu redução de 36% (Q=12,2; p<0,05), 69% (Q=54,0; p<0,05) e 28% (p>0,05) em 24, 48 e 72 horas, respectivamente (Figura 5.3C). Não foi observada correlação entre o tempo e exposição e a redução no conteúdo de glicogênio na glândula digestiva dos moluscos expostos a *S. paniculatum* (F=0,15; p=0,77; r²=0,13).

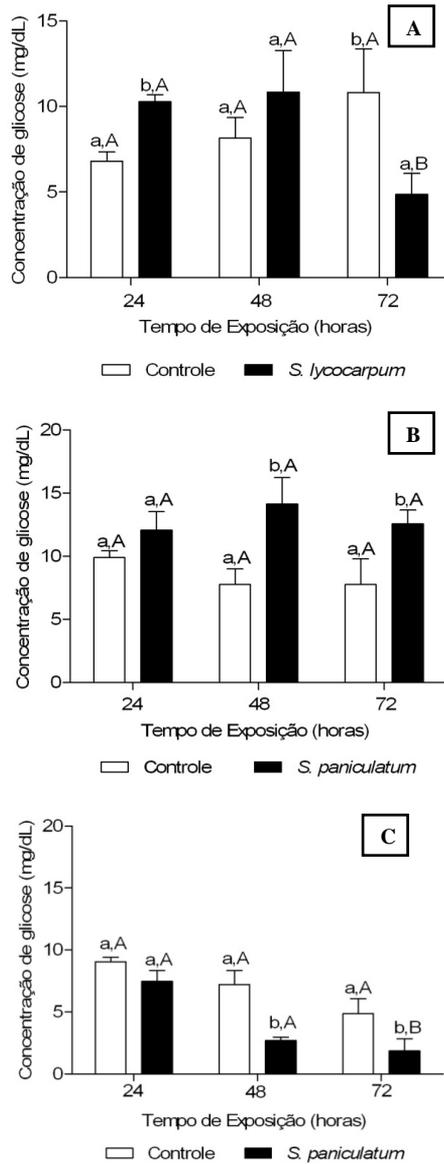


Figura 5.2. Concentração de glicose (mg/dL) na hemolinfa de moluscos expostos à CL₅₀ do extrato aquoso de *Solanum paniculatum* durante 72 horas. (A) *Bradybaena similaris*, (B) *Leptinaria unilamellata* e (C) *Subulina octona*. *Letras maiúsculas entre moluscos do grupo controle e exposto ao longo do tempo e minúsculas indicam diferença entre controle e expostos em cada intervalo de exposição (p<0.05).

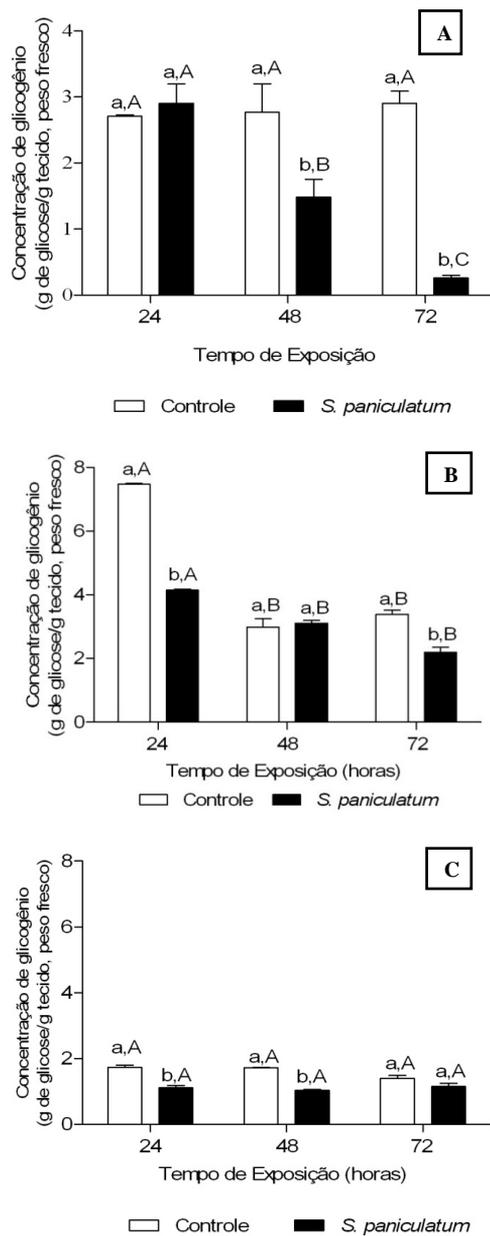


Figura 5.3. Concentração de glicogênio (g/dL) na glândula digestiva de moluscos expostos à CL₅₀ do extrato aquoso de *Solanum paniculatum* durante 72 horas. (A) *Bradybaena similaris*, (B) *Leptinaria unilamellata* e (C) *Subulina octona*. *Letras maiúsculas entre moluscos do grupo controle e exposto ao longo do tempo e minúsculas indicam diferença entre controle e expostos em cada intervalo de exposição (p<0.05).

5.3.1.5. Concentração de glicogênio na massa cefalopediosa

Em *B. similis* foi observado que 24 horas de exposição ao extrato reduziu em 194% a concentração de glicogênio na massa cefalopediosa ($Q=10,1$; $p<0,01$) (Figura 5.4A). Entretanto, quando expostos por 48 e 72 horas, a concentração de glicogênio mostrou-se maior em relação ao grupo controle em 1245% ($Q=16,4$; $p<0,01$) e 83% ($Q=16,4$; $p<0,01$), respectivamente (Figura 5.4A). Não foi verificada correlação entre a concentração de glicogênio na massa cefalopediosa e tempo de exposição à CL_{50} de *S. paniculatum* ($F=0,62$; $p>0,05$; $r^2=0,38$) e *S. lycocarpum* ($F=0,07$; $p>0,05$; $r^2=0,07$).

Na massa cefalopediosa de *L. unilamellata* a concentração de glicogênio foi significativamente mais alta para moluscos expostos à CL_{50} de *S. paniculatum* em comparação ao grupo controle em todos os intervalos de exposição ($p<0,01$) (Figura 5.4B). Não houve correlação entre a concentração de glicogênio na massa cefalopediosa e o tempo de exposição para os moluscos expostos ao extrato de *S. paniculatum* ($F=6,90$; $p<0,23$; $r^2=0,87$).

A concentração de glicogênio na massa cefalopediosa de *S. octona* foi significativamente reduzida em 24 horas de exposição ($Q=44,82$; $p<0,05$) e nos períodos de exposição posteriores manteve-se mais elevada (48 horas: 53,96; $p<0,05$ e 72 horas: 6,34; $p>0,05$) (Figura 5.4 C). Não foi observada correlação entre o tempo de exposição e as variações na concentração desse polissacarídeo ($F=25,35$; $p=0,12$; $r^2=0,92$).

5.3.1.6. Atividade da desidrogenase láctica (LDH)

Houve aumento significativo (698%) da atividade da LDH quando os moluscos foram expostos ao extrato de *S. paniculatum* após 24 horas ($Q=5,74$; $p<0,05$). Em 48 horas observou-se redução (17%) não significativa ($p>0,05$) em relação ao grupo controle. Após 72 horas ocorreu novamente aumento de 46% da atividade da enzima ($Q=5,60$; $p<0,05$) (Figura 5.5 A). Não houve relação entre a variação na atividade da LDH e o tempo de exposição ($F=0,47$; $p=0,62$; $r^2=0,32$).

Houve alteração da atividade da LDH na hemolinfa de *L. unilamellata* quando os moluscos foram expostos a CL_{50} de *S. paniculatum*. Foi observada maior atividade da enzima em 24 ($Q=13,96$; $p<0,01$), 48 ($Q=4,85$; $p<0,05$) e 72 horas ($Q=5,86$; $p<0,05$) de exposição (Figura 5.5 B). Não foi observada correlação entre o aumento da atividade da LDH e o tempo de exposição ao extrato ($F=4,22$; $p=0,29$; $r^2=0,81$).

Houve redução significativa (7%) da atividade da LDH na hemolinfa de *S. octona* quando os moluscos foram expostos durante 24 horas ($Q=103,30$; $p<0,05$). Para os moluscos expostos durante 48 ($Q=4,85$; $p<0,05$) e 72 horas ($Q=5,86$; $p<0,05$) a atividade foi maior, 5% e 11%, respectivamente, porém não foram encontradas diferenças estatísticas (Figura 2.5 C). O tempo de exposição ao extrato não foi correlacionada ao aumento da atividade da LDH ($F=4,22$; $p=0,29$; $r^2=0,81$).

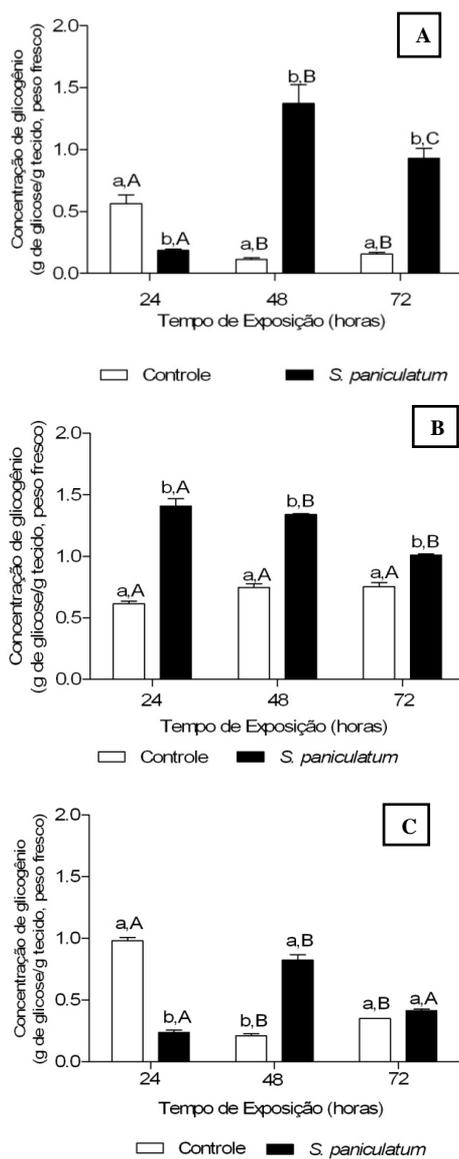


Figura 5.4. Concentração de glicogênio (g/dL) na massa cefalopediosa de moluscos expostos à CL₅₀ do extrato aquoso de *Solanum paniculatum* durante 72 horas. (A) *Bradybaena similaris*, (B) *Leptinaria unilamellata* e (C) *Subulina octona*. *Letras maiúsculas entre moluscos do grupo controle e exposto ao longo do tempo e minúsculas indicam diferença entre controle e expostos em cada intervalo de exposição (p<0.05).

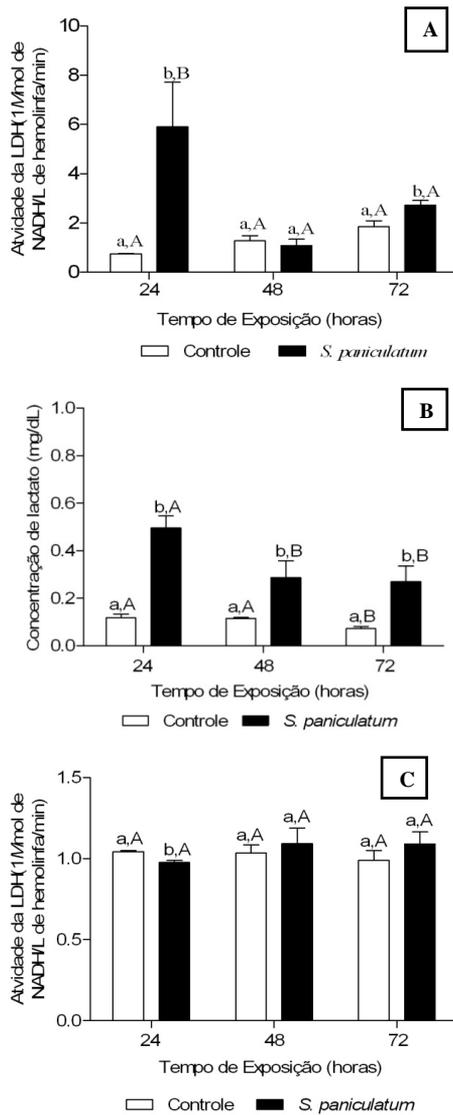


Figura 5.5. Atividade da desidrogenase láctica (LDH) (μmol de NADH/L de hemolinfa/minuto) na hemolinfa de moluscos expostos à CL_{50} do extrato aquoso de *Solanum paniculatum* durante 72 horas. (A) *Bradybaena similaris*, (B) *Leptinaria unilamellata* e (C) *Subulina octona*. *Letras maiúsculas entre moluscos do grupo controle e exposto ao longo do tempo e minúsculas indicam diferença entre controle e expostos em cada intervalo de exposição ($p < 0.05$).

5.2.3.2. Efeitos da exposição ao extrato aquoso de frutos de *Solanum lycocarpum*

5.3.2.1. Fecundidade dos moluscos

Quando expostos à CL₅₀ de *S. lycocarpum* a fecundidade de *B. similis* foi significativamente reduzida ($p < 0,05$). O percentual de redução da fecundidade foi de 83%, 95% e 96% quando os moluscos foram expostos a 24, 48 e 72 horas, respectivamente. A fecundidade média/semana dos moluscos expostos e não expostos pode ser observada na Tabela V.

Tabela V– Fecundidade média semanal (número de ovos/moluscos vivos) de *Bradybaena similis* exposta ao extrato aquoso dos frutos de *Solanum lycocarpum* durante 24, 48 e 72 horas.

| Semanas | Tempo de exposição (horas) | | | | | |
|---------------------------------|----------------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|----------------------|
| | 24 | | 48 | | 72 | |
| | Controle | Exposto | Controle | Exposto | Controle | Exposto |
| 1 | 11,0±2,8 ^a | 2,2±2,0 ^b | 7,0±3,8 ^a | 0,0 | 12,8±3,2 ^a | 0,7±1,0 ^b |
| 2 | 6,9± 2,6 ^a | 2,8±2,0 ^b | 8,9 ± 2,5 ^a | 1,5±2,0 ^b | 8,2 ± 0,1 ^a | 0,7±1,0 ^b |
| 3 | 7,6 ± 1,8 ^a | 0,0 | 6,8 ± 1,7 ^a | 0,0 | 8,4±1,9 ^a | 0,0 |
| 4 | 9,7± 3,6 ^a | 1,1±1,0 ^b | 7,9±2,0 ^a | 0,0 | 9,9±1,3 ^a | 0,0 |
| Média mensal ± Desvio Padrão | 8,8±2,75 ^a | 1,5±1,25 ^b | 7,7 ± 2,5 ^a | 0,4 ± 0,5 ^b | 9,8±1,63 ^a | 0,4±0,5 ^b |

* Letras diferentes indicam diferença significativa entre exposto e controle nos em cada intervalo de exposição (ANOVA, $p < 0,05$).

A fecundidade da espécie *L. unilamellata* foi reduzida devido à exposição ao extrato de *S. lycocarpum* durante 24 horas ($Q=5,25$; $p < 0,01$) (Tabela VI). A exposição por 48 horas ao extrato apenas reduziu a fecundidade dos animais nas primeiras duas semanas após a exposição (Semana 1: $Q=5,80$; $p < 0,05$ e Semana 2: $F=3,40$; $p < 0,05$). Nas semanas subsequentes não foi verificada redução do número de jovens produzidos ($p > 0,05$), porém, comparando-se a fecundidade mensal observou-se que esse grupo teve sua fecundidade reduzida (Tabela VI). A exposição ao extrato durante 72 horas causou interrupção da reprodução na primeira semana pós-exposição. Na segunda semana a fecundidade foi significativamente menor que o controle ($F=5,61$; $p=0,03$) e nas demais, a fecundidade não diferiu do controle ($p > 0,05$) (Tabela VI). Para esse grupo não se observou diferença da fecundidade mensal em relação ao controle ($p > 0,05$).

Tabela VI– Fecundidade média semanal (número de jovens/moluscos vivos) de *Leptinaria unilamellata* exposta ao extrato aquoso de frutos de *Solanum lycocarpum* durante 24, 48 e 72 horas.

| Semanas | Tempo de observação (horas) | | | | | |
|---------------------------------|-----------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | 24 | | 48 | | 72 | |
| | Controle | Exposto | Controle | Exposto | Controle | Exposto |
| 1 | 6,00 ± 0,80 ^a | 1,50±0,80 ^b | 4,50±1,50 ^a | 1,50±2,00 ^b | 1,50±0,30 | 0,0 |
| 2 | 3,10±0,80 ^a | 3,50±2,80 ^b | 5,00±2,00 ^a | 0,40±0,30 ^b | 3,50±1,50 ^a | 1,50±1,20 ^b |
| 3 | 3,00±1,00 ^a | 2,50±2,00 ^b | 4,00±2,00 ^a | 0,60±0,20 ^a | 2,50±1,20 ^a | 1,40±1,30 ^a |
| 4 | 2,90±1,10 ^a | 2,00±1,90 ^b | 4,10±1,10 ^a | 1,10±1,90 ^a | 2,00±1,00 ^a | 1,20±0,90 ^a |
| Média mensal ± Desvio Padrão | 3,75±0,93 ^a | 2,40±1,86 ^b | 4,4±1,65 ^a | 0,9±1,10 ^b | 2,4±1,00 ^a | 1,03±0,85 ^a |

¹ Letras diferentes indicam diferença significativa entre exposto e controle nos em cada intervalo de exposição (ANOVA, $p < 0,05$).

Para *S. octona* observou-se que quando expostos à CL₅₀ do extrato aquoso de *S. lycocarpum* o número de ovos produzidos não diferiu em relação ao grupo controle em nenhum dos intervalos de exposição na primeira e terceira semanas (p>0,05) (Tabela VII).

O número de jovens produzidos a partir segunda semana pós-exposição foi significativamente menor para os animais expostos durante 24 horas (Q=5,45; p<0,05), porém quando avaliada a fecundidade mensal média não houve diferença estatística (p>0,05). Quando expostos por 48 horas não foi verificada diferença na fecundidade semanal (p>0,05) e mensal (p>0,05). A exposição ao extrato durante 72 horas apenas verificou-se redução significativa na segunda semana (Q=8,95; p<0,05). A fecundidade media mensal não diferiu do controle (p>0,05) (Tabela VII).

A comparação entre a liberação de ovos e jovens por moluscos mostrou que quando expostos os animais expostos a *S. lycocarpum* o número de jovens foi menor em todos os intervalos de exposição durante as semanas de observação (p<0,01). No grupo controle não foi verificada redução significativa (p>0,05) (Tabelas VII e VIII).

Tabela VII – Fecundidade média semanal (número de ovos/moluscos vivos) de *Subulina octona* exposta ao extrato aquoso de frutos de *Solanum lycocarpum* durante 24, 48 e 72 horas.

| Semanas | Tempo de observação (horas) | | | | | |
|------------------------------|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| | 24 | | 48 | | 72 | |
| | Controle | Exposto | Controle | Exposto | Controle | Exposto |
| 1 | 0,0 | 0,35±0,5 ^{a,A} | 2,5±1,9 ^{a,A} | 1,7±2,4 ^{a,A} | 1,0±0,0 | 0,0 |
| 2 | 13,0±4,3 ^{a,f} | 5,5±1,7 ^{a,A} | 3,5±1,7 ^{a,A} | 1,7±1,2 ^{a,A} | 4,5±3,7 | 0,0 |
| 3 | 3,7±1,9 ^{a,A} | 13,0±4,3 ^{a,A} | 11,7±3,4 ^{a,A} | 10,0±7,8 ^{a,A} | 16,3±6,0 ^{a,A} | 9,0±6,4 ^{a,A} |
| 4 | 3,0±1,5 ^{a,A} | 2,7±0,9 ^{a,A} | 8,0±4,6 ^{a,A} | 2,5±3,3 ^{a,A} | 8,7±0,9 ^a | 2,0±2,8 ^{a,A} |
| Média mensal ± Desvio Padrão | 4,9±1,9 | 5,4±1,9 | 6,4±2,9 | 6,4±2,9 | 7,6±1,0 | 2,7±2,3 |

^fLetras diferentes indicam diferença significativa entre exposto e controle nos em cada intervalo de exposição (ANOVA, p<0,05). * Mortalidade dos grupos experimentais.

Tabela VIII – Fecundidade média semanal (número de jovens/moluscos vivos) de *Subulina octona* exposta ao extrato aquoso de frutos de *Solanum lycocarpum* durante 24, 48 e 72 horas.

| Semanas | Tempo de observação (horas) | | | | | |
|------------------------------|-----------------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | 24 | | 48 | | 72 | |
| | Controle | Exposto | Controle | Exposto | Controle | Exposto |
| 1 | - | 2,7±1,9 | 0,0 | 0,7±0,9 | 0,0 | 3,7±4,0 |
| 2 | 4,35±3,4 ^a | 0,3±0,5 ^b | 1,5±0,5 ^a | 1,7±2,4 ^a | 3,5±1,5 ^b | 0,7±0,9 ^b |
| 3 | 3,00±2,0 ^a | 2,0±1,6 ^b | 1,5±0,95 ^a | 2,0±2,6 ^a | 3,6±4,5 ^a | 0,0 |
| 4 | 1,0±0,8 ^a | 2,0±1,9 ^b | 1,0±0,0 ^a | 1,1±1,9 ^a | 0,3±0,4 ^a | 1,2±0,9 ^a |
| Média mensal ± Desvio Padrão | 3,75±0,9 ^a | 2,4±1,7 ^a | 4,4±1,6 ^a | 0,9±1,1 ^a | 2,4±1,0 ^a | 1,0±0,0 ^a |

^fLetras diferentes indicam diferença significativa entre exposto e controle nos em cada intervalo de exposição (ANOVA, p<0,05).

5.3.2.2. Concentração de galactogênio na glândula de albúmen dos moluscos

Quando os moluscos da espécie *B. similis* foram expostos a CL₅₀ do extrato de *S. lycocarpum* houve redução da concentração de galactogênio na glândula de albúmen. O percentual de redução foi de 48%, 636% e 175% em 24 (Q=7,24; p<0,01), 48 (Q=5,1; p<0,05) e 72 horas pós-exposição (Q=21,7; p<0,01). Não foi observada redução correlação entre a redução no conteúdo de galactogênio e tempo de exposição ao extrato (F=0,37; p=0,65; r²=0,27) (Figura 5.6 A).

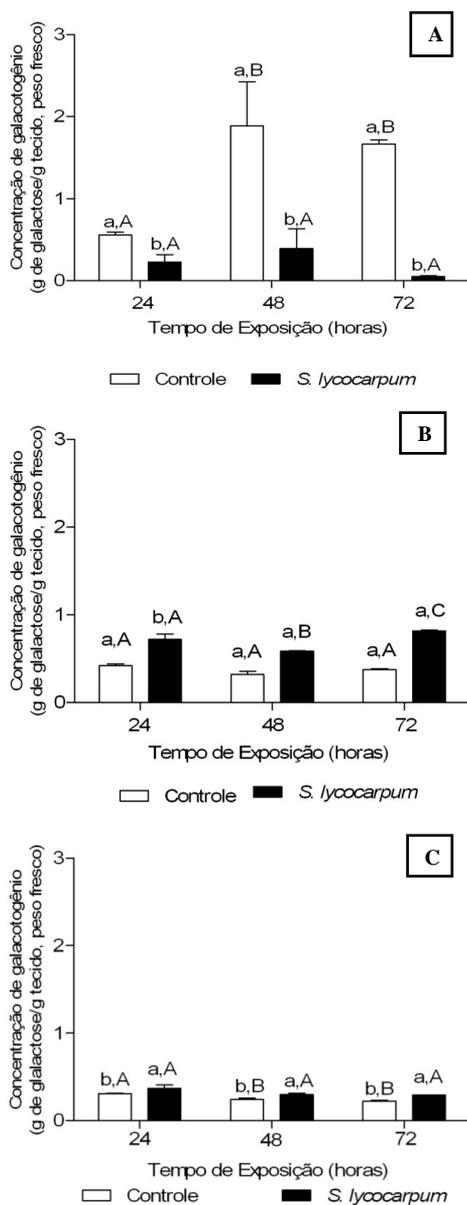


Figura 5.6. Conteúdo de galactose (g/dL) na glândula de albúmen de moluscos expostos à CL₅₀ do extrato aquoso de frutos de *Solanum lycocarpum* durante 72 horas. (A) *Bradybaena similaris*, (B) *Leptinaria unilamellata* e (C) *Subulina octona*. *Letras maiúsculas entre moluscos do grupo controle e exposto ao longo do tempo e minúsculas indicam diferença entre controle e expostos em cada intervalo de exposição (p<0.05).

A análise da concentração de galactogênio em *L. unilamellata* mostrou que esse polissacarídeo manteve-se mais elevado na glândula de albúmen dos moluscos expostos ao extrato em todos os intervalos, porém, apenas em 24 horas essa elevação foi significativa ($Q=21,2$; $p<0,05$). Nos demais intervalos as concentrações de galactogênio de expostos e não expostos não diferiu significativamente ($p<0,01$) (Figura 5.6 B). Não houve relação entre o conteúdo de galactogênio e o tempo de exposição à *S. lycocarpum* ($F=0,21$; $p=0,72$; $r^2=0,18$).

Em *S. octona* foi verificado aumento significativo da concentração de galactogênio quando os animais foram expostos durante 24 ($Q=43,00$; $p<0,05$), 48 ($Q=5,10$; $p<0,05$) e 72 horas ($Q=18,20$; $p<0,01$). Foi observado percentual de aumento de 19%, 17,3% e 20% para os períodos de 24, 48 e 72 horas, respectivamente (Figura 5.6 C). Não houve correlação entre o tempo de exposição e o aumento de concentração de galactogênio ($F=3,68$; $p=0,30$; $r^2=0,78$).

5.3.2.3. Concentração de glicose na hemolinfa dos moluscos

Foi observada alteração da concentração de glicose na hemolinfa dos moluscos da espécie *B. similaris* expostos à CL_{50} de *S. lycocarpum*. Foi observado aumento de 33,6% do conteúdo de glicose após 24 horas de exposição ($Q=10,1$; $p<0,11$). O mesmo foi observado aumento após 48 horas onde foi registrado aumento de 24,4%, porém esse aumento não foi significativo ($p>0,05$). Após 72 horas de exposição houve redução acentuada da concentração de glicose (122,7%) ($Q= 10,5$; $p<0,01$) (Figura 5.7A). Não foi verificada correlação entre as alterações na concentração de glicose e o tempo de exposição a *S. lycocarpum* ($F=2,05$; $p=0,39$; $r^2=0,67$).

Foi verificado aumento significativo da concentração de glicose na hemolinfa de *L. unilamellata* sendo observados os percentuais de 34,6%, 57% e 83% nos períodos de 24 ($Q=7,5$; $p<0,05$), 48 ($Q=5,7$; $p<0,05$) e 72 horas de exposição ($Q=4,8$; $p<0,05$), respectivamente (Figura 5.7B). Não houve correlação entre a concentração de glicose na hemolinfa e o tempo de exposição à CL_{50} de *S. lycocarpum* ($F=18,07$; $p=0,14$).

Quando *S. octona* foi exposta à CL_{50} de *S. lycocarpum* houve aumento da concentração de glicose na hemolinfa de em todos os intervalos de exposição, embora esse aumento só tenha sido significativo em 72 horas ($Q=11,6$; $p<0,01$) (Figura 5.7C). O percentual de aumento verificado para essa espécie foi de 37%, 16% e 200% para os intervalos de 24, 48 e 72 horas, respectivamente. Nesse caso também não foi observada correlação entre o aumento da concentração de glicose e o tempo de exposição a *S. lycocarpum* ($F=0,35$; $p=1,00$; $r^2=0,53$).

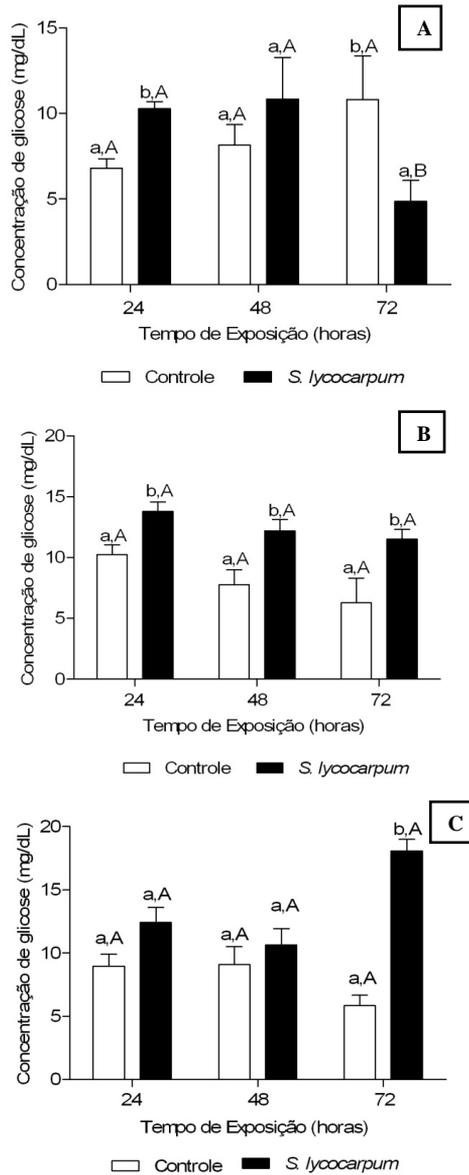


Figura 5.7. Concentração de glicose (mg/dL) na hemolinfa de moluscos expostos à CL₅₀ do extrato aquoso de frutos de *Solanum lycocarpum* durante 72 horas. (A) *Bradybaena similaris*, (B) *Leptinaria unilamellata* e (C) *Subulina octona*. *Letras maiúsculas entre moluscos do grupo controle e exposto ao longo do tempo e minúsculas indicam diferença entre controle e expostos em cada intervalo de exposição ($p < 0.05$).

5.3.2.4. Concentração de glicogênio na glândula digestiva dos moluscos

Quando expostos a *S. lycocarpum* apenas observou-se redução significativa da concentração de glicogênio na glândula digestiva quando *B. similis* foi exposta durante 72 horas ($Q=10,5$; $p<0,01$) (Figura 2.8A). O percentual de redução nesse período foi de 85%. Nas primeiras 24 horas verificou-se que o conteúdo de galactogênio foi mais elevado (8%) nos moluscos expostos do que o controle. Em 48 horas, entretanto, observou-se redução de 6% porém, não foi encontrada diferença estatística ($p>0,01$). O tempo de exposição não foi correlacionado às alterações no conteúdo de glicogênio na glândula digestiva dessa espécie ($F=14,18$; $p=0,16$; $r^2=0,86$) (Figura 2.8 A).

Para *L. unilamellata* apenas foi verificada redução significativa da concentração de glicogênio na glândula digestiva (62%) quando os moluscos permaneceram expostos durante 24 horas ($Q=21,2$; $p<0,01$). Nos demais intervalos de exposição verificaram-se elevação de 5% e 10% para 24 e 48 horas, respectivamente. Não foi observado correlação entre o tempo de exposição e as alterações na concentração de glicogênio na glândula digestiva quando os moluscos foram expostos a *S. lycocarpum* ($F=2,50$; $p=0,36$; $r^2=0,71$) (Figura 5.8 B).

Os resultados foram semelhantes quando os animais foram expostos para *S. octona* sendo observada redução significativa da concentração de glicogênio nesse órgão de 41% em 24 horas ($Q=13,2$; $p<0,01$), de 72% em 48 horas ($Q=56,3$; $p<0,01$) e de 2% em 72 horas ($F=5,73$; $p=0,07$). Não foi observada correlação entre o tempo e exposição e a redução no conteúdo de glicogênio na glândula digestiva ($F=0,33$; $p=1,00$; $r^2=0,25$) (Figura 5.8 C).

5.3.2.5. Concentração de glicogênio na massa cefalopédica dos moluscos

A exposição de *B. similis* à CL_{50} extrato de *S. lycocarpum* durante 24 horas causou redução de 48% da concentração de glicogênio na massa cefalopédica ($Q=31,00$; $p<0,05$) (Figura 5.9A). Nos demais períodos de exposição observaram-se elevação de 636% em 48 horas ($Q=21,74$; $p<0,01$) e de 175% 72 horas ($Q=35,7$; $p<0,01$). Não foi verificada correlação entre a concentração de glicogênio na massa cefalopédica e tempo de exposição ao extrato ($F=0,07$; $p>0,05$; $r^2=0,07$).

Na massa cefalopédica de *L. unilamellata*, entretanto, a concentração de glicogênio foi significativamente mais alta para moluscos expostos à CL_{50} de *S. lycocarpum* em comparação ao grupo em todos os intervalos de exposição. O percentual de aumento foi de 61% ($Q=14,50$; $p<0,01$), 67% ($Q=4,25$; $p<0,05$), e 1,5% ($F=0,10$; $0,76$) nos intervalos de 24, 48 e 72 horas respectivamente (Figura 5.9 B).

Para *S. octona* foi verificado um padrão similar ao verificado para *B. similis* sendo que nas primeiras 24 horas houve redução de 35% ($Q=93,95$; $p<0,01$), em 48 houve elevação de 74% ($Q=11,75$; $p<0,01$) e em 72 horas, elevação de 5% ($Q=18,12$; $p<0,01$) (Figura 5.9 C). Para essa espécie também não foi estabelecida correlação entre o tempo de exposição e alterações na concentração de glicogênio na massa cefalopédica ($F=0,61$; $p=0,57$; $r^2=0,38$).

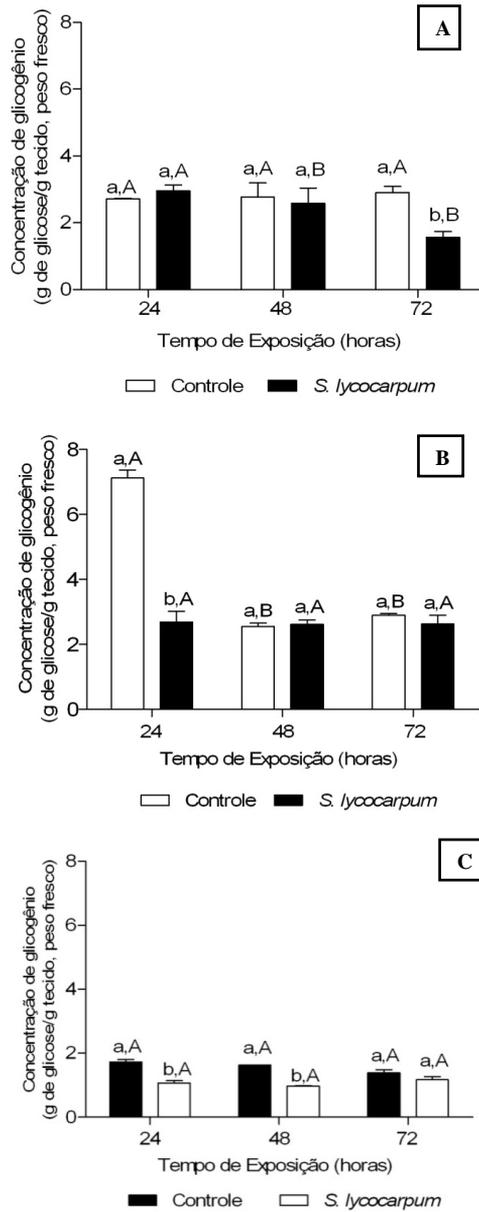


Figura 5.8. Concentração de glicogênio (g/dL) na glândula digestiva de moluscos expostos à CL₅₀ do extrato aquoso de frutos de *Solanum lycocarpum* durante 72 horas. (A) *Bradybaena similaris*, (B) *Leptinaria unilamellata* e (C) *Subulina octona*. *Letras maiúsculas entre moluscos do grupo controle e exposto ao longo do tempo e minúsculas indicam diferença entre controle e expostos em cada intervalo de exposição ($p < 0.05$).

5.3.2.6. Atividade da desidrogenase láctica (LDH)

Quando expostos ao extrato de *S. lycocarpum*, a atividade da LDH na hemolinfa de *B. similaris* foi maior em 24 horas (22%) ($p>0,05$). Em 48 horas pós-aplicação verificou-se redução de 23% e em 72 horas a redução foi igual a 30%, não sendo verificada diferença estatística na atividade desta enzima nesses intervalos de exposição ($p>0,05$) (Figura 5.10A). Não foi verificada correlação entre o tempo de exposição e variação na atividade enzimática ($F=0,37$; $p=0,65$; $r^2=0,27$).

Entretanto, para a espécie *L. unilamellata* a atividade da enzima foi mais elevada em todos os intervalos, porém foi apenas possível observar aumento significativo em 24 horas ($Q=33,58$; $p<0,01$). Nos demais intervalos de exposição aumento observado não foi significativo ($p>0,05$) (Figura 5.10B). Também não foi observada correlação entre o aumento da atividade da LDH e o tempo de exposição ao extrato de *S. lycocarpum* ($F=0,02$; $p=0,93$; $r^2=0,01$).

Em *S. octona* foi detectada redução significativa da atividade da LDH em todos os intervalos de exposição. O percentual de redução foi de 74% em 24 horas ($Q=12,24$; $p<0,01$), 91% em 48 horas ($Q=49,50$; $p<0,01$) e de 89% em 72 horas de exposição ($Q=15,30$; $p<0,01$). Para essa espécie também não foi observada correlação entre a redução da atividade da LDH e o tempo de exposição ao extrato de *S. lycocarpum* ($F=0,02$; $p=0,93$; $r^2=0,01$) (Figura 5.10 C).

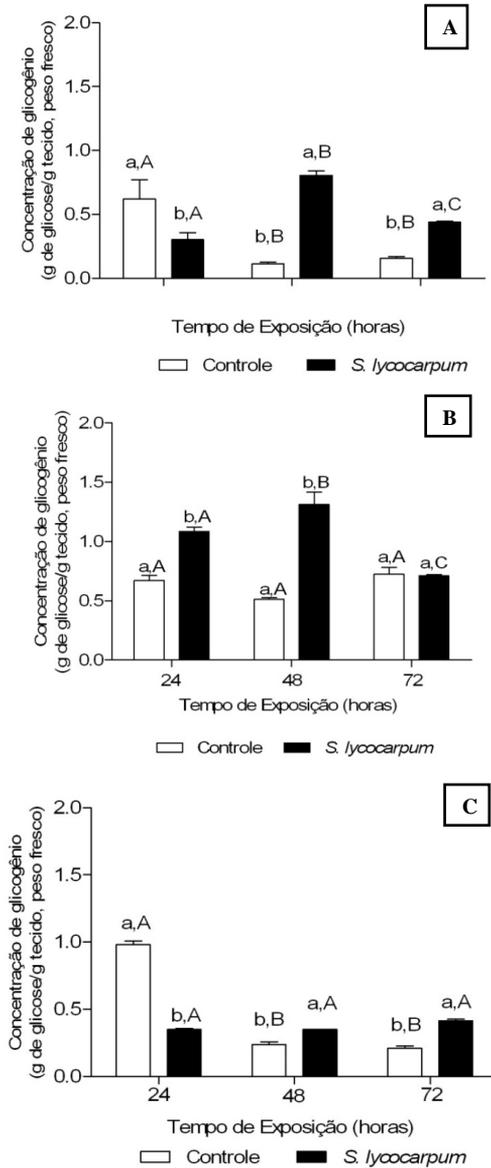


Figura 5.9. Concentração de glicogênio (g/dL) na massa cefalopediosa de moluscos expostos à CL₅₀ do extrato aquoso de *Solanum lycocarpum* durante 72 horas. (A) *Bradybaena similaris*, (B) *Leptinaria unilamellata* e (C) *Subulina octona*. *Letras maiúsculas entre moluscos do grupo controle e exposto ao longo do tempo e minúsculas indicam diferença entre controle e expostos em cada intervalo de exposição (p<0.05).

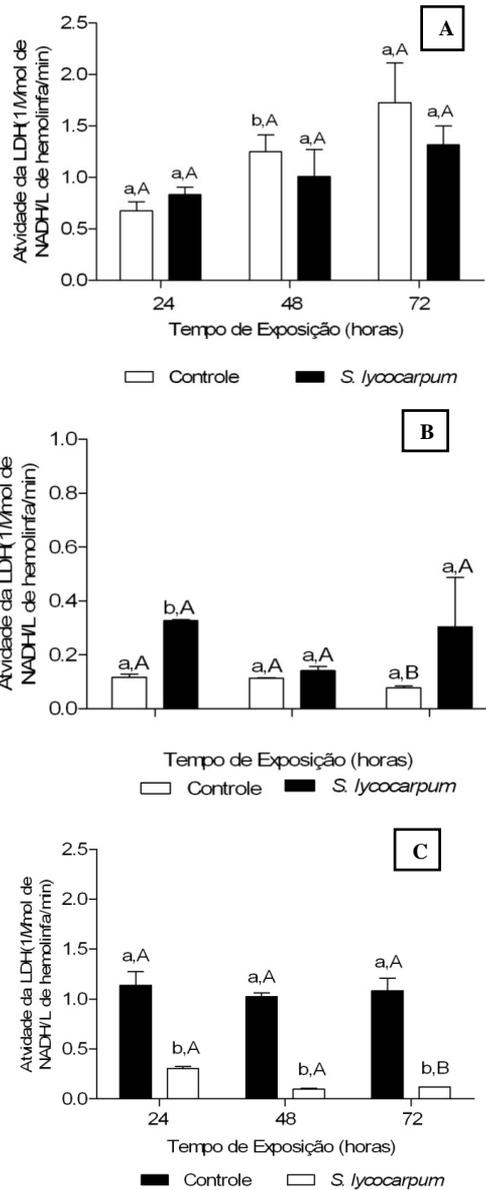


Figura 5.10. Atividade da desidrogenase láctica(LDH) (μmol de NADH/L de hemolinfa/minuto) na hemolinfa de moluscos expostos à CL_{50} do extrato aquoso de frutos de *Solanum lycocarpum* durante 72 horas. (A) *Bradybaena similaris*, (B) *Leptinaria unilamellata* e (C) *Subulina octona*. *Letras maiúsculas entre moluscos do grupo controle e exposto ao longo do tempo e minúsculas indicam diferença entre controle e expostos em cada intervalo de exposição ($p < 0.05$).

5.3.3. Comparação das alterações no metabolismo de carboidratos dos moluscos provocadas pela exposição dos moluscos à CL₅₀ dos extratos aquosos de folhas de *Solanum paniculatum* e de frutos de *Solanum lycocarpum*

2.3.3.1. Concentração de galactogênio na glândula de albúmen

Ao comparar a redução na concentração de galactogênio na glândula de albúmen de *B. similaris* exposta pode-se observar que em 24 horas houve redução similar para ambos os extratos ($p>0,05$). Todavia, após 48 horas houve redução mais acentuada quando os moluscos foram expostos à *S. paniculatum* ($Q=6,8$; $p<0,01$) e após 72 a redução foi significativo para moluscos expostos ao extrato de *S. lycocarpum* ($Q=21,0$; $p<0,01$).

Para *L. unilamellata* apenas foi observada maior eficiência de *S. paniculatum* em 48 de exposição ($Q=8,30$; $p<0,05$) não sendo registrada diferença estatística entre a variação provocada pelos extratos nos demais intervalos ($p>0,05$).

Para *S. octona* foi verificada maior eficiência de *S. paniculatum* em 72 horas de exposição ($Q=265,0$; $p<0,05$).

2.3.3.2. Concentração de glicose

O teste de análise de variância mostrou que o extrato de *S. paniculatum* provocou alterações mais acentuadas na concentração de glicose nos períodos de 24 ($Q=7,6$; $p<0,05$) e 48 horas ($Q=4,9$; $p<0,05$). Em 72 horas não houve variação entre os efeitos provocados na concentração de glicose pela exposição aos dois extratos ($p>0,05$).

As alterações nos níveis de glicose dos moluscos da espécie *L. unilamellata* expostos aos dois extratos foram similares ($p>0,05$).

Ao comparar as alterações provocadas na concentração de glicose de *S. octona*, observou-se, entretanto, em 72 horas o aumento provocado pela exposição a *S. lycocarpum* foi significativo ($Q=14,9$; $p<0,01$). Nos demais intervalos os resultados não diferiram ($p>0,05$).

2.3.3.2. Concentração de glicogênio na glândula digestiva e massa cefalopediosa

A concentração de glicogênio na glândula digestiva dos moluscos expostos da espécie *B. similaris* aos extratos das duas plantas, verificamos que 24 horas de exposição a *S. lycocarpum* causou maior elevação desse polissacarídeo do que a exposição à *S. paniculatum* ($Q=10$; $p<0,01$). Para os outros períodos de exposição as alterações na concentração de glicogênio na glândula digestiva foram similares quando expostos ao extrato de ambas as plantas (24 horas: $Q=0,19$; $p=1$ e 48 horas: $Q=0,14$; $p=0,73$). *Solanum paniculatum*, entretanto, causou maior redução da concentração de glicogênio na massa cefalopediosa quando os moluscos foram expostos durante 24 horas ($Q=4,2$; $p<0,01$). Nos demais intervalos *S. lycocarpum* provocou maior elevação da concentração desse polissacarídeo (48 horas: ($Q=7,2$; $p<0,01$) e 72 horas: ($Q=12,1$; $p<0,01$).

Em *L. unilamellata*, o extrato de *S. paniculatum* causou efeito mais acentuado na concentração glicogênio na glândula digestiva e na massa cefalopediosa maior em todos os intervalos de exposição do que o extrato de *S. lycocarpum* ($p<0,01$).

O extrato de *S. paniculatum* causou efeito mais acentuado na glândula digestiva de *S. octona* em 48 de exposição ($Q=4,19$; $p<0,05$). Nos demais intervalos não houve diferença entre a redução da concentração de glicogênio na glândula digestiva dos moluscos expostos aos dois extratos ($p>0,01$). Na massa cefalopediosa, esse extrato também foi mais eficiente em 24 ($Q=10,7$; $p<0,05$) e 48 horas ($Q=63,5$; $p<0,05$) do que *S. lycocarpum*.

2.3.3.2. Atividade da desidrogenase láctica

A comparação entre as alterações na atividade da LDH na hemolinfa de moluscos expostos aos dois extratos mostrou que em 24 e 48 horas a exposição à CL₅₀ de *S. paniculatum* alteração mais acentuada (24 horas: Q=5,08; p<0,05 e 48 horas: Q=10,41; p<0,01). Em 48 horas de exposição o efeito causado na atividade da LDH foi similar para os dois extratos (p>0,05).

A comparação entre o efeito dos extratos mostrou que *S. paniculatum* causou maior elevação na atividade da LDH na hemolinfa de *L. unilamellata* em 24 (Q=6,50; p<0,05) e 48 (Q=4,03; p<0,05). Em *S. octona*, a atividade da LDH também foi mais afetada pela exposição ao extrato aquoso de *S. paniculatum* independente do período de aplicação (p<0,05).

5.4 DISCUSSÃO

A influência de pesticidas e princípios vegetais na biologia reprodutiva foi observada por vários autores (RAO & SINGH, 2000; TRIPHATI & SINGH, 2004; MELLO-SILVA et al., 2007; FERREIRA et al, 2009). Segundo tais autores as interferências na fisiologia para minimizar os efeitos da intoxicação geram gasto de energia de reserva do organismo que irá ocasionar a castração dos moluscos.

Os resultados obtidos demonstraram que a redução da fecundidade de foi mais evidente nas espécies *B. similaris* e *L. unilamellata*. Para essa última, podemos concluir que o efeito residual da CL₅₀ de *S. paniculatum* foi mais intenso até 15 dias após a exposição ocasionando a morte dos animais. Esse resultado é importante, pois demonstra a estabilidade dos extratos no organismo dos animais após a cessada exposição. Além disso, para os moluscos sobreviventes observou-se severa redução da fecundidade, sendo essa redução aumentada de acordo com o tempo de exposição.

Em *S. octona*, os efeitos sobre a fecundidade foram menos intensos que os observados para as outras espécies. Porém, *Subulina octona* é uma espécie ovípara que apresenta uma estratégia de retenção de ovos no útero. Essa estratégia reprodutiva tenta garantir a sobrevivência da prole em condições desfavoráveis para a incubação de ovos (TOMPA, 1984). Nesse estudo ficou evidente que a aplicação dos extratos, principalmente *S. lycocarpum*, propiciaram condições adversas que tornaram a retenção de ovos mais evidente. Silva et al. (2012) relataram, entretanto, que sucessivas aplicações de *S. paniculatum* ocasionaram castração parcial de *S. octona*, causando efeitos negativos no tempo de maturidade sexual e tamanho no momento do alcance da maturidade da prole proveniente de parentais expostos. De acordo com os resultados obtidos por tais autores, a adoção da retenção de ovos como estratégia reprodutiva não seriam suficientes para amenizar os efeitos negativos da exposição aos extratos em longo prazo.

Em *B. similaris* observou-se redução do conteúdo de galactogênio pela exposição aos dois extratos o que esta diretamente relacionada à redução da fecundidade observada para essa espécie. O contrario foi observado para as outras duas espécies sendo registrado o aumento da concentração de galactogênio. Em *S. octona* a fecundidade não foi significativamente reduzida o que indica a necessidade de continuidade da síntese dessa reserva. O galactogênio é uma reserva utilizada principalmente como fonte energética para formação do fluido perivitelínico, que irá nutrir o embrião durante o desenvolvimento (TOMPA, 1984). Porém, tal reserva pode ser reduzida por outras razões que não a produção dos ovos. Em condições de estresse metabólico acentuado, como em longo período de estivação ou parasitismo (PINHEIRO & AMATO, 1994; PINHEIRO, 1996), o molusco cessa a síntese de galactogênio

a partir da glicose, uma vez que os carboidratos disponíveis são direcionados para suprir a demanda aumentada em resposta ao estresse, neste caso a redução da concentração do galactogênio se dá não por seu consumo aumentado, mas sim por redução da síntese.

Porém, em *L. unilamellata* observou-se aumento de galactogênio e redução da fecundidade. Ao contrário do observado no presente estudo, a exposição de *B. similis* ao extrato de *Alamanda cathartica* Linné (Apocynaceae) causou aumento da concentração de galactogênio. Os autores sugeriram que esse aumento esteja relacionado à aceleração da síntese desse polissacarídeo ou interrupção do processo reprodutivo como forma de garantir um mecanismo compensatório futuro. Todavia, os autores não avaliaram os efeitos na fecundidade dos moluscos.

Foram observados que as alterações na biologia reprodutiva dos moluscos expostos possivelmente estão relacionadas às alterações no metabolismo de carboidratos. Assim como o verificado nesse estudo, Mello-silva *et al.* (2007) observaram redução da fecundidade de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) exposta ao látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii* infectada com *S. mansoni*. Esses autores obtiveram resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo, ou seja, aumento dos níveis de glicose na hemolinfa e massa cefalopodia e redução das reservas de glicogênio na glândula digestiva indicando aumento do consumo energético e aceleração da glicólise (MELLO-SILVA *et al.*, 2010).

A redução de reservas da glândula digestiva devido à exposição à moluscicidas vegetais também foi registrada para *A. fulica* exposta ao látex de *E. Splendens* (OLIVEIRA, 2007) e *B. glabrata* ao extrato bruto de *Solanum malacoxylon* (Sendter). Nesta última, além da redução no conteúdo de glicogênio na glândula digestiva houve aumento da concentração de glicose livre na hemolinfa conforme o verificado no presente estudo (MELLO-SILVA *et al.*, 2006).

A glicemia nos moluscos é precisamente regulada (THOMPSON & LEE, 1986). A quebra na homeostasia glicêmica é um indicativo de processo de intoxicação do animal. A intoxicação dos moluscos pela exposição aos extratos pode ter levado a alteração do sistema neuroendócrino, responsável pela regulação da glicemia no animal (células verdes-claras [LG]). Os processos de desintoxicação do organismo levam a um consumo elevado de energia, resultando na exaustão destes depósitos.

O deslocamento energético da glândula digestiva para os músculos e também a liberação de glicose livre na hemolinfa observado nos grupos expostos às CL₅₀ de *S. paniculatum* e *S. lycocarpum*, demonstra a compensação metabólica para regulação homeostática.

O glicogênio na massa cefalopodia de *B. similis* e *S. octona* foi reduzido nas primeiras horas pós-aplicação e aumentado nos demais intervalos. Esse padrão está relacionado à atividade de fuga dos extratos que foi observada logo após a aplicação. Nos períodos posteriores foi observada diminuição da atividade e conseqüente o aumento das reservas de glicogênio nos tecidos musculares. Já em *L. unilamellata* o glicogênio muscular manteve-se alto visto que esses moluscos exibiram menor atividade de fuga, permanecendo parados em contato com extrato e produzindo grande quantidade de muco que criou uma barreira ao extrato. Lustrino *et al.* (2009) também observaram aumento da concentração de glicogênio na massa cefalopodia em *B. similis* exposta à concentração de 5% de sementes de *A. cathartica*. Entretanto, esses autores verificaram aumento no conteúdo desse polissacarídeo nos tecidos da glândula digestiva o que sugere diferentes mecanismos de ação das plantas.

Apenas foi verificado aumento significativo da atividade da DLH em *B. similis* para aqueles moluscos expostos à CL₅₀ de *S. paniculatum* nas primeiras 24 horas após a exposição. Para *L. unilamellata* foi registrado aumento da DLH em todos os períodos de exposição aos dois extratos, enquanto para *S. octona* foi observada redução após exposição durante 24 horas

ao extrato de *S. paniculatum* e em todos os períodos de exposição a CL₅₀ de *S. lycocarpum*. Assim, pode-se concluir que os extratos ocasionaram uma aceleração do metabolismo anaeróbico possivelmente devido aos efeitos da intoxicação. Resultados semelhantes foram observados por Tripathi & Singh (2004) verificaram aumento da atividade dessa enzima em *Lymnaea acuminata* (Lymnaeidae) exposta à concentração sub-letal do pesticida carbaril. Essa enzima está relacionada ao equilíbrio entre anabolismo e catabolismo de carboidratos e com a interconversão entre ácido pirúvico e ácido láctico (ABSTON & YARBROUGH, 1976).

Rao et al (2003) demonstraram que a exposição à CL₅₀ de combinações binárias de óleos vegetais (*Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae), *Cedrus deodara* (Roxb) G. Don (Pinaceae), *Allium sativum* Linné, (Liliaceae) e *Nerium indicum* Mill. (Apocinaceae)) inibiram a atividade da enzima LDH em *A. fulica*, conforme o observado em *S. octona*. Esses autores sugeriram que os princípios vegetais impediram a ativação do metabolismo anaeróbico o que pode levar a intensificação do efeito moluscicida.

A redução da fecundidade em moluscos expostos a moluscicidas vegetais podem estar relacionadas a outras vias metabólicas. Rao & Singh (2000) verificaram redução da fecundidade induzidas por exposição a diferentes combinações de derivados vegetais (*A. indica*, *C. deodara*, *A. sativum* e *N. indicum* em diferentes proporções) para a espécie *A. fulica*. Esses autores observaram a redução no conteúdo de DNA, RNA e fosfolípidios e concomitante aumento na atividade dalipídio-peroxidase no ovotestis dos moluscos indicando o comprometimento da produção de gametas.

As alterações no metabolismo de carboidratos foram similares para os dois extratos o que indica mecanismos de ação também semelhantes. Os princípios ativos encontrados nessas plantas (saponinas, taninos e flavonóides) têm sido amplamente estudados no controle de moluscos (MOOLGAARD et al. 2000; SÁ BARRETO et al. 2007; SOUZA 2011). Souza (2011) observou que a aplicação sucessiva CL₅₀ de *Bidens pilosa* Linné e *Mikania glomerata* Sprengel (Asteraceae) que possuem os menos princípios ativos interferiram no crescimento, fecundidade e sobrevivência de *S. octona*.

Os resultados demonstram, portanto, que os extratos de ambas as plantas promoveram alterações fisiológicas nos moluscos que podem ser observadas pelas alterações na glicemia, mobilização de reservas de glicogênio e alterações na atividade da DLH nas três espécies de moluscos. Essas alterações possivelmente ocasionaram as alterações negativas na fecundidade, havendo um processo de castração nas espécies *B. similis* e *L. unilamellata* dos moluscos pelo desvio de nutrientes que seriam destinados à atividade reprodutiva. Em *S. octona* não foi observada castração porém o processo de retenção de embriões no útero foi aumentado. Assim, pode-se concluir que os extratos de *S. paniculatum* e *S. lycocarpum* são promissores para o controle de moluscos terrestres.

5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABSTON, P.A.; YARBROUGH, J.D. The in vitro effect of mirex on soluble hepatic enzymes in the rat. **Pesticides Biochemistry and Physiology**, v. 6, p. 192–199, 1976.

ALMEIDA, M. N.; BESSA, E. C. A. Efeito da densidade populacional sobre o crescimento e a reprodução de *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Mollusca, Xanthonychidae) e *Leptinaria unilamellata* (d'Orbigny, 1835) (Mollusca, Subulinidae). *Revista Brasileira de Zoociências*, v.2, n.1, p.97-104, 2000.

ALMEIDA, M.N.; E.C.A. BESSA. a. Estudo do crescimento e da reprodução de *Bradybaena similaris* (Mollusca, Xanthonychidae) em laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.18, n.4, p.1115-1122. 2001.

ALMEIDA, M.N.; E.C.A. BESSA. b. Estudo do crescimento e da reprodução de *Leptinaria unilamellata* (D'Orbigny) (Mollusca, Subulinidae) em laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.18, n.4, p.1107-1113, 2001.

ARAÚJO, J.L.B. 1989. Moluscos de importância econômica na Brasil. I. Xanthonychidae: *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata, Stylommatophora). *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 6, no. 4, p. 538-592.

ARAÚJO, J.L.B.; BESSA, E.C.A. Moluscos de importância econômica do Brasil. II Subulinidae, *Subulina octona* (Bruguière) (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata, Stylommatophora). **Revista Brasileira de Zoologia**, v.10, p.497, 1995.

BESSA, E.C.A.; ARAÚJO, J.L.B. Oviposição, tamanho de ovos e medida do comprimento da concha em diferentes fases do desenvolvimento de *Subulina octona* (Bruguière) (Pulmonata, Subulinidae) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.2, p.647-654, 1995.

BRITO, A.R.M.S.; BRITO, A.A.S. Forty years of Brazilian medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 39, n. 1, p. 53–67. 1993.

CARVALHO, C.M.; BESSA, E.C.A.; S. D'ÁVILA. Life history strategy of *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Mollusca, Pulmonata, Bradybaenidae). **Molluscan Research**, v.28, n.3, p.171–174, 2008.

CARVALHO, C. DE M.; SILVA, J. P. DA; MENDONÇA, C. L. F.; BESSA, E. C. DE A.; D'ÁVILA, S. Life history strategy of *Leptinaria unilamellata* (d'Orbigny, 1835) (Mollusca, Pulmonata, Subulinidae). **Journal Invertebrate Reproduction & Development**, v.53, n.4, p.211-222, 2009.

CHINEDU, S.N.; OLASUMBO, A.C.; EBOJI, O.K.; EMILOJU, O.C.; ARINOLA, O.K. & DANIA, D.I. Proximate and phytochemical analyses of *Solanum aethiopicum* L. and *Solanum macrocarpon* L. fruits. **Research Journal of Chemical Sciences**, v. 1, p.63-71, 2011.

CHINTHANA, P.; ANANTHI, T. Protective Effect of *Solanum nigrum* and *Solanum trilobatum* Aqueous Leaf. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 4, p.72-74, 2012.

D'ÁVILA, S. & BESSA, E.C.A. a. Influência de diferentes substratos e umidade sobre o crescimento e número de ovos produzidos por *Subulina octona* (Brugüiere) (Mollusca, Subulinidae), sob condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.22, n.1, p.349-353, 2005.

D'ÁVILA, S.; BESSA, E. C. A., b. Influência do substrato sobre a reprodução de *Subulina octona* (Brugüiere) (Mollusca, Subulinidae), sob condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.22, n.1, p.197-204, 2005.

FERREIRA, P; SOARES G.L.G.; D'ÁVILA S. & E.C.A. BESSA. The influence of caffeine and thymol on the survival, growth and reproduction of *Subulina octona* (Brugüiere, 1789) (Mollusca, Subulinidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p.945-952, 2009.

JURBERG, P., VASCONCELLOS, M.C & N.M. MENDES. Plantas empregadas como moluscicidas: Uma visão crítica. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, n.1, p.76- 83, 1989.

LUSTRINO, D.; TUNHOLI- ALVES, V.M.; TUNHOLI, V.M.; BESSA, E.C.A.; PINHEIRO, J. *Allamanda cathartica* L. (apocynacea) seeds induces changes on carbohydrates deposits of *Bradybaena similares* (Férussac, 1821) (Mollusca, Bradybaenidae). **Revista Brasileira de Zoociências**, v.10, n. 1, p. 23-27, 2009.

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

MELLO-SILVA, C.C.; VASCONCELLOS M.C.; PINHEIRO J.; RODRIGUES, M.L.A. Physiological changes in *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Pulmonata: Planorbidae) caused by sub-lethal concentrations of the latex of *Euphorbia splendens* var. *hislopilii* N.E.B (Euphorbiaceae). **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, p.3-8, 2007.

MELLO-SILVA, C.C.; VILAR. M.M.; BEZERRA, J.C.B. VASCONCELLOS, M.C. PINHEIRO,J.; RODRIGUES, M.L.A. Carbohydrate metabolism alterations in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* and exposed to *Euphorbia splendens* var. *hislopilii* latex. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.105, n. 4, p.492-495. 2010.

MENDES, N.M.; VASCONCELLOS, M.C.; BAPTISTA, D.F.; ROCHA, R.S.; V.T. SCHALL. Evaluation of the molluscicidal properties of *Euphorbia splendens* var. *hislopilii* (N.E.B.) latex: Experimental test in an endemic area in the state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.92, n. 5, p.719-724, 1997.

MOLGAARD, P.; CHIHAKA, A.; LEMMICH, E.; FURU, P.; WINDBERG, C.; INGERSLEV, F.; B. HALLING-SORENSEN. Biodegradability of the molluscicidal saponins of *Phytolacca dodecandra*. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.32, p. 248–255, 2000.

OLIVEIRA, C.S. Alterações nos depósitos de glicogênio e conteúdo de glicose na hemolinfa de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca: Gastropoda) hospedeiro intermediário de *Angiostrongylus*, exposta ao látex de coroa-se-cristo *Euphorbia splendens* var. *hilopii*.

Dissertação de mestrado em Ciência Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 55p. 2007.

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

PINHEIRO, J.; Gomes, E.M. A method for glicogen determination in molluscs. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 37, n. 3, p.569-576, 1994.

PINHEIRO, J. Influence of starvation on the glycogen and galactogen contents in the snail *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Mollusca, Gastropoda). **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 39, p.349-357, 1996.

RAO, I.G.; SINGH., D.K. Effect of single and binary combinations of plant-derived molluscicides on reproduction and survival of the snail *Achatina fulica*. **Environmental Contamination and Toxicology**, v. 39, p. 486-493, 2000.

RAO, I.G.; SINGH, A.; SINGH, V.K.; SINGH, D.K.. Effect of single and binary combinations of plant-derived molluscicides on different enzyme activities in the nervous tissue of *Achatina fulica*. **Journal of Applied Toxicology**, v. 23, p.19–22, 2003.

SÁ BARRETO, L.C.L.; CARVALHO, E.F.N.B; CUNHA-FILHO, M.S.S.; FERREIRA, C.P.; H.S. XAVIER. Atividade moluscicida de extratos e de *Aucubina* de *Vitex gardneriana* Schauer (Verbenaceae) em embriões da *Biomphalaria glabrata*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.26, n.3, p.339-43, 2007.

SCHALL, V.T., VASCONCELLOS, M.C., 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*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 1, p. 7-10, 1998.

SCHALL V.T.; VASCONCELLOS, M.C.; ROCHA, R.S.; SOUZA, C.P.; MENDES, N.M. The control of the schistosome-transmitting snail *Biomphalaria glabrata* by the plant molluscicide *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (syn *milli* Des Moul): a longitudinal field study in an endemic area in Brazil. *Acta Tropica*, v. 79, p. 165-170, 2001.

SILVA, L.C.; MEIRELES, L.M.O.; JUNQUEIRA, F.O.; BESSA, E.C.A. Development and reproduction in *Bulimulus tenuissimus* (Mollusca, Bulimulidae) in laboratory. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 25, n. 2, p.220-223, 2008.

SILVA, L.; SOUZA, B.; BESSA, E.C.A.; PINHEIRO, J. Effect of successive applications of the sublethal concentration of *Solanum paniculatum* in *Subulina octona* (Subulinidae). **Journal of Natural Products**, v. 5, p. 157-167, 2012.

Souza (2011). Efeitos dos extratos aquosos de *Bidens pilosa* Linné e *Mikania glomerata* Sprengel (Asteraceae) sobre aspectos biológicos e comportamentais de *Subulina octona* (Bruguère,1789) (Mollusca, Subulinidae)" 145 f. : il. Dissertação (Mestrado em

Comportamento e Biologia Animal)—Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2012.

SUMNER, J.B. 1925. A method for colorimetric determination of phosphorus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 65, p. 393.

TOMPA, A. 1984. Land snails (Stylomatophora). In Tompa, A.; Verdonk, N.K. & J.M.W Van Den Biggelaar (eds). **The Mollusca Reproduction**. London, Academic Press 7: 47-140p.

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*. **Z Parasitenkd**, v. 72, p. 417- 421, 1986

TRIPATHI, P.K; SINGH, A. Carbaryl induced alterations in the reproduction and metabolism of freshwater snail *Lymnaea acuminata*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 79, n.1, p. 1-9, 2004.

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, 1996.

VASCONCELOS, M.C.; A. AMORIM. a Activity of *Euphorbia splendens* var. *hislopilii* N.E.B. (Euphorbiaceae) latex against *Lymnaea columella* (Say, 1817) (Pulmonata: Lymnaeidae), intermediate host of *Fasciola hepatica*, Linnaeus, 1758 (Trematoda: Fasciolidae). 2: Limited Field-testing, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, n.4, p.7981-985, 2003.

VASCONCELOS, M.C.; A. AMORIM. b. Molluscicidal action of the latex of *Euphorbia splendens* var. *hislopilii* 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.544-563, 2003.

XAVIER, V.B.; BORBA, H.R.; BRANDOLINI, S.V.P.B. Atividade biológica de *Solanum lycocarpum* (Solanaceae) procedente de regiões fitogeográficas distintas sobre *Biomphalaria glabrata* (Planorbidae). **Revista Brasileira de Zoociências**, v.12,1, p.43-49, 2010.

ZHOU, X.; HE, X. WANG, G.; GAO, H.; ZHOU, G.; YE, W.; YAO, X. Steroidal Saponins from *Solanum nigrum*. **Journal of Natural Products**, 1-6, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Memoranda: molluscicide screening and evaluation. **Bulletin World Health Organization**, v.33, p.567-576, 1965.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Reports Of The Scientific Group On Plant Molluscicide. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 61. p. 927-929. 1983.

CAPÍTULO 3

**ALTERAÇÕES NO CONTEÚDO DE PROTEÍNAS TOTAIS E COMPOSTOS
NITROGENADOS DE ESCREÇÃO EM *Bradybaena similaris* (FÈRUSSAC, 1821), *Leptinaria
unilamellata* (D'ORBIGNY, 1835) E *Subulina octona* (BRUGÜIERE, 1789) EXPOSTAS À CL₅₀
DE *Solanum paniculatum* LINNÉ E *Solanum lycocarpum* A.S.t.- HIL**

Alterações no conteúdo de proteínas totais e compostos nitrogenados de excreção em *Bradybaena similaris* (FÉRUSSAC, 1821), *Leptinaria unilamellata* (D' Orbigny, 1835) e *Subulina octona* (Brugüière, 1789) expostas à CL₅₀ de *Solanum paniculatum* Linné e *Solanum lycocarpum* A.S.t.-Hil

RESUMO

Foi objetivo desse estudo verificar a atividade dos extratos aquosos de folhas de *S. paniculatum* e de frutos de *S. lycocarpum* sobre o conteúdo de proteínas totais e produtos nitrogenados de excreção, ureia e ácido úrico, na hemolinfa de *B. similaris*, *L. unilamellata* e *S. octona*. Para essa avaliação, moluscos foram expostos à CL₅₀ dos extratos de ambas as plantas durante 24, 48 e 72 horas e coletada a hemolinfa por punção cardíaca. O controle foi submetido ao mesmo período de exposição à água destilada. A exposição à CL₅₀ do extrato de *S. paniculatum* causou redução significativa do conteúdo de proteínas totais e aumento das concentrações de ácido úrico e ureia em *B. similaris*. Quando essa espécie foi exposta a *S. lycocarpum*, foi observada redução da concentração de proteínas e ácido úrico e aumento da concentração de ureia. Em *L. unilamellata*, a exposição à *S. paniculatum* e *S. lycocarpum* provocaram redução da concentração de proteínas totais e elevação das concentrações de ácido úrico e ureia. A concentração de proteínas totais manteve-se mais elevada nos moluscos da espécie *S. octona* expostos aos dois extratos. As concentrações de ácido úrico e ureia também permaneceram mais altas quando os moluscos expostos aos dois extratos. Os resultados obtidos demonstram que a exposição aos extratos causou um quadro de intoxicação, ocasionando um desvio do padrão excretor de uricotélico para ureotélico na espécie *B. similaris* e provocou o acionamento das duas rotas excretoras de modo a reduzir os efeitos tóxicos dos extratos nas espécies *L. unilamellata* e *S. octona*. A redução da concentração de proteínas totais, observada para *B. similaris* e *L. unilamellata*, pode estar relacionada aos princípios ativos presentes nos extratos, principalmente os taninos que se ligam a proteínas causando sua inativação ou à utilização dessas como fontes de energia. Os resultados obtidos demonstraram que os extratos ocasionaram alterações significativas no metabolismo de proteínas totais e nos produtos de excreção, sendo o uso dessas plantas promissoras para o controle de moluscos terrestres.

Palavras chaves: ácido úrico, extratos vegetais, intoxicação, molusco terrestre

ABSTRACT

The objective of this study was to verify the effect of aqueous extracts obtained from the leaves of *S. paniculatum* and fruits of *S. lycocarpum* on total protein contents and nitrogenous products of excretion, urea and uric acid, in hemolymph of *B. similaris*, *L. unilamellata* and *S. octona*. For the assays, snails were exposed to the LC₅₀ of extracts of both plants during 24, 48 and 72 hours, hemolymph samples were collected after each exposure interval by cardiac puncture. Control group was subjected to the same exposure period to distilled water. The exposure to LC₅₀ of *S. paniculatum* extract caused a significant reduction in total proteins content and an increasing in the concentrations of uric acid and urea in *B. similaris*. When this species was exposed to *S. lycocarpum* extract, it was observed a reduction in proteins and uric acid concentrations and an increasing in urea contents. In individuals of *L. unilamellata*, the contact with *S. paniculatum* and *S. lycocarpum* provoked a decrease in total proteins concentration and increased uric acid and urea concentration. Total proteins concentrations remained higher in individuals of *S. octona* exposed to both extracts. The concentrations of uric acid and urea also remained higher when snails were exposed to both extracts. The results show that the exposure to extracts caused intoxication that led to a deviation from uricotelic to a ureotelic pattern of excretion in *B. similaris* and triggered the mechanism of both excretory routes in order to reduce the toxic effects of extracts in individuals of *L. unilamellata* and *S. octona*. The reduction in total proteins concentrations in *B. similaris* and *L. unilamellata* can be related to the active principles present in extracts, mainly tannins that bound to proteins causing their inactivation or the use of them as energy resources. The results show that the extracts caused alterations in total proteins metabolism and in excretion products, proving that the use of these plants in the control of land snails is promising.

Key Words: land snail, uric acid, urea, vegetal extract.

6.1 INTRODUÇÃO

O controle de moluscos com uso de extratos vegetais é estudado desde meados do século XX, sendo os primeiros registros verificados na Ásia (JURBERG et al. 1989). Atualmente, tem-se intensificado a busca por substâncias de origem vegetal eficazes no controle desses animais de modo a substituir os moluscidas sintéticos utilizados (MALEK & CHENG, 1974; JURBERG et al. 1989; DIAS et al., 2000; VASCONCELOS et al., 2003 a,b; YADAV & JAGANNADHAN, 2008; OLIVEIRA-FILHO et al., 2010). A utilização de extratos vegetais brutos pode representar uma alternativa de baixo custo e eficiente para o controle de moluscos.

Para que se estabeleçam extratos vegetais eficientes no controle de moluscos são necessários estudos de alterações fisiológicas provocadas pelo uso destes extratos. Estudos realizados demonstraram que compostos de origem vegetal promoveram alterações no metabolismo de carboidratos (TRIPATHI & SINGH, 2004; MELLO-SILVA et al 2006; MELLO-SILVA et al., 2010; 2011), regulação enzimática (RAO et al, 2003) e síntese de ácidos nucléicos em moluscos terrestres (RAO & SINGH, 2000; SINGH & SING, 2004). Os efeitos metabólicos observados garantiram a letalidade do extrato ou a redução da fecundidade dos moluscos.

O gênero *Solanum* tem sido foco de muitas pesquisas por possuírem princípios ativos como taninos, saponinas e flavonóides que apresentam eficiente efeito biocida (referencas). Nesse gênero, destacam-se as espécies *Solanum paniculatum* L. e *Solanum lycocarpum* Ast. Hill que já foram testadas devido seus efeitos moluscicida (XAVIER et al. 2010; SILVA et al., 2012). Ambas as espécies apresentaram promissoras no controle de moluscos dulciaquícolas e terrestres.

No Brasil, as principais pesquisas se referem ao controle de moluscos dos gêneros *Biomphalaria* e *Lymnaea*, que são transmissores de helmintoses humanas sendo poucos os estudos sobre controle de moluscos terrestres (SILVA et al., 2012).

Moluscos terrestres, entretanto, são hospedeiros intermediários de importantes parasitos humanos como o *Angiostrongylus cantonensis* e *Angiostrongylus costaricensis* além de outras espécies de parasitos de animais domésticos e de criação. Nesse contexto encontramos as espécies *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821), *Leptinaria unilamellata* (D' Orbigny, 1835) e *Subulina octona* (Brugüière, 1789) que além de atuarem como transmissores de helmintos causam sérios prejuízos em plantações, principalmente em culturas de subsistência. Essas espécies podem ser consideradas bons modelos para testes com moluscidas por terem suas características biológicas como tempo de vida, tempo para maturidade sexual, fecundidade o que permite a observação de todo o ciclo reprodutivo em laboratório.

Desse modo foram objetivos desse estudo avaliar o efeito da exposição à CL₅₀ de *S. paniculatum* e *S. lycocarpum* sobre a concentração de proteínas totais, ureia e ácido úrico na hemolinfa de *B. similaris*, *L. unilamellata* e *S. octona*.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1. Obtenção dos moluscos, plantas e preparação dos extratos

Os moluscos utilizados nesse estudo foram obtido de criações matrizes mantidas no Laboratório de Biologia de Moluscos do Museu da Malacologia Prof. Maury Pinto de Oliveira. Os animais foram criados conforme descrito no capítulo 2.

O material vegetal foi coletado e acondicionado e os extratos foram preparados segundo descrito no Capítulo 1.

6.2.2. Atividade da CL_{50} de *Solanum paniculatum* e *Solanum lycocarpum* sobre a concentração de proteínas totais na hemolinfa de *Bradybaena similaris*

Para análise da concentração de proteínas totais na hemolinfa, 120 moluscos foram expostos à CL_{50} do extrato aquoso de *S. paniculatum* e *S. lycocarpum* (20 moluscos/intervalo de exposição) durante 24, 48 e 72 horas. O mesmo número de moluscos permaneceu em contato com água destilada durante os mesmos intervalos de tempo. A cada intervalo de exposição foi realizada punção cardíaca e coletada da hemolinfa dos moluscos.

O conteúdo de proteínas totais foi determinado com a técnica do Biureto (WEICHSELBAUM, 1946). Para tal, uma mistura de 50 μ L de hemolinfa e 2,5 mL de reagente de biureto (citrato trissódico 0,144M, carbonato de sódio 0,21M e sulfato de cobre 0,01M) foi homogeneizada, deixado sob temperatura ambiente e após 5 min. as absorbâncias foram lidas em triplicata em espectrofotômetro em 550nm. Os resultados expressos em mg/dL.

6.2.3. Atividade da CL_{50} de *Solanum paniculatum* e *Solanum lycocarpum* sobre a concentração de ácido úrico e ureia na hemolinfa de *Bradybaena similaris*

As concentrações de ácido úrico e ureia foram determinadas a partir da exposição de 60 moluscos à CL_{50} dos extratos de *S. paniculatum* e *S. lycocarpum* durante 24, 48 e 72 horas. Outros 60 animais foram expostos à água destilada e permaneceram nas mesmas condições. Apesar da redução do número de moluscos, a densidade populacional em cada terrário foi mantida. A cada intervalo de exposição a hemolinfa foi coletada através de punção cardíaca.

Para a determinação da concentração de ácido úrico, 50 μ L de hemolinfa foi misturado ao reagente de cor (tampão fosfato de 100mmol/L [pH 7,8] contendo 4 mmol diclorofenol-sulfonato, 4-aminoantipirina 0,5 mmol/L, 120U \leq uricase, 4.980U \leq ascorbato oxidase, 1.080U \leq peroxidase). A mistura foi homogeneizada e incubada a 37° C por 5 min. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro em 520 nm (BISHOP et al., 1996) e os resultados expressos como mg/dL;

A dosagem de ureia foi realizada através da adição de 2mL de solução contendo 60 mmol de salicilato de sódio, nitroprussiato de sódio 3,4 mmol e ETDA dissódico 1,35 mmol à 100 μ L de hemolinfa. A mistura foi homogeneizada e incubada a 37°C. As absorbâncias foram lidas em triplicata em espectrofotômetro em 600 nm e os resultados foram expressos em mg/dL (CONNERTY et al., 1955).

6.2.4. Análise dos resultados

As concentrações de proteínas totais, ácido úrico e ureia foram comparados pelo teste de variância de ANOVA do programa BioEstat, versão 5.0. O teste de correlação de Pearson foi utilizado para correlacionar as concentrações de proteínas, ureia e ácido úrico entre si. E o teste de regressão linear simples para avaliar as alterações desses produtos ao longo do tempo.

6.3 RESULTADOS

4.3.1. Efeitos da exposição ao extrato aquoso das folhas de *Solanum paniculatum*

4.3.1.1. Proteínas totais na hemolinfa

Houve redução do conteúdo de proteínas totais na hemolinfa de *B. similis* expostos ao extrato aquoso de *S. paniculatum* em todos os intervalos de exposição. Em 24 horas a redução foi de 34% ($Q=6,02$; $p<0,05$), em 48 horas de 172% ($Q=14,40$; $p<0,05$) e em 72 horas pós-exposição foi de 94% ($Q=6,40$; $p<0,05$) (Figura 6.1A). Não houve correlação significativa entre a redução da concentração e tempo de exposição ($F=0,11$; $p=0,79$; $R^2=0,10$).

Para a espécie *L. unilamellata* verificou-se elevação de 40% da concentração de proteínas em 24 horas pós-exposição embora esse aumento não tenha sido significativo ($F=4,56$; $p=0,09$) (Figura 4.1 B). Em 48 horas houve redução de 30% ($Q=14,0$; $p<0,05$) e em 72 horas a redução foi de 35% ($Q=4,12$; $p<0,05$) (Figura 6.1 B). Não houve correlação significativa entre o tempo de exposição e alterações na concentração de proteínas quando os moluscos foram expostos à CL_{50} de *S. paniculatum* ($r=0,22$; $p=0,71$, $R^2=0,18$).

Todavia, na espécie *S. octona* a concentração de proteínas totais foi significativamente mais elevada em 24 ($Q=9,50$; $p<0,05$) e 48 horas ($Q=5,23$; $p<0,05$). Em 72 horas a concentração de proteínas totais manteve-se mais alta, porém não foi verificada diferença estatística entre a concentração de proteínas totais de expostos e não expostos ($p>0,05$) (Figura 6.1 C). O percentual de elevação foi de 173%, 256% e 30% para os intervalos de 24, 48 e 72 horas, respectivamente. Não foi verificada correlação entre o tempo de exposição e a elevação da concentração de proteínas totais ($F=102,3$; $p=0,06$, $R^2=0,99$).

3.3.1.2. Ácido úrico na hemolinfa

A concentração de ácido úrico na hemolinfa de *B. similis* foi aumentada em 30% quando os moluscos foram expostos durante 24 horas ($F=0,74$; $p=0,56$), 85% em 48 horas ($Q=31,7$; $p<0,01$) e 56% em 72 horas de exposição ao extrato de *S. paniculatum* ($Q=4,84$; $p<0,05$) (Figura 6.2 A). Não houve correlação entre o tempo de exposição e a redução da concentração de ácido úrico na hemolinfa dos moluscos expostos ($F=0,37$; $p=0,65$; $R^2=0,27$).

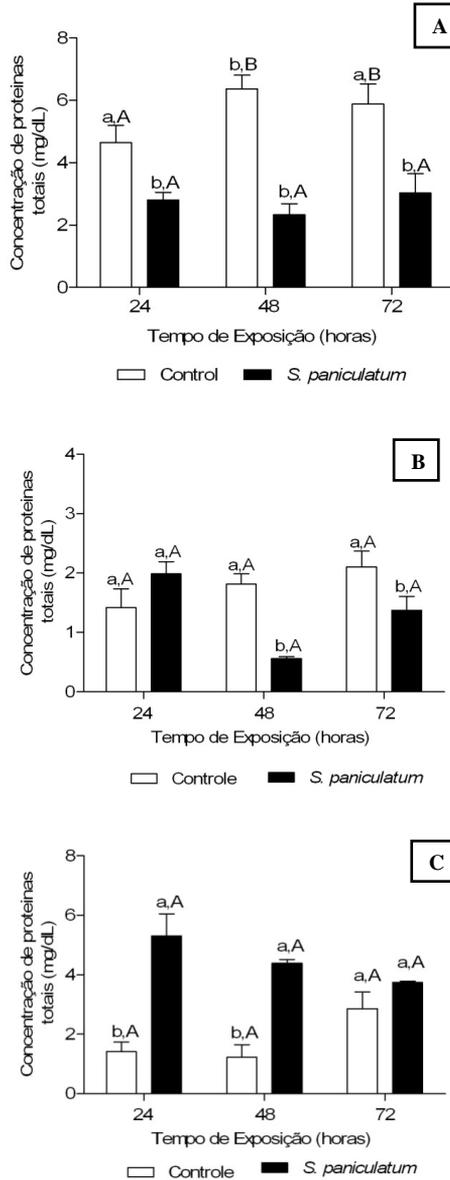


Figura 6.1. Concentração de proteínas totais (mg/dL) na hemolinfa de moluscos expostos à CL₅₀ do extrato aquoso de *Solanum paniculatum* durante 72 horas. (A) *Bradybaena similaris*, (B) *Leptinaria unilamellata* e (C) *Subulina octona*. *Letras maiúsculas entre moluscos do grupo controle e exposto ao longo do tempo e minúsculas indicam diferença entre controle e expostos em cada intervalo de exposição (p<0.05).

Para *L. unilamellata* exposta a CL₅₀ de *S. paniculatum* houve aumento da concentração de ácido úrico de 89%, 83,6% e 43,3% em 24, 48 e 72 horas, respectivamente (Figura 6.2 B). Do mesmo modo, não foi observada correlação entre o tempo de exposição e o conteúdo de ácido úrico quando os moluscos expostos à *S. paniculatum* ($F=-0,37$; $p=0,423$; $R^2=0,62$).

A concentração de ácido úrico na hemolinfa de *S. octona* demonstrou o mesmo padrão que as demais espécies mantendo-se mais elevada em relação ao controle em todos os intervalos. O percentual de aumento foi de 56% ($Q=4,90$; $p<0,05$), 52% ($F=4,66$; $p=0,09$) e 62% ($Q=4,50$; $p<0,05$) para os intervalos de 24, 48 e 72 horas, respectivamente (Figura 6.2 C). Para essa espécie também não foi registrada correlação entre o tempo de exposição ao extrato e o aumento da concentração de ácido úrico na hemolinfa dos moluscos expostos.

3.3.1.3. Ureia na hemolinfa

Foi observado que a exposição à CL₅₀ de *S. paniculatum* causou aumento da concentração de ureia na hemolinfa de *B. similis*. Porém, esse aumento apenas foi significativo nas primeiras 24 horas de exposição ao extrato ($Q=5,30$; $p<0,05$) (Figura 6.3 A). Não houve correlação entre a o aumento da concentração de ureia na hemolinfa e o tempo de exposição ao extrato de *S. paniculatum* ($F=3,33$; $p=0,32$; $R^2=0,77$).

Resultados similares foram verificados para *L. unilamellata* sendo observado aumento percentual da concentração de ureia 68% em 24 horas ($Q=6,24$; $p<0,05$), 65,5% em 48 ($Q=6,75$; $p<0,05$) e de 70% em 72 horas ($Q=28,1$; $p<0,00$) (Figura 6.3 B). Para essa espécie também não foi encontrada correlação entre o aumento da concentração de ureia e o tempo de exposição ao extrato ($F=1,23$; $p=1$; $R^2=0,56$).

Para *S. octona* verificou-se aumento significativo da concentração de proteínas em 24 (173%) e 48 horas (250%) ($p<0,01$). Em 72 horas o aumento (30%) não foi significativo ($p>0,05$).

Não houve correlação entre a diminuição da concentração de proteínas totais e os produtos de degradação, ureia e ácido úrico, quando os moluscos da espécie *B. similis* expostos à *S. paniculatum* (ureia: $r=-0,21$, $p=0,57$, $R^2=0,05$; ácido úrico: $r=0,57$; $p=0,66$). O mesmo foi observado para *L. unilamellata* (ácido úrico: $r=-0,54$; $p=0,63$ e ureia: $r=0,97$; $p=0,14$) quando os moluscos foram expostos ao extrato. Em *S. octona* também não foi estabelecida correlação entre o aumento da concentração de proteína totais e de ácido úrico ($r=0,28$; $p=0,81$; $R^2=0,08$) e ureia ($r=0,81$; $p=0,39$; $R^2=0,67$).

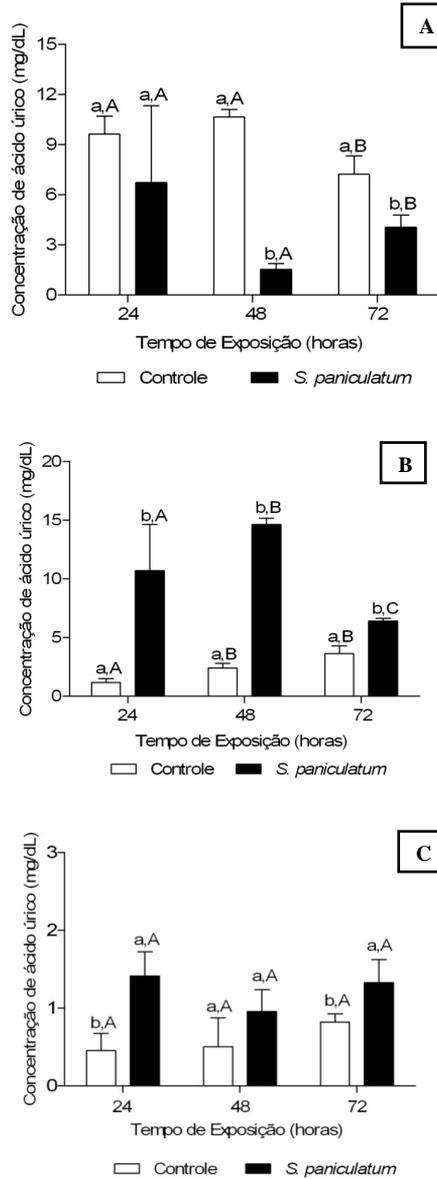


Figura 6.2. Concentração ácido úrico (mg/dL) na hemolinfa de moluscos expostos à CL₅₀ do extrato aquoso de *Solanum paniculatum* durante 72 horas. (A) *Bradybaena similaris*, (B) *Leptinaria unilamellata* e (C) *Subulina octona*. *Letras maiúsculas entre moluscos do grupo controle e exposto ao longo do tempo e minúsculas indicam diferença entre controle e expostos em cada intervalo de exposição (p<0.05).

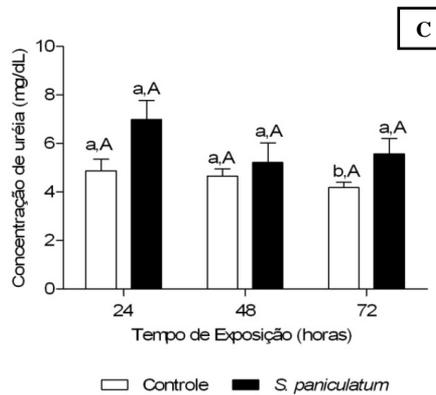
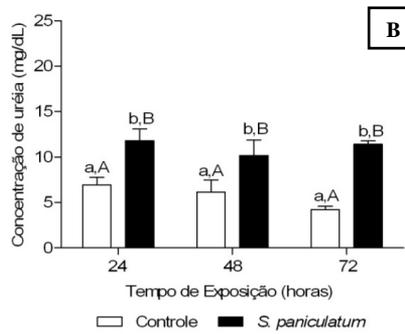
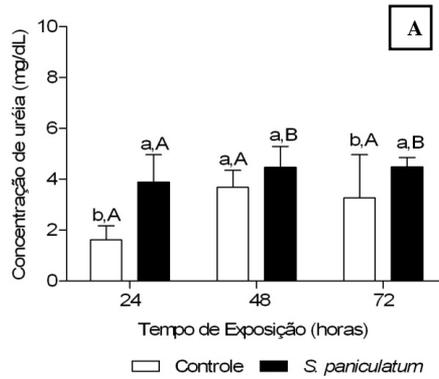


Figura 6.3. Concentração ureia (mg/dL) na hemolinfa de moluscos expostos à CL₅₀ do extrato aquoso de *Solanum paniculatum* durante 72 horas. (A) *Bradybaena similaris*, (B) *Leptinaria unilamellata* e (C) *Subulina octona*. *Letras maiúsculas entre moluscos do grupo controle e exposto ao longo do tempo e minúsculas indicam diferença entre controle e expostos em cada intervalo de exposição ($p < 0.05$).

6.3.2. Efeitos da exposição ao extrato aquoso das folhas de *Solanum lycocarpum*

6.3.2.1. Proteínas totais na hemolinfa

A exposição a *S. lycocarpum* causou redução no conteúdo de proteínas totais na hemolinfa de *B. similaris* em todos os períodos de exposição, porém essa redução não foi significativa ($p > 0,05$) (Figura 6.4 A). O percentual de redução foi de 34%, 9% e 22% nos intervalos de 24, 48 e 72 horas, respectivamente. Também não houve relação entre o tempo de exposição e a alteração na concentração de proteínas na hemolinfa dos moluscos expostos ao extrato dessa planta ($F=0,71$; $p=0,55$; $R^2=0,42$).

Na espécie *L. unilamellata* a concentração de proteínas totais na hemolinfa manteve-se mais alta em relação ao controle após 24 horas, porém não foi identificada diferença significativa ($p > 0,05$). Nos intervalos de 48 e 72 horas, entretanto, verificou-se redução significativa de 55% ($Q=6,26$; $p < 0,05$) e 35% ($Q=15,00$; $p < 0,05$) na concentração de proteínas totais (Figura 6.4 B). Do mesmo modo que na espécie anteriormente citada, não houve correlação significativa entre o tempo de exposição e alterações na concentração de proteínas ($r=-0,33$; $p=0,79$, $R^2=0,11$).

Diferente do que foi observado para as outras espécies, em *S. octona* a concentração de proteínas totais manteve-se significativamente mais elevada em relação ao controle em todos os intervalos de exposição à CL₅₀ de *S. lycocarpum*. O percentual de aumento foi de 251% em 24 horas ($Q=9,31$; $p < 0,05$), 154,80% em 48 horas ($Q=5,90$; $p < 0,05$) e de 76,00% em 72 horas ($Q=6,90$; $p < 0,05$) (Figura 6.4 C). Também não foi detectada correlação entre o tempo de exposição ao extrato e o aumento da concentração de proteínas totais em *S. octona* ($F=0,57$; $p=0,59$; $R^2=0,36$).

4.3.2.2. Ácido úrico totais na hemolinfa

Em *B. similaris* foi observado que exposição à CL₅₀ de *S. lycocarpum* causou redução da concentração de ácido úrico, embora essa redução apenas tenha sido significativa quando os animais foram expostos durante 72 horas ($Q=9,80$; $p < 0,01$). O percentual de redução da concentração de ácido úrico foi de 42,0%, 37,0% e 116% em 24, 48 e 72 horas pós-exposição, respectivamente (Figura 6.5 A).

Diferente do observado para *B. similaris*, nas espécies *L. unilamellata* e *S. octona* e foi verificado aumento significativo em todos os intervalos de exposição. Em *L. unilamellata* o percentual de aumento foi de 80,60% em 24 horas ($Q=4,60$; $p < 0,05$), 62,0% em 48 horas ($Q=6,0$; $p < 0,05$) e de 70,1% em 72 horas ($Q=15,4$, $p < 0,05$) (Figura 6.5 B). Para *S. octona* os percentuais de aumento foram de 886% em 24 horas ($Q=19,50$; $p < 0,05$), 531,70% em 48 horas ($Q=19,20$; $p < 0,05$) e de 665,90 em 72 horas ($Q=43,50$; $p < 0,05$) (Figura 6.5 C). Não foi verificada correlação entre o tempo de exposição e o aumento da concentração de ácido úrico em *L. unilamellata* ($F=0,27$; $p=0,83$; $R^2=0,08$) e *S. octona* ($F=0,33$; $p=0,67$; $R^2=0,25$).

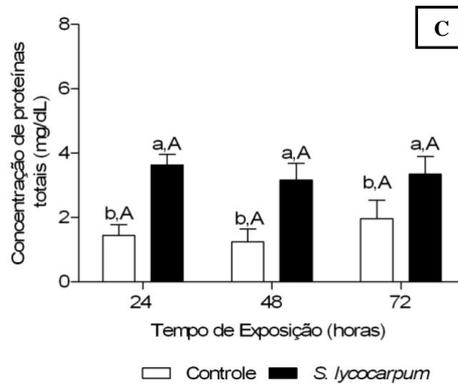
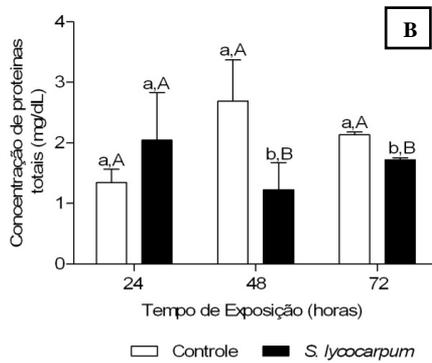
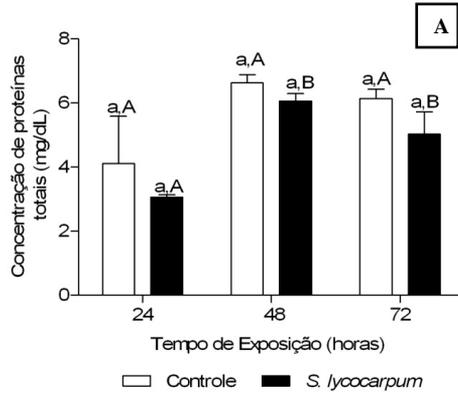


Figura 6.4. Concentração de proteínas totais (mg/dL) na hemolinfa de moluscos expostos à CL_{50} do extrato aquoso de *Solanum lycocarpum* durante 72 horas. (A) *Bradybaena similaris*, (B) *Leptinaria unilamellata* e (C) *Subulina octona*. *Letras maiúsculas entre moluscos do grupo controle e exposto ao longo do tempo e minúsculas indicam diferença entre controle e expostos em cada intervalo de exposição ($p < 0.05$).

4.3.2.3. Ureia na hemolinfa

Foi observado que a exposição à CL_{50} de *S. lycocarpum* causou aumento da concentração de ureia na hemolinfa de *B. similis*, porém esse aumento apenas foi significativo em 48 horas ($Q=4,88$; $p<0,05$) (Figura 6.6 A). Não houve correlação entre a o aumento da concentração de ureia na hemolinfa e o tempo de exposição ao extrato ($F=114,60$; $p=0,06$; $R^2=0,90$).

Foi observado que nas primeiras 24 horas de exposição houve redução da concentração de ureia na hemolinfa de *L. unilamellata*, porém essa redução não foi significativa ($F=2,11$; $p=0,21$) (Figura 6.6 B). Entretanto em 48 ($Q=7,34$; $p<0,01$) e 72 horas pós-exposição ($Q=181,00$; $p<0,01$) houve aumento de ureia na hemolinfa foi estatisticamente significativo. O tempo de exposição à CL_{50} de *S. lycocarpum* não foi correlacionado ao aumento da concentração de ureia na hemolinfa ($F=0,51$; $p=0,78$; $R^2=0,34$).

Em *S. octona* foi verificado aumento significativo em todos os intervalos de exposição. Os percentuais observados foram de 338% em 24 horas ($Q=15,30$; $p<0,05$), 73% em 48 horas ($Q=14,4$; $p<0,05$) e de 35% em 72 horas ($Q=5,10$; $p<0,05$) (Figura 6.6 C). Nesse caso também não foi observada correlação entre o aumento e o tempo de exposição ($F=4,00$; $p=0,30$; $R^2=0,80$).

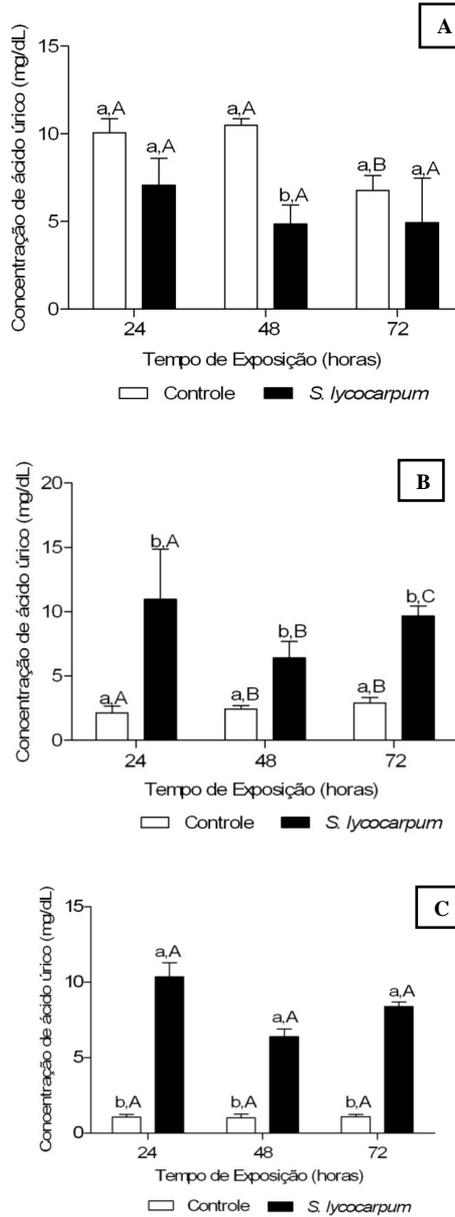


Figura 6.5. Concentração ácido úrico (mg/dL) na hemolinfa de moluscos expostos à CL₅₀ do extrato aquoso de *Solanum lycocarpum* durante 72 horas. (A) *Bradybaena similaris*, (B) *Leptinaria unilamellata* e (C) *Subulina octona*. *Letras maiúsculas entre moluscos do grupo controle e exposto ao longo do tempo e minúsculas indicam diferença entre controle e expostos em cada intervalo de exposição (p<0.05).

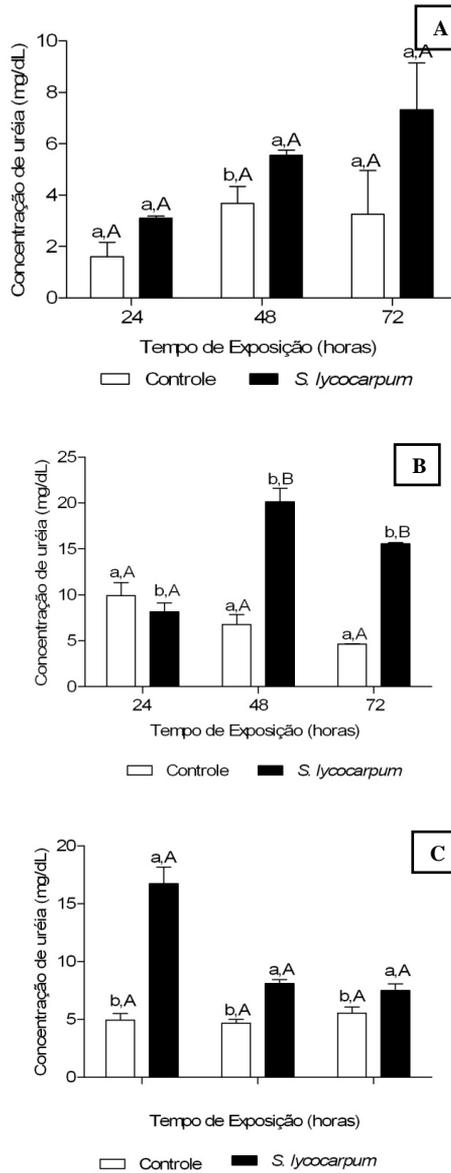


Figura 6.6. Concentração ureia (mg/dL) na hemolinfa de moluscos expostos à CL₅₀ do extrato aquoso de *Solanum lycocarpum* durante 72 horas. (A) *Bradybaena similaris*, (B) *Leptinaria unilamellata* e (C) *Subulina octona*. *Letras maiúsculas entre moluscos do grupo controle e exposto ao longo do tempo e minúsculas indicam diferença entre controle e expostos em cada intervalo de exposição (p<0.05).

Não houve correlação entre a diminuição da concentração de proteínas totais e os produtos de degradação, ureia e ácido úrico, quando *B. similaris* foi exposta ao extrato de *S. lycocarpum* (ureia: $r=0,59$, $p=0,09$, $R^2=0,35$; ácido úrico: $r=-0,33$, $p=0,39$, $R^2=0,10$). O mesmo foi observado para a espécie *L. unilamellata* (ácido úrico: $r=0,99$; $p=0,07$; ureia: $r=-0,96$; $p>0,17$) e *S. octona* (ácido úrico: $r=0,99$; $p>0,07$; $R^2=0,98$ e ureia: $r=0,89$; $p=0,29$; $R^2=0,80$).

6.3.3. Comparação das alterações nas concentrações de proteínas totais, ácido úrico e ureia pela exposição dos moluscos à CL₅₀ dos extratos aquosos de folhas de *Solanum paniculatum* e de frutos de *Solanum lycocarpum*

6.3.3.1. Proteínas totais

Ao comparar a redução na concentração de proteínas causada pela exposição de *B. similaris* aos dois extratos, foi observado que *S. paniculatum* foi mais efetivo nos intervalos de 48 (Q=17,80; $p<0,01$) e 72 horas (Q=4,30; $p<0,05$). No intervalo 24 a redução na concentração de proteínas totais não diferiu ($p>0,05$).

Em *L. unilamellata*, os efeitos da exposição aos extratos das duas plantas sobre a concentração de proteínas totais não diferiu significativamente em nenhum dos intervalos ($p>0,05$).

Para a espécie *S. octona* foi observado que em 24 horas o extrato de *S. paniculatum* mostrou-se mais eficiente (Q=4,1; $p<0,05$). Nos demais intervalos os resultados foram similares para ambos os extratos ($p>0,05$).

6.3.3.2. Ácido úrico

A redução no conteúdo de ácido úrico na hemolinfa de *B. similaris* apenas foi significativamente mais acentuada em 48 de exposição à CL₅₀ de *S. paniculatum* (Q=5,83; $p<0,05$). Nos demais intervalos a redução foi similar para os dois extratos ($p>0,05$). Para a espécie *L. unilamellata*, o aumento da concentração de ácido úrico foi mais evidente para aqueles animais expostos a *S. paniculatum* em 48 horas (Q=11,8; $p<0,01$) e aos expostos a *S. lycocarpum* em 72 horas (Q=8,2; $p<0,01$).

Para a espécie *S. octona* foi observado que o extrato de *S. lycocarpum* foi mais eficiente em 24 horas (Q=16,6; $p<0,01$), 48 (Q=11,5; $p<0,01$) e 72 horas (Q=34,3; $p<0,01$).

6.3.3.3. Ureia

O efeito da exposição ao extrato das duas plantas sobre a concentração de ureia na hemolinfa não diferiu para a espécie *B. similaris* ($p>0,05$).

A comparação entre a ação dos dois extratos para a espécie *L. unilamellata* demonstrou que *S. paniculatum* ocasionou efeito significativo no aumento da concentração de ureia nas primeiras 24 horas (Q=4,46; $p<0,05$), enquanto o mesmo foi observado para *S. lycocarpum* nos demais intervalos de exposição, 48 e 72 horas ($p<0,01$).

Para a espécie *S. octona* também verificou-se maior eficiência do extrato de *S. lycocarpum* nos intervalos de 24 horas (Q=8,52; $p<0,01$) e 72 horas (Q=5,0; $p<0,05$). Em 48 horas houve similaridade do efeito dos dois extratos sobre esse composto nitrogenado ($p>0,05$).

6.4 DISCUSSÃO

Proteínas totais são utilizadas como fonte de energia quando existe uma deficiência das fontes de carboidratos que são primariamente consumidas (BECKER, 1980). Nesse estudo verificou-se redução de proteínas totais nas espécies *B. similaris* e *L. unilamellata* o que indica que pode ter havido consumo dessas para manutenção das funções orgânicas.

Mello-Silva et al. (2006; 2010) demonstraram a redução das reservas de carboidratos de *B. glabrata* pela ação do latex de *E. splendens*. Em condições de estresse nutricional moluscos passam a utilizar proteínas para manutenção da homeostase glicêmica, pela biossíntese *de novo* de glicose a partir de aminoácidos (THOMPSON & LEE, 1986). Conforme observado no Capítulo 2, a redução da concentração de glicogênio na glândula digestiva pela a exposição aos extratos pode estar relacionado à redução no conteúdo de proteínas, indicando a utilização dessas como fonte de energia. Na espécie *B. similaris*, foi verificada a maior redução tanto de glicogênio de reserva quanto de proteínas totais na hemolinfa.

Nos subulinídeos, entretanto, foram observados efeitos contrários, sendo verificado aumento da concentração de proteínas totais pela exposição aos dois extratos. Para essa espécie foi verificado o mesmo padrão de redução de glicogênio de reserva como nas outras duas espécies (Capítulo 2). É possível sugerir que nessa espécie as reservas primarias de energia foram suficientes para garantir a desintoxicação e manutenção homeostática. Vale ressaltar que a fecundidade média e os efeitos comportamentais também foram minimamente alterados o que reforça a idéia de maior resistência de *S. octona* à exposição aos moluscicidas.

Outra hipótese para a redução de proteínas totais seria a complexação dessa com os taninos presentes nos extratos. Porém, apenas houve redução evidente de proteínas totais na hemolinfa de *B. similaris*, enquanto nas demais espécies verificou-se aumento dessas. Além disso, conforme foi constatado no Capítulo 1, em *S. paniculatum* esse composto se apresenta em quantidade cerca de 1,5 vezes maior que *S. lycocarpum* o que geraria maior efeito do primeiro extrato nas alterações nas concentrações de proteínas totais das três espécies, o que não foi observado.

A atividade moluscicida de plantas taníferas foi verificada por Marston & Hostettmann (1985), que enfatizaram essa classe química promissora como possíveis produtos no controle de pragas. Alcanfor et al. (2001) demonstraram os efeitos histofisiológicos na glândula digestiva de adultos de *B. glabrata* expostos a extratos de plantas ricas em taninos. A atividade desse composto pode ter contribuído para a redução da concentração de proteínas.

Em condições normais, moluscos pulmonados terrestres excretam ácido úrico, guanina e xantinas que acarretam baixa perda de água na excreção de nitrogenio (RIDDLE, 1983). Porém, sob condições de estresse como estivação, infecção por parasitos e exposição à moluscicidas ocorre aceleração da atividade catabólica e variações, qualitativas e quantitativas, dos compostos de excreção (BECKER, 1980; HORNE, 1973; GIRAUD-BILLOUD et al. 2011; PINHEIRO et al, 2009). Fatores sazonais também podem levar a alterações metabólicas, refletindo no conteúdo dos produtos nitrogenados como demonstrado por Smith & Smith (1998). Esses autores verificaram variação sazonal no conteúdo de ácido úrico relacionado à proteção contra perda de água nas estações mais quentes do ano.

Quando expostos ao extrato de *S. lycocarpum* houve aumento da concentração de ureia e redução da concentração de ácido úrico em *B. similaris* indicando o acionamento da rota ureotélica para a desintoxicação dos moluscos. Para as outras espécies expostas aos dois extratos, incluindo *B. similaris* exposta a *S. paniculatum*, observou-se aumento dos dois compostos nitrogenados na hemolinfa o que demonstrou a necessidade de utilização das duas rotas para excreção. Esses resultados demonstram a plasticidade metabólica de moluscos

terrestres frente a condições adversas. Esses resultados demonstram a plasticidade metabólica dos moluscos frente a uma situação de intoxicação.

Resultados semelhantes aos obtidos foram encontrados por Mello-Silva et al. (2011) que registraram redução no conteúdo de ácido úrico em *B. glabrata* infectada por *S. mansoni* e exposta ao látex de *E. splendens*. Entretanto, Mello-Silva et al. (2006) observaram aumento do conteúdo de proteínas totais e ácido úrico em *B. glabrata* exposta ao extrato de *S. malacoxylon*. Esses autores sugeriram que o estresse provocado pela exposição ao moluscicida levou ao aumento do consumo de proteínas pelo organismo como forma compensatória de produção de energia através da gliconeogênese, promovendo o aumento na concentração de ácido úrico, sendo esse mecanismo uma estratégia para diminuir os efeitos da intoxicação pelo extrato.

Na infecção por parasitos também pode ocorrer variações nas rotas de excreção de moluscos. Souza et al. (2000) verificaram que marcada redução na concentração de ureia de *B. similis* infectada por *Eurytrema coelomatum*. Tunholi et al. (2011) demonstraram que a infecção de *B. glabrata* por *Echinostoma paraensei* Lie & Basch, 1976 demonstraram que doses miracídias diferentes aumentaram as concentrações de ureia e ácido úrico na hemolinfa dos moluscos no decorrer da infecção. Esses autores também verificaram marcado decréscimo na concentração de proteínas totais na hemolinfa e sugeriram que o parasito pode estimular a alteração das vias de formação de produtos nitrogenados durante o curso da infecção aumentando as concentrações de produtos nitrogenados.

Os resultados obtidos nesse estudo demonstraram que as espécies *S. paniculatum* e *S. lycocarpum* provocaram um processo de intoxicação nas espécies de moluscos que por sua vez acarretou importantes alterações no metabolismo de proteínas e formação de produtos nitrogenados de excreção. Assim, o estudo dessas plantas no controle de moluscos terrestres são promissores.

6.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCANFOR, J. D. X.; FERRI, P. H.; SANTOS, S. C.; BEZERRA, J. P. C. Plantas moluscocidas o controle dos caramujos transmissores da esquistossomíase, com ênfase na ação de taninos. **Revista de Patologia Tropical**, v.30, n. 1, p.167-175, 2001.

AHMED, A. H.; RAMZY, R. M. R. Laboratory assessment of the molluscicidal and cercaricidal activities of the Egyptian weed, *Solanum nigrum* L. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.91, p.931–937, 1997.

ALZERRECA, A.; ARBOLEDA, B.; HART, G. Molluscicidal activity of natural products: the effects of *Solanum* glycosidic alkaloids on *Lymnaea cubensis* snails. **Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico**, v.65, p.69–72, 1981.

ARAÚJO, J. L. B.; KELLER, G. D. Moluscos de importância econômica no Brasil. III. Subulinidae, *Leptinaria unilamellata* (Orbigny) (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata, Stylommatophora). **Revista Brasileira de Zoologia**, v.10, n.3, 499-507, 1993.

BECKER, W. Metabolic interrelationships of parasitic trematodes and molluscs especially *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. **Z. Parasitenkd.**, v.63, p.101-111, 1980.

BEKKOUCHE, K.; MARKOUK, M.; LARHSINI, M.; JANA, M.; LAZREK, H. B. Molluscicidal properties of glycoalkaloid extracts from Moroccan *Solanum* species. **Phytotherapy Research**, v.14, p. 366–367, 2000.

BISHOP, M. L.; DUBEN-ENGELKIRK, J. L.; FODY, E. P. **Clinical Chemistry. Principles, Procedures, Correlations**. 3ª Edição. Lippincott, Filadelfia, 1996

BOFFI, A. V. Moluscos brasileiros de interesse médico e econômico. Rio de Janeiro, Hucitec Ed., 376p. 1979.

BRITO, A. R. M. S.; BRITO, A. A. S. Forty years of Brazilian medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**, v.39, n.1, p.53-67, 1993.

CANTANHEDE, S. P. D.; MARQUES, A.M.; VALVERDE, A. L. ATIVIDADE moluscicida de plantas: uma alternativa profilática. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.20, n.2, p. 282-288,2010.

CONNERTY, H. V.; BRIGGS, A. R.; EATEN, E. H. Determination of blood urea nitrogen using a simple stabilizing reagent. **American Journal of Clinical Pthology**, v.25, p.1321, 1955.

D'ÁVILA, S.; DIAS, R. J. P.; BESSA, E. C. A.; DAEMON, E. Resistência à dessecação em três espécies de moluscos terrestres: aspectos adaptativos e significado para o controle de helmintos. **Revista Brasileira de Zoociências**, v.6, p.115-127, 2004.

DUARTE, M. J. F. O ciclo evolutivo de *Postharmostomum gallinum* Witenberg, 1923, no Estado do Rio de Janeiro. Tese de doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, 69p, 1977.

GIRAUD-BILLOUD, M.; ABUD, M. A; CUETO, J. A.; VEGA, I. A. CASTRO-VAZQUEZ, A. Uric acid deposits and estivation in the invasive apple-snail, *Pomacea canaliculata*, **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v.158, p.506-512, 2011.

HORNE, F. R. The utilization of foodstuffs and urea production by a land snail during estivation. **Biological Bulletin**, v.144, p.321-330, 1973.

HUCKABEE, W. E. Relationship of pyruvate and lactate during anaerobic metabolism. II. Exercise and formation of O₂-debt. **Journal of Clinical Investigation**, v.37, p. 255-263, 1958.

JARNE, P.; THERON, A. Genetic structure in natural populations of flukes and snails: A practical approach and review. **Parasitology**, v.123, p. 527-540, 2001.

KLOOS, H.; THIONGO, F. W.; OUMA, J. H.; BUTTERWORTH, A. E. Preliminary evaluation of some wild and cultivated plants for snail control in Machakos district, Kenya. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.90, p.197-204, 1987.

MEDINA, F. R.; WOODBURY, R. Terrestrial plants molluscicidal to lymnaeid hosts of *Fasciliasis hepatica* in Puerto Rico. **Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico**, v.63, p.366-376, 1979.

MEDINA, F. R.; RITCHIE, L. S. Molluscicidal activity of the Puerto Rican weed *Solanum nodiflorum* against snail hosts of *Fasciola hepatica*. **Economic Botany**, v.34, p.368-375, 1980.

MELLO-SILVA, C. C.; VASCONCELLOS, M. C.; BEZERRA, J. C. B.; RODRIGUES, M. L. A. & PINHEIRO, J. The influence of exposure to *Euphorbia splendens* var. *hislopii* latex on the concentrations of total proteins and nitrogen products in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*, **Acta Tropica**, v.117, p.107-104, 2011.

MKOJI, G. M.; NJUNG, K.; KIMANI, G.; KOFI-TSEKPO, B.; MUNGAI, B. N.; KAMAU, T.; MUTHAURA, R.; KIBAYA, R. M.; WAMBAYI, E. Molluscicidal activity of *Solanum aculeatum* (family: Solanaceae) berries against *Biomphalaria pfeifferi*, *Bulinus globosus* and *Lymnaea natalensis*. **Parasitology**, v.40, p.119-120, 1989.

ODYEK, O.; MAKANGA, B.; BYARUHANGA, M. A. Larvicidal and molluscicidal activities of *Solanum aculeastrum* berry methanol extract. **Fitoterapia**, v.63, p.71-72, 1992.

PINHEIRO, P.; MALDONADO-JÚNIOR, A.; LANFREDI, R.M. Physiological changes in *Lymnaea columella* (Say, 1817) (Mollusca, Gastropoda) in response to *Echinostoma paraensei* Lie and Basch, 1967 (Trematoda: Echinostomatidae) infection. **Parasitology Research**, v.106, p.55-59, 2009.

SILVA, L.; SOUZA, B.; BESSA, E. C. A.; PINHEIRO, J. Effect of successive applications of the sublethal concentration of *Solanum paniculatum* in *Subulina octona* (Subulinidae). **Journal of Natural Products**, v.5, p.157-167, 2012.

STURROCK, R. F. Current concepts of snail control. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.90, p.24-248, 1995.

TUNHOLI, V.M.; LISTRINO, D.; TUNHOLI-ALVES, V. M.; MELLO-SILVA, CLÉLIA, C.C.; MALDONADO JR., A.; PINHEIRO, J.; RODRIGUES, M. L. A. Biochemical profile of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda) after infection by *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). **Parasitology Research**, v. 109, p.885-891, 2011.

XAVIER, V. B.; BORBA, H. R.; BRANDOLINI, S. V. P. B. Atividade biológica de *Solanum lycocarpum* (Solanaceae) procedente de regiões fitogeográficas distintas sobre *Biomphalaria glabrata* (Planorbidae). **Revista Brasileira de Zoociências**, v.12, n.1, p.43-49, 2010.

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

WEBSTER J. P.; SHRIVASTAVA J.; JOHNSON P. J.; BLAIR, L. Is host-schistosome coevolution going anywhere? **Evolutionary Biology**, v.7, p.91. 2007.

WEI, F. H.; XU, X. J.; LIU, J. B.; DAI, Y. H.; DUSSART, G.; TRIGWELL, J. Toxicology of a potential molluscicide derived from the plant *Solanum xanthocarpum*: a preliminary study. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.96, p.325-331, 2002.

WEICHSELBAUM, C. T. E. Na accurate and rapid method for determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. **American Journal of Clinical Pathology**, v.16, p.40-49, 1946.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Reports Of The Scientific Group On Plant
Moluscicide. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 61. p. 927-929. 1983.

CAPÍTULO 4

ATIVIDADE MOLUSCICIDA DA CL₅₀ DE *Solanum paniculatum* Linné E *Solanum lycocarpum* A.S.t.-Hil (SOLANACEAE) SOBRE DIFERENTES FASES DE DESENVOLVIMENTO DAS ESPÉCIES *Bradybaena similaris* (FÉRUSSAC, 1821), *Leptinaria unilamellata* (D'ORBIGNY, 1835) e *Subulina octona* (BRÜGUIÈRE, 1789)

Atividade moluscicida da CL₅₀ DE *Solanum paniculatum* Linné e *Solanum lycocarpum* A.S.t.-Hil (Solanaceae) sobre diferentes fases de desenvolvimento das espécies *Bradybaena similaris* (Ferussac, 1821), *Leptinaria unilamellata* (D'Orbigny, 1835) e *Subulina octona* (Brügnièrre, 1789)

RESUMO

Para que um moluscicida de origem vegetal seja utilizado ele deve apresentar vários pré-requisitos dentre dos quais se destaca a atividade tóxica sobre todas as fases ontogenéticas dos moluscos. Desse modo foi objetivo estudo foi avaliar o efeito da CL₅₀ dos extratos de *S. paniculatum* e *S. lycocarpum* sobre ovos, jovens recém eclodidos e pré-adultos das espécies *Bradybaena similaris* (Ferussac, 1821), *Leptinaria unilamellata* (D'Orbigny, 1835) e *Subulina octona* (Brügnièrre, 1798) durante 72 horas. Para avaliar a atividade ovicida, grupos de 15 ovos das espécies *B. similaris* e *S. octona* foram expostos aos dois extratos em terrários plásticos (250g de capacidade) contendo terra vegetal como substrato e observado o percentual de eclosão durante 30 dias. A mortalidade de jovens recém eclodidos e pré-adultos foi avaliada através da exposição de 30 jovens de cada idade e de cada espécie (10 moluscos/grupo) aos extratos das duas plantas durante 72 horas. Grupos controle para os quais foi utilizada água destilada foram feitos tanto para ovos quanto para jovens. Foi observada a redução da taxa de eclosão para as duas espécies. Os percentuais de eclosão para *B. similaris* foram de 15%, 11% e 9% quando exposta à *S. paniculatum* e 18%, 11% e 2% quando exposta a *S. lycocarpum* por 24, 28 e 72 horas, respectivamente. Para a espécie *S. octona* foram observados percentuais de 13% nos intervalos de 24 e 48 horas de exposição a *S. paniculatum*. Em 24 horas não houve eclosão. Quando expostos à *S. lycocarpum* também houve redução significativa da eclosão em relação ao controle (60%, 13% e 2% em 24, 48 e 72 horas, respectivamente). A mortalidade de jovens recém eclodidos expostos ao extrato de *S. paniculatum* foi significativamente aumentada registrando-se mortalidade superior a 90% para todas as espécies. A mortalidade de jovens dessa idade das espécies *B. similaris* e *S. octona* foi menor quando exposta a *S. lycocarpum*, embora tenha sido significativamente maior que o controle. Houve 100% de mortalidade para jovens recém eclodidos da espécie *L. unilamellata*. Os moluscos pré-adultos mostraram-se mais resistentes do que os recém eclodidos, porém a mortalidade foi significativamente maior que a do grupo controle para as três espécies. Os resultados obtidos demonstram que os extratos de ambas as plantas apresentaram toxidez para todas as fases de vida avaliadas o que indica seu possível uso para controle dessas espécies. O uso de moluscicidas que atinjam as fases iniciais do ciclo de vida pode contribuir com a redução da densidade populacional futura, pois reduz o número de adultos reprodutivamente ativos. Quando a densidade populacional é mantida em níveis controlados os prejuízos causados pelos animais é reduzido bem como a oportunidade de infecção por parasitos.

Palavras-chave: Extrato vegetal, moluscicida, molusco terrestre, ovicida.

ABSTRACT

A molluscicide plant must present several preconditions to be applied, among them, a toxic effect in all development stages in life cycle of snails. In this way, the aim of this study was to evaluate the effect of LC₅₀ of *S. paniculatum* and *S. lycocarpum* extracts in eggs, newly hatched and young adults of *B. similaris*, *L. unilamellata* and *S. octona* exposed during 72 hours. To evaluate the ovicidal effect, groups with 15 eggs of *B. similaris* and *S. octona* were exposed to both plant extracts in plastic terrariums (250g of capacity) containing moistened sterilized mulch where the observations were carried out for 30 days. The mortality of newly hatched and young adults was assessed through the exposure to the plant extracts of 30 individuals of each age and species (10 snails/group) during 72 hours. Control groups were made for both eggs and young individuals, exposed to distilled water for the same period. It was observed a reduction in hatchability for both species. The hatching percentage for *B. similaris* were 15%, 11% and 9% when exposed to *S. paniculatum* and 18%, 11% and 2% when exposed to *S. lycocarpum* during 24, 28 and 72 hours, respectively. For *S. octona* percentages of 13% were observed in intervals of 24 and 48 hours of exposure to *S. paniculatum*. It was not observed any hatching in 24 hours. There was also a significant reduction of hatchability when exposed to *S. lycocarpum* comparing to control group (60%, 13% and 2% in 24, 48 e 72 hours, respectively). The mortality of newly hatched individuals exposed to *S. paniculatum* extract was significantly increased, with mortality higher than 90% for all snail species. Mortality of *B. similaris* and *S. octona* in this same age was reduced when exposed to *S. lycocarpum*, though it was significantly higher than control group. A 100% of mortality was observed for newly hatched individuals of *L. unilamellata*. Young adult were more resistant to the extracts than newly hatched although, mortality being significantly higher when comparing to control groups for three species. The results demonstrated the both plant extracts were toxic to snails in all life stages observed in this study, what indicate its application in the control of these snails' species. The use of molluscicides that affect initial life stages of the life cycle can contribute to the reduction of future population density, reducing the number of active mature individuals. When population density is maintained in controlled levels, the damages caused snails are reduced so as the opportunity of infection by parasites.

Key-words: Plant extract, molluscicide, land snail, ovicide.

7.1 INTRODUÇÃO

O controle de moluscos pode ser uma estratégia eficiente para o controle parasitos causadores de enfermidades em animais domésticos, de criação e de humanos (D'ÁVILA et al., 2004). Desse modo, as pesquisas sobre produtos de origem vegetal com atividade moluscicida tem recebido grande atenção nas ultimas décadas (STURROCK, 1995).

As espécies de moluscos terrestres *Bradybaena similaris*, *Leptinaria unillamelata* e *Subulina octona* tem destaque na transmissão de helmintos de importância veterinária. São amplamente estudadas em condições de laboratório sob ponto de vista da biologia comportamental e parasitologia (PINHEIRO & AMATO 1994; BESSA & ARAÚJO, 1995; ALMEIDA & BESSA, 2000; BRANDOLINI, & GOMES, 2002; D'ÁVILA & BESSA, 2005A,B; FERREIRA et al, 2009; AFONSO-NETO et al., 2010). Por serem espécies bem conhecidas, elas se tornam bons modelos para testes de substâncias moluscicidas visto que é possível o estabelecimento de vários parâmetros para verificar a eficiência dessas substâncias. Além disso, as variadas estratégias reprodutivas apresentadas por essas espécies, oviparidade para *B. similaris*, ovoviviparidade para *L. unillamelata* e ovoviparidade com retenção de ovos no útero para *S. octona* podem contribuir para esclarecer a ação dos extratos nas fases iniciais do desenvolvimento.

O controle das fases iniciais de desenvolvimento contribuem de forma eficaz reduzem as populações de adultos e conseqüentemente ocorre redução futura da densidades populacionais. Algumas pesquisas já foram realizadas com intuito de verificar a atividade de moluscicidas sobre ovos e/ou massas de ovos e jovens (ALI, 2005; FERREIRA et al., 2009; FERREIRA et a. 2010). A ação sobre fases iniciais de desenvolvimento é um dos pré-requisitos para que uma espécie vegetal possa ser usada como moluscicida (MARSTON & HOSTETTMAN, 1996; MOTT, 1987; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

As plantas medicinais *Solanum paniculatum* Linné e *Solanum lycocarpum* A.S.t.-Hil são utilizadas popularmente com diversas finalidades pela população. Essas espécies apresentam constituintes químicos como taninos, saponinas, flavonóides e alcalóides (LÔBO et al., 2010; ARAÚJO et al., 2010). Esses constituintes químicos proporcionam a essas espécies propriedades biocidas, o que incentiva o estudo de seu efeito como moluscicida (SILVA et al., 2005; LÔBO et al., 2010; CHINTHANA & ANANTHI, 2012; XAVIER et al., 2010).

O objetivo desse estudo foi verificar a atividade da CL₅₀ do extrato aquoso de folhas de *S. paniculatum* e frutos de *S. lycocarpum* sobre ovos, jovens recém eclodidos e pré-adultos das espécies *B. similaris*, *L. unillamelata* e *S. octona*.

7.2 MATERIAL E MÉTODOS

7.2.1. Obtenção dos moluscos, plantas e preparação dos extratos

Os moluscos recém eclodidos, pré-adultos e ovos foram obtidos de criações matrizes existentes no Laboratório de Biologia de Moluscos Prof. Arnaldo dos Santos Coelho, Museu de Malacologia Prof. Maury Pinto de Oliveira, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, onde também foram realizados os experimentos.

O material vegetal foi coletado e acondicionado e os extratos foram preparados segundo descrito no Capítulo 1.

7.2.2. Atividade ovicida

Para avaliar a atividade ovicida dos extratos de *S. paniculatum* e *S. lycocarpum* ovos de *B. similaris* e *S. octona* foram expostos a 5mL de cada uma das CL₅₀ dos extratos durante 24, 48 e 72 horas. Foram utilizados 45 ovos de cada espécie (distribuídos 15 ovos/grupo). Mesmo número de ovos foram expostos a água destilada durante os mesmos períodos. Após o período de exposição os ovos foram transferidos para novos terrários e durante 30 dias foi observada a eclosão de jovens.

7.2.3. Atividade da CL₅₀ de *S. paniculatum* e *S. lycocarpum* sobre ovos de *B. similaris* e *S. octona*

Para verificar a atividade ovicida dos extratos 135 ovos (15 ovos/grupo) de cada espécie foram acondicionados em terrários de 250 mL de capacidade contendo 50g de terra vegetal esterilizada e umedecida e sobre esses foram aplicados 10 mL de cada um dos extratos. Para o controle utilizou-se água destilada. Os ovos permaneceram expostos durante os mesmos períodos. Após os períodos de exposição os ovos foram observados diariamente durante 30 dias.

7.2.4. Percentual de mortalidade de jovens recém eclodidos e pré-adultos expostos à CL₅₀ dos extratos de *S. paniculatum* e *S. lycocarpum*

Para essa análise, 180 moluscos recém-eclodidos e 180 pré-adultos de cada espécie (*S. octona*: 30 dias de vida, *B. similaris* e *L. unilamellata*: 60 dias) foram expostos à CL₅₀ dos extratos de *S. paniculatum* e *S. lycocarpum* durante 24, 48 e 72 horas.

Para a exposição os animais foram distribuídos em grupos (10 moluscos cada) em terrários de 250mL de capacidade. Para jovens recém eclodidos e pré-adultos foram utilizados 5mL e 8mL de extrato, respectivamente. Grupos controle idênticos receberam a mesma quantidade de água destilada. Os moluscos permaneceram em contato com os extratos durante 24, 48 e 72 horas. Após cada período de exposição foi feita a quantificação da mortalidade.

7.2.5. Análise dos dados

Para comparação dos dados de mortalidade, tempo para maturidade sexual e tamanho na maturidade entre os moluscos expostos e não expostos aos extratos foi utilizado o teste de ANOVA do programa Biostat, versão 5.0.

7.3 RESULTADOS

7.3.1. Atividade do extrato aquoso de folhas de *Solanum paniculatum*

7.3.1.1 Atividade ovicida

Foi verificada redução significativa da eclosão de jovens para as espécies *B. similaris* e *S. octona*. Para *B. similaris* o percentual de eclosão quando os ovos foram expostos à CL₅₀ do extrato de *S. paniculatum* foi significativamente menor em 24 (Q=10,3; p<0,05), 48 (Q=7,8; p<0,05) e 72 horas (Q=8,8; p<0,05) (Tabela I).

Em *S. octona* o percentual de eclosão foi de 13% em 48 horas (Q=4,8; p<0,05) e 7% em 72 horas (Q=3,8; p<0,05). Não houve eclosão quando os ovos foram expostos durante 24 horas ao extrato de *S. paniculatum* (Tabela I).

Tabela I. Percentual de eclosão para espécies *Bradybaena similaris* e *Subulina octona* expostos à CL₅₀ do extrato aquoso das folhas de *Solanum paniculatum* durante 72 horas.

| Horas de exposição | Eclosão (%) | | | |
|--------------------|-----------------------------|-----------------|------------------------|-----------------|
| | <i>Bradybaena similaris</i> | | <i>Subulina octona</i> | |
| | Controle | Exposto | Controle | Exposto |
| 24 | 100 ^a | 15 ^b | 100 | 0 |
| 48 | 100 ^a | 11 ^b | 100 ^a | 13 ^b |
| 72 | 100 ^a | 9 ^b | 100 ^a | 13 ^b |

*Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA, p<0,05)

7.3.1.2 Jovens recém eclodidos

O percentual de mortalidade de jovens recém eclodidos da espécie *B. similaris* foi de 92% em 24 horas de exposição e de 100% nos demais intervalos à CL₅₀ de *S. paniculatum* (p<0,05). Não foi observada mortalidade nos grupos não expostos ao extrato (Tabela II).

Para a espécie *L. unilamellata* houve 100% de mortalidade de jovens dessa idade em todos os períodos de exposição. Também foi observada mortalidade no grupo controle em 72 horas de exposição de 2,5%, nos demais não houve mortalidade (Tabela II).

Os percentuais de mortalidade para a espécie *S. octona* podem ser observados na Tabela II. Foi observada diferença significativa entre a mortalidade de expostos e não expostos em todos os intervalos de exposição (24 horas: Q=10,2; p<0,05; 48 horas: Q=8,7, P<0,05 e 72 horas: Q=10,5, p<0,01).

Tabela II. Percentual de mortalidade de jovens recém eclodidos das espécies *Bradybaena similaris*, *Leptinaria unilamellata* e *Subulina octona* expostos à CL₅₀ do extrato aquoso das folhas de *Solanum paniculatum* durante 72 horas.

| Horas de exposição | Mortalidade (%) | | | | | |
|--------------------|-----------------------------|---------|--------------------------------|---------|------------------------|------------------|
| | <i>Bradybaena similaris</i> | | <i>Leptinaria unilamellata</i> | | <i>Subulina octona</i> | |
| | Controle | Exposto | Controle | Exposto | Controle | Exposto |
| 24 | 0 | 92 | 0 | 100 | 10 ^a | 100 ^b |
| 48 | 0 | 100 | 0 | 100 | 17 ^a | 93 ^b |
| 72 | 0 | 100 | 2 | 100 | 7 ^a | 100 ^b |

*Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA, p<0,05)

7.3.1.3 Pré-adultos

Para os moluscos pré-adultos da espécie *B. similaris* não foi verificado mortalidade nos grupos controle. Nessa fase da vida os moluscos mostraram maior resistência à exposição ao extrato de *S. paniculatum* sendo o percentual de mortalidade menor que a registrada para recém eclodidos, porém significativamente maior que o controle (24 horas: Q=8,8 p<0,05; 48horas: Q=8,0, p<0,05 e 72 horas: Q=11,2, p<0,05) (Tabela III).

Para a espécie *L. unilamellata* também foi verificado percentual de mortalidade significativamente maior quando os jovens pré-adultos foram expostos ao extrato em todos os intervalos de exposição (24 horas: Q=4,85, p<0,05; 48horas: Q=3,97, p<0,05 e 72 horas: Q=4,9, p<0,05). Os percentuais de mortalidade nos intervalos de 24, 48 e 72 hora estão demonstrados na Tabela III.

O percentual de mortalidade registrado para a espécie *S. octona* estão demonstrados na Tabela III. Em todos os intervalos de exposição a mortalidade dos jovens expostos foi significativamente maior (24 horas: Q=3,97, p<0,05; 48 horas: Q=4,36, p<0,05 e 72 horas: Q=4,5, p<0,05).

Tabela III. Percentual de mortalidade de jovens pré-adultos das espécies *Bradybaena similaris*, *Leptinaria unilamellata* e *Subulina octona* expostos à CL₅₀ do extrato aquoso das folhas de *Solanum paniculatum* durante 72 horas.

| Horas de exposição | Mortalidade (%) | | | | | |
|--------------------|-----------------------------|---------|--------------------------------|-----------------|------------------------|------------------|
| | <i>Bradybaena similaris</i> | | <i>Leptinaria unilamellata</i> | | <i>Subulina octona</i> | |
| | Controle | Exposto | Controle | Exposto | Controle | Exposto |
| 24 | 0 | 30 | 13 ^a | 97 ^b | 2 ^a | 22 ^b |
| 48 | 0 | 33 | 20 ^a | 93 ^b | 0 ^a | 100 ^b |
| 72 | 0 | 73 | 17 ^a | 97 ^b | 0 ^a | 100 ^b |

*Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA, p<0,05)

7.3.2. Atividade do extrato aquoso de frutos de *Solanum lycocarpum*

7.3.2.1 Atividade ovicida

O percentual de eclosão registrado para as espécies *B. similaris* e *S. octona* estão demonstrados na Tabela IV. Para *B. similaris* foi observada redução significativa do percentual de eclosão em 24 (Q=10,0, p<0,05), 48 (Q=13,2, p<0,01) e 72 horas (Q=10,3, p<0,01). Em *S. octona* a redução do percentual de eclosão também foi significativamente menor nos três intervalos de exposição (24 horas: Q=4,3 p<0,05, 48 (Q=3,9, p<0,01) e 72 horas (Q=3,9 p<0,01).

Tabela IV. Percentual de eclosão para espécies *Bradybaena similaris* e *Subulina octona* expostos a CL₅₀ do extrato aquoso das folhas de *Solanum lycocarpum* durante 72 horas.

| Horas de exposição | Eclosão (%) | | | |
|--------------------|-----------------------------|-----------------|------------------------|-----------------|
| | <i>Bradybaena similaris</i> | | <i>Subulina octona</i> | |
| | Controle | Exposto | Controle | Exposto |
| 24 | 100 ^a | 18 ^b | 100 ^a | 60 ^b |
| 48 | 93 ^a | 11 ^b | 89 ^a | 13 ^b |
| 72 | 93 ^a | 2 ^b | 91 ^a | 2 ^b |

*Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA, p<0,05)

7.3.2.2 Jovens Recém eclodidos

O percentual de mortalidade quando jovens recém eclodidos das três espécies estão representados na Tabela V.

Para *B. similaris* houve aumento significativo da mortalidade em 24 (Q=3,9; p<0,05), 48 (Q=3,9; p<0,05) e 72 horas (Q=4,0; p<0,05) (Tabela V).

Para *L. unilamellata* observou-se mortalidade de 100% de jovens dessa idade em todos os intervalos de exposição (p<0,01).

Em *S. octona* foi verificado aumento significativo da mortalidade em todos os intervalos de exposição (24 horas: Q=3,9, p<0,05; 48 horas: Q=4,0, p<0,01 e 72 horas: Q=4,4, p<0,01).

Tabela V. Percentual de mortalidade de jovens recém eclodidos das espécies *Bradybaena similaris*, *Leptinaria unilamellata* e *Subulina octona* expostos a CL₅₀ do extrato aquoso das folhas de *Solanum lycocarpum* durante 72 horas.

| Horas de exposição | Mortalidade (%) | | | | | |
|--------------------|-----------------------------|---------|--------------------------------|---------|------------------------|------------------|
| | <i>Bradybaena similaris</i> | | <i>Leptinaria unilamellata</i> | | <i>Subulina octona</i> | |
| | Controle | Exposto | Controle | Exposto | Controle | Exposto |
| 24 | 0 | 40 | 0 | 100 | 0 ^a | 50 ^b |
| 48 | 0 | 40 | 0 | 100 | 0 ^a | 67 ^b |
| 72 | 0 | 90 | 0 | 100 | 0 ^a | 100 ^b |

*Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA, p<0,05)

7.3.2.3 Jovens pré-adultos

Nessa fase da vida, o percentual de mortalidade de *B. similaris* expostos *S. lycocarpum* também foi significativamente maior que o controle em 24 (Q=3,8; p<0,05), 48 (Q=4,0;

$p < 0,05$) e 72 horas ($Q=3,9$; $p < 0,05$). Para *L. unilamellata* a mortalidade também foi maior que a verificada para o controle em todos os intervalos de exposição (24 horas: $Q=3,8$, $p < 0,05$; 48 horas: $Q=3,8$, $p < 0,05$ e 72 horas: $Q=3,8$, $p < 0,05$). O mesmo foi observado quando jovens de *S. octona* foram expostos a esse extrato exposição (24 horas: $Q=4,0$, $p < 0,05$; 48 horas: $Q=3,8$, $p < 0,05$ e 72 horas: $Q=3,9$, $p < 0,05$)

Tabela VI. Percentual de mortalidade de jovens pré-adultos das espécies *Bradybaena similaris*, *Leptinaria unilamellata* e *Subulina octona* expostos à CL_{50} do extrato aquoso das folhas de *Solanum lycocarpum* durante 72 horas.

| Horas de exposição | Mortalidade (%) | | | | | |
|--------------------|-----------------------------|---------|--------------------------------|------------------|------------------------|-----------------|
| | <i>Bradybaena similaris</i> | | <i>Leptinaria unilamellata</i> | | <i>Subulina octona</i> | |
| | Controle | Exposto | Controle | Exposto | Controle | Exposto |
| 24 | 0 | 53 | 11 ^a | 90 ^b | 0 ^a | 30 ^b |
| 48 | 0 | 63 | 18 ^a | 97 ^b | 0 ^a | 87 ^b |
| 72 | 0 | 83 | 22 ^a | 100 ^b | 0 ^a | 90 ^b |

*Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA, $p < 0,05$)

7.3.3. Comparação entre a atividade dos extratos aquosos das folhas de *Solanum paniculatum* de frutos de *Solanum lycocarpum*

7.3.3.1. Atividade ovicida

Não foi observada diferença entre a taxa de eclosão quando os ovos da espécie *B. similaris* foram expostos a ambos os extratos independente do tempo de exposição ($p > 0,05$). Resultados semelhantes foram observados para *S. octona* não sendo verificada maior eficiência de um dos extratos sobre a taxa de eclosão ($p > 0,05$).

7.3.3.2. Jovens recém eclodidos

Quando jovens recém eclodidos da espécie *B. similaris* foram expostos à CL_{50} de *S. paniculatum* a mortalidade de recém eclodidos maior do que os que receberam *S. lycocarpum* em todos os períodos de exposição, porém o percentual apenas foi significativamente diferente em 48 horas após a aplicação ($Q=7,35$; $p < 0,01$).

Para a espécie *L. unilamellata* o efeito de ambos os extratos foi similar ($p > 0,05$).

A mortalidade provocada pelos extratos de *S. paniculatum* foi significativamente maior para jovens recém eclodidos da espécie *S. octona* ($Q=12,2$; $p < 0,01$). Nos demais intervalos a mortalidade não diferiu entre os extratos.

7.3.3.3. Pré-adultos

Para jovens de *B. similaris* dessa idade o extrato de *S. paniculatum* causou maior mortalidade que o de *S. lycocarpum* embora não tenha sido verificada diferença entre o percentual para os dois extratos ($p > 0,05$) nos intervalos de exposição analisados.

A mortalidade de pré-adultos das espécies *L. unilamellata* e *S. octona* não diferiu ($p < 0,05$).

7.4 DISCUSSÃO

Para que uma substância possa ser utilizada como moluscicida, esta deve atender a determinadas características indispensáveis a qualquer praguicida, tais como ser ativo em baixas concentrações, inofensivo ao homem e aos animais, facilidade de preparação e aplicação, apresentar baixo custo. Além disso, a substância deve ser tóxica em todos os estágios de vida do molusco (MOTT, 1987; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008; WHO, 1983).

Os resultados obtidos nesse estudo indicam que a CL_{50} dos extratos de ambas as plantas, calculada para adultos, foram suficientes para provocar significativa mortalidade de jovens recém eclodidos e pré-adultos das três espécies de moluscos e também provocou redução da taxa de eclosão.

Outros autores já verificaram a atividade de moluscicidas químicos e extraídos de plantas sobre diferentes fases de desenvolvimento e também sobre ovos de moluscos (ALI, 2005; DANKOWSKA, 2009; FERREIRA et al, 2009; 2010; Shoaib et al., 2010; ·TRIPATHI et al. 2010). Ali (2005) verificou que tanto a niclosamida quanto os extratos de *Euphorbia helioscop* e *Melia azadirachta* reduziram a sobrevivência de embriões de *Physa acuta*. Esse autor verificou más formações nos embriões principalmente no estágio de gástrula. Ainda segundo esse autor o os efeitos dos moluscicida testados deveu-se a capacidade do moluscicida em penetrar a camada gelatinosa que recobre e protege os ovos. Resultados semelhantes foram observados para outras espécies de moluscos dulciaquícolas como *Lymnaea luteolea* (PARASHAR, et al., 1995; SUKUMARAN, et al., 2004), *L. natalensis* (Gillet, & Bruax, 1962), *Oncomelaria sp.* (ZHANY & GUO, 1992) e *P. acuta* (CHEUNY & LAM, 1998).

BAKRY et al. (2011) demonstraram redução da produção de ovos e da taxa e eclosão de *Bulinus truncatus* bem como aumento do percentual de ovos anormais sugerindo a atividade do extrato tanto sobre o desenvolvimento embrionário e quanto no período que antecede a formação do ovo.

Poucos trabalhos investigam a ação de moluscicidas sobre fases de vida de moluscos. Ferreira et al (2009) demonstraram, entretanto, que soluções de cafeína e timol nas concentrações de 2,5% e 5% causaram redução da eclosão na espécie *S. octona*. Porém, a cafeína não provocou alterações significativas na taxa de eclosão de *B. similis* (FERREIRA et al. 2010).

A exposição a extratos vegetais ocasionou redução significativa da eclosão de jovens de *S. octona* como verificados pela exposição aos extratos *Bidens pilosa* Linné e *Mikania glomerata* Sprengel (SOUZA, 2012) e *Furcreae foetida* L. (NASCIMENTO, 2008). Todas as plantas citadas são ricas em saponinas, princípio ativo que também é encontrado nos extratos aquosos de *S. paniculatum* e *S. lycocarpum*. SÁ BARRETO et al. também observaram ação moluscicida de *Vitex gardneriana* sobre embriões de *B. glabrata* e relacionaram os resultados e presença de saponinas existentes no vegetal. A similaridade dos resultados indicam que possivelmente esse metabólito esteja envolvido na redução da eclodibilidade verificada nesse estudo. Os ovos de gastrópodes terrestres apresentam a proteção de uma casca calcária que atua como uma barreira física a condições ambientais e predadores (TOMPA, 1984). Porém, com os resultados obtidos é possível sugerir que houve a penetração do moluscicida através da casca dos ovos interrompendo/alterando o desenvolvimento dos embriões.

Pereira & Souza (1974), entretanto, demonstraram ovos de *Biomphalaria glabrata* foram cerca de 30 vezes mais resistentes que adultos dessa espécie exposta ao extrato hexânico de castanha de caju. A baixa susceptibilidade de ovos também foi observada quando ovos dessa espécie foram expostos ao extrato butílico de *Phytolaca dodecandra* L.. Schall et al. (1998) também observaram ser necessária alta concentração do látex de *Euphorbia splendens var. hislopii* para matar embriões de *B. glabrata*. O látex dessa planta também

reduziu a fecundidade dessa espécie, além de causar redução do percentual de eclosão conforme foi observado por Mello-Silva et al. (2007).

Nesse estudo foi observado que os extratos de ambas as plantas foram potencialmente tóxicos jovens das três espécies. Observou-se menor mortalidade de pré-adultos quando comparados aos jovens recém eclodidos o indica que a reserva de energia dos animais é necessária para garantir a desintoxicação pelos extratos. Jovens recém eclodidos ainda contam com as reservas adquiridas através do albúmen dos ovos (TOMPA, 1984). Essa reserva é utilizada para todo o período embrionário e primeiros momentos da vida até que sejam complementadas com alimento encontrado na natureza.

Jovens pré-adultos por outro lado, tendem a armazenar glicogênio na glândula digestiva para garantir o processo reprodutivo (Silva, 2009) a qual possivelmente é utilizada num processo de intoxicação. Ferreira et al. (2010) demonstrou que a cafeína (5%) ocasionou mortalidade de jovens 10 e 30 dias de vida da espécie *B. similis*. Embora a idade da espécie *B. similis* utilizada no presente estudo seja diferente (40 dias de vida), os resultados foram similares aos encontrados por esses autores com maior mortalidade de indivíduos com menor idade. Ferreira et al. (2009) observaram resultados semelhantes quanto a exposição de *S. octona* à soluções de timol e cafeína, sendo encontrada maior mortalidade para jovens com menor idade.

Não foram encontrados trabalhos que investigassem o efeito de moluscidas de origem vegetal sobre a espécie *L. unilamellata*, porém os resultados encontrados demonstraram que essa foi mais suscetível a ação dos extratos com maiores taxas de mortalidade tanto para jovens recém eclodidos quanto para pré-adultos.

Diferente do encontrado nesse estudo, Thammasiri et al. (2011) verificaram que moluscos imaturos da espécie *Bithynia siamensis goniomphalos* mostraram maior resistência que adultos ao moluscida comercial Bayluscide® em concentrações variando de 1mg/L a 0,03mg/L, ou seja, a concentrações letal foi maior para jovens imaturos do que para adultos. Nesse trabalho ficou evidenciado que as concentrações subletais encontradas para adultos foram suficientes para ocasionar redução da eclosão e mortalidade de jovens recém eclodidos e adultos.

A diferença entre a mortalidade entre as espécies pode estar relacionada ao padrão comportamental. A espécie *B. similis* é uma espécie mais ativa com intenso deslocamento para as paredes do terrário o que diminui o contato com o extrato. A espécie *S. octona* quando exposta a ambos os extratos também apresenta esse comportamento que é tido como anormal para a espécie, mas também diminui o contato com o extrato. Já *L. unilamellata*, apresenta o comportamento de liberação de muco quando exposta a extratos vegetais. Porém acredita-se que o muco liberado por jovens não garantiu uma barreira eficiente ao extrato conforme verificado nos adultos. Do mesmo modo, acredita-se que nos adultos o comportamento de fuga foi mais eficiente o que explica a alta mortalidade de jovens expostos à CL₅₀ dos extratos.

Os resultados obtidos demonstraram que a concentração subletal dos extratos aquosos de *S. paniculatum* e *S. lycocarpum* causaram efeitos negativos sobre a eclosão de *B. similis* e *S. octona* e sobre a mortalidade de jovens todas as espécies avaliadas. Esses resultados são importantes, pois a ação de moluscidas sobre diferentes fases de desenvolvimento dos animais é uma importante forma de manutenção da densidade populacional em níveis controlados de modo a evitar a oportunidade de infecção por parasitos.

7.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFONSO-NETO, I.S.; BESSA, E.A.; G.L.G. SOARES. Avaliação da atividade moluscicida do látex de três espécies de *Euphorbia* (Euphorbiaceae) sobre *Leptinaria unilamellata* D'Orbigny, 1835 (Gastropoda - Subulinidae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n.1, p.90-95, 2010.

ALI, TH. 2005. Effects of synthetics molluscicide niclosamide and plant extracts (Euphorbia and Melia) molluscicide against the different developmental stages of the fresh-water snail *Physa acuta*, the (Draparnaud) vector of trematode parasite in Mosul area, North Iraq. **Priorities of scientific research in the Arab World, and specialized domains Science** [serial online] Disponível em: www.astf.net/SRO/sro4/english_pages/Eng_9_c.html, Acesso em dezembro de 2012.

ALMEIDA, M. N.; BESSA, E. C. A. Efeito da densidade populacional sobre o crescimento e a reprodução de *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Mollusca, Xanthonychidae) e *Leptinaria unilamellata* (d'Orbigny, 1835) (Mollusca, Subulinidae). **Revista Brasileira de Zoociências**, v.2, n.1, p.97-104, 2000.

ARAÚJO, J.L.B.; E.C.A. BESSA. Moluscos de importância econômica do Brasil. II Subulinidae, *Subulina octona* (Bruguière) (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata, Stylommatophora). **Revista Brasileira de Zoologia**, v.10, p.497, 1995.

ARAÚJO, M.G.F.; CUNHA, W.R.; R.C.S. VENEZIANI. Estudo fitoquímico preliminar e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de extrato obtido de frutos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hill (Solanaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.31, n.2, p.205-209, 2010.

BRANDOLINI, S.V.P.B.; A.P.S. GOMES. Influência de diferentes dietas sobre o crescimento, sobrevivência e reprodução de *Leptinaria unilamellata* (D'Orbigny, 1835) (Gastropoda, Subulinidae) em laboratório. **Revista Brasileira de Zoociências**, v.4, n.2, p.169-177, 2002.

BAKRY, F.A.; MOHAMED, R.T.; W.S. HASHEESH. Impact of methanol extract of *Adenium obesum* plant on some biochemical and biological parameters of *Bulinus truncatus* snails. **Journal of Evolutionary Biology Research**, v.3, n.6, p. 87-94, 2011.

CHEUNG, C.C.C.; P.K.S. LAM. Effect of Cadmium on the embryo and Juveniles of a tropical fresh water snail, *Physa acuta* (Draparnand, 1805), **Water Science and Technology**, v.38, n.7, p.263-270, 1998.

CHINTHANA, P.; T. ANANTHI. Protective Effect of *Solanum nigrum* and *Solanum trilobatum* Aqueous Leaf. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 4, p.72-74, 2012.

D'ÁVILA, S.; DIAS, R.; BESSA, E.C.A.; E. DAEMON. Resistência à dessecação em três espécies de moluscos terrestres: aspectos adaptativos e significado para o controle de helmintos. **Revista Brasileira de Zoociências**, v.6, n.1, p.115-127, 2004.

D'ÁVILA, S.; E.C.A. BESSA. a. Influência de diferentes substratos e umidade sobre o crescimento e número de ovos produzidos por *Subulina octona* (Brugüiere) (Mollusca, Subulinidae), sob condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.22, n.1, p.349-353, 2005.

D'ÁVILA, S.; E.C.A. BESSA. b. Influência do substrato sobre a reprodução de *Subulina octona* (Brugüiere) (Mollusca, Subulinidae), sob condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.22, n.1, p.197-204, 2005.

FERREIRA, P; SOARES G.L.G.; D'ÁVILA S. & E.C.A. BESSA. The influence of caffeine and thymol on the survival, growth and reproduction of *Subulina octona* (Brugüiere, 1789) (Mollusca, Subulinidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, p.945-952, 2009.

FERREIRA, P., SOARES, G. L. G., D'ÁVILA, S.; E.C.A. Bessa. Influência da cafeína sobre a sobrevivência, crescimento e reprodução de *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Mollusca, Xanthonychidae), com diferentes idades, **Revista Brasileira de Zoociências**, v.12, n.2, p.157-163, 2010

LÔBO, K.M.S.; COSTA, J.G.M.; ATHAYDE, A.C.R.; SILVA, A.M.A.; RODRIGUES, F.F.G.; LÔBO, I.S.; D.A.C. BEZERRA. Avaliação da atividade antibacteriana e prospecção fitoquímica de *Solanum paniculatum* Lam. e *Operculina hamiltonii* (G. Don) D. F. Austin & Staples, do semi-árido paraibano. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n.2, p.227-233, 2010.

MARSTON, A.; DUDAN, G.; GUPTA, M.P; SOIS, P.N.; CORREA, M.D.; HOSTETTMAN, K. Screening of Panamanian plants for molluscicidal activity. **International Journal of Pharmacology**, v.34, p.15-18, 1996.

MELLO-SILVA, C.C.; VASCONCELLOS M.C.; PINHEIRO J.; RODRIGUES, M.L.A. Physiological changes in *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Pulmonata: Planorbidae) caused by sub-lethal concentrations of the latex of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B (Euphorbiaceae). **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, p.3-8, 2007.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAUDE. Vigilância e Controle de Moluscos de Importância Epidemiológica. Diretrizes técnicas: **Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE)**. 2008. 2ª edição, Brasília.

MOTT, K.E. **Plant Molluscicides**, UNDP/World Bank/WHO, John Wiley & Sons, New York. 1987. 326 pp.

NASCIMENTO, C.A.A. 2008. **Influência de *Furcraea foetida* (L.) Haw sobre a sobrevivência, crescimento, reprodução e comportamento de *Subulina octona* (Brugüiere, 1789) (Mollusca, Subulinidae)**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora, MG. 2008.

PARASHAR, B.D.; KAUSHIK, M.P.;GUPTA, A.K.; SWAMY, R.V.; K.M. RAO. Toxicity of some molluscicides to fresh water snail *Lymnaea auricularia* the vector of animal fascioliasis and to non target organisms. **Proceedings Academic Environmental Biology**, v.1, p.4-6, 1995.

PEREIRA, J. P.; C.P. SOUZA. Ensaios preliminares com “*Anacardium occidentale*” como moluscicida. **Ciência e Cultura**, v.26, p.1054-1057, 1974.

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

SÁ BARRETO, L.C.L.; CARVALHO, E.F.N.B; CUNHA-FILHO, M.S.S.; FERREIRA, C.P.; H.S. XAVIER. Atividade moluscicida de extratos e de *Aucubina* de *Vitex gardneriana* Schauer (Verbenaceae) em embriões da *Biomphalaria glabrata*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.26, n.3, p.339-43, 2007.

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

SILVA, L.C. História de vida de *Bulimulus tenuissimus* (D’ Orbigny, 1835) (Mollusca, Bulimulidae): variação no conteúdo dos substratos energéticos de acordo com a idade e sazonalidade. **Dissertação de Mestrado**. Pós-graduação em Comportamento e Biologia Animal, Universidade Federal de Juiz de Fora a. Juiz de Fora, Minas Gerais, 97p. 2009

SCHALL, V.T.; VASCONCELLOS, M.C.; SOUZA, C.P.; D.F. BAPTISTA. The molluscicidal activity of ‘crown of christ’ (*Euphorbia splendens var. hislopii*) latex on snails acting as intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.58, n.1, p.7-10, 1998.

SHOAIB, M.A.; MAHMOUD, M.F.; LOUTFY, N.; TAWWC, M.A.; M. BARTA. Effect of botanical insecticide Nimbecidine® on food consumption and egg hatchability of the terrestrial snail *Monacha obstructa*. **Journal Pesticides Sciences**, v.83, p.83:27-32, 2010.

SUKUMARAN, D.; PARSHAR, B.D.; GUPTA, A.K.; JEEVARATNAM, K.; S.H. PRAKASH. Molluscicidal effect of nicotinanilide & to intermediate compounds against a fresh water snail *Lymnaea luteolas*, the vector of the animal schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, n. 2, p.1-12, 2004.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAUDE. Vigilância e Controle de Moluscos de Importância Epidemiológica. Diretrizes técnicas: **Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE)**. 2008. 2º edição, Brasília.

STURROCK, R.F. Current concepts of snail control. **do Instituto Oswaldo Cruz**, v.90, p.241- 248, 1995.

THAMMASIRI, C.; TESANA, S.; SUWANNATRAI, A. ; PIRATAE, S.; KHAMPOOSA, P.; KULSANTIWONG, J.; PRASOPDEE, S.; RUANGJIRACHUPORN, W.; WONGPANICH, V.; P. TARBSRIPAIR. Molluscicidal Effects of Bayluscide (niclosamide) on *Bithynia siamensis goniomphalos*, First Intermediate Host of Liver Fluke, *Opisthorchis viverrini* KKU Res J (GS) 9 (2) : April - June 2009

TOMPA, A. 1984. Land snails (Stylomatophora). In Tompa, A.; Verdonk, N.K. & J.M.W Van Den Biggelaar (eds). **The Mollusca Reproduction**. London, Academic Press 7: 47-140p.

TRIPATHI, R.; KUMAR, P.; SINGH, V.K.; D.K. SINGH. Cow Urine and their formulations with plant molluscicide against the reproduction of vector snail *Lymnaea acuminata*, **Drug Invention Today**, v.2, n.8, p.376-380, 2010.

XAVIER, V.B.; BORBA, H.R.; BRANDOLINI, S.V.P.B. Atividade biológica de *Solanum lycocarpum* (Solanaceae) procedente de regiões fitogeográficas distintas sobre *Biomphalaria glabrata* (Planorbidae). **Revista Brasileira de Zootecias**, v.12,1, p.43-49, 2010.

ZHANY, Y.; GUO, Y.H. Study on the effect of bromoacetamide upon the development of snail eggs, **Journal of Parasitic Diseases**, v.10, p.258-262, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Reports Of The Scientific Group On Plant Molluscicide. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 61. p. 927-929. 1983.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que:

1. Foi confirmada a presença dos princípios ativos, saponinas, taninos condensados e flavonóides nos extratos de *S. paniculatum* e *S. lycocarpum* e ambos apresentaram atividade moluscicida. O extrato de *S. paniculatum* apresentou maior concentração de taninos e saponinas que o extrato de *S. lycocarpum*.
2. A fecundidade das espécies *B. similaris* e *L. unilamellata* foram significativamente reduzida em todos os intervalos de exposição. A produção de ovos de *S. octona* não foi alterada pela exposição aos extratos, porém foi observada uma mudança da estratégia reprodutiva com o aumento da retenção de ovos no corpo e liberação de jovens.
3. A concentração de galactogênio em *B. similaris* foi reduzida. Em *L. unilamellata* a concentração desse polissacarídeo permaneceu alta em todos os períodos de observação e *S. octona* a concentração apenas foi reduzida após 72 horas de exposição.
4. A glicemia das espécies foi afetada. Foi observado um deslocamento da energia de reserva da glândula digestiva e aumento nos tecidos da massa cefalopodiosa. Também houve elevação da glicose livre na hemolinfa.
5. A concentração de proteínas totais foi reduzida apenas em *B. similaris* pelos dois extratos. Em *L. unilamellata* a redução e proteínas apenas foi observada a partir de 48 horas de exposição. Em *S. octona* concentração de proteínas totais permaneceu mais elevada do que no controle.
6. Em *B. similaris* observou-se a redução da concentração de ácido úrico e aumento da ureia indicando o direcionamento para rota ureotélica para a desintoxicação dos moluscos. Nas demais espécies foi verificado o acionamento das rotas com aumento da excreção de ácido úrico e ureia para desintoxicação.
7. A CL₅₀ de ambos os extratos apresentou eficiente efeito ovicida. Do mesmo modo, essa concentração foi letal para jovens recém eclodidos e adultos das três espécies.
8. Os efeitos verificados na fecundidade, metabolismo de carboidratos e de proteínas totais e produtos nitrogenados foram similares os extratos de *S. paniculatum* e *S. lycocarpum*, possivelmente devido à similaridade dos princípios ativos encontrados em ambas as plantas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos nesse estudo é possível afirmar que as plantas *Solanum paniculatum* e *Solanum lycocarpum* são promissoras no controle de moluscos terrestres. Ambas as plantas apresentaram atividade moluscicida em extração aquoso sendo constatadas concentrações inferiores a 10%, que é viável de preparação e aplicação. As plantas apresentaram características recomendadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como: grande porte, perenes, princípios ativos contidos em partes renováveis, ativas concentrações baixas, e eficaz em várias fases de desenvolvimento de moluscos terrestres.

Os extratos aquosos de *S. paniculatum* e *S. lycocarpum* foram eficazes na redução da fecundidade das espécies *B. similaris* e *L. unilamellata*, causando uma castração parcial e interrupção da reprodução, respectivamente. Na espécie *S. octona* os extratos causaram a alteração na estratégia reprodutiva aumentando a retenção de ovos no útero.

As reservas energéticas destinadas à reprodução foram reduzidas na espécie *B. similaris*, sendo coincidente a redução da fecundidade. Nas demais espécies as reservas foram aumentadas indicando um mecanismo de manutenção da reprodução futura.

Em relação aos depósitos de carboidratos, foi observado que ambos os extratos interferiram na regulação glicêmica dos moluscos levando à mobilização de glicogênio de reserva para manter a homeostasia orgânica.

Também é importante ressaltar que o metabolismo de carboidratos foi alterado havendo uma tendência à aumento da atividade da enzima desidrogenase láctica e aceleração do metabolismo anaeróbio.

Nas espécies *B. similaris* e *L. unilamellata* foi evidenciado redução da concentração de proteínas totais na hemolinfa. Em *S. octona*, não se estabeleceu esse padrão, havendo aumento de proteínas totais na hemolinfa dos moluscos em relação ao controle, o que sugere o consumo dessas como fonte de energia. A redução da concentração de proteínas pode estar relacionada ao consumo dessas como fonte de energia devido à redução da concentração de carboidratos. Sugere-se que a espécie *S. octona* não utilizou proteínas como fonte energética já que as alterações nos depósitos de glicogênio foram minimamente afetadas.

Em relação à excreção dos moluscos foi observado duas repostas distintas: nas espécies *B. similaris* e *L. unilamellata* houve alteração da rota uricotélica para ureotélica e em *S. octona* houve o acionamento das duas rotas. Esses resultados demonstram a plasticidade de mecanismos utilizados pelos moluscos frente à intoxicação pelos extratos.

Assim como o preconizado pela OMS, a CL_{50} foi suficiente para causar mortalidade de fases iniciais de desenvolvimento bem como reduziram a eclodibilidade de ovos.

Os resultados obtidos permitem concluir que ambos os extratos são promissores para estudos como moluscicidas sendo ainda necessários estudos que esclareçam as suas frações ativas e respostas fisiológicas de moluscos terrestres.

10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AERTS, T.J.; BARRY, T.N. & W.C. MCNABB. 2003. Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *In*. Pansera, M.R.; Santos, A.C.A., Paese, K.; Wasuam, R.; Rossato, M.; Rota, L.D.; Pauletti, G.F.; L.A. Serafini. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no nordeste do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, n.1, p.17-22, 2003.

AFONSO-NETO, I.S.; BESSA, E.A.; G.L.G. SOARES. Avaliação da atividade moluscicida do látex de três espécies de Euphorbia (Eupforbiaceae) sobre *Leptinaria unilamellata* D'Orbigny, 1835 (Gastropoda- Subulinidae). **Revista Brasileira de Plantas Médicas Botucatu**, v.12, n.1, p.90-95, 2010.

AGUDO-PADRÓN, I. Listagem sistemática dos moluscos continentais ocorrentes no estado de Santa Catarina, Brasil. **Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay**, v.9, n.91, p.147-179, 2008.

ALICATA, E. The life cycle of *Postharmostomum gallinum* the cecal fluke of poultry. **Journal Parasitology**, v.26, n. 2, p.135-143, 1940.

ALMEIDA, M. N.; BESSA, E. C. A. Efeito da densidade populacional sobre o crescimento e a reprodução de *Bradybaena similis* (Férussac, 1821) (Mollusca, Xanthonychidae) e *Leptinaria unilamellata* (d'Orbigny, 1835) (Mollusca, Subulinidae). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.2, n.1, p.97-104, 2000.

ALMEIDA, M.N.; E.C.A. BESSA. a. Estudo do crescimento e da reprodução de *Bradybaena similis* (Mollusca, Xanthonychidae) em laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.18, n.4, p.1115-1122. 2001.

ALMEIDA, M.N.; E.C.A. BESSA. b. Estudo do crescimento e da reprodução de *Leptinaria unilamellata* (D'Orbigny) (Mollusca, Subulinidae) em laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.18, n.4, p.1107-1113, 2001.

ALMEIDA, M.N.; G.G. MOTA. b. Ecologia, reprodução e crescimento da concha de *Leptinaria unilamellata* (D'Orbigny) (Pulmonata, Subulinidae) em condições naturais. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v.18, n.1, p.23-28, 2011.

ALMEIDA, M.N.; G.G. MOTA. b. Conquiliomorfofimetria, ciclo de vida, crescimento alométrico da concha (*Subulina octona* Bruguière, 1789) (Pulmonata, Subulinidae) em condições de campo. **Biofar**, v.5, n.1, p.141-151, 2011.

ALVES, R.B.N.; COSTA, T.S.A.; SILVA, D.B.; R.F. VIEIRA. **Manual de curadores de germoplasma. Vegetal: caracterização química de metabólitos secundários em germoplasma vegetal**. Embrapa, 12 p., 2010. Disponível em: <http://www.cenargen.embrapa.br/publica/2010/doc/doc315.pdf>. acesso em dezembro de 2012.

ALZERRECA, A.; ARBOLEDA, B.; HART, G. Molluscicidal activity of natural products: the effects of Solanum glycosidic alkaloids on *Lymnaea cubensis* snails. **Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico**, v.65, p.69-72, 1981.

ARAÚJO, M.G.F.; CUNHA, W.R.; R.C.S. VENEZIANI. Estudo fitoquímico preliminar e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de extrato obtido de frutos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hill (Solanaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.31, n.2, 205-209, 2010.

AMATO, S.B.; J.C.B. BEZERRA. Parasitismo natural de *Bradybaena similis* (Férussac, 1821) por *Postharmostomum gallinum* Witeberg, 1923. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.84, p.75-79, 1989.

AMORIM, J. P.; PESSOA, S.B. Experiências de alguns vegetais como moluscicida. *Rev. bras. Malar.*, v.14, p.255-260, 1962.

ARAÚJO, J.L.B. Alguns moluscos terrestres como hospedeiros intermediários de animais domésticos, no Brasil: estudos sobre a anatomia sistemática e participação em helmintoses. **Tese de Doutorado**. Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 82p. 1982.

ARAÚJO, J.L.B. Moluscos de importância econômica na Brasil. I. Xanthonychidae: *Bradybaena similis* (Férussac, 1821) (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata, Stylommatophora). **Revista Brasileira de Zoologia**, v.6, n.4, p.538-592, 1989.

ARAÚJO, J. L. B.; G.D. KELLER. Moluscos de importância econômica no Brasil. III. Subulinidae, *Leptinaria unilamellata* (Orbigny) (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata, Stylommatophora). **Revista Brasileira de Zoologia**, v.10, n.3, 499-507, 1993.

ARAÚJO, J.L.B.; E.C.A. BESSA. Moluscos de importância econômica do Brasil. II Subulinidae, *Subulina octona* (Bruguière) (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata, Stylommatophora). **Revista Brasileira de Zoologia**, v.10, p.497, 1995.

ARCHIBALD, R. G. The use of the fruit of the tree *Balanites aegyptiaca* in the control of schistosomiasis in the Sudan. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.27, p.207-210, 1933.

ARÉVALO, E.G.; JUNQUEIRA, F.O.; G.L.G. SOARES. Atividade fagocinibidora do ácido salicílico sobre *Bradybaena similis* (Férussac, 1821) (Mollusca, Bradybaenidae) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zootecias**, v.8, n.2, p.111-115, 2006.

ASH, L.R. Helminths parasites of dogs and cats in Hawaii. **Journal of Parasitology**, v.48, p.63-65, 1962.

ASSUNÇÃO, I. P.; LIMA, G. S. A.; AMORIM, E. P. R.; MUNIZ, M. F. S.; ENDRES, L. Ocorrência de *Curvularia lunata* em Jurubeba no estado de Alagoas. **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 4, p. 386-387, 2006.

BAPTISTA, D.F.; VASCONCELLOS, M.C.; LOPES, F.E.; SILVA, I.P.; V.T. SCHALL. Perspective of using *Euphorbia splendens* as a molluscicide in schistosomiasis control programs. **Asian Journal Of Tropical Medicine And Public Health**, v.25, p.419-424, 1994.

BASH, P.F. Completion of the cycle of *Eurytrema pancreaticum* (Trematoda: Dicrocoelidae). **Journal of Parasitology**, v.5, n.3, p.350-355, 1965.

ARAÚJO, J. L. B. & E. C. A BESSA. Moluscos de importância econômica do Brasil. II Subulinidae, *Subulina octona* (Bruguière) (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata, Stylommatophora). **Revista Brasileira de Zoologia**, v.10, n.3, 489-497, 1993.

BESSA, E.C.A.; J.L.B. ARAÚJO. a. Oviposição, tamanho de ovos e medida do comprimento da concha em diferentes fases do desenvolvimento de *Subulina octona* (Bruguière) (Pulmonata, Subulinidae) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.2, p.647-654, 1995.

BESSA, E.C.A.; J.L.B. ARAÚJO. b. Ocorrência de autofecundação em *Subulina octona* (Bruguière) (Pulmonata, Subulinidae) sob condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.12, n.3, p.719-723, 1995.

BESSA, E.C.A.; LIMA, W.S.; DAEMON, E.; CURY, M.C.; J.L.B. Araújo. Desenvolvimento biológico de *Angiostrongylus vasorum* (Baillet) Kamensky (Nematoda, Angiostrongylidae) em *Subulina octona* Bruguière (Mollusca, Subulinidae) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.17, n.1, p29-41, 2000.

BOTION, L.M.; FERREIRA, A. V. M.; CÔRTEZ, S. F.; LEMOSA, V. S.; BRAGA, F. C. Effects of the Brazilian phytopharmaceutical product Ierobina® on lipid metabolism and intestinal tonus. **Journal of Ethnopharmacology**, v.102, p.137-142, 2005.

BRANDOLINI, S.V.P.B., AMATO, A.; A.A. PEREIRA. Relacionamento de *Tanaisia bragai* (Digenea, Eucotylidae) e seu hospedeiro intermediário, *Subulina octona* (Gastropoda, Subulinidae) sob condições experimentais, **Parasitología al día**, v.21, n.3-4, 1997.

BRANDOLINI, S.V.P.B.; S., AMATO. Desenvolvimento de *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet) (Digenea, Dicrocoeliidae) em *Bradybaena similaris* (Férussac) (Gastropoda, Xanthonychidae), **Revista Brasileira de Zoologia**, v.18, n.2, p.499-510, 2001.

Brandolini, S.V.P.B; A.P.S. Gomes. Influência de diferentes dietas sobre o crescimento, sobrevivência e reprodução de *Leptinaria unilamellata* (d'Orbigny, 1935) (Gastropoda, Subulinidae) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zoociências**, v.4; p.169-171, 2002.

BRANDOLINI, S.V. P.B.; S. B. AMATO. Desenvolvimento larval de *Paratanaisia bragai* (Santos) (Digenea, Eucotylidae) sob condições experimentais. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.23, n.4, p.1097-1100, 2006.

BASH, P.F. Completion of the cycle of *Eurytrema pancreaticum* (Trematoda: Dicrocoeliidae). **Journal Parasitology**, v.1, n.3, 350-355, 1965.

BEKKOUCHE, K.; MARKOUK, M.; LARHSINI, M.; JANA, M.; LAZREK, H.B. Molluscicidal properties of glycoalkaloid extracts from Moroccan *Solanum* species. **Phytotherapy Research**, v.14, p.366-367, 2000.

BEZERRA, J.C.B; SILVA, I.A.; FERREIRA, H.D.; FERRI, P.H.; S.C. SANTOS. Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal plants. **Fitoterapia**, v.73, p.428-430, 2002.

BORELLA, J.C.; FONTOURA, A.; MENEZES JR., A, S.C. FRANÇA. Influência da adubação mineral (N-P-K) e sazonalidade no rendimento e teor de flavonóides em indivíduos masculinos de *Baccharis trimera* (Asteraceae) - Carqueja. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.4, p.99-102, 2001.

BORELLA J.C.; A. FONTOURA. Avaliação do perfil cromatográfico e do teor de flavonóides em amostras de *Baccharis trimera* (Less) DC., Asteraceae (carqueja) comercializadas em Ribeirão Preto, SP, Brasil. **Revista brasileira de Farmacognosia**, v.12, p.63-67, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Vigilância e Controle de Moluscos de Importância Epidemiológica. Diretrizes técnicas: **Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE)**. 2ª edição, Brasília. 2008.

BRUSTOLIN, A.; D.A.G. CORTEZ. Avaliação da atividade moluscicida da *Gymnema sylvestre* R. Br., (Asclepiadaceae). **Acta Scientiarum**, v.22, n.2, p.605-608, 2000.

CASTRO, A.H.F.L.; ALVARENGA, A.A.; SOARES, A.M.; VOUNG, M.C.M.; A.A.C. PURCINO. Avaliação sazonal da atividade da fenilalanina amônia-llase e dos teores de fenóis e taninos totais em *Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss.: uma espécie medicinal do cerrado. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.7, n.3, p.45-55, 2005.

CARVALHO, C.M.; BESSA, E.C.A.; S. D'ÁVILA. Life history strategy of *Bradybaena similaris* (Fèrussac, 1821) (Mollusca, Pulmonata, Bradybaenidae). **Molluscan Research**, v.28, n.3, p.171-174, 2008.

CARVALHO, C. DE M.; SILVA, J. P. DA; MENDONÇA, C. L. F.; BESSA, E. C. DE A.; D'ÁVILA, S. Life history strategy of *Leptinaria unilamellata* (d'Orbigny, 1835) (Mollusca, Pulmonata, Subulinidae). **Journal Invertebrate Reproduction & Development**, v.53, n.4, p.211-222, 2009.

CANTANHEDE, S.P.D. *et al.* Atividade moluscicida de plantas: uma alternativa profilática. **Revista Brasileira de Farmácia** 20 (2):282-288, 2000.

CHEN, Z.; A.R. MILLER. Steroidal alkaloids in Solanaceous vegetable crops. **Horticultural Reviews**, v.25, p.171-96, 2001.

CHINEDU, S.N.; OLASUMBO, A.C.; EBOJI, O.K.; EMILOJU, O.C.; ARINOLA, O.K.; DI. DANIA. Proximate and phytochemical analyses of *Solanum aethiopicum* L. and *Solanum macrocarpon* L. fruits. **Research Journal of Chemical Sciences**, v.1, n.3, 2011.

CORDEIRO, L.N. (2008). Efeito *in vitro* de extratos etanólicos da raiz de jurubeba (*Solanum paniculatum* L.) e das folhas de melão-de-são-caetano (*Momordica charantia* L.) sobre ovos e larvas de nematóides gastrintestinais de caprinos. **Dissertação de Mestrado**, Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, Paraíba, 66p.

CRUZ, G.L. **Dicionário de Plantas Úteis no Brasil**. 2ª ed, Rio de Janeiro: Civilização Brasileira; 1982. 599p.

DALL'AGNOL, R.; G.L. VON POSER. The use of complex polysaccharides in the management of metabolic diseases: the case of *Solanum lycocarpum* fruits. **Journal Ethnopharmacology**, v.71, p.337-41, 2000.

D'ÁVILA, S.; DIAS, R.J.P.; BESSA, E.C.A.; DAEMON, E. Resistência à dessecação em três espécies de moluscos terrestres: aspectos adaptativos e significado para o controle de helmintos. **Revista Brasileira de Zootecias**, v.6, p.115-127, 2004.

D'ÁVILA, S. & BESSA, E.C.A. a. Influência de diferentes substratos e umidade sobre o crescimento e número de ovos produzidos por *Subulina octona* (Brugüière) (Mollusca, Subulinidae), sob condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.22, n.1, p.349-353, 2005.

D'ÁVILA, S.; BESSA, E. C. A., b. Influência do substrato sobre a reprodução de *Subulina octona* (Brugüière) (Mollusca, Subulinidae), sob condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.22, n.1, p.197-204, 2005.

DUARTE, M.J.F. 1977. O ciclo evolutivo de *Postharmostomum galinum* Witenberg, 1923, no Estado do Rio de Janeiro. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, 69p.

DUTRA, A.V.E. Aspectos da ecologia e da reprodução de *Leptillaria ullilamellata* (Orbigny, 1835) (Gasropoda, Subulinidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v.5, n.4, p.581 -591, 1988.

EANES R.C.; TEK, N.; KIRSOY, O.; FRARY, A, DOGANLAR, S.; A.E. ALMEIDA. Development of practical HPLC methods for the separation and determination of egg plant steroidal glycoalkaloids and their aglycones. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.31, p.984-1000, 2008.

FERREIRA, P.; SOARES, G.L.G.; D'ÁVILA, S.; BESSA, E.C.A. The Influence of caffeine and thymol on the survival, growth and reproduction of *Subulina octona* (Brugüière, 1789) (Mollusca, Subulinidae). **Brazilian Archives Biology Technology**, v.52, n.4, p.945-952. 2009.

FERREIRA, P.; SOARES, G.L.G.; D'ÁVILA, S.; E.C.A. BESSA. Influência da cafeína sobre a sobrevivência, crescimento e reprodução de *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Mollusca, Xanthonychidae), com diferentes idades. **Revista Brasileira de Zootecias**, v.12, n.2, p.157-163, 2010.

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

GASPAROTTO JR. A.; BREZAN, M.A.; PILOTO, I.C.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V.; FILHO, B.P.D. FILHO, R.E. & A.G. FERREIRA. Estudo Fitoquímico e avaliação da atividade moluscicida do *Calophyllum brasiliense* CAMB (CLUSIACEAE). **Química Nova**, v.28, n.4, p.575-578, 2005.

HASHEESH, W.S.; MOHAMED-ASSEM, S.M.; EL-DEEB, F.A.A; M. SAYED. Impact of *Asparagus densiflours* and *Oreopanax guatemalensis* plants and Difenconazole Fungicide

on biochemical parameters of *Biomphalaria alexandrina* snails. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v.5, n.12, p.366-378, 2011.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical methods**. 1 o ed. N. York-USA. Great Britan Ltd. 1976.

HARBORNE, J. B. **The flavonoids (advances in research since 1986)**, 1ª ed. Chapman and Hall. London- GBR. 1994.

HELLER, J. Life History Strategies. 413-445 p. *In*: BARKER, G. M. 2001 (Ed.). **The biology of terrestrial molluscs**. CABI Publishing. 552p. 2001.

HERBERT, D.G. **The introduced terrestrial Mollusca of South Africa**. SANBI. Biodiversity Series 15. Pretoria: South Africa National Biodiversity Institute, 2010.

HYMAN, L.H. **The invertebrates: Mollusca I**. Vol. VI. New York: MC Graw-Hill Book Company. 1967.

BRANDOLINI, S. V. P. B.; S.B. AMATO. Desenvolvimento larval de *Paratanaisia bragai* (Santos) (Digenea, Eucotylidae) sob condições experimentais. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.23, n.4, p.1097–1100, 2006.

JURBERG, P., VASCONCELLOS, M.C; MENDES, N.M. Plantas empregadas como moluscicidas: Uma visão crítica. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.84(1), p. 76- 83, 1989.

KELLER, D.G.; J.L.B. ARAÚJO. Ciclo evolutivo de *Paratanaisia bragai* (Santos, 1934) (Trematoda, Eucotylidae) com novo hospedeiro intermediário no Brasil: *Leptinaria unilamellata* (D’Orbigny, 1835) (Gastropoda, Pulmonata, Subulinidae) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.1, n.2, p.89-92, 1992.

KOZUTSUMI, T.; H. ITAGAKI. Migration and emergence of *Eurytrema pancreaticum* daughter sporocysts from host snail (Trematoda, Dicrocoeliidae). **Japanese Journal Parasitology**, v.38, p.290-295, 1989.

KLOOS, H. & MCCULLOUGH, F.S. Plant Molluscicides. **Planta Medica**, v.46, n.12, p.195-209, 1982.

KLOOS, H.; F.S. MCCULLOUGH. Plants with recognised molluscicidal activity. *In*: MOTT, K.E. (Ed.), **Plant Molluscicides**. John Wiley, Chichester, pp. 45-108, 1987.

KOZUTSUMI, T.; H. ITAGAKI. Migration and emergence of *Eurytrema pancreaticum* daughter sporocysts from host snail (Trematoda, Dicrocoeliidae). **Japanese Journal Parasitology**. V.38, p.290-295, 1989.

LANZIERI, P.D. Alguns aspectos morfo-estruturais do aparelho genital de *Subulina octona* (Bruguière, 1792) (Gastropoda, Pulmonata, Subulinidae). **Tese de Doutorado**. 44p. 1966.

LAWRENCE, R.; POTTS, B.M.; T.G. WHITHAM. Relative importance of plant ontogeny, host genetic variation, and leaf age for a common herbivore. **Ecology**, v.84, p.1171-1178, 2003.

- LEAHY, W. Aspectos adaptativos de *Bradybaena similaris* Férussac, 1821 (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata) submetido ao jejum e dessecação. **Boletim de Fisiologia Animal**, v.5, p.47-55, 1984.
- LEMMICH, E.; CORNETT, C.; FURU, P.; JORSTIAN, C.L.; KNUDSEN, A.D.; OLSEN, C.E.; SALIH, A.; S.T. THILBORG. Molluscicidal saponins from *Catunaregam nilotica*. **Phytochemistry**, v.39, n.1, p.63-68, 1995.
- LEMOS, T.L.G.; AL MENDES, A.L.; SOUSA, M.P.; R. BRAZ-FILHO. New saponin from *Sapindus saponaria*. **Fitoterapia**, v.53, p.515-517. 1992.
- LIRA, C.R.S.; GOMES, E.M.; CHAGAS G.M.; J. PINHEIRO. Influência do jejum severo sobre o conteúdo de proteínas totais e de amônio na hemolinfa de *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Gastropoda). **Revista Brasileira de Zoologia**, v.17, p.907-913/2000.
- LÔBO, K.M.S.; ATHAYDE, A.C.R.; SILVA, A.M.A.; RODRIGUES, F.F.G.; LÔBO, I.S.; BEZERRA, D.A.C.; COSTA, J.G.M. Avaliação da atividade antibacteriana e prospecção fitoquímica de *Solanum paniculatum* Lam. E *Operculina hamiltonii* (D.Don) D. F. Austin & Staples, do semi-árido paraibano. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, p.227-233, 2010.
- LOPES, T. C.; GONÇALVES, J.R.S.; SOUZA, N. S.; MORAES, D. F. C.; AMARAL, F. M. M.; I.G. ROSA. Avaliação moluscicida e perfil fitoquímico das folhas de *Caryocar brasiliense* Camb. **Cadernos de Pesquisa**, v.18, n. 3, 2011.
- LOUREIRO, M.C. Manutenção de *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) em terrários. **Revista Ceres**, v.62, n.11, p. 60-63, 1960.
- LUSTRINO, D.; TUNHOLI- ALVES, V.M.; TUNHOLI, V.M.; BESSA, E.C.A.; PINHEIRO, J. *Allamanda cathartica* L. (apocynacea) seeds induces changes on carbohydrates deposits of *Bradybaena similares* (Férussac, 1821) (Mollusca, Bradybaenidae). **Revista Brasileira de Zoociências**, v.10, n. 1, p. 23-27, 2009.
- MARQUI, S.R.; LEMOS, R.B.; SANTOS, L.A.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A.J.; SCORZONI, L.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; YOUNG, M.C.M.; L. M.B. TORRES. Saponinas antifúngicas de *Swartzia langsdorffii*. **Química Nova**, v.31, n.4, p. 828-831, 2008.
- MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Review article number 6: Plants moluscicidas. **Phytochemistry**, v.24, p.639-652, 1985.
- MARUO, V.M.; BERNARDI, M.M.; H.S. SPINOSA. Toxicological evaluations of long-term consumption of *Solanum lycocarpum* St. Hill fruits in male and female adult rats. **Phytomedicine**, v.10, p.48-52, 2003.
- MEDINA, F. R.; RITCHIE, L. S. Molluscicidal activity of the Puerto Rican weed *Solanum nodiflorum* against snail hosts of *Fasciola hepatica*. **Economic Botany**, v.34, p.368-375, 1980.

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

MENDES, N.M.; BAPTISTA, D.F.; VASCONCELLOS, M.C.; V.T. SCHALL. Evaluation of the molluscicidal properties of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (N.E.B) (Euphorbiaceae). 1.Experimental test in lentic habi- tat. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.87, p.21-23, 1992.

MENDES NM; QUEIROZ R; GRANDI. TSM: DOS ANJOS AMG; OLIVEIRA AB; C.L. ZANI. Screening of Asteraceae" (Compositae) plant extracts for molluscicidal activity. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, p.411-412, 1999.

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

MELLO-SILVA, C.C.; VASCONCELLOS M.C.; PINHEIRO J.; RODRIGUES, M.L.A. Physiological changes in *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Pulmonata: Planorbidae) caused by sub-lethal concentrations of the latex of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B (Euphorbiaceae). **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, p.3-8, 2007.

MELLO-SILVA, C.C.; VILAR. M.M.; BEZERRA, J.C.B. VASCONCELLOS, M.C. PINHEIRO,J.; RODRIGUES, M.L.A. Carbohydrate metabolism alterations in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* and exposed to *Euphorbia splendens* var. *hislopii* latex. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 4, p.492-495, 2010.

MESIA-VELA, S.; SANTOS, M. T.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; LAPA, A. J. *Solanum paniculatum* L. (Jurubeba): Potent inhibitor of gastric acid secretion in mice. **Phytomedicine**, v.9, p.508-514, 2002.

MORAIS, L.A.S. 2009. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v.27, supl. 2, p. 4050-4063, 2009.

NASCIMENTO, C.A.A.; ARÉVALO, E. AFONSO-NETO, I.S.; BESSA, E.C.A.; SOARES, G.L.G. Efeito do extrato aquoso de folhas de *Allamanda cathartica* L. (Apocynaceae) sobre *Bradybaena similis* (Férussac, 1821) (Mollusca, Bradybaenidae) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zootecias**, v. 8, n. 1, p. 77-82, 2006.

MOLGAARD, P.; CHIHAKA, A.; LEMMICH, E.; FURU, P.; WINDBERG, C. INGERSLEV, F.; B. HALLING-SORENSEN. Biodegradability of the molluscicidal saponins of *Phytolacca dodecandra*. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.32, p.248–255, 2000.

NASCIMENTO, C.A.A. 2008. Influência de *Furcraea foetida* (L.) Haw sobre a sobrevivência, crescimento, reprodução e comportamento de *Subulina octona* (Bruguère, 1789) (Mollusca, Subulinidae). **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora, MG. 2008.

ODYEK, O.; MAKANGA, B.; M.A. BYARUHANGA. Larvicidal and molluscicidal activities of *Solanum aculeastrum* berry methanol extract. **Fitoterapia**, v.63, p.71–72, 1992.

OLIVEIRA, M.P.; REZENDE, G.J.R.; CASTRO, G.A. Sobre *Bradybaena similaris* Férussac (Gastropoda, Pulmonata, Stylommatophora, Fruticolidae) copula y funcionamiento del oviducto durante el período de fecundación y formación del huevo. *Com. Soc. Malac. Uruguay*, v.3, n.21, p.155-156, 1971.

OLIVEIRA, R. C. M. et al. Extratos metanólico e acetato de etila de *Solanum megalonyx* Sendtn. (Solanaceae) apresentam atividade espasmolítica em óleo isolado de cobaia: um estudo comparativo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.2, p.146-151, 2006.

OLIVEIRA JR. E.N.; SANTOS, C.D.; ABREU, C.M.P.; CORRÊA, A.D.; J.Z.L. SANTOS. Análise nutricional da fruta-do-lobo (*Solanum lycocarpum* St. Hill.) durante o amadurecimento. **Ciências e Agrotecnologia**, v.27, n.4, p.846-51, 2003.

PARRA-GARCÉS, M.I.; CAROPRESE-ARAQUE, J.F.; ARRIETA-PRIETO, D.; STASHENKO, E. Morfología, anatomía, ontogenia y composición química de metabolitos secundarios en inflorescencias de *Lippia alba* (Verbenaceae). **Revista de Biología Tropical**, v.58, n.4, p.1533-1548, 2010.

PICORAL, M.; J.W. THOMÉ. Sobre a anatomia do sistema genital de *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Pulmonata, Stylommatophora, Bradybaenidae) ocorrentes em Porto Alegre, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.84, p.435-439, 1989.

PINHEIRO J.; S.B. AMATO. *Eurytrema coelomaticum* (Digenea, Dicrocoeliidae): the effect of infection on carbohydrate contents of intermediate snail host, *Bradybaena similaris* (Gastropoda, Xanthonychidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.89, 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, p.291-311, 1944.

NAKAMURA, S.; HONGO, M.; SUGIMOTO, S.; MATSUDA, H.; M. YOSHIKAWA. “Steroidal saponins and pseudoalkaloid oligoglycoside from Brazilian natural medicine, “fruta do lobo” (fruit of *Solanum lycocarpum*). **Phytochemistry**, v.69, p.1565-72, 2008.

NASCIMENTO, L.C.S.; SILVA, T.A.; ORLANDA, J.F.F. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos vegetais de *Solanum paniculatum* L. sobre o crescimento de *Ralstonia solanacearum*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n.2, p.227-233, 2010.

NETO, P.A.S. P; CAETANO, L.C. **Plantas Mediciniais: Do Popular ao Científico**. Editora EDUDAL, Maceió, 90p, 2005.

SANTOS, J.A.A.; TOMASSINI, T.C.B.; XAVIER, D.C.D.; RIBEIRO, I.M.; SILVA, M.T.G.; FILHO, Z.B.M. Molluscicidal activity of *Physalis angulata* L. extracts and fractions on *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835) under laboratory conditions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, n.3, 425-428. 2003.

SANTOS, P.F. 2005. Influência da cafeína e do timol sobre a sobrevivência, crescimento e reprodução de três espécies de moluscos terrestres, sob condições de laboratório. **Dissertação de Mestrado**. Pós-graduação em Comportamento e Biologia Animal. Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora, MG. 2005. 116p

SANTOS, S.C.; COSTA, W.F.; BATISTA, F.; SANTOS, L.R. FERRI, P.H.; FERREIRA, H.D.; J.C. SERAPHIN. Seasonal variation in the content of tannins in barks of barbatimão species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.4, p.552-556, 2006.

SANTOS, T.V. Variabilidade conchiliológica, anatômica e molecular em *Subulina octona* (Brugüière, 1789) (Mollusca, Gastropoda, Subulinidae). **Dissertação de Mestrado**. Pós-graduação em Comportamento e Biologia Animal. Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, 118p.

SCHALL, V.T., VASCONCELLOS, M.C., 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*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.58, n.1, p.7-10, 1998.

SCHALL V.T.; VASCONCELLOS, M.C.; ROCHA, R.S.; SOUZA, C.P.; MENDES, N.M. The control of the schistosome-transmitting snail *Biomphalaria glabrata* by the plant molluscicide *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (syn *milli* Des Moul): a longitudinal field study in an endemic area in Brazil. **Acta Tropica**, v. 79, p. 165-170, 2001.

SCHALL, V.T.; VASCONCELLOS, M.C.; VILLAÇA-COELHO, A.L.; FERREIRA-LOPES, F.L.; I. PAZ-DA-SILVA. Evaluation of temporal, seasonal and geographic stability of the molluscicidal property of *Euphorbia splendens* latex. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.34, p.183-191, 1992.

SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. 2003. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. & P. R. PETROVICK. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, p. 711-740, 2007.

SCHWARZ, A.; PINTO, E.; HARAGUCHI, M.; OLIVEIRA, C.A.; BERNARDI, M.M.; H.D. SPINOSA. Phytochemical study of *Solanum lycocarpum* (St. Hil) unripe fruit and its effects on rat gestation. **Phytotherapy Research**, v.21, p.1025-1028, 2007.

SIMONE, L.R.L. **Land and freshwater molluscs of Brazil**. São Paulo. EGB, FAPESP. 390p. 2006.

SILVA, T. M. S.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R.; AGRA, M. F. Ocorrência de flavonas, flavonóis e seus glicosídeos em espécies do gênero *Solanum* (SOLANACEAE). **Química Nova**, v.26, n.4, p.517-522, 2003.

SILVA, T.M.S.; AGRA, M.D.F.; J. BHATTACHARYYA. a. Studies on the alkaloids of *Solanum* of northeastern Brazil, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.4, 292-293, 2005.

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

SILVA, T.M.S.; NASCIMENTO, R.J.B.; BATISTA, M.M.; AGRA, M.F.; C.A. CAMARA. Brine Shrimp Bioassay of Some Species of *Solanum* from Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p.35-38, 2007.

SILVA, L.; SOUZA, B.; BESSA, E.C.A.; PINHEIRO, J. Effect of successive applications of the sublethal concentration of *Solanum paniculatum* in *Subulina octona* (Subulinidae). **Journal of Natural Products**, v. 5, p. 157-167, 2012.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L. A.; P.R. PETROVICK. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6º edição. UFRGS. p.712, 2010.

SINGH, S.; D.K. SINGH. Molluscicidal activity of *Nerium indicum* bark. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.31, p.951–954, 1998.

SOUZA, R.M.; GOMES, E.M.; CHAGAS, G.M.; J. PINHEIRO. The influence of starvation and *Eurytrema coelomaticum* infection on the nitrogenous products of degradation in the hemolymph of *Bradybaena similaris*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.43, p.365-371, 2000.

SOUZA, V.S.; BRUM, K.B.; HARAGUCHI, GARUTTI, M.B.; FIORAVANTI, M.C.S.; M. HARAGUCHI. Influência da sazonalidade e pluviometria sobre a saponina esteroidal das gramíneas *Brachiaria brizantha* e *B. decumbens* em Jataí (GO). 2003. 2p. Disponível em: <http://sec.sbg.org.br/cd29ra/resumos/T1315-1.pdf>. Acesso em dezembro de 2012.

SOUZA, B.A. Efeitos dos extratos aquosos de *Bidens pilosa* Linné e *Mikania glomerata* Sprengel (Asteraceae) sobre aspectos biológicos e comportamentais de *Subulina octona* (Bruguière,1789) (Mollusca, Subulinidae)" **Dissertação de Mestrado**, Pós-graduação em Comportamento e Biologia Animal, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 145 p., 2012.

SOUTH, H. A comparison of the life cycle of *Deroceras reticulatum* (Müller) and *Arion intermedius* Normand (Pulmonata: Stylommatophora) at different temperatures under laboratory conditions. **Journal of Molluscan Studies**, v.48, p.233-244, 1992.

RAMBO, P.R.; AGOSTINI, A.A.; C. GRAEFF-TEIXEIRA. 1997. Abdominal angiostrongylosis in southernence and parasitic burden in molluscs intermediate hosts from eighteen endemic foci. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.92, n.1, p9-14, 1997.

ROCHFORT, S.; PARKER, A. J.; F. R. DUNSHEA, Plant bioactives for ruminant health and productivity. **Phytochemistry**, v.69, p.299-322. 2008.

ROUQUAYROL, M.Z.; SOUSA, M.P.; M.J.M. SILVA. Atividade moluscicida de plantas do Nordeste brasileiro (III). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.53, p.215-20, 1972.

MALDONADO J F. The life cycle of *Tamerlania bragai*, Santos 1934 (Eucoiylidae) a kidney fluke of domestic pigeons. **Journal of Parasitology**, v.31, p.306-314, 1945.

TEIXEIRA, C.G.; THIENGO, S.C.; THOME, J.W.; MEDEIROS, A.B.; CAMILLO-COURA, L.; A.A. AGOSTINI. On the diversity of mollusc intermediate hosts of *A. costaricensis* Morera & Cespedes, 1971 in southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.88, n.3, 487-489, 1993.

THIENGO, S.A.R.C. Estudo da helmintofauna dos moluscos em áreas de ocorrência de angiostrongilose no Brasil. **Tese de Doutorado**, Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil, 91 p. ,1995.

THILBORG, S.T.; CORNETT, C.; LEMMICH, E. Investigations of molluscicidal saponins from the Endod plant *Phytolacca dodecandra*. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.404, p.151-164, 1996.

TREYVAD, V.; MARSTON, A.; DYATMIKO, W.; HOSTETTMANN, K. Molluscicidal saponins from *Phytolacca icosandra*. **Phytochemistry**, v.55, p.603-609, 2000.

TRIPATHI, S.M.; D.K. SINGH. Molluscicidal activity of *Punica granatum* bark and *Canna indica* root. Molluscicidal activity of *P. granatum* and *C. indica*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, p.1351-1355, 2000.

TSUZUKI, J.K.; VIDZINSKI, T.I.E; SHINOBU, S.C.; SILVA, L.F.A.; RODRIGUES-FILHO, E.; CORTEZ, D.A.G.; I.C.P. FERREIRA. Antifungal activity of the extracts and saponins from *Sapindus saponaria* L. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.79, n.4, p. 577-583, 2004

TWAIJ H.A.; SAWSAN, N.M.; M.K. RWAIDA. Molluscicidal evaluation of some Iraqi plants. **Journal of Biological Research**, v.19, p.773, 1988.

VALENTINE, J. W. **On the origin of Phyla**. Chicago. The University of Chicago Press, 2004.

VARGAS, M.; GOMEZ PEREZ, J.D.; E.A. MALEK. First record of *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda: Metastrongylidae) in the Dominican Republic. **Tropical Medicine Parasitology**, v.43, n.4, p.253-255, 1992.

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, 1996.

VASCONCELOS, M.C.; A. AMORIM. a Activity of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B. (Euphorbiaceae) latex against *Lymnaea columella* (Say, 1817) (Pulmonata: Lymnaeidae), intermediate host of *Fasciola hepatica*, Linnaeus, 1758 (Trematoda: Fasciolidae). 2: Limited Field-testing, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, n.4, p.7981-985, 2003.

VASCONCELOS, M.C.; A. AMORIM. b. Molluscicidal action of the latex 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.544-563, 2003.

WALLACE, G. D. & ROSEN, L. Studies on eosinophilic meningites. V. Molluscan hosts of *Angiostrongylus cantonensis* on the Pacific Islands. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 18: 206-16, 1969.

VINAUD, M.C.; LINO JR., R.S.; J.C.B. BEZERRA. Activity of *Stryphnodendron polyphyllum*, a plant from the brazilian savannah, against hemocytes of *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Revista de Patologia Tropical*, v.37, n.3, p.237-246, 2008.

XAVIER, V.B.; BORBA, H.R.; BRANDOLINI, S.V.P.B. Atividade biológica de *Solanum lycocarpum* (Solanaceae) procedente de regiões fitogeográficas distintas sobre *Biomphalaria glabrata* (Planorbidae). **Revista Brasileira de Zootecias**, v.12,1, p.43-49, 2010.

ZILCH, A. 1959/1 960. Euthyneura. In : W. WENZ (Ed.). *Gastropoda*. Berlin. Gebruder Bomlraeger, Vol. 2, 560p.

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

YOSHIKAWA, M.; NAKAMURA, S.; OZAKI, K.; KUMAHARA, A.; MORIKAWA, T.; H. MATSUDA. Structures of steroidal alkaloid oligoglycosides, robeneosides A and B, and antidiabetogenic constituents from the Brazilian medicinal plant *Solanum lycocarpum*. **Journal of Natural Products**, v.70, p.210-4, 2007.

WANYONYI, A.W.; CHHABRA, S.C.; G. MKOJIB. Molluscicidal and antimicrobial activity of *Solanum aculeastrum*. **Fitoterapia**, v.74, p.298-301, 2003.

WEBSTER J. P.; SHRIVASTAVA J.; JOHNSON P. J.; BLAIR, L. Is host-schistosome coevolution going anywhere? **Evolutionary Biology**, v.7, p.91. 2007.

WEI, F.H.; XU, X.J.; LIU, J.B.; DAI, Y.H.; DUSSART, G.; J. TRIGWELL. Toxicology of a potential molluscicide derived from the plant *Solanum xanthocarpum*: a preliminary study. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.96, p.325-31, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Memoranda: molluscicide screening and evaluation. **Bulletin World Health Organization**, v.33, p.567-576, 1965.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Quality control methods for medicinal plant materials**. Geneva: WHO/Pharm/92.559, p. 33-35, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Specifications and evaluations for public health pesticides**. World Health Organization, Geneva, 24 p. 2002.

11 ANEXOS