

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
FACULDADE DE FARMÁCIA**

DANDARA QUIZZI PEREIRA SOARES

Análise da atividade moluscicida do lavado glandular de *Achyrocline satureioides* (Lam) D. C. e seu impacto frente ao molusco *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*.

**Juiz de Fora
2018**

DANDARA QUIZZI PEREIRA SOARES

Análise da atividade moluscicida do lavado glandular de *Achyrocline satureioides* (Lam) D. C. e seu impacto frente ao molusco *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao corpo docente da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para conclusão do Curso de Graduação em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Olavo dos Santos Pereira Júnior

**Juiz de Fora
2018**

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Soares, Dandara Quizzi Pereira.

Análise da atividade moluscicida do lavado glandular de *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. e seu impacto frente ao molusco *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*. / Dandara Quizzi Pereira Soares. -- 2018. 43 p. : il.

Orientador: Olavo dos Santos Pereira Júnior
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica, 2018.

1. Moluscidas vegetais. 2. *Biomphalaria glabrata*. 3. Esquistossomose. 4. *Achyrocline satureioides*. I. Pereira Júnior, Olavo dos Santos, orient. II. Título.

DANDARA QUIZZI PEREIRA SOARES

Análise da atividade moluscicida do lavado glandular de *Achyrocline satureioides* (Lam) D. C. e seu impacto frente ao molusco *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*.

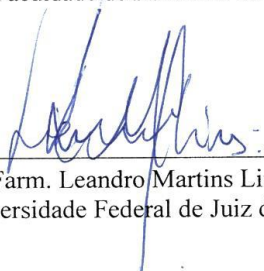
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao corpo docente da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para conclusão do Curso de Graduação em Farmácia.

Aprovada em 27 de Junho de 2018

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Olavo dos Santos Pereira Júnior
Faculdade de Farmácia/UFJF



Farm. Leandro Martins Lima
Universidade Federal de Juiz de Fora



Farm. Renata Torre Rêgo
Universidade Federal de Juiz de Fora

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me possibilitou chegar até aqui, me sustentando nos momentos mais difíceis e me permitindo superar todas as adversidades.

Agradeço aos meus pais, José Roberto Soares e Rosangela Pereira Lourenço Soares, por todo apoio e paciência durante estes anos de graduação, por todo incentivo, noites em claro, mas principalmente por todo amor e esforço, sem os quais, eu não chegaria onde estou.

Ao professor orientador por todo auxílio, apoio e por ter acreditado no meu potencial

Ao meu namorado, Guilherme Medeiros por todo apoio, incentivo, amor e paciência, sem o qual, minha caminhada não teria sido tão feliz e completa.

Aos amigos Bruno Américo e Priscila Márcia, que me auxiliaram na execução deste trabalho e sem os quais nada disso seria possível.

À melhor amiga que alguém poderia ter, Talita Lopes, que me apoiou, incentivou e se alegrou com cada conquista minha durante esta graduação.

Às minhas crianças (afilhados/primos/sobrinhos) Grazielly, Miguel, Angela Victoria, Antônio, Alice, João Miguel e Lucas por todos os sorrisos e novidades, que sem dúvida tornaram a minha caminhada ao longo desses anos muito mais leve e feliz! Obrigada também pela paciência com a minha ausência em alguns momentos e por todo amor a mim dedicado.

RESUMO

A esquistossomose mansônica é classificada como uma doença negligenciada (ou tropical), possuindo alta incidência em países como África, Ásia e América do Sul, onde o Brasil se destaca como área endêmica. Consiste em uma doença parasitária de veiculação hídrica, sendo causada pelo trematódeo *Schistosoma mansoni*. No seu ciclo evolutivo, o homem é considerado o principal reservatório e seus principais hospedeiros intermediários são moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata*, devido a sua grande capacidade de adaptação, características biológicas favoráveis ao desenvolvimento do helminto, bem como ampla distribuição geográfica. Por ser considerada um importante problema de saúde pública, a Organização Mundial de Saúde (OMS) preconiza como estratégia complementar de combate à esquistossomose, o controle do hospedeiro intermediário, mediante a utilização de moluscidas, interrompendo assim o ciclo evolutivo do parasito bem como a proliferação da doença. A niclosamida é o único moluscida de origem sintética recomendado pela OMS, entretanto, devido a sua ação biocida e grande custo de transporte da mesma, há o interesse na pesquisa e desenvolvimento de novas drogas moluscidas de origem vegetal, que seja seletivas para as espécies *Biomphalaria* e menos agressivas ao ecossistema aquático. Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo principal avaliar o potencial moluscidas de extratos vegetais frente a moluscos *Biomphalaria glabrata*. O extrato vegetal do lavado glandular de *Achyrocline satureioides* foi avaliado em um teste de toxicidade aguda em concentrações menores ou igual a $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, onde foi possível obter a DL90 e a DL50. Os moluscos sobreviventes à exposição ao extrato, foram submetidos ao teste de ovoposição e contagem de ovos viáveis, onde houve uma redução tanto no número de desovas quanto no número de moluscos originados, mostrando a possibilidade da sua utilização como um moluscida vegetal viável.

Palavras-chave: Moluscidas, *Biomphalaria glabrata*, Esquistossomose, *Achyrocline satureioides*.

ABSTRACT

Schistosomiasis mansoni is classified as a neglected (or tropical) disease, with a high incidence in countries such as Africa, Asia and South America, in which Brazil stands out as an endemic area. It consists of a parasitic disease of water transport, being caused by *Schistosoma mansoni* trematode. In its evolutionary cycle, the human being is considered the main reservoir and its intermediate hosts are mollusks of the species *Biomphalaria glabrata*, due to their great adaptability, favorable biological characteristics to the development of helminth, as well as wide geographic distribution. Because it is considered an important public health problem, the World Health Organization (WHO) advocates the control of the intermediate host, through the use of molluscicides, as a complementary strategy to combat schistosomiasis, thus interrupting the evolutionary cycle of the parasite as well as the proliferation of the disease. Niclosamide is the only molluscicide of synthetic origin recommended by WHO, however, due to its biocidal action and great cost of transport of the same, it is interesting to research and develop new plant-derived molluscidal drugs origin that are selective for *Biomphalaria* species and less aggressive to the aquatic ecosystem. The present work has as main objective to evaluate the potential plant extracted molluscicides against molluscs *Biomphalaria glabrata*. The plant extract of the glandular lavage of *Achyrocline satureioides* was evaluated in an acute toxicity test at concentrations less or equal than 25 µg.mL⁻¹, where it was possible to obtain DL90 and LD50. The molluscs that survived the exposure to the extract were submitted to a test of ovoposition and counting of viable eggs, where there was a reduction both in the number of spawnings as well as in the number of molluscs originated, showing the viability of its use as a vegetable molluscicide.

Keywords: molluscicides, *Biomphalaria glabrata*, Schistosomiasis, *Achyrocline satureioides*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01	<i>Schistosoma mansoni</i>	15
Figura 02	Distribuição mundial da Esquistossomose.....	17
Figura 03	- Ciclo biológico do <i>Schistosoma mansoni</i>	19
Figura 04	Distribuição espacial da <i>Biomphalaria glabrata</i> no Brasil.....	20
Figura 05	Molusco da espécie <i>Biomphalaria glabrata</i>	21
Figura 06	Coleções hídricas de desenvolvimento natural e habitat dos moluscos da espécie <i>B. glabrata</i>	21
Figura 07	Inflorescências da <i>A. satureioides</i> (Lam) DC, em seu habitat natural.....	24
Figura 08	Tubos utilizados na realização do teste de toxicidade aguda.....	27
Figura 09	Caramujos da concentração de 22,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, demonstrando nítida retração da massa cefalopodal e discreta liberação de hemolinfa.....	31
Figura 10	Gráfico da atividade do extrato de lavado glandular de <i>A. satureioides</i> nos grupos AS 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, AS 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, AS 22,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ comparada aos grupos controle negativo 1 (CN1) e controle negativo 2 (CN2) sobre o número de ovos em moluscos da espécie <i>Biomphalaria glabrata</i> , no período de 15 dias.....	33

LISTA DE QUADROS

Quadro 01	Preparo das concentrações de 10, 20, 22,5 e 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, a partir da solução estoque de 10 mg.mL^{-1} , para realização do ensaio de toxicidade aguda.....	28
Quadro 02	Resultados da exposição de moluscos <i>B. glabrata</i> ao extrato do lavado glandular de <i>A. saturoioides</i> (AS).....	30
Quadro 03	Avaliação da ovoposição de moluscos expostos ao extrato vegetal de <i>A. saturoioides</i> nas concentrações de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 22,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, comparados aos grupos controle negativo.....	34
Quadro 04	Comparativo entre a quantidade de ovos viáveis e características dos moluscos originados.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AS	<i>Achyrocline satureioides</i> (Lam) D. C.
CN1	Controle Negativo 1
CN2	Controle Negativo 2
DL50	Dose Letal Mediana
DL90	Dose Letal de 90%
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
HPJ	Método de Sedimentação Espontânea de Hoffmann, Pons, Janer
IF	Imunofluorescência
IgG	Imunoglobulina G
NIPPAN	Núcleo de Identificação e Pesquisa de Princípios Ativos Naturais
OMS	Organização Mundial de Saúde
OXA	Oxamniquina
PCE	Programa de Controle da Esquistossomose
PZQ	Praziquantel
RPOV	Reação Peri-ovular
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA.....	14
2.1.1	Epidemiologia	17
2.1.2	Ciclo Biológico de <i>Schistosoma mansoni</i>	18
2.2	HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO.....	19
2.3	MOLUSCIDAS.....	22
2.3.1	Moluscidas vegetais	22
2.3.1.1	<i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) D. C	23
3	OBJETIVOS	25
3.1	OBJETIVO GERAL.....	25
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
4	MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1	MATERIAL VEGETAL.....	26
4.2	MOLUSCOS.....	26
4.3	TESTE DE TOXICIDADE AGUDA.....	26
4.4	ENSAIO DE AVALIAÇÃO DA OVOPOSIÇÃO DOS MOLUSCOS.....	28
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
4.6	AVALIAÇÃO DOS OVOS VIÁVEIS.....	29
5	RESULTADOS	30
5.1	TESTE DE TOXICIDADE AGUDA.....	30
5.2	AVALIAÇÃO DA OVOPOSIÇÃO DOS MOLUSCOS SOBREVIVENTES...	32
5.3	AVALIAÇÃO DOS OVOS VIÁVEIS.....	35
6	CONCLUSÃO	38
	REFERÊNCIAS.....	39

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose corresponde a uma das doenças infectoparasitárias mais prevalentes no mundo, afetando cerca de 200 milhões de pessoas em 74 países. Ocorre predominantemente em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, e sua alta prevalência está intimamente ligada ao saneamento básico deficiente e a presença de moluscos hospedeiros (VITORINO *et al.*, 2012; BRASIL, 2014).

A esquistossomose mansônica é uma doença de veiculação hídrica, causada por helmintos trematódeos da espécie *Schistosoma mansoni*, cujos hospedeiros intermediários de maior interesse são moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata*, devido a sua grande distribuição geográfica, eficiência de transmissão e capacidade adaptativa. A doença é endêmica em grande parte do território brasileiro e configura um grave problema de saúde pública, uma vez que, além de acometer milhões de pessoas, causa um número expressivo de formas graves e óbitos (BRASIL, 2014; ROCHA *et al.*, 2016).

Por possuir um mecanismo de transmissão complexo e diversos fatores condicionantes, o controle da esquistossomose depende não só do diagnóstico precoce, tratamento oportuno e educação em saúde, mas também de ações de saneamento e do controle dos hospedeiros intermediários. A erradicação da doença se dá através da interrupção do ciclo evolutivo do parasito e a eliminação do hospedeiro intermediário (caramujo), tornando-se indispensável para que não haja evolução da mesma (BRASIL, 2014; ROCHA *et al.*, 2016).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) preconiza como um dos procedimentos para o controle da esquistossomose, a utilização de moluscidas em áreas onde há grande risco de infecção pela doença (KING *et al.*, 2015).

A niclosamida, o moluscida recomendado pela OMS, é de origem sintética e embora apresente grande efetividade no controle dos hospedeiros intermediários, apresenta também baixa seletividade, alto custo e possibilidade de desenvolvimento de mecanismos de resistência pelos moluscos. Desta forma, a busca por moluscidas de origem vegetal e de baixo custo tem aumentado consideravelmente nos últimos anos (MATAL *et al.*, 2011; PEREIRA FILHO *et al.*, 2014; COELHO & CALDEIRA, 2016).

Os ensaios de toxicidade aguda são utilizados com a finalidade de avaliar a toxicidade de uma substância frente ao organismo testado em um período de exposição pré-determinado. Alguns critérios de avaliação são considerados durante este teste, tais como mortalidade ou

imobilidade dos organismos-teste, tornando possível assim, calcular os valores de Dose Letal Mediana (DL50) e de Dose Letal 90% (DL90) (DAMATO & BARBIERI, 2011).

Tendo em vista a importância do controle da esquistossomose bem como a necessidade de se obter produtos naturais com ação moluscicida e de baixo custo, este trabalho foi desenvolvido com objetivo de realizar a análise da atividade moluscicida do extrato do lavado glandular da espécie vegetal *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C., levando em consideração a capacidade de sobrevivência e ovoposição de *B. glabrata* quando em contato com o este extrato.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA

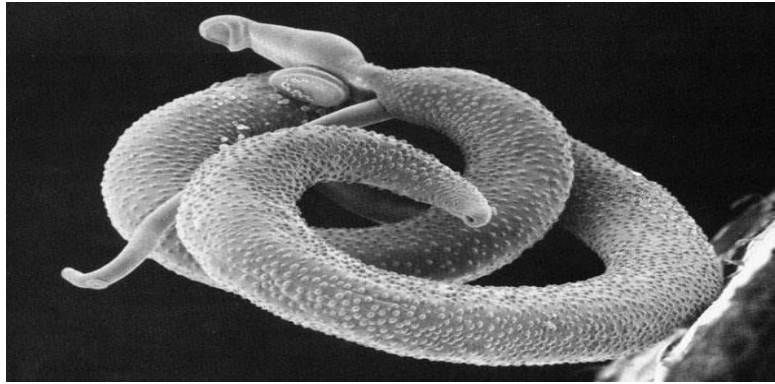
Classificada como uma doença negligenciada ou tropical, a esquistossomose afeta predominantemente as populações mais pobres em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, devido a falta de acesso à água tratada e infraestrutura sanitária adequada. A ausência de investimento em pesquisas para erradicação da doença, bem como a falta de interesse da indústria farmacêutica devido ao baixo retorno financeiro, faz com que haja a perpetuação desta doença (WERNECK; HASSELMANN; GOUVÊA, 2011).

Acredita-se que tenha sido introduzida no Brasil no período colonial, com a vinda de escravos africanos principalmente na região nordeste. O primeiro registro da infecção no país foi realizado na Bahia, em 1908. O trematódeo foi assim batizado em homenagem a achados semelhantes de Manson em portadores da infecção na África (COURA & AMARAL, 2004; BRASIL, 2014).

Diversos fatores influenciam na disseminação da esquistossomose pelo país. Dentre estes, podemos citar como mais relevantes a migração populacional para áreas endêmicas, a longevidade de vida dos vermes adultos (podendo chegar a décadas), a grande capacidade de postura de ovos pelas fêmeas, a existência de portadores assintomáticos, que dessa forma, continuam excretando ovos por longos períodos, a ampla distribuição de hospedeiros intermediários, falta de higiene e a precariedade no tratamento da água, bem como saneamento básico ausente ou deficiente (BRASIL, 2008; BRASIL, 2014).

A esquistossomose mansônica, também conhecida como barriga d'água, xistosa ou doença do caramujo (COURA & AMARAL, 2004), é uma doença infectoparasitária causada pelo trematódeo digenético denominado *Schistosoma mansoni* (família *Schistosomatidae*, gênero *Schistosoma*) (BRASIL, 2014; GOMES *et al.*, 2016) apresentado na Figura 01.

Figura 01. *Schistosoma mansoni*.



Fonte: SOARES, 2013.

O *S. mansoni* possui dois hospedeiros: os caramujos do gênero *Biomphalaria* e o homem (BRASIL, 2014). O homem é denominado hospedeiro definitivo ou reservatório, pois após contaminado, possui as formas adultas sexualmente diferenciadas deste helminto alojadas nos vasos mesentéricos, permitindo a eliminação de seus ovos juntamente com as fezes de forma contínua. Já os caramujos são denominados hospedeiros intermediários, uma vez que liberam larvas infectantes em coleções de água doce, que podem penetrar na pele ou mucosa de outros indivíduos, infectando-os. A transmissão da doença ocorre mediante ao contato humano com as formas infectantes do parasito, reforçando assim, a necessidade do hospedeiro intermediário para propagação da doença (RODRIGUES JUNIOR *et al.*, 2017).

As três espécies de hospedeiros envolvidos na transmissão da doença no Brasil são: *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila* (BRASIL, 2014). Entretanto, a espécie *Biomphalaria glabrata* é a mais relevante, uma vez que é mais adaptada à transmissão e tem sua distribuição geográfica mais ampla (PEREIRA FILHO, 2014).

Os indivíduos infectados podem permanecer assintomáticos ou apresentarem sintomas característicos ao estágio de desenvolvimento do parasito. Clinicamente, a esquistossomose pode ser classificada em: **Fase aguda**, que compreende a Dermatite Cercariana (corresponde à fase de penetração das cercarias na pele e os sintomas são dermatite urticariforme, eritemia e prurido) e a esquistossomose aguda ou febre de Katayama (normalmente ocorre após três a sete semanas de exposição e é caracterizada por febre, anorexia, dor abdominal, diarreia, vômitos e tosse seca; ao exame físico, pode ser encontrado hepatoesplenomegalia) ou **Fase crônica**, que compreende a esquistossomose crônica (esta fase pode se iniciar a partir de 6 meses após a infecção, onde a doença progride para diversos órgãos alcançando altos graus de severidade, podendo causar, por exemplo, hipertensão pulmonar e portal, fibrose perivascular, ruptura de varizes do esôfago e morte) (SOUZA *et al.*, 2011).

O diagnóstico clínico da esquistossomose mansônica normalmente é demorado e dificultado, devido a presença de sintomas inespecíficos, fazendo com que esta se assemelhe a muitas outras doenças. Portanto, além de ser levantado o histórico geográfico do paciente, para analisar possíveis exposições a áreas endêmicas, devem ser realizados também exames laboratoriais por meio de métodos diretos e indiretos ou exames de imagem, para confirmar o diagnóstico (VITORINO *et al.*, 2012).

Os métodos diretos consistem na visualização de ovos do parasito nas fezes ou na demonstração de antígenos circulantes do mesmo. Dentre estes, podemos citar os exames parasitológicos: a) o método Kato-Katz, que é um exame quantitativo e por isso, permite inferir a carga parasitária (contagem de ovos por grama de fezes), sendo recomendado pela OMS, devido a sua alta sensibilidade, rapidez e facilidade de execução (SOUZA *et al.*, 2011; BRASIL, 2014); b) o método de Sedimentação Espontânea ou Hoffman, Pons e Janer (HPJ), consiste em um método qualitativo, que permite identificar os ovos e diferencia-los em viáveis e não viáveis; c) a técnica de eclosão de miracidios, onde as fezes são colocadas em um recipiente próprio, contendo água morna, e à exposição da luz, com a finalidade de acompanhar a saída dos miracidios dos ovos que por ventura possam existir na amostra (VITORINO *et al.*, 2012).

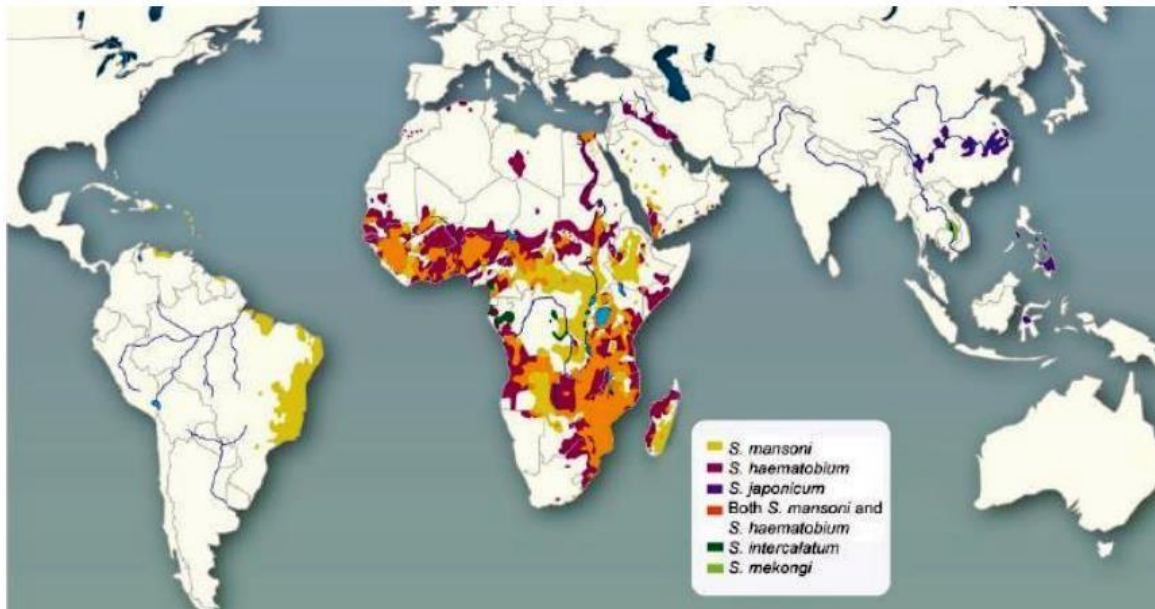
Já os métodos indiretos são baseados em reações antígeno-anticorpo, como exemplo, temos o ensaio imunoenzimático (ELISA), imunofluorescência (IF) e reação peri-ovular (RPOV). O ELISA é a técnica mais utilizada e baseia-se anticorpos na pesquisa dos anticorpos IgG (VITORINO *et al.*, 2012).

Para o tratamento clínico da esquistossomose, são utilizados os fármacos Oxamniquina (OXA) ou Praziquantel (PZQ). Ambos são bem tolerados e de baixa toxicidade. Normalmente, o PZQ é o fármaco de escolha devido ao menor custo do tratamento. O OXA, embora bastante difundido, permite o desenvolvimento de resistência às linhagens subsequentes do parasito (BRASIL, 2014). Outras características particulares do Oxamniquina são: sua atividade apenas em infecções causadas por *S.mansoni*, com maior em vermes machos, embora atrapalhe a ovoposição nas fêmeas (GALVÃO, 2010) e a presença de efeitos colaterais no Sistema Nervoso Central, efeitos mutagênicos e carcinogênicos. Por estes motivos, no Brasil, o Praziquantel tem sido utilizado como fármaco de escolha (VITORINO *et al.*, 2012).

2.1.1 Epidemiologia

A esquistossomose mansônica é uma doença tropical, sendo a segunda parasitose de maior disseminação no mundo, estando atrás apenas da malária (BRASIL, 2014). É registrada em mais de 70 países espalhados pelo mundo, afetando mais de 200 milhões de pessoas e estima-se que haja outros 700 milhões vivendo em áreas endêmicas (VITORINO *et al.*, 2012).

Figura 02. Distribuição mundial da Esquistossomose.



Fonte: WEERAKOON *et al.*, 2015.

Nas Américas, é encontrada no Brasil, Venezuela, Ilhas do Caribe e Suriname, sendo o Brasil, o que possui a maior área endêmica, configurando então um importante problema de saúde pública. (BARBOSA *et al.*, 2016)

Estima-se que a Esquistossomose mansônica no Brasil acometa cerca de 6 milhões de indivíduos e que outros 25 milhões estejam sob risco de contrair a doença (QUITES *et al.*, 2016). Esta atinge 19 unidades federativas, sendo mais expressiva nas regiões nordeste e sudeste, o que se justifica pela maior presença de moluscos transmissores (BRASIL, 2014).

No estado de Minas Gerais, há aproximadamente 10 milhões de pessoas vivendo em áreas endêmicas, sendo que em 61% dos municípios do estado, há transmissão ativa da esquistossomose (BRASIL, 2014; QUITES *et al.*, 2016).

O Ministério da Saúde propõe tratar as comunidades pertencentes às áreas de maior risco, buscando reduzir a transmissão da infecção e suas possíveis complicações e intensificar a busca de melhorias nas condições de saneamento. Em nível estadual, o Programa de

Controle da Esquistossomose (PCE) é responsável por capacitar e dar suporte aos municípios nas ações que envolvem o diagnóstico e tratamento da infecção, além de identificar focos de moluscos vetores. É competência ainda deste programa, incentivar as ações de controle e a mobilização social (BARBOSA *et al.*, 2012).

2.1.2 Ciclo biológico de *Schistosoma mansoni*

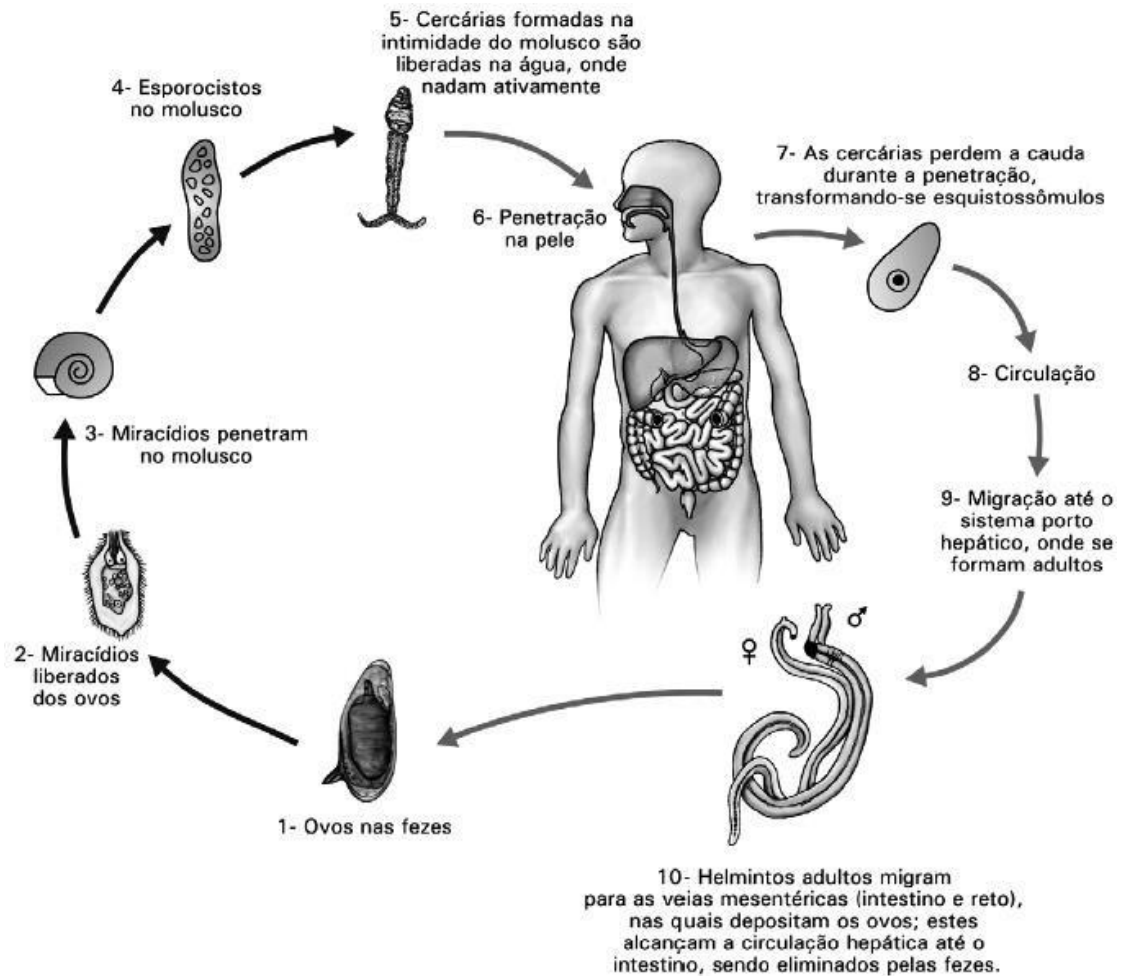
O agente causador da esquistossomose (*Schistosoma mansoni*) é um platelminto da classe dos trematódeos, que apresenta dimorfismo sexual, sendo o a fêmea maior e mais cilíndrica (VITORINO *et al.*, 2012). Este verme possui coloração esbranquiçada e parasita acasalado nas veias mesentéricas. A fêmea encontra-se abrigada no canal ginecóforo do macho, de onde realiza a postura de, em média, 300 ovos por dia, que após estarem maduros são liberados junto com as fezes (BRASIL, 2014).

O ciclo biológico do *S. mansoni*, representado na Figura 03, é heterógeno, ou seja, possui uma fase sexuada que ocorre no hospedeiro definitivo (homem) e uma fase assexuada, que ocorre no hospedeiro intermediário (caramujo) (SOUZA *et al.*, 2011).

As fezes de indivíduos infectados são liberadas em locais contendo água doce (rios, lagoas) juntamente com os ovos viáveis de *S. mansoni*. Ao encontrarem condições favoráveis de luminosidade, temperatura e oxigenação, o parasito eclode do ovo, havendo a liberação de miracídios (larvas ciliadas) que irão infectar caramujos do gênero *Biomphalaria*. Ao penetrar no caramujo, o miracídio perde a cauda e transforma-se em esporocisto primário, cujas células germinativas se multiplicam e dão origem a esporocistos secundários. Cada miracídio é capaz de gerar 300 mil cercarias. Desta forma, após 4 ou 6 semanas de infecção, com incidência de alta luminosidade e temperatura, o caramujo libera as cercarias na água (SOUZA *et al.*, 2011; BRASIL, 2014).

Ao entrar em contato com a pele ou com a mucosa do homem, as cercarias penetram, causando irritação local. Neste momento, perdem a cauda e transformam-se em esquistossômulos, que atingem a circulação sanguínea e/ou a linfática, podendo chegar ao coração e pulmão. Contudo, é no sistema intra-hepático que estes vermes se tornam adultos e diferenciados. Após, migram para os vasos mesentéricos, dando origem a sua ovoposição próxima aos capilares intestinais. Desta forma, os ovos são eliminados junto com as fezes, dando continuidade ao ciclo (SOUZA *et al.*, 2011).

Figura 03. Ciclo biológico de *Schistosoma mansoni*.



Fonte: SOUZA *et al.*, 2011.

2.2 HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO

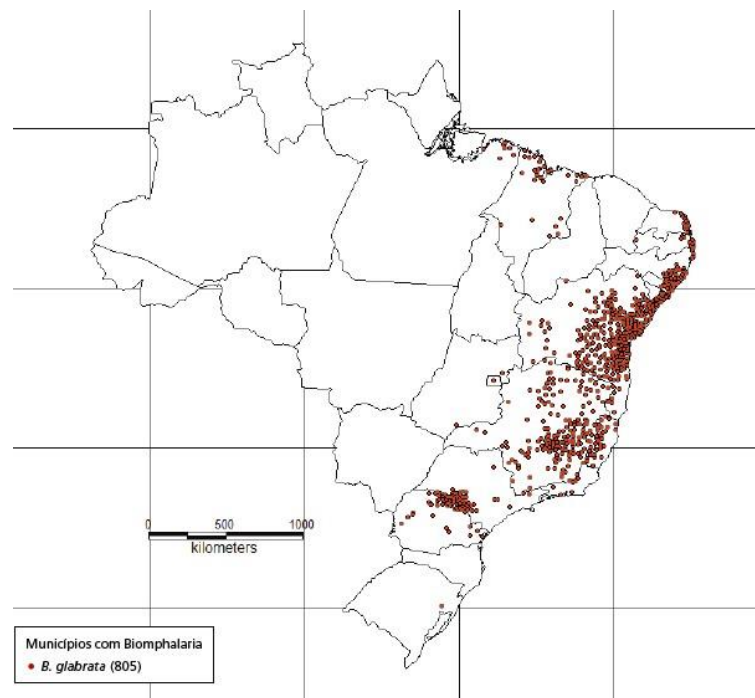
A presença de hospedeiros intermediários é uma condição indispensável para a manutenção e desenvolvimento de todo o ciclo biológico do parasito. Os caramujos do gênero *Biomphalaria* constituem os hospedeiros intermediários naturais do *S. mansoni* no Brasil e pertencem a família *Planorbidae*, gastrópodes pulmonados que habitam preferencialmente coleções de água doce lânticas (lagos, poços, córregos). Moluscos destes gêneros são amplamente distribuídos no Caribe, sudoeste da Ásia, África, América Central e Brasil (BRASIL, 2014).

No Brasil, dentre as dez espécies encontradas, apenas três são consideradas naturalmente infectadas pelo *S. mansoni*: *Biomphalaria tenagophila*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria glabrata*, sendo esta última, com maior relevância epidemiológica devido a

sua maior distribuição geográfica e capacidade de adaptação (OLIVEIRA-FILHO, 2003; BRASIL, 2014).

A espécie *B. glabrata* pode ser encontrada em 16 estados brasileiros: Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, São Paulo e Sergipe, além do Distrito Federal, como pode ser visto na Figura 04 (BRASIL, 2014).

Figura 04. Distribuição espacial da *Biomphalaria glabrata* no Brasil.



Fonte: BRASIL, 2014.

A identificação da espécie (Figura 05) é realizada anatomicamente, a partir das características da sua concha e do trato genital feminino e masculino. Normalmente, a concha mede de 20-40 mm de diâmetro, com 5-8 mm de largura, superfície lisa, sem opérculo e com, no máximo, sete giros arredondados. Além disso, apresentam uma massa cefalopédica exposta, um par de tentáculos, cavidade anal e cavidades genitais masculinas e femininas independentes, sendo assim, hermafroditas, podendo se reproduzir por fecundação cruzada ou por autofecundação (OLIVEIRA-FILHO, 2003; TUNHOLI *et al.*, 2016).

Figura 05. Molusco da espécie *Biomphalaria glabrata*.



Fonte: Elaborado pela autora.

Ambientes aquáticos ricos em substâncias orgânicas e plantas é o habitat natural dos caramujos. Como são preferencialmente seres de ambientes úmidos, em situações de seca, utilizam sua concha como mecanismo de sobrevivência e se mantem em estado fisiológico vegetativo. O aumento da população de *Biomphalaria* é dependente do clima e da fauna existente e sua distribuição é considerada como fator primordial para a transmissão da esquistossomose (OLIVEIRA, 2017).

Figura 06. Coleções hídricas de desenvolvimento natural e habitat dos moluscos da espécie *B. glabrata*.



Fonte: RODRIGUES *et al.*, 2017 (ADAPTADO).

2.3 MOLUSCICIDAS

Os moluscicidas foram substâncias inicialmente utilizadas para combater caramujos e moluscos que se alimentavam de plantas na agricultura, entretanto, no âmbito da saúde pública, sua utilização tem uma importância fundamental, uma vez que podem ser utilizados como controles de parasitas vetores, principalmente na esquistossomose (OLIVEIRA-FILHO, 2003).

Segundo a OMS, a associação entre a quimioterapia, educação sanitária e controle do caramujo transmissor mediante a utilização de moluscicidas são as estratégias mais eficazes para controle dessa parasitose (OLIVEIRA-FILHO, 2003, CATANHEDE *et al.*, 2010). Estas substâncias, que podem ser de origem natural ou sintética, agem interrompendo o ciclo evolutivo do *S. mansoni*, e conseqüentemente, o ciclo de transmissão deste trematódeo. É importante observar que sua eficácia pode ser reduzida, tanto devido à resistência adquirida pelos moluscos em relação as drogas escolhidas, como por condições físico-químicas do ambiente onde serão utilizadas (CATANHEDE *et al.*, 2010).

A OMS especifica ainda um *screening* de moluscicidas, onde há a análise da mortalidade dos caramujos mediante a realização de testes de toxicidade aguda, que permite obter a dose letal mediana (DL50) e 90% (DL90), dados em ppm ou $\mu\text{g.mL}^{-1}$, a fim de se avaliar efeitos deletérios provocados pela droga. A maioria destes ensaios são realizados com moluscos da espécie *B. glabrata*, onde analisam diversos fatores, desde aqueles que causam morte tecidual, bem como os que levam a produção de substâncias devido ao estresse (WHO, 2017).

2.3.1 Moluscicidas vegetais

Embora haja no mercado diversos tipos de moluscicidas sintéticos e que sejam de fato efetivos (como exemplo a niclosamida, único moluscicida vegetal indicado pela OMS), estes possuem também uma grande ação biocida, fazendo com que haja a necessidade de se investir em moluscicidas eficientes, mas ecologicamente aceitáveis (OLIVEIRA-FILHO, 2003).

Os moluscicidas naturais são uma alternativa eficaz, barata e menos agressiva, tanto para o homem quanto para a natureza, e devido a biodiversidade vegetal encontrada no país, a pesquisa de substâncias ativas vem crescendo gradualmente (OLIVEIRA-FILHO, 2003). A OMS preconiza a utilização de plantas com atividade moluscicida, mas que não afetem o equilíbrio do meio ambiente. Portanto, para atender às exigências econômicas e ecológicas,

estes moluscicidas de origem vegetal devem ter ação seletiva, serem viáveis, de fácil aplicação e custo reduzido, diferenciando-se dos sintéticos que além de onerosos, podem acarretar toxicidade em organismos não alvos (ALCANFOR *et al.*, 2001). Além de destruir o vetor causador da parasitose, uma importante característica do moluscicida é sua capacidade letal sobre as desovas dos caramujos (RUIZ, *et al.*, 2005).

Para que uma planta seja considerada como um moluscicida viável, são necessárias algumas características, como: concentração menor que $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ obtida de extrato bruto de qualquer componente, elevada atividade moluscicida, planta de fácil cultivo e crescimento abundante em áreas endêmicas, flores e folhas serem preferencialmente utilizadas, baixa toxicidade para organismos não alvos, procedimento de aplicação simples e seguro, dentre outras (DAMATO & BARBIERI, 2011).

2.3.1.1 *Achyrocline satureioides* (Lam.) D. C

A *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C., pertencente à família *Asteraceae*, é uma planta anual, popularmente conhecida como “marcela-do-campo”, “marcela”, “macela”, “macelinha”, “camomila nacional”, “alecrim-de-parede” e “yatei-caá”(em Tupi-guarani). É originária da América do Sul, ocorrendo em quase todo o território Brasileiro (exceto na Amazônia) e em países vizinhos como Argentina, Uruguai, Paraguai, Venezuela, Colômbia, Bolívia e Peru (MOTA *et al.*, 2011; RETTA *et al.*, 2012).

É uma planta herbácea, como mostrada na Figura 07, que possui aproximadamente 1 metro de altura, caules, ramos e folhas cobertos por pilosidades esbranquiçadas, folhas lineares com largura de até 1,5 cm e 10-15 cm de comprimento, flores em número de 5-10, reunidas em inflorescência do tipo capítulo e de coloração amarela-clara, localizadas no ápice da planta. Possui ainda fruto do tipo aquênio de aproximadamente 0,5 cm (BARATA *et al.*, 2009; ZAMPIERON, 2010)

Figura 07. Inflorescências da *A. satureioides* (Lam) DC, em seu habitat natural.



Fonte: RETTA *et al.*, 2012.

É considerada uma planta invasora, devido a capacidade de se desenvolver em solos arenosos, pedregosos, montanhosos ou planos e até mesmo em regiões próximas ao mar. Desta forma, pode ser encontrada em terrenos baldios, pastagens, campos agrícolas abandonados, entre outros (BARATA *et al.*, 2009; ZAMPIERON, 2010; RETTA *et al.*, 2012). Na medicina popular, sua utilização é indicada para problemas digestivos, males do fígado e epilepsia. Apresenta também atividade anti-inflamatória, antiespasmódica, calmante, carminativa, sedativa, emenagoga e contra prisão de ventre, comprovadas através de estudos farmacológicos (ZAMPIERON, 2010).

A análise fitoquímica, demonstra que esta planta é rica em flavonoides, principalmente quercetina, luteolina e 3-O-metilquercetina, compostos com conhecida atividade antioxidante e consideradas promissoras para o desenvolvimento de drogas anticancerígenas. Há a presença também de monoterpenos e sesquiterpenos em quantidade considerável, de saponinas triterpênicas, carotenoides, polissacarídeos, cumarinas e lactonas. Os extratos obtidos, além desses compostos, possuem polifenóis como ácido cafeico, ácido clorogênico e isoclorogênico (BARATA *et al.*, 2009; RETTA *et al.*, 2012; BALDISSERA *et al.*, 2014; VIEIRA *et al.*, 2015)

Diversos estudos experimentais, com diferentes extratos e frações purificadas das inflorescências, folhas e caules tem sido realizados, tanto *in vitro* como *in vivo* e demonstram resultados promissores também para as atividades repelente, anti-proliferativa, hipoglicemiante, imunomodulatória, antiviral e antimicrobiana (BARATA *et al.*, 2009). Dessa forma, o grande volume de estudos publicados e os resultados positivos relatados, refletem o potencial indubitável dessa planta (RETTA *et al.*, 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade moluscicida e moluscostática do extrato do lavado glandular de *Achyrocline satureioides* (Lam.) D. C. sobre *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade moluscicida e moluscostática do extrato do lavado glandular de *Achyrocline satureioides* (Lam.) D. C. em diferentes concentrações sobre moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata*;
- Avaliar a influência do extrato vegetal na ovoposição dos moluscos resistentes;
- Avaliar a influência do extrato vegetal na viabilidade das desovas;
- Determinar a dose letal mediana (DL50) e a dose letal de 90% (DL90).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

O extrato do lavado glandular da *Achyrocline satureioides* (Lam) D. C. foi disponibilizado pelo Professor Doutor Ademar Alves da Silva Filho, coordenador do Núcleo de Identificação e Pesquisa de Princípios Ativos Naturais (NIPPAN) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

O material vegetal foi coletado no horto da Faculdade da Farmácia da UFJF, em que suas partes aéreas foram lavadas com 700 mL de diclorometano:etanol (1:1 v/v) durante 10 segundos, a temperatura ambiente, com a finalidade de extrair os metabólitos secundários existentes nos tricomas glandulares da planta citada. Após a lavagem, a solução em diclorometano:etanol foi evaporada em rotavapor, fornecendo 0,0339 g do seu extrato.

4.2 MOLUSCOS

Foram utilizados moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata*, livres de infecção por *S. mansoni* e foram mantidos no Moluscário da Faculdade de Farmácia da UFJF. Os mesmos foram acondicionados em recipientes plásticos sem tampa, com água declorada, onde a alimentação diária foi realizada com alface fresca (*Lactuca sativa*) previamente lavada, e a troca de água, bem como a remoção das excretas, realizada a cada quatro dias. Desta forma, foram mantidas as condições hídricas necessárias para o desenvolvimento destes espécimes. Em cada recipiente, foi colocado um pequeno substrato (isopor), a fim de que este facilitasse e estimulasse a ovoposição, sendo necessária sua troca quando houvesse o acúmulo de 8 massas de ovos, e então, sua transferência para um criadouro (berçário) de caramujos.

Durante o experimento, foram utilizados caramujos adultos, com tamanho médio da concha de 1,2 cm (variando de 0,9 a 1,5 cm) e um termostato Roxin HT-19 para manter a temperatura de acondicionamento em torno de 25 °C.

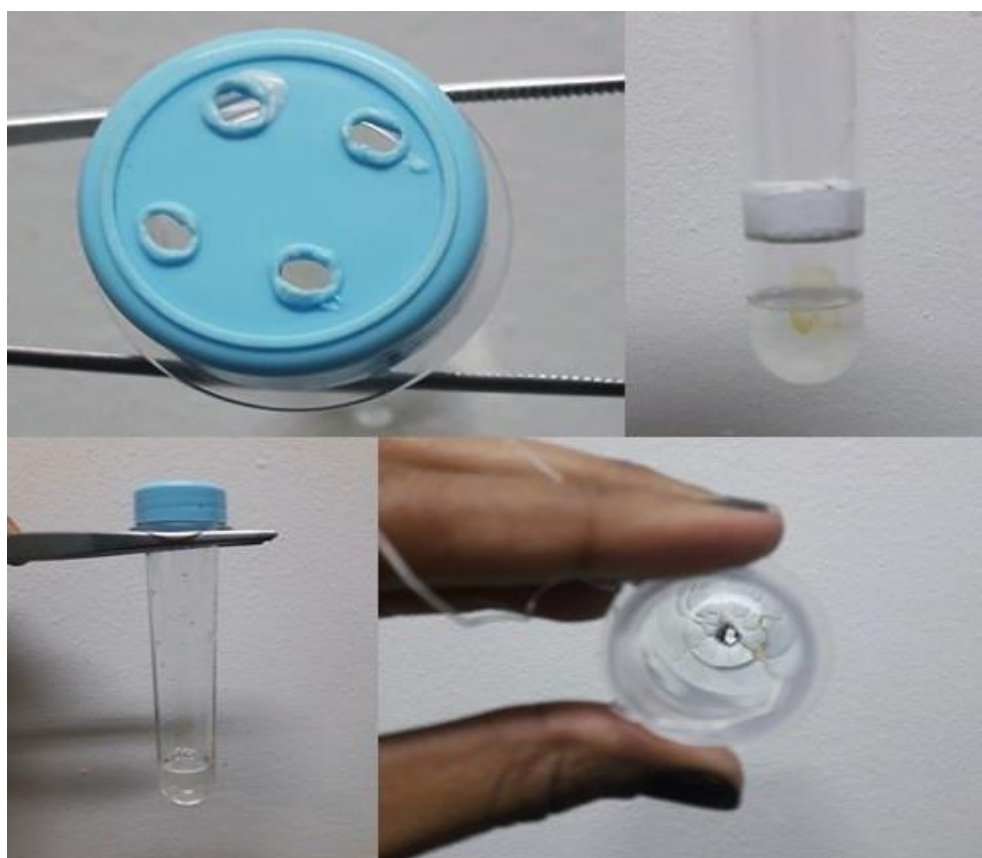
4.3 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA

A avaliação da atividade moluscicida dos extratos vegetais foi baseada em recomendações de Silva e colaboradores (2008), com algumas modificações.

Após a obtenção do espécime vegetal, seguiu-se com a realização da diluição de 10 mg do extrato vegetal de *Achyrocline satureioides* em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), chegando então a uma solução estoque de concentração igual a 10 mg.mL^{-1} .

Para a realização do teste de toxicidade aguda, foram utilizados tubos plásticos transparentes (Figura 08), com tampa de rosca que apresentava quatro furos, afim de permitir a passagem de ar e um aparado feito de borracha, que possuía um furo central grande, que tinha por finalidade evitar a subida dos moluscos pelo tubo, sem comprometer sua oxigenação.

Figura 08. Tubos utilizados na realização do teste de toxicidade aguda.



Fonte: Imagem elaborada pela própria autora, 2018.

Foram preparadas as concentrações de 10, 20, 22,5 e $25 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ a partir da solução estoque de 10 mg.mL^{-1} , selecionados grupos de três moluscos para cada concentração (triplicata) e diluídos em 3mL de água declorada, como mostra o Quadro 01 a seguir:

Quadro 01. Preparo das concentrações de 10, 20, 22,5 e 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, a partir da solução estoque de 10 mg.mL^{-1} , para realização do ensaio de toxicidade aguda.

Volume da solução estoque (μL)	Volume de água declorada - diluente (mL)	Concentração final ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
3,0	3,0	10
6,0	3,0	20
6,75	3,0	22,5
7,5	3,0	25

Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Foram utilizados dois controles negativos: o controle negativo 1, onde foi utilizado apenas água e o controle negativo 2, onde foi utilizado uma solução de DMSO.

O controle negativo 1 (CN1), foi obtido utilizando-se apenas 3 ml de água potável declorada, enquanto o controle negativo 2 (CN2), foi obtido utilizando-se de DMSO na proporção de 0,25% v/v, onde foram diluídos 7,5 μL de solução estoque (DMSO) em 3 mL de água potável declorada. Para que seja descartada a interferência deste diluente nos ensaios, a concentração da solução de DMSO utilizada está relacionada com uma quantidade de DMSO igual a maior presente nos extratos (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

O teste de toxicidade aguda teve a duração de 48 horas e se dividiu em duas etapas, com duração de 24 horas cada. Ambas foram realizadas em um tanque plástico transparente contendo água e um termostato Roxin HT-19, que permitiu manter a temperatura de acondicionamento em torno de 25 °C. Os tubos contendo o caramujo e as soluções foram imersos neste tanque e mantidos durante todo o procedimento.

Na primeira etapa do teste, houve a exposição dos moluscos tanto às soluções contendo diversas concentrações do extrato vegetal, como às soluções referentes aos controles negativos (CN1 e CN2). Posteriormente, os moluscos foram cuidadosamente lavados para remoção de quaisquer resquícios de extrato do mesmo e seguiu-se com a segunda etapa, onde estes foram novamente acondicionados em recipientes plásticos contendo 3 mL de água potável declorada, onde permaneceram até o final do teste.

4.4 ENSAIO DE AVALIAÇÃO DA OVOPOSIÇÃO DOS MOLUSCOS

Após decorrido o ensaio de toxicidade aguda do extrato vegetal, foi realizada a avaliação da ovoposição nos animais sobreviventes. Desta forma, foram divididos em 4

grupos, de acordo com as diluições e com denominação AS 10, AS 20, AS 22,5 e AS 25 ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $22,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente), além de dois grupos controle negativo, que não foram submetidos a droga vegetal, apenas à água potável declorada (CN1) e uma solução de DMSO na concentração de 0,25% v/v (CN2).

Após as 48 horas do teste de toxicidade aguda, os moluscos foram novamente lavados e transferidos para recipientes plásticos foscos, devidamente identificados e mantidos sob tratamento que garantisse condições semelhantes de sobrevivência. Em cada um, havia 400 mL de água declorada, que era renovada a cada 3 dias, substrato (isopor) para estimulação da ovoposição, além de serem alimentados diariamente com alface fresca e lavada.

O ensaio foi monitorado diariamente, durante 15 dias a contar do término do teste de toxicidade aguda. Os animais foram observados em relação a sua ovoposição, bem como suas atividades de maneira geral. A contagem de ovos foi realizada com auxílio de uma lupa, uma lanterna e uma pinça.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após realizado o ensaio de avaliação da atividade moluscicida, foram determinadas as doses letais DL90 e DL50 da *A. satureioides* frente ao molusco *B. glabrata* por meio do software BioStat®.

4.6 AVALIAÇÃO DOS OVOS VIÁVEIS

Após o ensaio de ovoposição, os moluscos adultos sobreviventes de cada concentração, foram transferidos para outro criadouro, restando apenas os substratos de isopor contendo os ovos. Este substrato foi mantido no mesmo recipiente durante 30 dias consecutivos, sendo realizada a renovação da água declorada a cada 3 dias, além de serem alimentados diariamente com alface fresca e lavada. Após estes 30 dias, foram contados os moluscos originados a partir dos sobreviventes de cada concentração, a fim de se obter quantos ovos foram viáveis.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA

O teste de toxicidade aguda foi realizado utilizando-se o extrato do lavado glandular de *A. satureioides* em diferentes concentrações e os resultados da exposição dos moluscos ao mesmo, estão descritos no quadro 2. Os grupos controle negativo foram denominados CN1 (água potável dechlorada) e CN2 (DMSO 0,25%), enquanto os grupos AS relacionam-se aos grupos testes, que foram avaliados nas concentrações de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 22,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Quadro 02. Resultados da exposição de moluscos *B. glabrata* ao extrato do lavado glandular de *A. satureioides* (AS).

Grupos testados	Total de espécimes utilizados	Morte aparente 24 horas (%)	Morte real 48 horas (%)
CN1	3	0	0
CN2	3	0	0
AS 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	3	0	0
AS 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	3	66,6 (2)	66,6 (2)
AS 22,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	3	66,6 (2)	66,6 (2)
AS 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	3	100 (3)	100 (3)

Fonte: Elaborado pela autora.

Nas concentrações de 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 22, $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, cerca de quatro horas após o contato inicial dos moluscos com as soluções testes, observou-se redução da motilidade e pequena retração da massa cefalopodal para dentro da concha em todos os

gastrópodes, enquanto os moluscos presentes na concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, não apresentaram mudança de comportamento e demonstraram-se ativos.

Após as primeiras 24 horas de exposição ao extrato, dois dos moluscos da concentração de $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e dois da concentração de $22,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, demonstraram 100% de morte aparente, em que era observada uma nítida retração da massa cefalopodal, ausência de motilidade, nenhuma resposta a estímulos e excretas, além de discreta liberação de hemolinfa, como pode ser observado na figura 09. Todos os moluscos da concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, embora estivessem vivos, apresentaram diminuição da resposta a estímulos em suas partes moles, bem como diminuição da motilidade.

Figura 09. Caramujos da concentração de $22,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, demonstrando nítida retração da massa cefalopodal e discreta liberação de hemolinfa.



Fonte: Elaborado pela própria autora.

Após o período de 48 horas do teste, que engloba 24 horas de exposição dos moluscos ao extrato vegetal e 24 horas em que os mesmos passaram pelo processo de recuperação, houve 100% de letalidade na concentração de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, demonstrando assim, a capacidade moluscicida do extrato. Tanto na concentração de $22,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, como na de $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$, houve 66,6% de letalidade, uma vez que apenas um molusco sobreviveu. Já na concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, todos encontravam-se vivos. Contudo, é importante destacar que os sobreviventes destas concentrações, apresentaram diminuição da motilidade, diminuição/baixa resposta à estímulos em suas partes moles e pequena quantidade de excretas na água. Estas alterações comportamentais sugerem reação própria destes moluscos frente a

um agente agressor, reforçando a atuação tóxica da *Achyrocline satureioides*, mesmo em baixa concentração.

O extrato do lavado glandular da planta mostrou DL90 igual a $24,0533\mu\text{g.mL}^{-1}$ e DL50 igual a $19,2364\mu\text{g.mL}^{-1}$, reforçando o resultado encontrado neste estudo, uma vez que a concentração de $10\mu\text{g.mL}^{-1}$ não foi capaz de causar letalidade, a de $22,5\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi capaz de causar 66,6% de letalidade, enquanto a de $25\mu\text{g.mL}^{-1}$, causou 100%.

Em um estudo semelhante utilizando extrato glandular de *Achyrocline satureioides* (Lam) D. C., desenvolvido por Alhadad (2017), também foram utilizadas as concentrações de $25\mu\text{g.mL}^{-1}$ e $10\mu\text{g.mL}^{-1}$ no teste de toxicidade aguda e os resultados encontrados foram os mesmos que neste trabalho: 100% e 0% de letalidade, respectivamente, no grupo de moluscos testados, entretanto, o valor de DL90 foi de $24,2\mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto no estudo aqui desenvolvido, a DL90 foi de $24,0553\mu\text{g.mL}^{-1}$ mostrando que, a quantidade de extrato a ser utilizado para causar a morte de 90% dos moluscos seria menor. Porém, estudos estatísticos seriam necessários para afirmar diferença significativa entre estes valores de dose letal 90%.

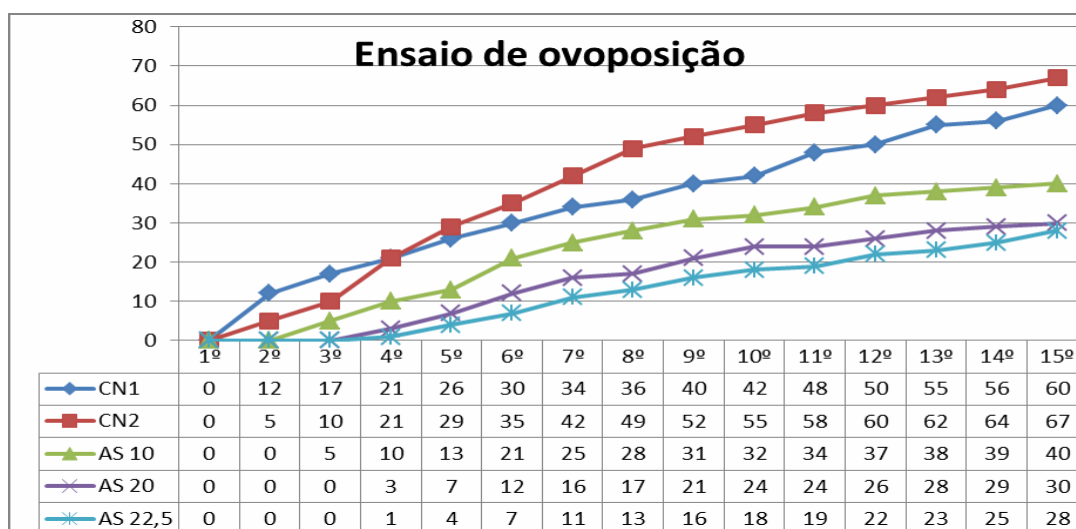
Outro trabalho desenvolvido por Lima (2016) sobre o extrato hidroalcoólico de raízes de *Aristolochia cymbifera* apresentou DL50 = $46,04\mu\text{g.mL}^{-1}$ e DL90 = $129,23\mu\text{g.mL}^{-1}$, não sendo considerado um moluscicida vegetal ideal de acordo com os critérios estabelecidos pela OMS (1983), onde o extrato vegetal bruto moluscicida ideal é aquele que apresenta DL90 igual ou menor a $100\mu\text{g.mL}^{-1}$ (CATANHEDE *et al.*, 2010). Isto mostra que, o extrato de *Achyrocline satureioides* se destaca, sendo considerado um moluscicida vegetal ideal, uma vez que, apresenta atividade moluscicida em concentrações bem abaixo (DL90= $24,0553\mu\text{g.mL}^{-1}$) do estabelecido pela OMS, minimizando a ocorrência de danos ao ecossistema aquático.

5.2 AVALIAÇÃO DA OVOPOSIÇÃO DOS MOLUSCOS SOBREVIVENTES

A atividade moluscicida de um extrato vegetal, pode ser avaliada mensurando seu impacto na ovoposição dos moluscos sobreviventes às suas menores concentrações (RUIZ *et al.*, 2005). Desta forma, foi realizado o ensaio de ovoposição, com duração de 15 dias, onde foram utilizados os moluscos sobreviventes nas concentrações de $10\mu\text{g.mL}^{-1}$ (AS 10), $20\mu\text{g.mL}^{-1}$ (AS 20) e $22,5\mu\text{g.mL}^{-1}$ (AS 22,5). Como nos grupos controle negativo 1, controle negativo 2 e AS 10 sobreviveram os 3 moluscos, enquanto nos demais (AS 20 e AS 22,5) sobreviveu apenas 1, o ensaio de ovoposição foi realizado utilizando apenas um molusco de cada grupo, com a finalidade de comparar proporcionalmente o número de ovos obtidos.

A contagem de ovos foi realizada diariamente (num intervalo de 24 em 24 horas), e os grupos das concentrações anteriores foram comparados aos grupos controle negativo 1 (CN1) e controle negativo 2 (CN2), como pode ser observado na figura 10.

Figura 10: Gráfico da atividade do extrato de lavado glandular de *A. saturoioides* nos grupos AS 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, AS 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, AS 22,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ comparada aos grupos controle negativo 1 (CN1) e controle negativo 2 (CN2) sobre o número de ovos em moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata*, no período de 15 dias.



Fonte: Elaborado pela autora.

A ovoposição ocorreu no segundo dia após o início do teste para os grupos CN1 e CN2, no terceiro dia para o grupo AS 10 e no quarto dia, para os grupos AS 20 e AS 22,5. O maior tempo para a postura de ovos nos grupos expostos anteriormente, pode estar relacionada às condições desfavoráveis em que se encontravam os moluscos desses grupos e o período necessário para reabilitação dos mesmos.

Após o início do ensaio de ovoposição, pôde-se observar uma redução das desovas dos moluscos dos grupos AS 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, AS 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e AS 22,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em comparação ao grupo CN1 e CN2 (DMSO 0,25%).

Em relação a contagem do número total de ovos ao final do décimo quinto dia, o grupo CN1 apresentou 60 ovos distribuídos em 8 massas, enquanto o grupo CN2 apresentou 67 ovos, distribuídos em 9 massas, demonstrando assim, que a presença de DMSO além de não causar letalidade, não afetou de forma exorbitante as desovas dos moluscos. Já o grupo AS 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, apresentou 40 ovos distribuídos em 6 massas, enquanto os grupos AS 20 e AS 22,5 apresentaram 30 e 28 ovos respectivamente, ambos distribuídos em 4 massas cada.

Constatou-se uma redução de 33%, 50% e 53% na contagem de ovos dos grupos AS 10, AS 20 e AS 22,5, respectivamente, quando comparados ao grupo controle negativo 1 (CN1) e de 40%, 55% e 58%, quando comparados ao grupo controle negativo 2 (CN2). Assim, em comparação com os dois grupos controle negativo, a capacidade de desova diminuiu mediante ao aumento da concentração do extrato testado. Isto demonstra que mesmo dias após a exposição dos moluscos ao extrato, não houve a recuperação total dos sobreviventes no que se refere a desova.

O Quadro 03 apresenta um comparativo entre as desovas dos quatro grupos e sua diminuição quando comparados aos grupos controle negativo, dados em porcentagem.

Quadro 03. Avaliação da ovoposição de moluscos expostos ao extrato vegetal de *A. saturoioides* nas concentrações de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $22,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, comparados aos grupos controle negativo.

Grupos	Número total de ovos	Número total de massas	Mínimo – Máximo de ovos por massa	Redução das desovas em comparação ao CN1 (%)	Redução das desovas em comparação ao CN2 (%)
CN1	60	8	6-10	-	-
CN2	67	9	7-12	-	-
AS 10	40	6	4- 8	33	40
AS 20	30	4	5-7	50	55
AS 22,5	28	4	4-8	53	58

Fonte: Elaborado pela autora.

Observou-se que as concentrações menores que $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do extrato de *A. saturoioides* não são capazes de causar 100% de letalidade, mas podem afetar a capacidade de desova, reforçando assim seu efeito tóxico frente aos moluscos da espécie *B. glabrata*.

5.3 AVALIAÇÃO DOS OVOS VIÁVEIS

Após o ensaio de ovoposição, foram obtidos, respectivamente 60, 67, 40, 30 e 28 ovos para os grupos CN1, CN2, AS 10, AS 20 e AS 22,5. Estes ovos foram mantidos nos criadouros durante 30 dias e receberam tratamento adequado para se desenvolverem normalmente. Decorridos os 30 dias, foram contados os moluscos provenientes das desovas.

No CN1, 60% das desovas geraram moluscos de fato, enquanto o percentual no grupo CN2, foi de 63%. Em ambos os grupos, os moluscos apresentaram tamanho homogêneo ($\pm 1,0$ cm para o grupo CN1 e $\pm 1,2$ cm para o grupo CN2), boa resposta a estímulos e ausência de comprometimento da motilidade. As diferenças encontradas nos dois grupos foram pequenas, sugerindo mais uma vez, ausência de impacto do DMSO nas desovas.

Já no AS 10, 15% dos ovos originaram moluscos, sendo que estes apresentaram diâmetro de concha menor quando comparados aos grupos controle negativo. Entretanto, a boa resposta a estímulos e a motilidade permaneceram preservadas. No grupo AS 20, apenas 7% dos ovos deram origem a novos moluscos, sendo que estes se apresentaram muito pequenos, com diâmetro de concha de aproximadamente 5 mm. No décimo sexto dia, os moluscos deste grupo já se encontravam mortos, apresentando nítida retração da massa cefalopodal. O grupo AS 22,5 foi o único em que não foram observados moluscos provenientes das ovoposições.

O Quadro 04 apresenta um comparativo entre a quantidade de ovos viáveis e características dos moluscos originados nos grupos teste e no controle negativo.

Quadro 04. Comparativo entre a quantidade de ovos viáveis e características dos moluscos originados.

Grupo	Número de ovos viáveis (n)	Percentual de ovos viáveis (%)	Tamanho médio de concha (cm)	Características
CN1	36	60	1,0	Boa resposta a estímulos em suas partes moles e boa motilidade.
CN2	42	63	1,2	Boa resposta a estímulos em suas partes moles e boa motilidade.
AS 10	6	15	0,9	Boa resposta a estímulos em suas partes moles e boa motilidade.
AS 20	2	7	0,5	Reduzida resposta a estímulos em suas partes moles e baixa motilidade. Morte aparente no 16º dia, confirmada no 30º dia.
AS 22,5	-	-	-	-

Fonte: Elaborado pela autora.

A alteração da capacidade de desova, bem como a diminuição do número de ovos viáveis, demonstra que os moluscos sobreviventes ao teste sofreram alterações irreversíveis, já que mesmo muitos dias após a exposição ao extrato, não houve a recuperação total dos mesmos.

Isto é relevante, pois na concentração de 20, embora o extrato tenha exercido 66,6% de letalidade, os moluscos originados, além de serem muito menores e menos resistentes, não sobreviveram mais de 15 dias. Já na concentração de 22,5, em que o extrato também exerceu 66,6% de letalidade, nenhum dos ovos foi capaz de originar novos moluscos. Desta forma, uma importante característica de uma substância moluscicida, foi encontrada neste extrato: a capacidade de ser letal tanto ao vetor causador da parasitose, como as desovas dos mesmos, justificando sua possível utilização como agente de controle do caramujo transmissor.

6 CONCLUSÃO

O extrato vegetal da espécie *Achyrocline satureioides* mostrou-se efetivo no teste de toxicidade aguda, levando a morte de 100% dos moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata* submetidos a concentração de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Segundo critérios da OMS (1983), a concentração indicada para um moluscicida ser considerado viável é igual ou menor a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, o que torna a espécie vegetal testada ser considerada um moluscicida vegetal viável. Nas concentrações de $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $22,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ houve uma redução significativa no número de desovas dos moluscos sobreviventes, bem como no número de ovos viáveis, mostrando ser letal tanto ao vetor causador desta parasitose como as desovas do mesmo, ratificando seu potencial de utilização como medida de controle do molusco vetor.

A concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ não causou letalidade nos moluscos, porém, foi capaz de alterar aspectos fisiológicos e comportamentais dos moluscos avaliados, além de diminuir o número de desovas destes, quando comparados aos grupos controle negativo (CN1 e CN2).

O metabólito responsável para atividade moluscicida da espécie vegetal em estudo, ainda não foi isolado, entretanto, acredita-se que esta atividade esteja relacionada à presença majoritária de quercetina presente nas partes aéreas de *A. satureioides*. Entretanto, são necessários estudos complementares para estabelecer detalhadamente sua ação moluscicida, bem como avaliados seu potencial de toxicidade aos ecossistemas aquáticos.

REFERÊNCIAS

ALCANFOR, J.D.X.; FERRI, P.H.; SANTOS, S.C.; BEZERRA, J.C.B. Plantas moluscicidas no controle dos caramujos transmissores da esquistossomíase, com ênfase na ação de taninos. **Revista de Patologia Tropical**, v. 30, n. 2, p. 167-176, 2001

BALDISSERA, M.D.; OLIVEIRA, C.B.; ZIMMERMANN, C.E.P.; BOLIGON, A.A.; ATHAYDE, M.L.; BOLZAN, L.P.; VAUXHER, R.A.; SANTURINO, J.M. SAGRILLO, M.R.; SILVA, A.S.; MONTEIRO, S.G. In Vitro Trypanocidal Activity of Macela (*Achyrocline satureioides*) Extracts against *Trypanosoma evansi*. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 52, n. 3, p. 311-315, 2014.

BARATA, L.E.S.; ALENCAR, A.A.J.; TASCONE, M.; TAMASHIRO, J. Plantas Medicinais Brasileiras. I. *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (Macela). **Revista Fitos**, v. 4, n. 1, p. 120-125, 2009.

BARBOSA, C.S.; GOMES, E.C.S.; CAMPOS, J.V.; OLIVEIRA, F.J.M.; MESQUITA, M.C.S.; DOMINGUES, A.C. Morbidity of mansoni schistosomiasis in Pernambuco—Brazil: Analysis on the temporal evolution of deaths, hospital admissions and severe clinical forms (1999–2014). **Acta Tropica**, n. 164, p. 10-16, 2016.

BARBOSA, V.S.; ARAUJO, K.C.; LEAL NETO, O.B.; BARBOSA, C.S. Spatial distribution of schistosomiasis and geohelminthiasis: cases in the rural areas of Pernambuco, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 5, p. 633-638, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: diretrizes técnicas** – 2ª Edição. Brasília, 2008. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigilancia_controle_moluscos_import_epidemio_2ed> . Acesso em: 12 abril 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância da esquistossomose mansoni: diretrizes técnicas** – 4ª Edição. Brasília, 2014. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigilancia_esquistossome_mansoni_diretrizes_tecnicas.pdf> Acesso em: 12 abril 2018.

CATANHEDE, S.P.D.; MARQUES, A.M.; SOUZA, N.S.; VALVERDE, A.L. Atividade moluscicida de plantas: uma alternativa profilática. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 282-288, 2010.

COELHO, P.M.Z.; CALDEIRA, R.L. Critical analysis of molluscicide application in schistosomiasis control programs in Brazil. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 5, n. 57, p. 1-6, 2016.

COURA, J.R.; AMARAL, R.S. Epidemiological and Control Aspect of Schistosomiasis in Brazilian Endemic Áreas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 1, p.13-19, 2004.

GALVÃO, A.F. **Impacto do tratamento com praziquantel na infecção por *Schistosoma mansoni* em adolescentes do município de São Lourenço da Mata, área endêmica da esquistossomose em Pernambuco**. 2010. Dissertação (mestrado)- Instituto Oswaldo Cruz, pós graduação em Biologia Parasitária, Rio de Janeiro, 2010.

GOMES, A.C.L.; GALINDO, J.M.; LIMA, N.N; SILVA, E.V.G. Prevalência e carga parasitária da esquistossomose mansônica antes e depois do tratamento coletivo em Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco. **Revista Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 2, p. 243-250, 2016.

KING, C.H.; SUTHERLAND, L.J.; BERTSCH, D. Systematic review and meta-analysis of the impact of chemical-based mollusciciding for control of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* transmission. **Public Library of Science Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 12, p. 1-23, 2015.

LIMA, L.M. **Avaliação de atividade moluscicida de extratos de *Aristolochia cymbifera* e *Pothomorphe umbellata* em *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário de *Schistosoma mansoni***. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2016

MATAL; R.C.S.; MENDONÇA, D.I.M.D.; VIEIRA, L.; SANTOS, A.E.; SILVA, L.A.; GASPAR. J.F.; MARTINS, C.; RUEFF, J.; SANT'ANA, A.E.G. Molluscicidal Activity of

compounds Isolated From *Euphorbia conspicua*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 58, n. 7, p.1-6, 2011.

MOTA, F.M.; CARVALHO, H.H.C.; WIEST, J.M. Atividade antibacteriana in vitro de inflorescências de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. – Asteraceae (“macela”, “marcela”) sobre agentes bacterianos de interesse em alimentos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 3, p. 298-304, 2011.

OLIVEIRA-FILHO, E.C. **Efeitos de substâncias químicas sobre a reprodução de moluscos de água doce: estudos com caramujos do gênero *Biomphalaria***. 2003. Tese (Doutorado). Escola Nacional de Saúde Pública – Fundação Oswaldo Cruz, 2003.

OLIVEIRA, P.M. **Análise de presença e contaminação de caramujos (*Schistosoma mansoni* Sambon, 1907) em duas áreas centrais do município de Porto Velho**. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso - Graduação em Ciências Biológicas, Rondônia. 2017.

PEREIRA FILHO, A.A.P.; FRANÇA, C.R.C.; OLIVEIRA, D.S.; MENDES. R.J.A.; GOLÇALVES, J.R.S.; ROSA, I.G. Evaluation of the molluscicidal potential of hydroalcoholic extracts of *Jatropha gossypifolia* Linnaeus, 1753 on *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n.6, 2014.

QUITES, H.F.O.; ABREU, M.N.S.; MATOSO, L.F.; GAZZINELLI, A. Avaliação das ações de controle da esquistossomose na Estratégia de Saúde da Família em municípios do Vale do Jequitinhonha em Minas Gerais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 19, n. 2, p. 375-389, 2016.

RETTA, D.; DELLACASSA, E.; VILLAMIL, J.; SUÁREZ, S.A.; BANDONI, A.L. Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: A review. **Industrial Crop and Products**, v. 38, p. 27-38, 2012.

ROCHA, T.J.M.; SANTOS, M.C.S.; LIMA, M.V.M; CALHEIROS, C.M.L.; WANDERLEY, F.S. Aspectos epidemiológicos e distribuição dos casos de infecção pelo *Schistosoma mansoni* em municípios do Estado de Alagoas, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 7, n. 2, p. 27-32, 2016.

RODRIGUES, J.G.M.; MIRANDA, G.S.; LIRA, M.G.S.; NOGUEIRA, R.A.; SILVA-SOUZA, N. Larvas de trematodeos de *Biomphalaria* spp. (Gastropoda: Planorbidae) de dois municípios do leste da Amazônia Legal brasileira. **Revista Pan – Amazônica de Saúde**, v.8, n. 3, p. 51-58, 2017.

RODRIGUES JUNIOR, C. A.; DIAS, F. C. F.; ROSA, R. T. A. S.; CARDOSO, C. R. L.; VELOSO, F. P. F. S.; MARIANO, S. M. B.; FIGUEIREDO, B. N. S. Esquistossomose na região norte do Brasil. **Revista de Patologia do Tocantins**, v. 4, n. 2, p. 58-61, 2017.

RUIZ, A.L.T.; MAGALHÃES, E.G.; MAGALHÃES, A.F.; FARIAS, A.D.; AMARAL, M.C.E.; SERRANO, D.R.; ZANOTTI-MAGALHÃES, E.M.; MAGALHÃES, L.A. Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (*Cyperaceae*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.2, p.98-102, 2005.

SILVA, N.F.S.; COGO, J.; WIEPIESKI, C.C.P.; LAVERDE JR, A. Bioensaio de atividade moluscicida adaptado para a avaliação de extratos de plantas medicinais. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, Umuarama, v. 11, n. 2, p. 179-81, 2008.

SOARES, D. Q. P. **Estudo da Liberação de Praziquantel inserido em nanocompósitos de PBS/PEG6000 e argila**. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação), Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Campo Grande (RJ), 2013.

SOUZA, C.A. **Avaliação da atividade moluscicida do lavado glandular de *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. frente ao molusco *Biomphalaria glabrata***. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2017.

SOUZA, F.P.C.; VITORINO, R.R.; COSTA, A.P.; FARIA JÚNIOR, L.A.S.; SANTANA, L. A.; GOMES, A.P. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. **Revista Brasileira de Clínica Médica São Paulo**, v. 9, n. 4, p. 300-307, 2011.

TUNHOLI, V.M.; ALVES, V.M.T.; SILVA, J.P.; MARTINS, I.V. F. *Biomphalaria* spp. e equinostomíase: aspectos biológicos e estudos experimentais desta interface. **Tópicos Especiais em Ciência Animal**, p. 65, 2016.

VIEIRA, M.C.; RAMOS, M.B.M.; HEREDIA, Z.N.A; LUCIANO, A.T.; GONÇALVES, W.V.; RODRIGUES, W.B.; TABALDI, L.A.; DE CARVALHO, T.M.; SOARES, L.F.; SIQUEIRA, J.M. Adubação fosfatada associada à cama de frango e sua influência na produtividade e no teor de flavonoides da Marcela (*Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.) em duas épocas de colheita. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 17, n. 2, p. 246-253, 2015.

VITORINO, R. R.; SOUZA, F. P. C.; COSTA, A. P.; FARIA JÚNIOR, L. A. S.; SANTANA, L. A.; GOMES, A. P. Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle. **Revista Brasileira de Clínica Médica São Paulo**, v. 10, n. 1, p. 39-45, 2012

ZAMPIERON, R. G. **Estudo químico e potencial antioxidante de espécies vegetais utilizadas na medicina popular de mato grosso do sul- *Achyrocline alata* (Kunth) DC. e *Achyrocline satureioides* (Lam) DC. – Asteraceae.** 2010. Tese (Doutorado em ciências da Saúde), Universidade Federal de Brasília, Brasília, 2010.

WEERAKOON, K. G. A. D.; GOBERT, G.N.; CAI, P; MCMANUSA, D. P. Advances in the Diagnosis of Human Schistosomiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 24, p.939-67, 2015.

WERNECK, G. L., HASSELMANN, M. H., GOUVÊA, T. G. Panorama dos estudos sobre nutrição e doenças negligenciadas no Brasil. **Revista Ciência & Saúde Coletiva**, v..16, n.1, p. 39-62, 2011.

WHO Field use of molluscicides in schistosomiasis control programmes: an operational manual for programme managers. Geneva: World Health Organization, 2017.