

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA

FERNANDA DA SILVA NEVES

Avaliação da atividade moluscicida de extratos vegetais frente ao molusco
Biomphalaria glabrata

Juiz de Fora

2017

FERNANDA DA SILVA NEVES

Avaliação da atividade moluscicida de extratos vegetais frente ao molusco
Biomphalaria glabrata

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Farmácia
da Universidade Federal de Juiz de Fora
como requisito parcial para a conclusão
do Curso de Graduação em Farmácia.
Área de concentração: Ciências
Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Olavo dos Santos Pereira Júnior
Co-orientador: Dr. Ademar Alves da Silva Filho

Juiz de Fora

2017

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

Neves, Fernanda da Silva.

Avaliação da atividade moluscicida de extratos vegetais frente ao molusco *Biomphalaria glabrata* / Fernanda da Silva Neves. -- 2017. 52 f.

Orientador: Olavo dos Santos Pereira Júnior

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica, 2017.

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

Avaliação da atividade moluscicida de extratos vegetais frente ao molusco
Biomphalaria glabrata

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Farmácia
da Universidade Federal de Juiz de Fora
como requisito parcial para a conclusão
do Curso de Graduação em Farmácia.
Área de concentração: Ciências
Farmacêuticas

Aprovado em _____ de _____ de _____

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr.Ademar Alves da Silva Filho
Faculdade de Farmácia/UFJF

Prof^a. Dr^a. Fabiola Dutra Rocha
Faculdade de Farmácia/UFJF

Grad. Leandro Martins Lima
Universidade Federal de Juiz de Fora

Msc. Débora dos Santos Dias
Universidade Federal de Juiz de Fora

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e pela oportunidade de me formar na Universidade na qual me transformou em uma pessoa melhor.

Agradeço a minha mãe Ana, que sempre se desdobrou mais do que podia para chegarmos até aqui, e que sempre compreendeu minha ausência e minha falta de tempo.

Agradeço ao Thiago, por ser meu melhor *happy hour*, pela ajuda e por todo o carinho. Agradeço as minhas amigas, IgGs, que muito me incentivaram na realização deste trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr Olavo pela orientação, pela oportunidade de realizar um trabalho no qual me sinto honrada em apresentar, pela paciência e por ser minha referência como profissional e como pessoa, por sua gentileza e simplicidade. Agradeço ao Leandro, pelo conhecimento em toda a prática e em estatística, pela contribuição na manutenção dos moluscos e principalmente pela boa vontade que nunca lhe faltou para me ajudar quando foi preciso. Agradeço aos meus colegas de projeto, Gabriela e Bruno, pelo companheirismo.

Agradeço ao meu co-orientador, Prof. Dr Ademar, por ter me apoiado durante momentos difíceis na Faculdade, por inspirar em mim o pensamento crítico reflexivo na pesquisa e por fornecer os extratos vegetais que foram utilizados neste trabalho. Agradeço aos amigos do NIPPAN que me receberam de braços abertos, especialmente a Marcela que trabalhou com os extratos.

À banca examinadora pela disponibilidade e boa vontade. E por fim agradeço a todos que de alguma forma me apoiaram, muito obrigada!

RESUMO

A esquistossomose é uma das principais doenças tropicais do mundo, causada por parasitos do gênero *Schistosoma*. Atualmente, é considerada um problema de saúde mundial por atingir 78 países, particularmente de regiões tropicais, como o Brasil. A Organização Mundial da Saúde (OMS) enfatiza a importância de estratégias complementares de combate, como o controle do hospedeiro intermediário através do uso de moluscidas que interrompam o ciclo de vida do parasito e diminuam o risco de infecção. Estudos revelam que o controle malacológico em alguns países diminuíram a prevalência da doença em até 90 %. A niclosamida é um moluscida eficiente, no entanto é biocida para peixes, anfíbios e plantas aquáticas. É necessário encontrar substâncias seletivas ao gênero *Biomphalaria*, sendo nessa perspectiva produtos naturais potenciais moluscidas. O objetivo desse trabalho é avaliar o potencial moluscida de extratos vegetais frente ao *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário da esquistossomose . Os extratos hidroalcoólicos das espécies *Aesculus hippocastanum* (Sapindaceae), *Dioscorea* sp. (Dioscoreaceae), *Smilax officinalis* (Liliaceae), *Centella asiática* (Umbelliferae), *Solanum lycocarpum* (Solanaceae), *Pfaffia glomerata* (Amaranthaceae) e *Polygonum hydropiperoides* (Polygonaceae) foram avaliados em teste de triagem na concentração 100 µg.mL⁻¹. E em seguida, as espécies *Aesculus hippocastanum* e *Smilax officinalis*, foram selecionadas e avaliadas em concentrações menores para obtenção de DL⁹⁰ e DL⁵⁰. A espécie *A. hippocastanum* promoveu atividade moluscida em DL⁹⁰ inferior a 100 µg.mL⁻¹, logo, pode-se considera-la moluscida vegetal viável segundo os critérios da OMS, o mesmo não ocorreu com a espécie *S. officinalis*. Moluscos *B. glabrata* sobreviventes a exposição de ambas as espécies também foram avaliados quanto a ovoposição durante o período de 15 dias, e demonstraram redução significativa do número de ovos em comparação ao grupo exposto ao controle negativo.

Palavras-chave: moluscidas, *Biomphalaria glabrata*, esquistossomose , *Schistosoma mansoni*, produtos naturais.

ABSTRACT

Schistosomiasis is one of the main tropical diseases in the world, caused by trematodal parasite of genus *Schistosoma*. Currently, it is regarded as a world health problem, reaches 78 countries, particularly tropical regions, such as Brazil. The World Health Organization (WHO), emphasizes the importance of complementary strategies of combat, such as the control of host through the use of molluscicides that interrupt the life cycle of the parasite and reduce the risk of infection. Studies show that the malacological control decreased a prevalence of disease by up to 90%. The Niclosamide is an effective molluscicide, however biocidal for fish, amphibians and aquatic plants. It is necessary to find selective substances in the genus *Biomphalaria*, and in this perspective, natural products are potential molluscicides. The objective of this work is to evaluate the molluscicidal potential of plant extracts against *Biomphalaria glabrata*, intermediate host of Schistosomiasis. Hydroalcoholic extracts of the species *Aesculus hippocastanum* (Sapindaceae), *Dioscorea* sp. (Dioscoreaceae), *Smilax officinalis* (Liliaceae), *Centella asiática* (Umbelliferae), *Solanum lycocarpum* (Solanaceae), *Pfaffia glomerata* (Amaranthaceae) and *Polygonum hydropiperoides* (Polygonaceae) were tested in screening tests at a concentration of 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, and after, species *Aesculus hippocastanum* and *Smilax Officinalis*, were selected and tested at lower concentrations to obtain DL^{90} and DL^{50} . The specie *A. hippocastanum* promoted molluscicidal activity in DL^{90} less than 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, therefore, it is considered a viable molluscicidal, not the same occurred with the *S. officinalis* specie. Molluscs *B. glabrata* survivors of both species were also evaluated by oviposition during the period of 15 days, and have been shown to reduce the number of eggs compared to the group exposed to the negative control.

Keywords: Molluscicidal, *Biomphalaria glabrata*, Schistosomiasis, *Schistosoma mansoni*, natural products.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição global da esquistossomose	15
Figura 2	Índice de positividade para Esquistossomose no Brasil em 2015.....	16
Figura 3	Ciclo Biológico do <i>Schistosoma mansoni</i>	17
Figura 4	Distribuição da espécie <i>B. glabrata</i> no Brasil.....	20
Figura 5	<i>B. glabrata</i> exposto ao extrato hidroalcoólico de <i>A. hippocastanum</i> , em A , linha vermelha indica a retração do molusco para a concha e B , líquido de coloração vermelha no fundo do recipiente evidencia liberação de hemolinfa.....	36
Figura 6	<i>B. glabrata</i> exposto ao extrato hidroalcoólico de <i>S. officinalis</i> , em A , linha vermelha indica a retração do molusco para a concha e B , líquido de coloração vermelha evidencia liberação de hemolinfa.....	38
Figura 7	Contagem diária de ovos dos moluscos <i>B. glabrata</i> durante 15 dias dos grupos SO 25 (<i>S. officinalis</i> 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), AH 10(<i>A. hippocastanum</i> 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), e DMSO (0,05% v/v).....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Espécies vegetais e suas respectivas partes utilizadas no extrato hidroalcoólico.....	27
Tabela 02	Resultados da exposição de moluscos <i>B. glabrata</i> aos extratos hidroalcoólicos das espécies vegetais do teste preliminar.....	32
Tabela 03	Resultados da exposição de moluscos <i>B. glabrata</i> ao extrato hidroalcoólico de <i>A. hippocastanum</i> (AH).....	33
Tabela 04	Resultados da exposição de moluscos <i>B. glabrata</i> ao extrato hidroalcoólico de <i>S. officinalis</i> (SO).....	35
Tabela 05	Atividade dos extratos <i>A. hippocastanum</i> (AH 10) e <i>S. officinalis</i> (SO 25) sobre a ovoposição de moluscos <i>B. glabrata</i> durante 15 dias	37

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

CDC	Centers for Disease Control and Prevention
DL ⁵⁰	Dose letal mediana
DL ⁹⁰	Dose letal 90%
DMSO	Dimetilsulfóxido
NIPPAN	Núcleo de Identificação e Pesquisa de Princípios Ativos Naturais
OMS	Organização Mundial de Saúde
PZQ	Praziquantel
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	Esquistossomose Humana	15
2.2	Epidemiologia	16
2.3	Infecção e Ciclo Biológico do <i>Shistosoma mansoni</i>	18
2.4	Manifestações Clínicas, Diagnóstico e Tratamento	19
2.5	Hospedeiros Intermediários	21
2.6	Moluscidas Vegetais	24
2.6.1	<i>Aesculus hippocastanum</i> - Castanha da Índia.....	26
2.6.2	<i>Dioscorea</i> sp. - Inhame.....	26
2.6.3	<i>Smilax officinalis</i> - Salsaparrilha	27
2.6.4	<i>Centella asiatica</i> - Centella	27
2.6.5	<i>Solanum lycocarpum</i> – Fruto do lobo	28
2.6.6	<i>Pfaffia glomerata</i> – Ginseng brasileiro.....	28
2.6.7	<i>Polygonum hydropiperoides</i> – Erva-de-bicho	29
3	OBJETIVOS	30
3.1	Objetivo Geral	30
3.2	Objetivos Específicos	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1	Material Vegetal	31
4.2	Moluscos	32
4.3	Triagem do Efeito Tóxico	32
4.3.1	Preparo da amostra	32
4.3.2	Teste preliminar	33
4.4	Ensaio de Toxicidade Aguda	34

4.5 Avaliação da ovoposição dos moluscos sobreviventes	34
4.6 Análise estatística	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1 Teste Preliminar	36
5.2 Teste Toxicidade Aguda	37
5.2.1 <i>Aesculus hippocastanum</i>	37
5.2.2 <i>Smilax officinalis</i>	39
5.2 Avaliação da Ovoposição.....	40
6 CONCLUSÃO	43

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose é causada por helmintos trematódeos do gênero *Schistosoma*, que afeta atualmente mais de 250 milhões de pessoas em mais de países no mundo. No Brasil, a área endêmica atinge 9 estados, sendo que as regiões Nordeste e Sudeste são as mais afetadas (BRASIL, 2015).

A distribuição da esquistossomose é focal, uma vez que a transmissão é governada por atividades humanas de contato com água doce contaminada. Países, como Japão e Tunísia, eliminaram a doença em consequência do desenvolvimento socioeconômico, no entanto, no Brasil e em muitas partes da África, a esquistossomose aumentou durante o século XX, como resultado do crescimento populacional sem provisão adequada de saneamento básico. Populações pobres são as mais afetadas, e por isso, a esquistossomose integra o grupo das “doenças tropicais negligenciadas” (PEREIRA FILHO *et al*, 2014; FENWICK e UTZINGER, 2016).

No Brasil, a espécie *Schistosoma mansoni* determina a infecção denominada esquistossomose mansônica ou intestinal e a espécie *Biomphalaria glabrata* é reconhecida como o hospedeiro intermediário mais adaptado para transmissão, devido à sua ampla distribuição geográfica e efetividade de transmissão (CANTANHEDE *et al.*, 2010; PEREIRA FILHO *et al.*, 2014).

Uma das únicas formas de tratamento para esquistossomose é o praziquantel, que embora eficaz e barato, não controla a reinfecção, o que, conseqüentemente, pode levar à seleção de parasitos resistentes (CIOLI *et al.*, 2014).

Dentre outros métodos utilizados para reduzir a ocorrência da doença, uma estratégia promissora é o controle da população do hospedeiro intermediário. A eliminação do vetor, por meio do uso moluscidas, interrompe o ciclo de vida do parasito e, portanto, a transmissão da doença (PEREIRA FILHO *et al*, 2014).

Atualmente o único moluscida recomendado pela OMS é a niclosamida (Bayluscide®), no entanto, as concentrações eficazes afetam também o ecossistema aquático e, além disso, o produto é caro e pouco biodegradável (PEREIRA FILHO *et al*, 2014).

Compostos moluscicidas naturais de origem vegetal têm recebido atenção no intuito de que possam fornecer agentes de controle de baixo custo, alto grau de degradabilidade e igual eficácia (MATAL *et al.*, 2011).

Embora o Brasil possua a maior diversidade genética de espécies vegetais do mundo, o conhecimento acerca do tema é considerado insuficiente. Essa diversidade e variedade de composição ainda inexplorada torna a busca de novos moluscicidas vegetais atrativa (CANTANHEDE *et al.*, 2010).

A concentração necessária para um extrato ser considerado moluscicida vegetal viável é até $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ segundo a OMS (CANTANHEDE *et al.*, 2010). No intuito de encontrar espécies vegetais com atividade moluscicida testamos sete extratos: *A. hippocastanum*, *Dioscorea sp.*, *S. officinalis*, *C. asiática*, *S. lycocarpum*, *P. glomerata* e *P. hydropiperoides*, os quais alguns com presença de metabólitos secundários com atividades larvicida, hemolítica e antiparasitária podem nortear um possível efeito nocivo aos moluscos vetores da Esquistossomose .

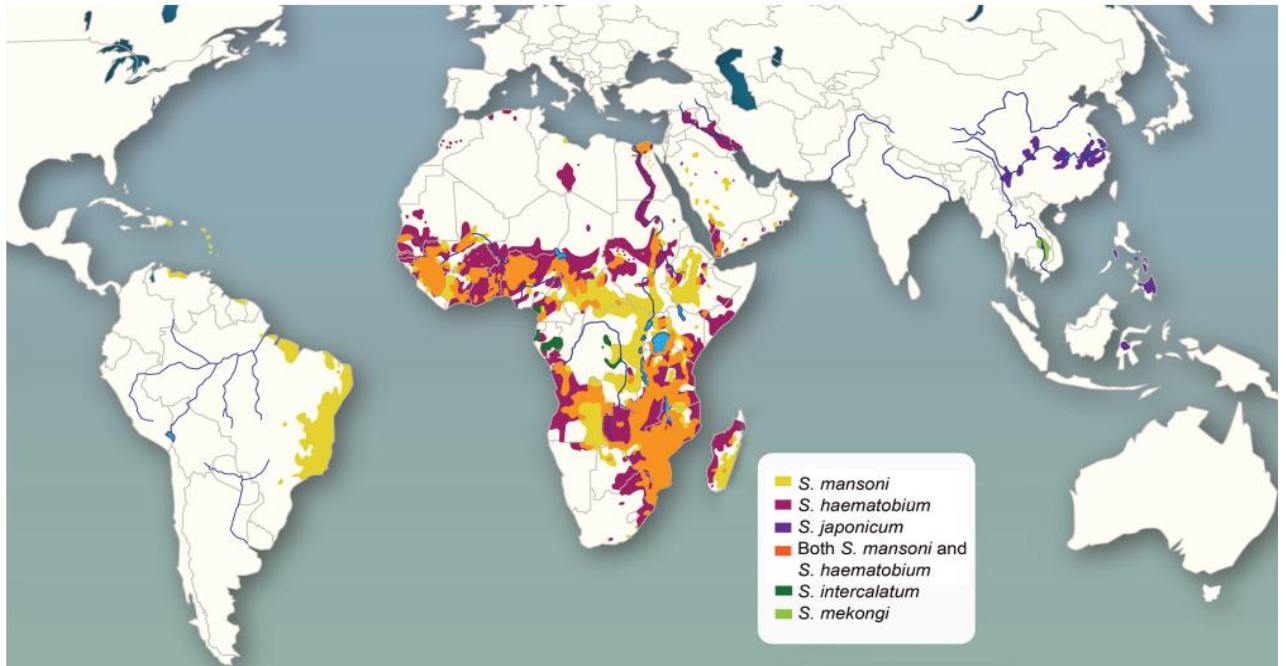
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Esquistossomose Humana

Assim como todas as parasitoses intestinais, a esquistossomose está relacionada a clássica tríade epidemiológica das doenças parasitárias, que se constitui por fatores indispensáveis para que ocorra a infecção, tais como as condições do hospedeiro, do parasito e do meio ambiente (NUNES, 2012). Em relação ao hospedeiro os fatores predisponentes são idade, fatores culturais e comportamentais. Em relação ao parasito a resistência ao sistema imune do hospedeiro e os mecanismos de escape vão influenciar a infecção. Quanto as condições ambientais, esta estará associada aos fatores anteriores que irão favorecer e definir a ocorrência de infecção e doença (NUNES, 2012). A doença atinge principalmente países em desenvolvimento, porém não só a população residente em zonas endêmicas está exposta aos riscos de contaminação, mas também visitantes que trafegam por essas áreas (TCHUENTÉ *et al.*, 2017).

A esquistossomose humana é causada por seis espécies de parasitos: *S. haematobium*, *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. mekongi*, *S. intercalatum* e *S. guineenses*. A espécie *S. haematobium* é responsável pela esquistossomose urogenital e tem interações significativas com o HIV e HPV, enquanto outras espécies causam a esquistossomose intestinal ou retal, sendo que apenas o *S. mansoni* está presente na América, onde é endêmica em 6 países, inclusive o Brasil (COLLEY *et al.*, 2014; MASSARA *et al.*, 2016). Na **Figura 1** podemos observar o mapa de distribuição dos parasitos.

Figura 1. Distribuição global da Esquistossomose .



Fonte. WEERAKOON *et al.*, 2015.

A introdução da Esquistossomose no Brasil se deu por meio do tráfico de escravos, que ingressaram no país, principalmente pelos portos de Recife e Salvador, locais onde atualmente a doença é endêmica. Dos portos de entrada, a doença se expandiu e atualmente possui extensa área de transmissão, já que uma vez introduzida em nosso território, o parasito encontrou condições favoráveis para a manutenção do ciclo biológico, constituindo hoje, pela sua magnitude e transcendência, importante problema de saúde pública (BRASIL, 2014).

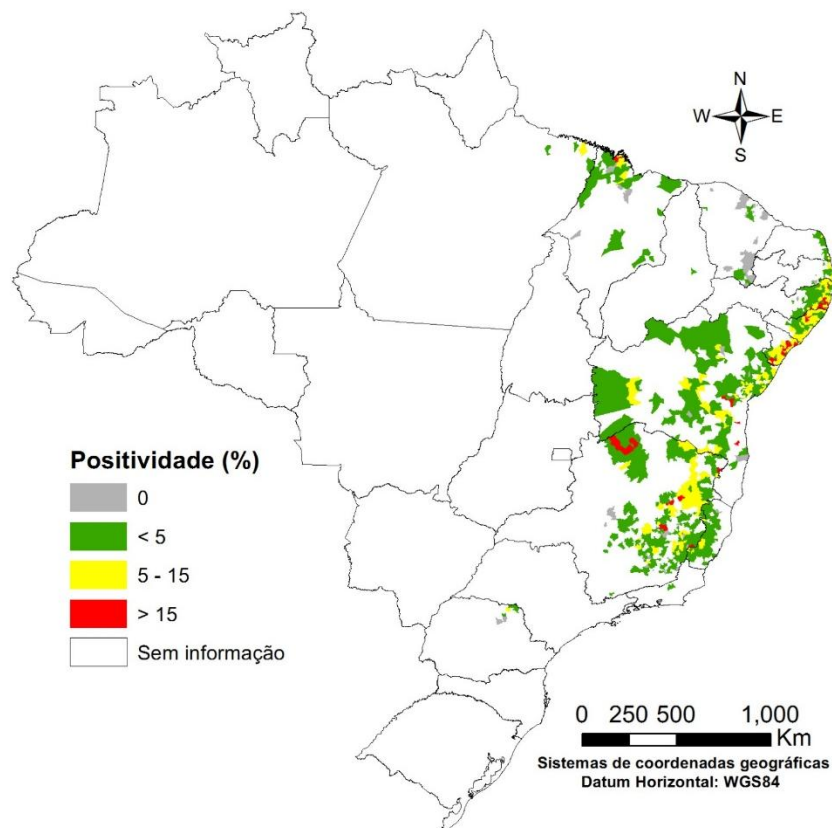
2.2 Epidemiologia

A esquistossomose é uma das doenças infecciosas parasitárias mais prevalentes no mundo. Estima-se que 779 milhões de pessoas estão expostas ao risco de infecção, sendo que 85% destes residem na África. Estudos recentes apontam que há um total de 250 milhões de pessoas infectadas no mundo, sendo que 97% do total dos infectados estão no continente africano. O número de óbitos ocasionados por agravos da esquistossomose está entre 15-280 mil no mundo (COLLEY *et al.*, 2014; MASSARA *et al.*, 2016).

No Brasil a transmissão da esquistossomose ocorre em 18 estados. Existem localidades onde a prevalência está acima de 25% (MASSARA *et al.*, 2016). Estima-

se que cerca de seis milhões de pessoas estão infectadas e em torno de 25 a 30 milhões estão expostas ao risco da doença, que atinge principalmente os estados de Minas Gerais, Bahia, Alagoas, Rio grande do Norte, Sergipe, Pernambuco e Paraíba (BARBOSA, *et al.*, 2016). Na **Figura 2**, está representado o índice de positividade por área geográfica do Brasil. Nesta figura é possível observar que os estados citados anteriormente atingem índices de positividade para a doença acima de 15%.

Figura 2. Índice de positividade para Esquistossomose no Brasil em 2015



Fonte: Ministério da Saúde, 2015

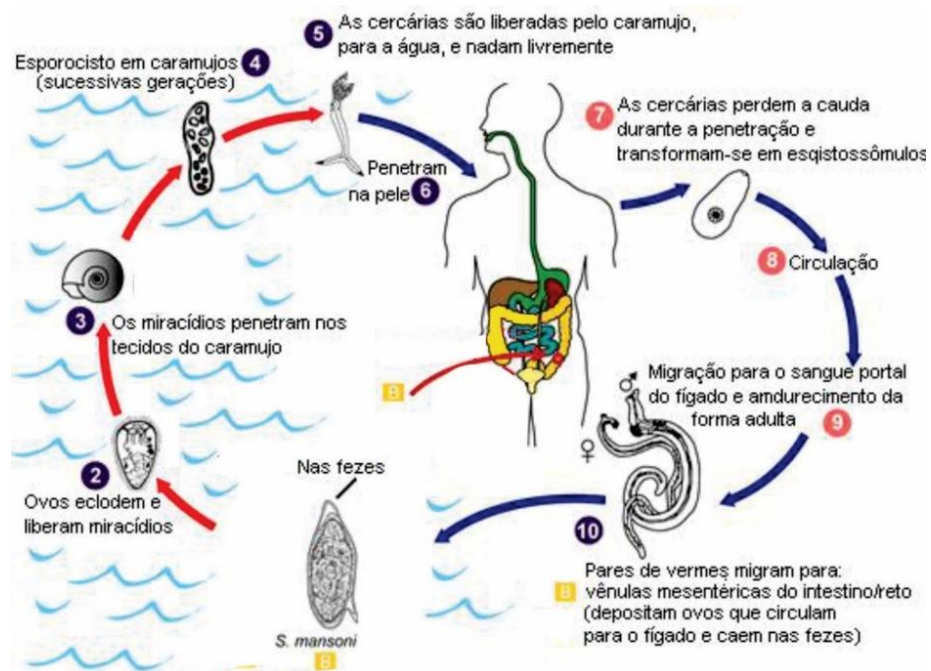
Dados recentes do Ministério da Saúde mostram que em 2015 houve 16.066 notificações de novos casos da doença na região Nordeste e 4.393 na região Sudeste, sendo que Minas Gerais comporta mais de 4.000 dessas notificações (BRASIL, 2016).

2.3 Infecção e Ciclo Biológico do *Shistosoma mansoni*

O ciclo biológico do *S. mansoni* está ilustrado na **Figura 3**. O início do ciclo é marcado pela liberação dos ovos, presentes nas fezes da pessoa infectada. O miracídio eclodem dos ovos em fontes de água doce (2), que infectam o hospedeiro intermediário, moluscos do gênero *Biomphalaria* (3). Dentro do molusco, os miracídios se transformam em esporocistos (4), e após a reprodução assexuada dão origem as cercárias (5), que em seguida, são liberadas pelo molusco e infectam o hospedeiro definitivo através da pele (6). As cercárias migram (7), atingem o sistema circulatório (8), e, durante a invasão, sofrem uma série de mudanças necessárias para seu desenvolvimento em esquistossômulos (DA'DARA e KRAUTZ-PETERSON, 2015). Os esquistossômulos migram e se instalam na veia porta hepática. Dentro do sistema portal os parasitos, já sexualmente maduros (9), vivem, se alimentam e se acasalam, iniciando a ovoposição cerca de 25 a 30 dias após a infecção (10). Os primeiros ovos são detectáveis a partir do 35º dia nas fezes da pessoa infectada (LAMBERTUCCI, 2010; CÉSPEDES, 2014).

São produzidos, em média, 300 ovos por dia. Os ovos, depositados nas vênulas, penetram na parede intestinal sendo liberados nas fezes para novamente contaminarem fontes de água doce e reiniciarem um novo ciclo (LAMBERTUCCI, 2010).

Figura 3. Ciclo biológico do *Schistosoma mansoni*.



Fonte: Centers for Disease Control and Prevention - CDC, (adaptado), 2012.

A falta de saneamento é um fator determinante para a infecção, pois permite a contaminação fecal de fontes de água doce, que são sítios de reprodução naturais do hospedeiro intermediário, iniciando o ciclo de transmissão da doença. O processo de ocupação urbana desordenada nos arredores das regiões de risco, onde, comumente, encontra-se falta de infra-estrutura de saneamento, esgoto aberto e fontes de alimento para o molusco, também contribuem para a manutenção da esquistossomose (WEERAKOON *et al.*, 2015; GOMES *et al.*, 2016).

2.4 Manifestações Clínicas, Diagnóstico e Tratamento

As manifestações clínicas da esquistossomose dependerão da fase da doença, ou seja, da fase do ciclo da infecção, compreendendo: Fase aguda e crônica (OCHOA *et al.*, 2015).

Uma minoria dos pacientes apresenta sintomas na fase aguda, porém alguns sinais clínicos de intensidade variável podem ser percebidos (MACÍAS *et al.*, 2010). As cercárias podem causar dermatite na área de contato em até 48 horas após penetração na pele do hospedeiro definitivo. Além disso, alguns pacientes apresentam prurido e febre que desaparecem em poucos dias. Também são comuns reações de hipersensibilidade, decorrente da migração dos

esquistossômulos e sintomas abdominais relacionados ao desenvolvimento dos vermes para fase adulta (LAMBERTUCCI, 2010).

Durante a fase crônica, o fluxo sanguíneo intestinal está comprometido pela instalação dos vermes que causam irritação e ações espoliativas por se alimentarem de sangue e obstruírem sua passagem. Nesse momento da infecção as queixas comuns são: dor abdominal, perda de peso e diarreia (LIMA *et al.*, 2015). A ovoposição traz as consequências mais graves da infecção, os ovos possuem espícula que causam danos a mucosa e parte deles pode ficar retidos e causar um quadro de inflamação granulomatosa. Essas reações podem progredir para esquistossomose hepatoesplênica grave, caracterizada por fibrose periportal, hipertensão portal, sangramento gastrointestinal e morte (OCHOA *et al.*, 2015).

O diagnóstico clínico é feito com anamnese minuciosa, incluindo informações acerca da história geográfica, da exposição à água potencialmente contaminada e a ocorrência de sinais e sintomas da fase aguda da infecção, como prurido e dermatite cercariana (VITORINO *et al.*, 2012). A investigação deverá ser confirmada por meio de métodos diretos, que consistem na visualização da presença de ovos de *S. mansoni* nas fezes ou tecidos ou de antígenos circulantes do parasito. O exame parasitológico de fezes tem sido essencial, especialmente a técnica de Kato-Katz, um método quantitativo com grande aplicabilidade na inferência da carga parasitária através da detecção de ovos nas fezes (BRASIL, 2014).

O praziquantel (PZQ) é o fármaco de escolha para o tratamento da esquistossomose e, atualmente, está na lista de medicamentos essenciais mais importantes em um sistema básico de saúde (SANTOS *et al.*, 2012). Desenvolvido na década de 70 pela Bayer, foi o primeiro fármaco anti-helmíntico a preencher os requisitos da OMS para a quimioterapia, sendo que em 1975 já estava sendo utilizado no Programa Nacional de Controle da esquistossomose no Brasil em concentração de 40-60 mg/kg divididos em duas doses intervaladas por 12 horas (MACÍAS *et al.*, 2010; MUTAPI, 2010). O PZQ substituiu a oxamniquina, que é eficaz apenas para espécie *S. mansoni*. Essa droga foi amplamente utilizada nos anos 70, momento em que repercutiram os primeiros estudos de resistência, o que resultou, ao longo do tempo, no decréscimo de seu uso com relação ao PZQ (STEIN *et al.*, 2015; CHEVALIER *et al.*, 2016).

A principal deficiência da quimioterapia é que não previne a reinfecção, necessitando assim de tratamentos repetidos para a população de área endêmica (MENDONÇA *et al.*, 2016). O uso maciço e repetitivo por muitas décadas de um único medicamento tem suscitado a comprovação da existência de vermes resistentes ao PZQ (CIOLI *et al.*, 2014).

Não há dúvidas de que a quimioterapia do PZQ é, ainda hoje, o melhor advento contra a esquistossomose, fornecendo inquestionáveis benefícios para populações endêmicas. No entanto, existem abordagens que revelam a necessidade de encontrar novas soluções a longo prazo (MENDONÇA *et al.*, 2016).

2.5 Hospedeiros Intermediários

A presença de um hospedeiro intermediário para continuidade do ciclo de vida do *S. mansoni* contribui em muitos aspectos que vão influenciar o ciclo de transmissão da esquistossomose. Os hospedeiros intermediários são moluscos do gênero *Biomphalaria* pertencentes a classe Gastropoda que apresentam características como concha calcária discoidal protetora de tamanho variado e massa cefalopodal (expansão musculosa de superfície ventral em forma de sola, que está fundida com a cabeça e corresponde à região que se expande para fora da concha). Possuem sistemas respiratório, circulatório (por onde circula a hemolinfa vermelha), digestivo, excretor, nervoso e sistema genital masculino e feminino (MELO *et al.*, 2012).

Seu habitat consiste em corpos de água doce com pouca velocidade da água (menos de 30 cm/seg), como rios, córregos, canais e áreas inundadas, preferencialmente com pouca profundidade. Também há relatos de sobrevivência em poças de água, esgotos e terra inundada e desocupada. A alimentação é a base de folhas e outros órgãos de plantas aquáticas, algas, bactérias, excrementos de outros animais, entre outros (MELO *et al.*, 2012; BARBOSA *et al.*, 2016).

São hermafroditas simultâneos e se reproduzem tanto por fecundação cruzada, quanto por autofecundação, além disso, em situações de seca, dessecam, mantendo-se vivos, recolhidos à concha, em estágio fisiológico vegetativo, preservando-se até a próxima estação úmida. Essas características são

fundamentais para a expansão das espécies do gênero *Biomphalaria* em ambientes sujeitos a perturbações ambientais (TUAN, 2009).

As três espécies envolvidas na cadeia produtiva do *S. mansoni* no Brasil são, *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*. Moluscos da espécie *B. straminea* são bem-sucedidos devido à sua capacidade de adaptação às variações climáticas. Já *B. tenagophila* tem importância epidemiológica para a transmissão do parasito nos estados da região Sul e Sudeste do Brasil (BARBOSA *et al.*, 2016).

Moluscos da espécie *B. glabrata* são os principais hospedeiros do parasito no Brasil, por serem amplamente distribuídos em nossa extensão territorial, e, comprovadamente são os moluscos mais susceptíveis a infecção (BARBOSA *et al.*, 2016). São encontrados na natureza com taxas de positividade para infecção de *S. mansoni* de até 80%. Um molusco infectado pode liberar até 18 mil cercarias por dia em fontes de água doce (MELO *et al.*, 2012). O mapa representado na **Figura 4** mostra a distribuição do *B. glabrata* no território brasileiro.

Figura 4. Distribuição da espécie *B. glabrata* no Brasil



Fonte: Brasil, 2014.

Sokolow e colaboradores (2016), em recente estudo evidenciou que o controle do hospedeiro intermediário reduziu cerca de 90% da prevalência da esquistossomose em alguns países. Esse estudo compreendeu análise de dados históricos ao longo de 100 anos em 83 países.

Atualmente, os moluscos são eliminados com o uso de produtos químicos sintéticos, como a Niclosamida (Bayluscide® - Bayer) que, conforme recomendado pelo OMS, é o único agente utilizado em programas de combate aos hospedeiros intermediários da esquistossomose. A niclosamida é eficaz no extermínio de moluscos e cercarias, sendo usada em baixas concentrações, porém, atinge ao mesmo tempo peixes, anfíbios e plantas aquáticas que compartilham o mesmo habitat (PEREIRA FILHO *et al.*, 2014). Sua ação letal, portanto, não é seletiva e, por isso, além de desequilibrar o ecossistema aquático, também prejudica atividades como a pesca, que é fonte de renda e alimento para ribeirinhos. Além disso, essa substância é pouco biodegradável, é relativamente cara, tornando seu uso inviável

para países mais pobres, que são justamente os que possuem índices mais altos de endemia (MARTINS *et al.*, 2017).

O uso de moluscidas oferece uma grande oportunidade para o controle rápido da transmissão da esquistossomose, porque tem a vantagem de não necessitar da cooperação da população, como é o caso da educação em saúde e da quimioterapia em massa (KING, SUTHERLAND e BERTSCH, 2015).

2.6 Moluscidas Vegetais

Surgiu, em 1930, o interesse por moluscidas vegetais a partir da observação do decréscimo do número de moluscos nas margens do foco de transmissão no Sudão, onde na área recoberta pelos os frutos da espécie *Balanites aegyptiaca* L., (Balanitaceae), o crescimento dos moluscos era visivelmente inibido e, conseqüentemente a densidade populacional diminuída. Desde então, estudiosos tem se empenhado na pesquisa de novos moluscidas vegetais (CANTANHEDE *et al.*, 2010).

A OMS criou, em 1965, alguns critérios para pesquisa de novas substâncias moluscidas. Um extrato é considerado inativo se levar de 0 a 30% de morte, parcialmente ativo se levar de 40 a 60% de morte e ativo se levar de 70 a 100% de morte aos moluscos. Entretanto, de acordo com a publicação da OMS em 1983, uma planta moluscida só deve ser considerada ativa quando obtiver 90% de mortalidade nas concentrações de até 10 ppm para substâncias isoladas e até 100 ppm para o extrato vegetal (CANTANHEDE *et al.*, 2010).

O Brasil abriga a maior biodiversidade vegetal do mundo, no entanto, o conhecimento acerca das espécies é insuficiente. Alguns autores projetam que o número total de espécies biológicas brasileiras seja da ordem de 1,8 milhões, e que apenas cerca de 10% delas são conhecidas (JOLYL *et al.*, 2011).

Já existem estudos correlacionando plantas com alto teor de saponinas e taninos que obtiveram resultados satisfatórios. Pereira Filho *et al.*, (2014) em estudos com o extrato alcoólico de folhas da *Jatropha gossypifolia* frente aos caramujos *B. glabrata*, obteve concentrações de atividade moluscida a 25ppm (26,6% de espécimes mortas), os autores relacionam os resultados a grande quantidade de saponinas que podem promover a hemólise de células.

Dentre os metabólitos secundários produzidos pelos vegetais, as saponinas constituem uma das classes de maior destaque devido à sua ampla distribuição no reino vegetal e suas importantes atividades biológicas. As Saponinas são glicosídeos que contém uma porção aglicona de sapogeninas triterpênicas ou sapogeninas esteroides e, com base na sua aglicona, são divididas em dois tipos principais, saponinas triterpênicas e saponinas esteroidais (KAISER, PAVEI e ORTEGA, 2010).

As saponinas possuem propriedades surfactantes que causam distúrbios na homeostase de células e até mesmo o rompimento de sua membrana, autores sugerem que essa atividade particular das saponinas ocorre por formação de poros na membrana até o rompimento, denominado de lise celular. As saponinas possuem semelhança estrutural com os lipídeos da membrana celular, e por isso pode-se dizer que há uma afinidade que permite a interação e atividade lítica. As saponinas são os surfactantes muito utilizados como agentes eritrolíticos (MANAARGADO-CATIN *et al.*, 2016).

Os taninos são um grupo de compostos polifenólicos cuja principal característica está na sua capacidade de precipitar proteínas, proveniente de sua reatividade química em formar ligações de hidrogênio inter e intra-moleculares, e assim precipitar macromoléculas, tais como proteínas e carboidratos. Sua característica principal de precipitar macromoléculas é apontada como principal mecanismo de funções antimicrobianas e antivirais (SMERIGLIO *et al.*, 2016; SERRANO *et al.*, 2009).

Existem estudos acerca da atividade moluscicida de extrato bruto e taninos isolados, como o estudo de Bezerra e colaboradores (2002), onde avaliaram seis extratos hidroalcoólicos de plantas medicinais do cerrado brasileiro quanto à atividade moluscicida contra *B. glabrata*. Os resultados para a espécie *Stryphnodendron polyphyllum* mostraram DL⁴⁰ igual a 20ppm, já a a espécie *Stryphnodendron adstringens* mostraram DL⁹⁰ igual a 50 ppm, ambas espécies ricas em taninos condensados.

Al-Sayed e colaboradores (2014) realizaram estudo sobre ação moluscicida de taninos isolados em moluscos do gênero *Biomphalaria*, utilizando o tanino eucalbanina B., proveniente da espécie vegetal *Eucalyptus globulus*, e mostraram DL⁵⁰ igual a 55 ppm. A análise dos pesquisadores detalha uma diminuição

significativa do nível de proteína em 22,7% e 25,8% nos tecidos dos moluscos e na hemolinfa, respectivamente. Os autores enfatizam que o isolamento dos taninos é relativamente fácil e que podem ser menos tóxicos quando comparados a outros metabólitos.

Nesse contexto, novas estratégias de controle da esquistossomose devem ser delineadas, e dentre as possíveis medidas existentes, o controle malacológico demonstra-se promissor. Sendo assim, a procura de novas substâncias moluscidas facilmente biodegradáveis e seletivas, tem aumentado o interesse de estudo por substâncias de origem vegetal (COELHO e CALDEIRA, 2016). Atualmente são crescentes os estudos na literatura sobre plantas e seus princípios ativos, pois são considerados ótimas fontes de novas substâncias moluscidas (CANTANHEDE et al., 2010).

2.6.1 *Aesculus hippocastanum* - Castanha da Índia

A. hippocastanum (Sapindaceae), conhecida como castanha da Índia, é uma árvore decídua que pode chegar a 36 metros de altura, nativa de países da península Balçânica, atualmente possui distribuição mundial (JIANG et al., 2011).

É utilizada para uma variedade de doenças, como malária, febre, bexiga e lesões gastrointestinais. As sementes contêm uma mistura complexa de saponinas triterpênicas glicosiladas (Escina) e algumas outras substâncias ativas, que incluem nível elevado de flavonoides (principalmente glicosídeos de quercetina e canferol) e cumarinas (esculetol). Estudos tem comprovado que os efeitos farmacológicos provenientes do uso de sementes da castanha da Índia são exclusivos da escina, como por exemplo sua ação venotônica, anti-inflamatória e antioxidante (JIANG et al., 2011).

As escinas são o componente majoritário da semente, e consiste no grupo de quatro saponinas: escina Ia 24%, escina Ib 17%, Escina IIa 13% e escina IIb 6% (ABUDAYEH et al., 2015).

2.6.2 *Dioscorea* sp. - Inhame

Dioscorea (Dioscoreaceae), é um tubérculo nativo da Ásia, África e América, distribuído em regiões tropicais de alta pluviosidade (GUTIÉRREZ, BUSTAMANTE e HURTADO, 2013).

Além de servir como alimento para o homem, são constituídos por princípios ativos como saponinas. A dioscina é uma das saponinas esteroidais bioativas mais abundantes do gênero *Dioscorea*, utilizada como complemento no tratamento de doenças coronárias e angina de peito na China (ZHU, *et al.*, 2015). A diosgenina, uma sapogenina esteroidal, é um importante insumo na produção de contraceptivos orais e cosméticos. Além disso, as propriedades de *Dioscorea* são valiosas pela produção de taninos e alcaloides (GARCÍA *et al.*, 2012; VELASCO-RAMÍREZ *et al.*, 2014).

2.6.3 *Smilax officinalis* - Salsaparrilha

S. officinalis (Liliaceae), é conhecida como fonte rica de saponinas esteroidais, das quais são conhecidas como sarsapogeninas e extraídas da raiz da planta (GU *et al.*, 2011; PATEL e SAVJANI, 2015).

É uma planta nativa brasileira, possui atividade anti-inflamatória, sendo utilizada no tratamento da artrite, reumatismo e psoríase (PATEL e SAVJANI, 2015).

Estudos sobre atividade hemolítica das saponinas da *S. officinalis* revelam que essa atividade hemolítica pode estar relacionada à composição química, porque a natureza da porção aglicona e oligossacarídica da molécula da saponina contribuem, naturalmente, para as propriedades físico-químicas e biológicas desta molécula. Nesse estudo comparativo da atividade hemolítica, os autores conferem alto potencial hemolítico às sarsapogeninas (SUN, CHEN e YE, 2006).

2.6.4 *Centella asiatica* - Centella

C. asiática (Umbelliferae) é popularmente conhecida no Brasil como cairuçu-asiático, centelha e pata-de-mula, tem sido utilizada para vários fins medicinais, tais como cicatrização de feridas, tratamento de asma, úlceras, lúpus, antibacteriano e antifúngico. Tem sido utilizada na medicina tradicional na Malásia e outras partes da Ásia por centenas de anos. Além de seu uso como uma planta medicinal, é também

consumida em saladas e misturada em bebidas, e em algumas regiões é utilizada como nutracêutico (HASHIM *et al.*, 2011; PITELLA *et al.*, 2009).

A investigação fitoquímica de folhas de *Centella asiatica* revela a presença de saponinas triterpênicas (RUMALLA *et al.*, 2011).

2.6.5 *Solanum lycocarpum* – Fruto do lobo

S. lycocarpum (Solanaceae) é amplamente distribuído pelo Cerrado brasileiro, e conhecido popularmente como o fruto do lobo. Apresenta alta resistência ao estresse hídrico e climático, sobrevivendo e frutificando ao longo do ano. Seus frutos são consumidos a fresco ou cozidos (PASCOAL *et al.*, 2013). Sua utilização na medicina tradicional é feita por sua ação sedativa e para tratamento de epilepsia, asma, diabetes, obesidade, dor abdominal, dor renal e níveis elevados de colesterol (SILVA *et al.*, 2015).

Estudos fitoquímicos da planta demonstraram a presença de polifenóis e glicoalcaloides, que são metabólitos secundários produzidos para proteção contra animais e insetos devido à sua toxicidade. Estudos utilizaram o extrato etanólico dos frutos dessa espécie para atividade tripanossomicida, onde o extrato obteve alto efeito tóxico contra a forma epimastigota da estirpe de *Trypanosoma cruzi* (MOREIRA *et al.*, 2013). Também existem relatos sobre forte atividade larvicida da utilização dos frutos de *S. lycocarpum* frente a larvas do mosquito *Culex quinquefasciatus* (SILVA *et al.*, 2015).

2.6.6 *Pfaffia glomerata* – Ginseng brasileiro

P. glomerata (Amaranthaceae) é conhecida como Ginseng brasileiro e amplamente distribuída por todo o Brasil. Os extratos de raízes de *Pfaffia glomerata* são utilizados por sua ação gastro-protetora, anti-inflamatório, analgésico, antioxidante, antireumáticos, e antidiabéticos e também como suplemento alimentar, entre outras indicações (SERRA, FELIPE e CORTEZ, 2012; SILVA *et al.*, 2017).

Os principais constituintes são o estigmasterol, o sitosterol, a alantoína, o ácido pfaffico e saponinas notriterpênicas. As raízes de *Pfaffia glomerata* contêm uma concentração média considerável de saponinas, aproximadamente $13,5 \pm 2,0\%$.

Recentemente em estudo inédito a fração hexânica do extrato hidroalcoólico hidrolisado da raiz de *P. glomerata* foi testado contra estirpe tripomastigota de *Trypanossoma cruzi*, e obteve resultados satisfatórios (SILVA *et al.*, 2017).

2.6.7 *Polygonum hydropiperoides* – Erva-de-bicho

P. hydropiperoides (Polygonaceae) é conhecida popularmente como “erva-de-bicho”. Suas partes aéreas são compostas principalmente de polifenóis, flavonoides e taninos. A espécie é utilizada na fabricação de pomadas, pílulas e supositórios empregados no tratamento de Hemorroidas (CARDOSO, HONDA e DIAS, 2012).

É também considerada uma planta invasora, pois cresce em sistemas de cultivo utilizados pelo homem, desde áreas agrícolas especialmente úmidas ou sob regime de irrigação, até praças e jardins de centros urbanos (JÁCOME *et al.*, 2004).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade moluscicida de extratos hidroalcoólicos obtidos de espécies vegetais ricas em saponinas e/ou taninos em *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário do parasito *S. mansoni*.

3.2 Objetivos Específicos

- Realizar triagem preliminar das espécies vegetais, sequenciando os testes apenas com as quais obtiverem ação moluscicida a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$;
- relacionar a atividade moluscicida à presença metabólitos secundários, nas espécies vegetais deste estudo de acordo com a literatura;
- avaliar efeito tóxico das espécies vegetais em moluscos da espécie *B. glabrata*;
- avaliar os efeitos dos extratos vegetais estudados sobre a taxa de ovoposição dos moluscos;
- determinar dose letal mediana (DL^{50}) e dose letal de 90% (DL^{90}) para os extratos que apresentarem atividade moluscicida até $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material Vegetal

Os extratos hidroalcoólicos foram disponibilizados pelo Professor Doutor Ademar Alves da Silva PEREIRA 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).

Segue abaixo a **Tabela 1** que descreve as partes utilizadas na produção do extrato bruto de cada espécie deste estudo e o respectivo meio de obtenção.

Tabela 1. Espécies vegetais e suas respectivas partes utilizadas no extrato hidroalcoólico.

<i>Espécie</i>	<i>Nome Popular</i>	<i>Parte utilizada</i>	<i>Meio de obtenção</i>
<i>A. hippocastanum</i>	Castanha da Índia	Sementes	Comercial
<i>C. asiática</i>	Centella	Partes aéreas	Coleta no horto*
<i>Dioscorea</i> sp.	Inhame	Raiz	Comercial
<i>P. glomerata</i>	Ginseng brasileiro	Partes aéreas	Coleta no horto*
<i>P. hydropiperoides</i>	Erva-de-bicho	Partes aéreas	Coleta no horto*
<i>S. officinalis</i>	Salsaparrilha	Partes aéreas	Coleta no horto*
<i>S. lycocarpum</i>	Fruta do Lobo	Fruto	Coleta no horto*

*Horto da Faculdade de Farmácia UFJF

Conforme descrito por LUIZ, 2014, o extrato hidroalcoólico de cada espécie vegetal foi produzido a partir da secagem do material em estufa com circulação de ar a 40 °C por 48 horas e, posteriormente, redução do material em moinho de facas. Cada material já triturado foi submetido a extração por maceração por 72 horas, em etanol água (1:1 v/v), logo após, o material foi filtrado utilizando papel de filtro. Os extratos hidroalcoólicos foram concentrados em evaporador rotativo, para obtenção dos extratos secos. Os extratos foram armazenados sob refrigeração no NIPPAN, e disponibilizados para preparo das soluções teste.

4.2 Moluscos

Os moluscos utilizados neste estudo são da espécie *B. glabrata*, adultos, selecionados pelo tamanho médio da concha de 1 cm (variando de 0,8 a 1,2 cm). Os moluscos são mantidos no Moluscário da Faculdade de Farmácia da UFJF, em recipientes plásticos onde a água é renovada de 4 em 4 dias para remoção de excretas e manutenção das características hídricas necessárias para seu desenvolvimento. A água onde estão habituados é declorada, a alimentação é feita diariamente com alface fresca (*Lactuca sativa*) previamente lavada.

Segundo Camargo e colaboradores (2016), ocorre maior liberação de cercárias pelo molusco *B. glabrata* na temperatura de 25 °C, por isso, a temperatura da água de acondicionamento foi mantida em média de 25 °C com auxílio do termostato Roxim Ht 1900.

4.3 Triagem do Efeito Tóxico

Para considerar o extrato bruto a ser testado como moluscicida viável, foram seguidas as recomendações da OMS (WHO, 1983) e do método adaptado de Silva e colaboradores (2008).

O objetivo em realizar a triagem consiste na racionalidade em se testar, preliminarmente, a concentração de 100 µg.mL⁻¹, porque, segundo os critérios da OMS, um moluscicida vegetal viável deve apresentar efeito tóxico em moluscos adultos numa concentração menor ou igual a 100 µg.mL⁻¹. Assim, a partir desse importante dado, foram testados os extratos hidroalcoólicos na concentração de 100 µg.mL⁻¹, das espécies: *A. hippocastanum*, *Dioscorea* sp., *S. officinalis*, *C. asiática*, *S. lycocarpum*, *P. glomerata* e *P. hydropiperoides*.

4.3.1 Preparo da amostra

Foram preparadas soluções com o extrato das 7 espécies utilizando 1 mL de DMSO – Dimetilsulfóxido para solubilização de 50 mg de cada extrato, de modo que a concentração final da solução estoque fosse 50 mg.mL⁻¹. Após a completa dissolução, o volume de 20 µL da solução estoque foi transferido para pequenos

recipientes plásticos onde o volume foi completado até 10 mL com água potável declorada, para obtenção da concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Para o controle negativo, foi utilizado 20 μL de DMSO (Dimetilsulfóxido de Sódio) em 10mL de água potável declorada. A concentração do controle corresponde ao volume de DMSO utilizado na maior concentração de extrato hidroalcoólico testada.

4.3.2 Teste preliminar

Foram utilizados três moluscos para avaliação de cada espécie vegetal. Os moluscos foram acondicionados em recipientes plásticos, individualmente, contendo a solução com o extrato vegetal (Item 4.3.1) e foram mantidos em contato com a mesma por 24 horas, durante este período os moluscos não foram alimentados e permaneceram sob observação de sinais como perda da motilidade, retração para a concha cefalópode, e presença de hemolinfa.

A perda da motilidade foi observada por meio de observação da resposta do molusco quando estimulado por uma espátula em suas partes moles, o normal é que eles se movimentem, se retraiam como mecanismo de defesa. A retração foi observada quando os moluscos permaneciam dentro de sua cocha. A liberação de hemolinfa foi observada pela presença de líquido de coloração vermelha na solução de exposição. Todas as observações realizadas a olho nu.

Após as 24 horas os grupos de moluscos foram analisados quanto ao número de sobreviventes e mortos de cada extrato vegetal e grupo controle. Para continuidade do ensaio, foi necessário avaliar a capacidade de recuperação dos moluscos após o estresse causado pela exposição à solução. Para avaliação da recuperação dos moluscos sobreviventes, um novo recipiente plástico foi preparado com água potável declorada com alface fresca previamente lavada. Os moluscos foram retirados da solução teste, lavados lentamente e transferidos para o novo recipiente, individualmente, e observados por mais 24 horas.

Os mesmos critérios foram analisados durante o período de recuperação dos moluscos. E ao final, do total de 48 horas, foi compilado o número de sobreviventes e mortos.

4.4 Ensaio de Toxicidade Aguda

As espécies vegetais tóxicas a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ no teste preliminar do item 4.3, foram submetidas ao ensaio de toxicidade aguda, no qual concentrações mais baixas foram estudadas, para obtenção de resultados quantitativos, como DL^{50} e DL^{90} .

Para este ensaio, foi utilizado um grupo de seis moluscos para cada concentração de extrato hidroalcolóico das espécies *S. officinalis* e *A. hippocastanum*, e para o grupo controle.

As concentrações testadas foram 10, 25, 50, 75 e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para *A. hippocastanum* e 25, 50, 75 e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para *S. officinalis*. O mesmo método utilizado no item 4.3 foi seguido para realização desse teste, assim como o preparo das amostras e do controle já descritos nos itens 4.3.1 e 4.3.2.

4.5 Avaliação da ovoposição dos moluscos sobreviventes

Foi realizada avaliação da ovoposição dos moluscos sobreviventes ao efeito da menor concentração da espécie vegetal testada que provocou menor letalidade, por essa razão essa avaliação foi subsequente ao teste de toxicidade aguda. A espécie *A. hippocastanum* obteve resultado tóxico em mais espécimes quando comparado a *S. officinalis*, e para realizar a avaliação do efeito desse extrato foi necessário testar concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, ou seja, um ponto de avaliação a mais que *S. officinalis*. Desta forma o extrato de *A. hippocastanum*, denominado grupo AH, foi testado na concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e de *S. officinalis*, denominado grupo SO, foi testado na concentração de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

O grupo controle, denominado DMSO, foi testado na concentração que corresponde ao volume de DMSO utilizado na maior concentração testada, ou seja, 0,2% v/v.

Após a exposição, já descrita no item 4.4, os moluscos foram reunidos em recipientes plásticos contendo 250 mL de água decolorada, renovada de 4 em 4 dias. No recipiente foi mantido um substrato para ovoposição e os moluscos foram alimentados com alface e monitorados diariamente.

Cada grupo continha três moluscos, número definido com base nos sobreviventes a exposição da concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do extrato hidroalcoólico de *A. hippocastanum*. O ensaio teve a duração de 15 dias, sendo contados a partir do momento em que foram expostos a solução teste.

Os ovos depositados no substrato foram coletadas diariamente e contadas com auxílio de lupa e lanterna.

4.6 Análise estatística

Dados estatísticos foram desenvolvidos para o ensaio de toxicidade aguda, realizado com *A. hippocastanum* e *S.offinalis*, onde pudemos determinar as doses letais DL^{50} e DL^{90} , através de auxílio do software BioStat®. DL^{50} e DL^{90} foram obtidas no tempo final do experimento, ou seja, após as 48 horas do início da exposição.

Para a avaliação de ovoposição dos moluscos, o número de massas ovos e número total de ovos presentes nas massas, foram analisados pelo teste T Student, com auxílio Microsoft Excel.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Teste Preliminar

As soluções teste de extratos que apresentaram alimento consumido, quantidade de excretas e características de motilidade semelhantes as do grupo controle não foram consideradas tóxicas aos moluscos *B. glabrata*. Após teste preliminar com os extratos hidroalcoólicos das sete espécies vegetais, constata-se que cinco delas, *Dioscorea sp*, *C. asiática*, *S. lycocarpum*, *P. glomerata* e *P. hydropiperoides*, não foram tóxicas aos moluscos *B. glabrata* na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, durante o tempo de exposição e período de recuperação. Os resultados preliminares estão dispostos na **Tabela 02**.

Tabela 02. Resultados da exposição de moluscos *B. glabrata* aos extratos hidroalcoólicos das espécies vegetais no teste preliminar

Grupos	Total (Tempo 0)	% morte aparente (tempo 24h)	% morte real (tempo 48h)
*CN (-)	3	0	0
<i>Aesculus hippocastanum</i>	3	33,3 (1)	100 (3)
<i>Centella asiática</i>	3	0	0
<i>Dioscorea sp.</i>	3	0	0
<i>Pfaffia glomerata</i>	3	0	0
<i>Polygonum hydropiperoides</i>	3	0	0
<i>Smilax officinalis</i>	3	66,66(2)	100 (3)
<i>Solanum lycocarpum</i>	3	0	0

*CN (-) representa grupo exposto a solução de 0,2% v/v de DMSO

No grupo controle negativo, a exposição ao DMSO, não apresentou qualquer efeito tóxico aos moluscos. As espécies *A. hippocastanum* e *S. officinalis* apresentaram atividade tóxica já nas primeiras 24 horas, com presença de hemolinfa e forte retração. Percorridas as 24 horas os moluscos aparentemente mortos também continuaram a ser observados no período de recuperação por mais 24

horas. Estes moluscos podem sobreviver em estivação ou anidrobiose, por suportar as condições desfavoráveis do meio, e quando são retomadas condições adequadas logo se reabilitam (REY, 2001). Portanto, esta etapa é fundamental para a completa constatação do efeito moluscicida dos extratos.

No final do teste, ou seja, após 48 horas, as espécies *A. hippocastanum* e *S. officinalis* apresentaram atividade moluscicida, induzindo 100% de morte nos espécimes testados, na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, e por isso, prosseguiram-se os testes em concentrações menores.

5.2 Teste Toxicidade Aguda

Os resultados demonstraram que o extrato vegetal da espécie *A. hippocastanum* foi tóxico em concentrações menores, ao contrário da espécie *S. officinalis*. Os resultados e observações seguem descritos nas próximas sessões.

5.2.1 *Aesculus hippocastanum*

Os resultados da exposição dos moluscos ao extrato hidroalcoólico de *A. hippocastanum* estão descritos na **Tabela 3**. O grupo foi denominado AH, testado nas concentrações de 100, 75, 50, 25 e $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Tabela 3. Resultados da exposição de moluscos *B. glabrata* ao extrato hidroalcoólico de *A. hippocastanum* (AH)

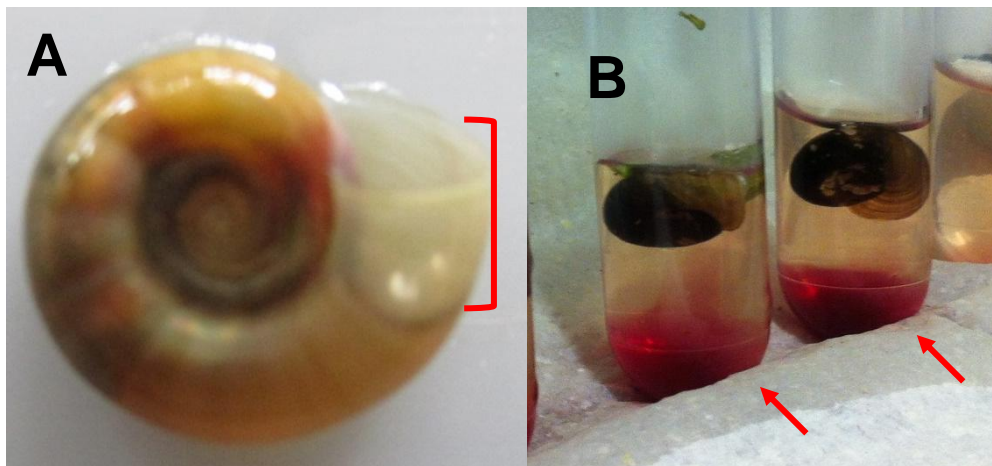
Grupos	Total de moluscos Tempo 0	% Morte aparente Tempo 24h (número de moluscos mortos)	% Morte real Tempo 48h (número de moluscos mortos)
CN (-)	6	0	0
AH $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$	6	33,3 % (2)	50 % (3)
AH $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$	6	33,3 % (2)	66,6 % (4)
AH $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$	6	50 % (3)	100 % (6)
AH $75 \mu\text{g.mL}^{-1}$	6	66,6 % (4)	100 % (6)
AH $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$	6	66,6 % (4)	100 % (6)

*CN (-) representa grupo exposto a solução de 0,2% v/v de DMSO

Após 24 horas de exposição, os grupos mais afetados foram AH 100 e AH 75, os quais 3 moluscos de cada grupo apresentaram liberação de hemolinfa. Foi observado que a liberação de hemolinfa acontecia quando os moluscos ainda conseguiam se retrair e se mover na solução teste, e só depois que uma grande quantidade de hemolinfa era liberada eles permaneciam estáticos ou retraídos. Os demais remanescentes apresentaram-se muito retraídos. O grupo AH 50 e AH 25, apresentaram sinais de estresse mais brandos, porém alguns moluscos não resistiram a exposição nas primeiras 24 horas.

Após o período de 48 horas todos os moluscos do grupo AH 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, AH 75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e AH 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ estavam mortos. No grupo AH 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e AH 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ houve sobreviventes com sinais de forte estresse, além da pouca motilidade, na água havia pouca excreta e o alface foi pouco consumido quando comparado ao grupo controle. O extrato *A. hippocastanum* mostrou DL^{90} igual a 34,09 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e DL^{50} igual a 11,87 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A **Figura 5** representa o efeito tóxico causado pela espécie *A. hippocastanum*.

Figura 5. *B. glabrata* exposto ao extrato hidroalcoólico de *A. hippocastanum*, em **A**, linha vermelha indica a retração do molusco para a concha e **B**, líquido de coloração vermelha no fundo do recipiente evidencia liberação de hemolinfa.



Fonte. A autora.

As sementes dessa espécie são compostas majoritariamente por saponinas triterpênicas, a Escina, portanto, a liberação acentuada de hemolinfa pode estar relacionada a presença desse metabólito. As saponinas, em geral, possuem essa

propriedade de rompimento da membrana. Pereira Filho e colaboradores (2014) utilizaram o extrato hidroalcoólico de folhas da espécie *Jatropha gossypifolia* frente aos caramujos *B. glabrata*, e obtiveram concentrações de atividade moluscicida a 25 ppm, na qual haviam 26,6% de espécimes mortos. Em nosso estudo, a concentração de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, que corresponde a 10 ppm, da espécie *A. hippocastanum* foi capaz de causar 50% de morte aos espécimes expostos.

5.2.2 *Smilax officinalis*

Os resultados da exposição dos moluscos ao extrato hidroalcoólico de *S. officinalis* estão descritos na **Tabela 04**. O grupo de moluscos foi denominado grupo SO, testado nas concentrações de 100, 75, 50 e 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Tabela 04. Resultados da exposição de moluscos *Biomphalaria glabrata* ao extrato hidroalcoólico de *Smilax officinalis* (SO)

Grupos	Total de moluscos Tempo 0	%	%
		Morte aparente Tempo 24h (número de moluscos mortos/moluscos tempo 0)	Morte real Tempo 48h (número de moluscos mortos/moluscos tempo 0)
CN (-)	6	0	0
SO 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	6	0	0
SO 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	6	0	33,3 % (3)
SO 75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	6	33,3 % (2)	50 % (4)
SO 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	6	50 % (3)	83,3 % (5)

*CN (-) representa grupo exposto a solução 0,2% v/v de DMSO

Após 24 horas de exposição, os grupos mais afetados foram SO 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e SO 75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, os quais 1 molusco de cada grupo apresentaram liberação de hemolinfa. Os demais grupos apresentaram sinais de estresse mais brandos, somente retração e lentidão.

A **Figura 6** representa o efeito tóxico causado pela espécie *S. officinalis*.

Figura 6. *B. glabrata* exposto ao extrato hidroalcoólico de *S. officinalis*, em **A**, linha vermelha indica a retração do molusco para a concha e **B**, líquido de coloração vermelha evidencia liberação de hemolinfa.

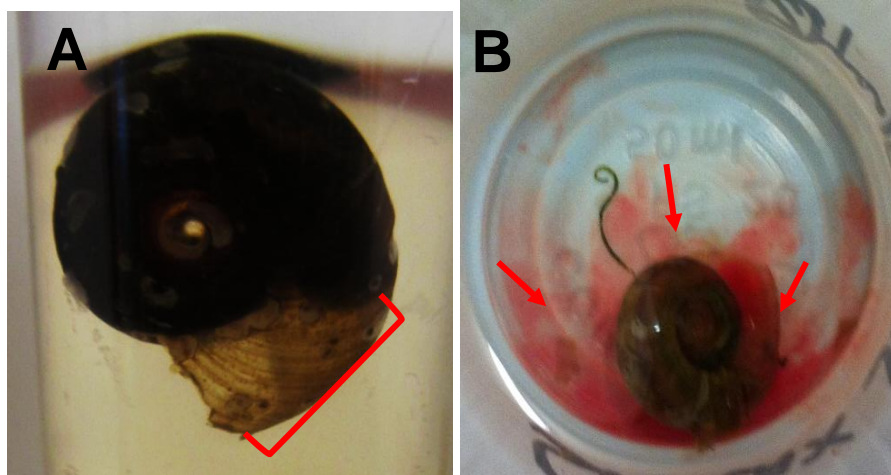


Figura 6. Sinais do efeito tóxico da espécie *S. officinalis* Fonte. A autora

Vale ressaltar que, após o período de 48 horas nenhum grupo, nem mesmo SO $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ causou 100% de espécimes mortos, diferentemente do resultado obtido no ensaio preliminar. Em SO $75 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e SO $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, pelo menos um molusco não havia resistido, e em SO $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ todos os moluscos expostos sobreviveram sem sinais de estresse aparentes, quando comparados ao grupo controle. O extrato *S. officinalis* mostrou DL^{90} igual a $132,30 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e DL^{50} igual a $51,21 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

As partes aéreas da *S. officinalis*, são ricas em saponina esteroide, cuja atividade hemolítica já foi comprovada por Sun, Che e Ye (2006), portanto, a liberação acentuada de hemolinfa também pode estar relacionada a presença desse metabólito.

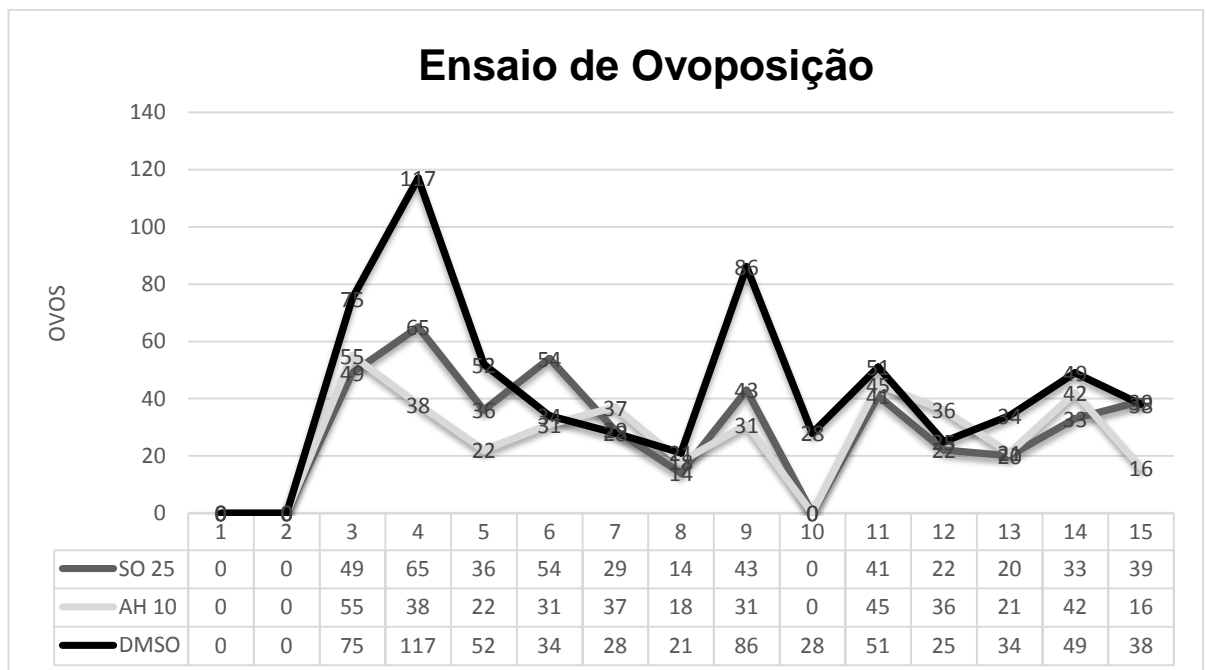
5.2 Avaliação da Ovoposição

A avaliação da ovoposição teve duração de 15 dias, incluindo as 24 horas de exposição a solução teste. Os resultados estão dispostos no **Figura 7**, que relaciona o número de ovos ao respectivo dia avaliado.

Podemos observar que o maior pico de ovoposição do grupo DMSO (Controle negativo) e SO $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ corresponde ao 4º dia após o início do teste, e o

maior pico do grupo AH 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ corresponde ao 3º dia. Precedente a estes picos não houve ovoposição, o que indica que os moluscos dos 3 grupos avaliados estavam em condições desfavoráveis a postura e, mesmo quando as condições foram normalizadas, ou seja, no 2º dia, também não houve postura, o que pode estar relacionado a um período de reabilitação dos moluscos após o estresse sofrido.

Figura 7. Contagem diária de ovos de moluscos *B. glabrata* durante 15 dias dos grupos SO 25 (*S. officinalis* 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), AH 10 (*A. hippocastanum* 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), e DMSO (0,05% v/v)



Os picos e declínios de cada grupo correspondem, em sua maioria, aos mesmos dias, o que pode estar relacionado a alguma característica fisiológica do molusco *B. glabrata*. A correspondência de comportamento entre os grupos teste e controle é notável, porém os grupos AH 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e SO 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentaram valores menores de ovoposição quando comparados ao grupo DMSO ao longo do período de estudo. A partir da análise do número total de ovos, na **Tabela 5**, observou-se uma redução de aproximadamente 40% do grupo inicialmente exposto ao extrato hidroalcoólico de *A. hippocastanum* e 30% do grupo inicialmente exposto ao extrato hidroalcoólico de *S. officinalis*.

Tabela 5. Atividade dos extratos *A. hippocastanum* (AH 10) e *S. officinalis* (SO 25) sobre a ovoposição de moluscos *B. glabrata* durante 15 dias

Grupos (n=3)	Total de Ovos	% de Redução em relação ao controle	Máximo - Mínimo (Ovos)
DMSO*	638	-	117 – 21
AH 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	392	38,55%	55 – 0
SO 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	445	30,25%	65 - 0

*DMSO = Grupo Controle Negativo, solução DMSO 0,05% v/v.

No grupo AH 10 houve menor quantidade de ovos, o que indica que foi o extrato que mais afetou a ovoposição, em comparação com o grupo DMSO (controle negativo). No grupo SO 25 também houve menor ovoposição comparada ao grupo DMSO. A redução de ambos os grupos é estatisticamente significativa ($p < 0,05$), ou seja, embora a concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do extrato hidroalcoólico de *A. hippocastanum* e $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e do extrato hidroalcoólico de *S. officinalis* não tenham causado letalidade, afetaram a capacidade de ovoposição dos moluscos sobreviventes. A importância da avaliação da ovoposição dos moluscos sobreviventes reflete no fato de que, embora concentrações menores dos extratos testados não foram capazes de causar letalidade, seu efeito tóxico pode contribuir para o controle do molusco através da diminuição da ovoposição dos mesmos.

6 CONCLUSÃO

O extrato hidroalcoólico das espécies *Dioscorea sp*, *C. asiática*, *S. lycocarpum*, *P. glomerata* e *P. hydropiperoides*, não foram efetivos no teste preliminar, onde não houve morte de moluscos *B. glabrata* submetidos a exposição da solução teste a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. As espécies *P. hydropiperoides* e *S. lycocarpum* avaliadas pelo relato de composição rica em taninos não foram moluscicidas efetivos, portanto, neste estudo, não há relação entre efeito moluscicida e presença de taninos nas espécies avaliadas.

Segundo os critérios da OMS (1983) a concentração para o extrato ser considerado moluscicida viável é igual ou menor a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, portanto o extrato da espécie *A. hippocastanum* pode ser considerado um moluscicida vegetal viável. Essa atividade pode estar relacionada a presença da Escina, saponina triterpênica de composição majoritária nas sementes da *A. hippocastanum*. A concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do extrato hidroalcoólico de *A. hippocastanum* induziu somente 50% de letalidade nos moluscos *B. glabrata* expostos, porém foi capaz de afetar a ovoposição dos moluscos sobreviventes quando comparados ao grupo controle. Logo, as concentrações menores do extrato que não causaram 100% de morte nos espécimes avaliados, afetaram significativamente a capacidade de ovoposição do molusco *B. glabrata*, e por essa razão, podem contribuir para seu controle.

O extrato hidroalcoólico de partes áreas da espécie *S. officinalis* demonstrou atividade moluscicida contra moluscos *B.glabrata*, porém seu valor de DL^{90} não é ideal segundo critérios da OMS e, por isso, o extrato não pode ser considerado moluscicida vegetal viável. Os moluscos *B. glabrata* sobreviventes a concentração de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ demonstraram redução significativa da ovoposição em relação ao grupo controle. Em conclusão, embora não seja um moluscicida vegetal viável, o extrato hidroalcoólico de *S. officinalis* foi capaz de afetar a ovoposição de moluscos *B. glabrata*, e assim, podem auxiliar no controle da espécie.

REFERÊNCIAS

ABUDAYEH, Z.H.M.; AZZAM, K.M.; NADDAF, A.; KARPIUK, U. V.; KISLICHENKO, V.S. Determination of Four Major Saponins in Skin and Endosperm of Seeds of Horse Chestnut (*Aesculus Hippocastanum* L.) Using High Performance Liquid Chromatography with Positive Confirmation by Thin Layer Chromatography. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v.5, n.4, p. 587-91, Kharkiv, 2015.

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. 10-6, Recife, 2016.

BEZERRA, J.C.; SILVA, I.A.; FERREIRA, H.D.; FERRI, P.H.; SANTOS, S.C. Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal plants. **Fitoterapia**, p. 7, n.5, p. 428-30, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância da Saúde. Vigilância da Esquistossomose Mansoní – Diretrizes técnicas. 4 ed., 1 reimpr. Brasília: Ministério da Saúde; 2014. 146p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Esquistossomose – Situação Epidemiológica. Brasília, 2016. Disponível em:

<<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/oministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/656-secretaria-svs/vigilancia-de-a-az/Esquistossomose /11244-situacao-epidemiologica-dados>> Acesso em: 04 maio 2017.

CAMARGO, E.A.F.; CAMARGO, J.T.F.; NEVES, M.F.; SIMÕES, L.F.; BASTOS, L.A.D.; MAGALHÃES, L.A.; ZANOTTI-MAGALHÃES, E.M. Assessment of the impact of chanves in temperatura in *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) melanica and albino variants infected with *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907). **Brazilian Journal of Biology**, v. 26, p. 1-5, Campinas, 2016.

CANTANHEDE, S.P.D, MARQUES, A.M., SILVA-SOUZA, N.; VALVERDE, A.L. Atividade moluscicida de plantas: uma alternativa profilática. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 2, v. 20, p. 282-88, Curitiba, 2010.

CARDOSO, C.A.L.; HONDA, N.K.; DIAS, E.S. Avaliação do perfil cromatográfico em espécies de Polygonum e amostras comercializadas como “erva-de-bicho”. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n.2, p. 236-45, Campo Grande, 2012.

CDC. Center for Disease Control and Prevention. Shistosomiasis - Biology, 2012. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.html>> Acesso em: 07 maio 2017.

CÉSPEDES, I.A.M. Intestinal Schistosomiasis: a case report. **Revista Ciências Médicas**, v. 18, n. 5, Pinar del Rio, 2014.

CIOLI, D.; PICA-MATOCCHIA, L.; BASSO, A.; GUIDI, A. Shistosomiasis control: Praziquantel forever? **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 195, n. 1, p. 23-9, Rome, 2014.

CHEVALIER, F.D.; LE CLEC'H, W.; ENG, N.; RUGEL, A.R.; ASSIS, R.R.; OLIVEIRA, G.; HOLLOWAY, S.; CAO, X.; HART, P.J.; LOVERDE, P.T.; ANDERSON, T.J.C. Independent origins of loss-of-function mutations conferring Oxamniquet resistance in a Brazilia Shistosome population. **International Journal for Parasitology**, v. 46, n. 7, p. 417–24, Belo Horizonte, 2016.

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

COLLEY, G. D.; BUSTINDUY, A.L.; SECOR, E.; KING, C.H. Human Schistosomiasis. **The Lancet**, v. 283, n. 9936, p. 2253-64, 2014.

DA'DARA, A.A.; KRAUTZ-PETERSON, G. New insights into the reaction of *Schistosoma mansoni* cercaria to the human complement system. **Parasitology Research**, v. 113, Iss. 10, p. 3685-2696, Massachusetts, 2015.

FENWICK, A.; UTZINGER, J. Helminthic Diseases: Schistosomiasis. **International Encyclopedia of Public Health**, ed. 2, p. 588-96, Londres, 2016.

GARCÍA, H.J.M.; LEZAMA, E.G.G.; CABEZAS, S.M.; TUPAYACHI, A.; ALBÁN, J. Estudio de sapogeninas esteroidales de especies peruanas del género *Dioscorea*. **Revista de la Sociedad Química del Perú**, v.78, n.3, p. 208-18, Lima, 2012.

GOMES, E.C.S.; MESQUITA, M.C.S.; REHN, V.N.C.; NASCIMENTO, W.R.C.; LOYO, R.; BARBOSA, C.S. Urban transmission of schistosomiasis: new epidemiological situation in the forest area of Pernambuco. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, n. 4 v. 19, p. 822-34, São Paulo, 2016.

GU, G.; FANG, M.; LIU, J.; GU, L. Concise synthesis and antitumor activities of trisaccharide steroidal saponins. **Carbohydrate Research**, v. 346, p. 2406-13, Jinan, 2011.

GUTIÉRREZ, Y.A.P.; BUSTAMANTE, S.L.; HURTADO, G.B. Diagnóstico molecular diferencial *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum* en ñame (*Dioscorea* sp.). **Revista Colombiana de Biotecnología**, v.15, n.1, p. 52-60, Bogotá, 2013.

HASHIM, P.; SIDEK, H.; HELAN, M.H.M.; SABERY, A.; PALANISAMY, U.D.; ILHAM, M. Triterpene Composition and Bioactivities of *Centella asiatica*. **Molecules**, v. 16, p. 1310-22, Selangor, 2011.

JÁCOME, R.L.R.P.; LOPES, D.E.S.; RECIO, R.A.; MACEDO, J.F.; OLIVEIRA, A.B. Caracterização farmacognóstica de *Polygonum hydropiperoides* Michaux e *P. spectabile* (Mart.) (Polygonaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 1, p.21-7, Belo Horizonte, 2004.

JIANG, N. XIN, W.; WANG, T.; ZHANG, L.; FAN, H.; DU, Y.; LI, C.; FU, F. Protective effect of aescin from the seeds of *Aesculus hippocastanum* on liver injury induced by endotoxin in mice. **Phytomedicine**, v.18, (2011), p. 1276–84, Yantai, 2011.

JOLYL, C.A.; HADDAD, C.F.B.; VERDADE, L.M.; OLIVEIRA, M.C.; BOLZANI, V.S.; BERLINCK, R.G.S. Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. **Revista USP**, n.89, p. 114-33, São Paulo, 2011.

KAISER, S.; PAVEI, C.; ORTEGA, G.G. Estudo da relação estrutura-atividade de saponinas hemolíticas e/ou imunoadjuvantes mediante uso de análise multivariada. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n. 3, p. 300-309, Porto Alegre, 2010.

KING, C.H.; SUTHERLAND, L.J.; BERTSCH, D. Systematic review and metaanalysis 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, Cleveland, 2015

LAMBERTUCCI, J.R. Acute Schistosomiasis mansoni: Revisited and reconsidered. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n.4, p. 422-35, Rio de Janeiro, 2010.

LIMA, K.M.; NEGRO-DELLACQUA, M.; SANTOS, V.E.F.A.; CASTRO, C.M.M.B. Post-splenectomy infections in chronic schistosomiasis as a consequence of bacterial translocation. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 3, p. 314-20, Uberada, 2015.

LUIZ, M. T. Avaliação de extratos vegetais ricos em saponinas e taninos como agentes mitigadores de metano entérico em ruminantes. 2014. 52p. Monografia (Graduação em Farmácia) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2014.

MACÍAS, L.R.; GARCÍA, I.S.; ROMANO, R.A.; TOLEDO, M.J. SALCEDO, B.S. Esquistosomiasis: Una Enfermedad Importada, **Revista Pediátrica de Atención Primaria**, v. 12, n. 47, p.425-30, Madrid, 2010.

MANAARGADO-CATIN, M.; ALI-CHERIF, A.; POUGNAS, J.L.; PERRIN, C.
Hemolysis by surfactants - A review. **Advances in Colloid and Interface Science**,
v. 228, p. 1-16, Montpellier, 2016.

MARTINS, M.C.B.; SILVA, M.C.; FAGUNDES, H.A.; SILVA, L.R.S.S.;
ALBUQUERQUE, M.C.P.A.; AIRES, A. L.; FALCÃO, E.P.S.; PEREIRA, E.C.; MELO,
A.M.M.A.; SILVA, N.H. Barbatic Acid Offers a New Possibility for Control of
Biomphalaria glabrata and Schistosomiasis. **Molecules**, v.22, n.4, p. 1-11, Recife,
2017.

MASSARA, L. C; MURTA, F.L.G.; ENK, M.J.; ARAÚJO, A.D.; MODENA, C.M.;
CARVALHO, O.S. Evaluación de materiales educativos impresos sobre la
esquistosomiasis, utilizados em educación para la salud em zonas endémicas de
Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.25, n.3, p. 575-685, Brasília, 2016.

MATAL, R.C.S. *et al.* Molluscicidal Activity of Compounds Isolated from *Euphorbia*
conspicua. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 10, p. 1880-87,
São Paulo, 2011.

MELO, A.L.; COELHO, P.M.Z. Schistosoma mansoni e a doença. In: NEVES, D.P.;
MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. **Parasitologia Humana**. 11ª Edição.
São Paulo, SP: Editora Atheneu, 2012. Capítulo 22, p. 193-212.

MENDONÇA, A.M.B.; FEITOSA, A.P.S.; VERAS, D.L.; MATOS-ROCHA, T.J.;
CAVALCANTI, M.G.S.; BARBOSA, C.C.G.S.; BRAYNER, F.A.; ALVES, L.C. The
susceptibility of recent isolates of *Schistosoma mansoni* to praziquantel. **Revista**
Instituto Medicina Tropical, v. 58, n. 7, p. 1-6, São Paulo, 2016.

MOREIRA, R.D.; MARTINS, G.Z.; MAGALHÃES, N.O.; ALMEIRA, A.E.; PIETRO,
R.C.L.R.; SILVA, F.A.; CICARELLI, R.M.B. In vitro trypanocidal activity of
solamargine and extracts from *Solanum palinacanthum* and *Solanum lycocarpum* of
brazilian cerrado. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 3, p. 903-
907, Rio de Janeiro, 2013.

MUTAPI, F. Changing Policy and Practice in the Control of Pediatric Schistosomiasis. **American Academy of Pediatrics**, v. 135, n. 3, p. 536-546, Edimburgo, 2015.

NUNES, A. L. Plano de intervenção: implantação de medidas educativas para o controle da esquistossomose : Estudo de caso no município do Cabo de Santo Agostinho. 36f. Especialização (Gestão de Sistemas e Serviços de Saúde) –, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2012.

OCHOA, U.G; MUJICA, A. S.; BARRIOS, E.E.; CONSENZA, M.C.; RADHAMES, C.M.; AYALA, J.; OJEDA, G.O. Respuesta humoral IgM e IgG frente a antígenos de excreción-secreción de *Schistosoma mansoni* en murinos infectados y su relación con las citoquinas Il-1 α y TNF- α . **Kasmera**, v.43, n.2, p. 98-211, Valencia, 2015.

PASCOAL, A.M.; DI-MEDEIROS, M.C.; BATISTA, K.A.; LELES, M.I.G.; LIÃO, L.M.; FERNANDES, K.F. Extraction and chemical characterization of starch from *S. lycocarpum* fruits. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, p. 1304–1310, Goiânia, 2013.

PATEL, S.S.; SAVJANI, J.K. Systematic review of plant steroids as potential antiinflammatory agents: Current status and future perspectives. **The Journal of Phytopharmacology**, v. 4, n.2, p. 121-125, Gujjarat, 2015.

PITTELA, F.; DUTRA, R.C.; JUNIOR, D.D.; LOPES, M.T.P.; BARBOSA, N.R. Antioxidant and Cytotoxic Activities of *Centella asiatica* (L) Urb. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 9, p. 3713-3721, Juiz de Fora, 2009.

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, São Paulo, 2014.

REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**. 3^o Ed. Rio de Janeiro, RJ: Editora Guanabara/ Koogan, 2001.

RUMALLA, C.S.; ALI, Z.; WEERASOORIYA, A.D.; SMILLIE, T.J.; KHAN, I.A. Two New Triterpene Glycosides from *Centella asiatica*. **Planta Med**, v.76, p. 1018–1021, Mississippi, 2011.

SANTOS, E.A.; CARVALHO, C.M.; COSTA, A.L.S.; CONCEIÇÃO, A.S.; MOURA, F.B.O.; SANTANA, A.E.G. Bioactivity Evaluation of Plant Extracts Used in Indigenous Medicine against the Snail, *Biomphalaria glabrata*, and the Larvae of *Aedes aegypti*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2012, p. 1-9, Alagoas, 2012.

SERRA, L.Z.; FELIPE, D.F.; CORTEZ, D.A.G. Quantification of β -ecdysone in different parts of *Pfaffia glomerata* by HPLC. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 6, p. 1349-54, Maringá, 2012.

SERRANO, J.; PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AURA, A.; SAURA-CALIXTO, F. Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. **Molecular Nutrition & Food Reserach**, v.53, n. 2, p.310–329, Madri, 2009.

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**, v. 11, n. 2, p. 179-81, Umuarama, 2008.

SILVA, C.L.P.A.C.; VARGAS, T.S.; BAPTISTA, D.F. Molluscicidal activity of *Moringa oleifera* on *Biomphalaria glabrata*: integrated dynamics to the control of the snail host of *Schistosoma mansoni*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 5, p. 848-50, Curitiba, 2013.

SILVA, V.C.B.; NETO, J.A.R.; ALVES, S.N.; LIMA, L.A.R.S. Larvicidal activity of oils, fatty acids, and methyl esters from ripe and unripe fruit of *Solanum lycocarpum* (Solanaceae) against the vector *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Revista**

da **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n.5, p. 610-3, Uberaba, 2015.

SILVA, M.L.A.; PEREIRA, A.C.; FERREIRA, D.S.; ESPERANDIM, V.R.; SÍMARO, G.V.; LIMA, T.C. JANUARIO, PAULETTI, P.M. REHDER, V.L.G.; CREVELIN, J.E.; CUNHA, W.R. CROTTI, A.E.M.; BASTOS, J.K. In vitro Activities of *Pfaffia glomerata* Root Extract, its Hydrolyzed Fractions and Pfaffic Acid Against *Trypanosoma cruzi* Trypomastigotes. **Chemistry & Biodiversity**, v. 14, p. 1-6, Ribeirão Preto, 2017.

SMERIGLIO, A.; BARRECA, D.; BELLOCO, E.; TROMBETTA, D. Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects. **British Journal of Pharmacology**, Messina, 2016.

STEIN, E.M.; MACHADO, L.P.; ROFFATO, H.K.; MIYASATO, P.A.; NAKANO, E.; COLECIPOLLO, P.; ANDREGUETTI, D.X. Antischistosomal activity from Brazilian marine algae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 6, p. 663-7, São Paulo, 2015.

SOKOLOW, S.H.; WOOD, C.L; JONES, I.J.; SWARTZ, S.J. LOPEZ, M.; HSIEH, M.H.; LAFFERTY, K.D.; KURIS, A.M.; RICKARDS, C.; LEO, G.A. Global Assessment of Schistosomiasis Control over the Past Century Shows Targeting the Snail Intermediate Host Works Best. **Neglected Tropical Diseases**, p. 1-19, Stanford, 2016.

SUN, H.X.; CHEN, Y., YE, Y. Ginsenoside Re and Notoginsenoside R: Immunologic Adjuvants with Low Haemolytic Effect. **Chemistry & Biodiversity**, v.3, p. 718-27, Hangzhou, 2006.

TCHUNENTÉ, L.A.; ROLLINSON, D.; STOTHARD, J.R.; MOLYNEUX, D. Moving from control to elimination of schistosomiasis in sub-Saharan Africa: time to change and adapt strategies. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 6, n.42, p. 1-14, Yaoundé, 2017.

TUAN, R. Distribuição e diversidade de espécies do gênero *Biomphalaria* em microrregiões localizadas no Médio Paranapanema, São Paulo, SP, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 9, n. 1, p. 280-84, São Paulo, 2009.

VELASCO-RAMÍREZ, A.P.; TORRES-MORÁN, M.I.; MOLINA-MORET, S.; SÁNCHEZ-GONZÁLES, J.J.; SANTACRUZ-RUVALCABA, F. Efficiency of RAPD, ISSR, AFLP and ISTR markers for the detection of polymorphisms and genetic relationships in camote de cerro (*Dioscorea* spp.). **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 65-71, Valparaíso, 2014.

VITORINO, R.R.; SOUZA, F.P.; COSTA, A.P.; JÚNIOR, F.C.F.; SANTANA, L.A.; GOMES, A.P. Shistosomiasis mansoni: diagnosis, treatment, epidemiology, prophylaxis and control. *Revista Brasileira de Clínica Médica*, v. 10, n.1, p. 9-45, São Paulo, 2012.

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, Brisbane, 2015.

WHO, World Health Organization. Report of the Scientific working Group on Plant Molluscicide & Guidelines for evaluation of plant molluscicides. Geneva:, 1983.

ZHU, H.; XU, J.; MAO, Q.; SHEN, H.; KONG, M.; CHEN, J.; LI, S. Metabolic profiles of dioscin in rats revealed by ultra-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, v. 29, n. 9, p. 1415-21, Hong Kong, 2015.