

**Fernanda Yoshika Takahashi**

**Efeitos de Piperaceae em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Mollusca: Planorbidae).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

**Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública**

**Orientadores:**

**Prof(a). Dr(a). Fernanda Pires Ohlweiler**

**Prof(a). Dr(a). Toshie Kawano (In memoriam)**

**São Paulo**

**2011**

**Fernanda Yoshika Takahashi**

**Efeitos de Piperaceae em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Mollusca: Planorbidae).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

**Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública**

**Orientadores:**

**Prof(a). Dr(a). Fernanda Pires Ohlweiler**

**Prof(a). Dr(a). Toshie Kawano (In memoriam)**

**São Paulo**

**2011**

#### FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Takahashi, Fernanda Yoshika

Efeitos de extratos de *Piperaceae* em *Biomphalaria glabrata* (Say 1818) (Mollusca: *Planorbidae*) / Fernanda Yoshika Takahashi - São Paulo, 2011.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública  
Orientadora: Fernanda Pires Ohlweiler

1. Esquistossomose mansoni / prevenção & Controle
2. *Biomphalaria*/efeitos de drogas
3. *Piperaceae* / toxicidade
4. *Moluscocidas*

SES/CCD/CD-247/11

## **AGRADECIMENTOS**

A minha mãe pelo amor, carinho, dedicação, apoio incondicional e seus ensinamentos.

Ao meu namorado Antonio pela amizade, carinho, apoio e paciência nos momentos que me ausentei.

A Dra. Toshie Kawano, mesmo não presente entre nós, agradeço pela orientação, amizade, carinho, oportunidade, atenção e confiança.

A Dra. Fernanda Pires Ohlweiler pela amizade, amparo, confiança, compreensão, paciência e orientação neste trabalho.

A Dra. Regiane Maria Tironi de Menezes pela amizade, paciência e auxílio no tratamento estatístico.

Aos Doutores Massuo Jorge Kato e Lydia Fumiko Yamaguchi do Laboratório de Química e Produtos Naturais pelo fornecimento dos extratos estudados.

Aos colegas do Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan pelo auxílio e fornecimento dos moluscos estudados.

Aos amigos do Laboratório de Malacologia da SUCEN: Juliana e Gabriel pela amizade e auxílio.

Aos amigos Danilo, Jucimara, Caroline e Alexsandro Cabral pela amizade, apoio e ânimo.

A Superintendência de Controle e Endemias (SUCEN), em especial a Divisão de Programas Especiais (DPE) e ao Laboratório de Malacologia por disponibilizar o espaço e recursos para o desenvolvimento deste trabalho.

A CAPES pelo auxílio financeiro com a bolsa de mestrado.

## RESUMO

A esquistossomose é uma doença grave e de evolução crônica, com importante papel sócio-econômico, cuja profilaxia inclui medidas que envolvem saneamento básico, educação sanitária, tratamento de indivíduos infectados e o controle dos caramujos hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni*. Uma das medidas mais eficientes para o controle dos caramujos é a aplicação de moluscidas, sendo os extratos vegetais os mais indicados. As vantagens do uso de extratos vegetais são devidas, principalmente, ao seu baixo custo e baixa ação tóxica para o ambiente. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação de extratos brutos de *Piper cubataonum*, *Piper caldense*, *Piper cernuum*, *Peperomia trineura*, *Peperomia rubricaulis*, *Peperomia blanda* e da substância ativa, ácido caldensínico de Piperaceae em embriões e adultos de *Biomphalaria glabrata*. Os extratos brutos e a substância ativa foram obtidos de folhas das plantas. Inicialmente todos os extratos e a substância ativa foram testados nas concentrações de 100 ppm e 20 ppm, respectivamente. Procurou-se determinar para cada extrato as concentrações responsáveis pela mortalidade de no mínimo 50% dos espécimes expostos. Os dados de mortalidade de adultos foram submetidos à análise de probito com intuito de estimar a concentração letal para 50% e 90% (CL50 e CL90) da população. Os extratos que apresentaram efeito tóxico em adultos foram *P. trineura* a 100, 80 e 60 ppm e *P. caldense* a 100, 80 e 50 ppm. O ácido caldensínico, quando testado em adultos, apresentou efeito tóxico a 20 e 10 ppm. Nas desovas os extratos que demonstraram efeito toxico foram *P. trineura* a 100, 80, 60 e 50 ppm, *P. rubricaulis* a 100 e 80 ppm e *P. caldense* a 100 ppm, apenas para os estádios de blástula, gástrula, e trocófora. Este último extrato apresentou efeito tóxico a 80 ppm somente para blástula e gástrula. *P. caldense* mostrou-se mais eficiente que *P. trineura* para causar a mortalidade em *B. glabrata* a 50 ppm. Os extratos de *P. caldense*, *P. rubricaulis* e *P. trineura*, que apresentaram atividade moluscida e/ou ovicida, devem ser testados em outros organismos, fracionados e terem suas estruturas químicas elucidadas.

## ABSTRACT

Schistosomiasis is a serious and chronic disease, with significant socio-economic role, which includes prevention measures that involve sanitation, health education, treatment of infected individuals and control of snail intermediate hosts of *Schistosoma mansoni*. One of the most efficient measures for the control of snails is the application of molluscicides, and plant extracts the most suitable. The advantages of using plant extracts are mainly due to its low cost and low toxic action for the environment. The objective of this study was to evaluate the activity of extracts of *Piper cubataonum*, *Piper caldense*, *Piper cernuum*, *Peperomia trineura*, *Peperomia rubricaulis*, *Peperomia blanda* and an active ingredient, caldensinic acid of Piperaceae in embryos and adults of *Biomphalaria glabrata*. The extracts and the active ingredient were obtained from the leaves. Initially all the extracts and the active ingredient were tested at concentrations of 100 ppm and 20 ppm, respectively. For each extract it was assessed the concentration responsible for at least 50% deaths of the exposed specimens. The adult mortality data were subjected to probit analysis in order to estimate the lethal concentration for 50% and 90% (LC50 and LC90) of the population. The extracts that showed toxic effect in adults were *P. trineura* at 100, 80 and 60 ppm and *P. caldense* at 100, 80 and 50 ppm. The caldensinic acid, when tested in adults, showed toxic effect at 20 and 10 ppm. About egg masses, the extracts that showed toxic effect were *P. trineura* at 100, 80, 60 and 50 ppm, *P. rubricaulis* at 100 and 80 ppm and *P. caldense* at 100 ppm, only for blastula, gastrula and trochophore instars. This last extract showed toxic effect at 80 ppm only for blastula and gastrula. *P. caldense* was more efficient than *P. trineura* to cause mortality in *B. glabrata* at 50 ppm. The extract of *P. caldense*, *P. rubricaulis* and *P. trineura*, which showed molluscicidal and/or ovicidal activity, should be tested in other organisms, be fractionated and have their chemical structures elucidated.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Expansão da transmissão da Esquistossomose no Brasil.....	14
<b>Figura 2</b> - Distribuição da Esquistossomose mansônica no Brasil de acordo com sua prevalência. ....	16
<b>Figura 3</b> – Ciclo evolutivo do <i>Schistosoma mansoni</i> . ....	17
<b>Figura 4</b> - Distribuição espacial de <i>Biomphalaria glabrata</i> . ....	19
<b>Figura 5</b> - Distribuição espacial de <i>Biomphalaria tenagophila</i> .....	20
<b>Figura 6</b> - Distribuição espacial de <i>Biomphalaria straminea</i> .....	21
<b>Figura 7</b> - Adultos de <i>Biomphalaria glabrata</i> . ....	22
<b>Figura 8</b> - Desova de <i>Biomphalaria glabrata</i> mostrando a membrana externa, ovos e embriões. ....	23
<b>Figura 9</b> - Imagem de microscopia eletrônica de varredura dos estádios embrionários de <i>Biomphalaria tenagophila</i> .....	25
<b>Figura 10</b> - <i>Biomphalaria glabrata</i> no estágio embrionário de hipo. ....	26
<b>Figura 11</b> – Fórmula estrutural do ácido caldensínico.....	42
<b>Figura 12</b> - Exposição dos moluscos adultos a extratos de Piperaceae ....	44
<b>Figura 13</b> - Moluscos individualizados e mantidos na água dechlorada, após as 24 horas de exposição a extratos de Piperaceae .....	44
<b>Figura 14</b> - Exposição de desovas a extratos de Piperaceae .....	45
<b>Figura 15</b> – Desovas individualizadas e mantidas em água dechlorada, em placa de cultura de células, após as 24 horas de exposição à extrato de Piperaceae.....	46
<b>Figura 16</b> - Embriões de <i>Biomphalaria glabrata</i> no estágio embrionário de trocófora jovem apresentando uma malformação do tipo exogástrula. ....	47
<b>Figura 17</b> - Embriões de <i>Biomphalaria glabrata</i> no estágio embrionário de véliger, apresentando algumas malformações inespecíficas .....	47

<b>Figura 18</b> - Atividade moluscicida do extrato de folhas de <i>Piper cubataonum</i> em <i>Biomphalaria glabrata</i> na concentração de 100 ppm, verificada ao longo de 10 dias de observação. ....	51
<b>Figura 19</b> - Atividade moluscicida do extrato de folhas de <i>Piper caldense</i> em <i>Biomphalaria glabrata</i> , nas concentrações de 100 ppm, 80 ppm e 50 ppm, verificada ao longo de 10 dias de observação. ....	52
<b>Figura 20</b> - Atividade moluscicida do extrato de folhas de <i>Piper cernuum</i> em <i>Biomphalaria glabrata</i> , na concentração de 100 ppm, verificada ao longo de 10 dias de observação. ....	53
<b>Figura 21</b> - Atividade moluscicida do extrato de folhas de <i>Peperomia trineura</i> em <i>Biomphalaria glabrata</i> , nas concentrações de 100 ppm, 80 ppm, 60 ppm e 50 ppm, verificada ao longo de 10 dias de observação.....	54
<b>Figura 22</b> - Atividade moluscicida do extrato de folhas de <i>Peperomia rubricaulis</i> em <i>Biomphalaria glabrata</i> , na concentração de 100 ppm, verificada ao longo de 10 dias de observação. ....	55
<b>Figura 23</b> - Atividade moluscicida do extrato de folhas de <i>Peperomia blanda</i> em <i>Biomphalaria glabrata</i> , na concentração de 100 ppm, verificada ao longo de 10 dias de observação. ....	56
<b>Figura 24</b> - Atividade moluscicida do ácido caldensínico em <i>Biomphalaria glabrata</i> , nas concentrações de 20 ppm, 10 ppm, 9 ppm, 8 ppm e 5 ppm, verificada ao longo de 10 dias de observação. ....	57
<b>Figura 25</b> - Atividade ovicida do extrato de folhas de <i>Piper cubataonum</i> a 100 ppm em embriões de <i>Biomphalaria glabrata</i> , nos estádios de blástula e gástrula .....	58
<b>Figura 26</b> - Atividade ovicida de folhas de <i>Piper caldense</i> a 100 ppm em embriões de <i>Biomphalaria glabrata</i> , nos estádios de blástula, gástrula, trocófora, véliger e hipo.....	59



<b>Figura 27</b> - Embrião no estágio embrionário de hipo com malformação inespecífica após exposição de 100 ppm ao extrato de folhas de <i>Piper caldense</i> .....	60
<b>Figura 28</b> - Atividade ovicida de folhas de <i>Piper caldense</i> a 80 ppm em embriões de <i>Biomphalaria glabrata</i> , nos estádios de blástula, gástrula, trocófora, véliger e hipo .....	61
<b>Figura 29</b> - Embriões no estágio embrionário de blástula, mortos após a exposição de 80ppm do extrato de folhas de <i>Piper caldense</i> .....	62
<b>Figura 30</b> - Embriões no estágio embrionário de hipo mortos após exposição de 80 ppm do extrato de folhas de <i>Piper caldense</i> .....	62
<b>Figura 31</b> - Atividade ovicida de folhas de <i>Piper cernuum</i> a 100 ppm em embriões de <i>Biomphalaria glabrata</i> , nos estádios de blástula, gástrula e trocófora .....	63
<b>Figura 32</b> - Atividade ovicida de folhas de <i>Peperomia trineura</i> a 100 ppm em embriões de <i>Biomphalaria glabrata</i> , nos estádios de blástula, gástrula, trocófora, véliger e hipo .....	64
<b>Figura 33</b> - Atividade ovicida de folhas de <i>Peperomia trineura</i> a 95 ppm em embriões de <i>Biomphalaria glabrata</i> , nos estádios de blástula, gástrula, trocófora, véliger e hipo .....	65
<b>Figura 34</b> - Atividade ovicida de folhas de <i>Peperomia trineura</i> a 90 ppm em embriões de <i>Biomphalaria glabrata</i> , nos estádios de blástula, gástrula, trocófora, véliger e hipo .....	66
<b>Figura 35</b> - Atividade ovicida de folhas de <i>Peperomia trineura</i> a 80 ppm em embriões de <i>Biomphalaria glabrata</i> , nos estádios de blástula, gástrula, trocófora, véliger e hipo .....	67
<b>Figura 36</b> - Atividade ovicida de folhas de <i>Peperomia trineura</i> a 60 ppm em embriões de <i>Biomphalaria glabrata</i> , nos estádios de blástula, gástrula, trocófora, véliger e hipo .....	68

<b>Figura 37</b> - Atividade ovicida de folhas de <i>Peperomia trineura</i> a 50 ppm em embriões de <i>Biomphalaria glabrata</i> , nos estádios de blástula, gástrula, trocófora, véliger e hipo .....	69
<b>Figura 38</b> - Atividade ovicida de folhas de <i>Peperomia rubricaulis</i> a 100 ppm em embriões de <i>Biomphalaria glabrata</i> , nos estádios de blástula, gástrula, trocófora, véliger e hipo.....	70
<b>Figura 39</b> - Atividade ovicida de folhas de <i>Peperomia rubricaulis</i> a 80 ppm em embriões de <i>Biomphalaria glabrata</i> , nos estádios de blástula, gástrula, trocófora, véliger e hipo.....	71
<b>Figura 40</b> - Atividade ovicida de folhas de <i>Peperomia rubricaulis</i> a 70 ppm em embriões de <i>Biomphalaria glabrata</i> , nos estádios de blástula, gástrula, trocófora, véliger e hipo.....	72
<b>Figura 41</b> - Embriões mortos e com malformações inespecíficas no estágio de véliger devido à exposição pelo extrato de folhas de <i>Peperomia rubricaulis</i> , na concentração de 70 ppm .....	73
<b>Figura 42</b> - Atividade ovicida de folhas de <i>Peperomia rubricaulis</i> a 60 ppm em embriões de <i>Biomphalaria glabrata</i> , nos estádios de blástula, gástrula e trocófora.....	74
<b>Figura 43</b> - Atividade ovicida de folhas de <i>Peperomia blanda</i> a 100 ppm em embriões de <i>Biomphalaria glabrata</i> , nos estádios de blástula, gástrula e trocófora .....	75
<b>Figura 44</b> - Atividade ovicida da substância ativa ácido caldensínico a 20 ppm, em embriões de <i>Biomphalaria glabrata</i> , nos estádios de blástula, gástrula, trocófora, véliger e hipo .....	76
<b>Figura 45</b> - Concentração letal (ppm) do ácido caldensínico, contra percentual de mortalidade de <i>Biomphalaria glabrata</i> .....	77
<b>Figura 46</b> - Concentração letal (ppm) de <i>Piper caldense</i> contra percentual de mortalidade de <i>Biomphalaria glabrata</i> .....	78

<b>Figura 47</b> - Concentração letal (ppm) de <i>Peperomia trineura</i> contra percentual de mortalidade de <i>Biomphalaria glabrata</i> .....	79
<b>Figura 48</b> - Mortalidade de <i>Biomphalaria glabrata</i> em função da concentração do extrato de <i>Peperomia trineura</i> .....	82
<b>Figura 49</b> - Mortalidade de <i>Biomphalaria glabrata</i> em função da concentração do ácido caldensínico .....	83
<b>Figura 50</b> - Correlação entre a mortalidade de <i>Biomphalaria glabrata</i> em função da concentração do extrato de <i>Piper caldense</i> .....	85
<b>Figura 51</b> - Atividade moluscicida de bayluscide nas concentrações de 0,01 ppm a 0,1 ppm, observada no período de 10 dias, em moluscos adultos de <i>Biomphalaria glabrata</i> .....	86

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Distribuição dos mortos e sobreviventes de adultos de *Biomphalaria glabrata* submetidos a substância ativa, ácido caldensínico. . 80
- Tabela 2:** Distribuição dos mortos e sobreviventes de adultos de *Biomphalaria glabrata* submetidos a *Piper caldense* e *Peperomia trineura* a 50 ppm. .... 81

## Índice

<b>1. Introdução</b> .....	13
<b>1.1 Esquistossomose no Brasil.</b> .....	13
<b>1.2 Ciclo evolutivo do <i>Schistosoma mansoni</i></b> .....	16
<b>1.3. Hospedeiros intermediários do <i>Schistosoma mansoni</i></b> .....	18
<b>1.4 Biologia e ecologia dos hospedeiros intermediários do <i>Schistosoma mansoni</i></b> .....	21
<b>1.5 Profilaxia</b> .....	27
<b>1.5.1 Saneamento básico e educação sanitária</b> .....	29
<b>1.5.2 Quimioterapia e vacina</b> .....	29
<b>1.5.3 Controle dos hospedeiros intermediários do <i>Schistosoma mansoni</i></b> .....	32
<b>1.5.3.1 Métodos ambientais</b> .....	32
<b>1.5.3.2 Métodos biológicos</b> .....	32
<b>1.5.3.3 Moluscidas</b> .....	33
<b>1.5.3.3.a Moluscidas sintéticos</b> .....	33
<b>1.5.3.3.b Moluscidas de origem vegetal</b> .....	35
<b>2. Objetivos</b> .....	39
<b>2.1. Geral</b> .....	39
<b>2.2. Específicos</b> .....	39
<b>3. Material e Métodos</b> .....	40
<b>3.1. Material de estudo</b> .....	40
<b>3.1.1. Animais</b> .....	40

3.1.2 Extratos vegetais .....	40
3.2 Protocolo com moluscos e desovas .....	42
3.2.1 Ensaio biológico com moluscos.....	43
3.2.2 Ensaio biológico com embriões .....	44
3.3 Experimentos com Bayluscide WP70 <sup>®</sup> .....	48
3.4 Análise estatística .....	48
3.4.1 Análises dos dados .....	48
4. Resultados.....	51
4.1 Experimentos com moluscos adultos.....	51
4.2 Experimentos com embriões .....	57
4.3 Obtenções de CL50 e CL90 para adultos de <i>Biomphalaria glabrata</i> .....	76
4.4 Associação entre mortos e sobreviventes de <i>Biomphalaria glabrata</i> expostos aos extratos de Piperaceae .....	79
4.5 Efeitos de diferentes concentrações de extratos de Piperaceae sob a população adulta de <i>Biomphalaria glabrata</i> .....	81
4.6 Suscetibilidade da população de <i>Biomphalaria glabrata</i> pelo Bayluscide WP70 <sup>®</sup> .....	85
5. Discussão .....	87
6. Conclusão.....	95
7. Referências Bibliográficas .....	96
8. Anexos .....	111

## 1. Introdução

A Esquistossomose é uma doença causada por um trematódeo digenético do gênero *Schistosoma* (Weiland, 1858). As principais espécies com importância para a saúde pública são: *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, *Schistosoma haematobium* (Bilharz, 1852), *Schistosoma intercalatum* (Fischer, 1934), *Schistosoma japonicum* (Katsurada, 1904), *Schistosoma mekongi* (Voge, Buckener e Bruce, 1978) e *Schistosoma malayensis* (Greedy e Young, 1988) (Carvalho et al., 2008). A doença é transmitida para o homem e alguns vertebrados através de moluscos contaminados pelo parasita (Ministério da Saúde, 2007; Rey, 2008; Silva et al., 2008).

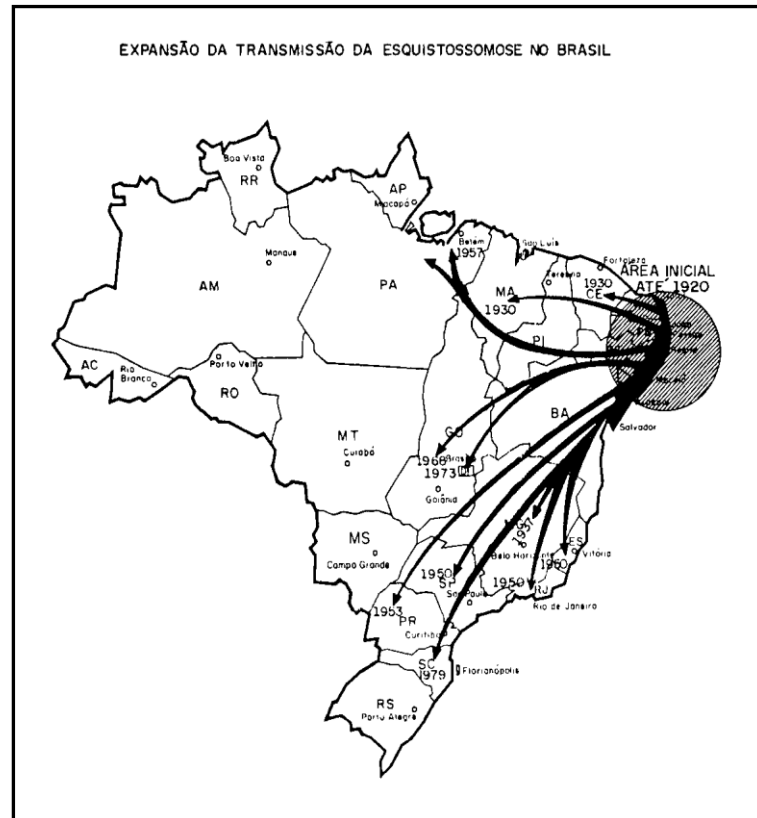
A esquistossomose é a segunda parasitose de maior importância para a saúde pública no mundo. É uma doença endêmica que atinge 74 países tropicais e subtropicais dos continentes Africano, Americano e Asiático (Chitsulo et al., 2000). Estima-se que 700 milhões de pessoas ao redor do mundo correm o risco de infecção e 270 milhões de pessoas estejam infectadas, devido à falta de saneamento básico, problemas sócio-econômicos e culturais (WHO, 2010a).

A esquistossomose mansônica, causada pelo *S. mansoni*, ocorre em 54 países e territórios, principalmente na América do Sul, Caribe, África e leste do Mediterrâneo (Chitsulo et al., 2000).

### 1.1 Esquistossomose no Brasil.

A esquistossomose mansônica, doença oriunda da África, chegou ao Brasil devido ao tráfico de escravos, instalando-se inicialmente no litoral nordestino. *S. mansoni* encontrou no Brasil condições favoráveis para sua permanência, principalmente devido à presença do molusco hospedeiro intermediário suscetível e à falta de saneamento básico. A propagação da esquistossomose no país acompanhou os fluxos migratórios da população de áreas endêmicas do nordeste para as regiões norte, centro-oeste,

sudeste e sul do país em vista da expansão das culturas de cana-de-açúcar, café e mineração (Rey, 1991; Chieffi e Waldman, 1988; Coura e Amaral, 2004) (Figura 1).



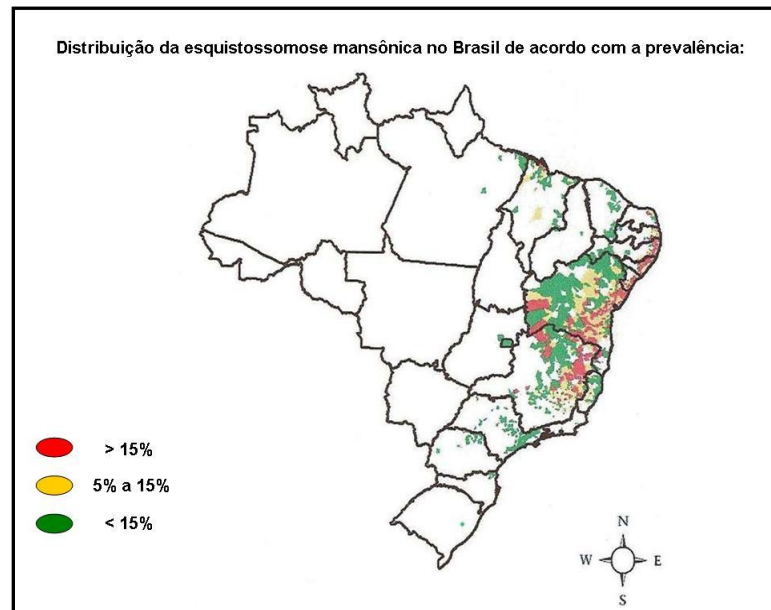
**Figura 1:** Expansão da transmissão da Esquistossomose no Brasil. Fonte: Silveira (1989).

Estima-se no Brasil mais de 6 milhões de pessoas infectadas e 25 milhões de pessoas expostas ao risco de infecção (WHO, 2001; CVE, 2007). Segundo Katz e Peixoto (2000) o número de esquistossomóticos no Brasil não condiz com a realidade, pois os dados levantados pelo Programa de Controle da Esquistossomose (PCE) são subestimados devido a ausência de dados precisos e a necessidade de um levantamento mais rigoroso a nível nacional. A estimativa do número de pessoas infectadas e expostas ao risco de infecção é controverso devido ao grande número de pessoas não diagnosticadas e ao deslocamento das mesmas em busca de melhores condições de vida (Teles, 2005).



No Brasil, as áreas endêmicas compreendem do norte do Maranhão a uma faixa que abrange algumas regiões do Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Minas Gerais e Espírito Santo. As altas prevalências concentram-se na região costeira do nordeste e se projetam para o interior da Bahia até Minas Gerais (Amaral et al., 2006; Muniz, 2007; CVE, 2007; Rey, 2008) (Figura 2). Há focos isolados da doença no Pará, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. (Rey, 2008; CVE, 2009a).

No estado de São Paulo as regiões com o maior número de casos notificados e autoctones, são: Vale do Ribeira, Baixada Santista, Vale do Paraíba, Litoral Norte, região de Campinas e alguns municípios da Grande São Paulo, incluindo o município de São Paulo. De 2007 a 2011 (agosto) o estado de São Paulo teve 678 notificações de esquistossomose, sendo que destas 406 foram classificados como autóctones; 75 em 2007, 79 em 2008, 134 em 2009, 92 em 2010 e 26 em 2011 (SINAN, 2011). Em áreas de baixa endemicidade como São Paulo os pacientes apresentam baixa carga parasitária, o que dificulta o seu diagnóstico com o exame convencional de Kato-Katz (CVE, 2009a).

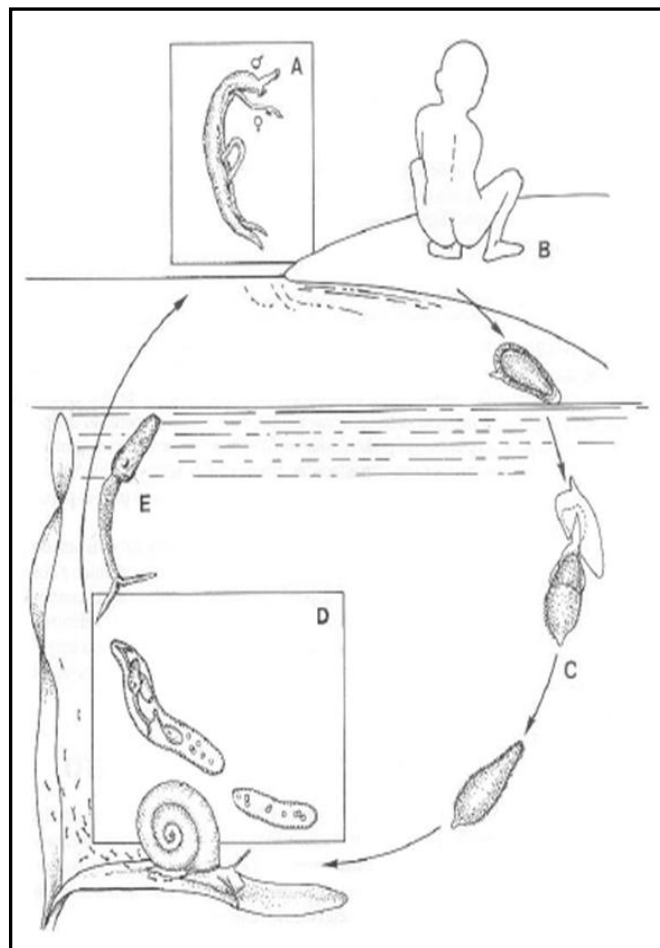


**Figura 2:** Distribuição da Esquistossomose mansônica no Brasil de acordo com sua prevalência. Fonte: Modificado de Amaral et al. (2006).

## 1.2 Ciclo evolutivo do *Schistosoma mansoni*

O ciclo de *S. mansoni* envolve dois hospedeiros: um intermediário (molusco) e outro definitivo (homem ou outro vertebrado). Quando o parasita atinge a fase adulta no sistema porta hepático do hospedeiro definitivo, o macho e a fêmea se acasalam e migram para as veias mesentéricas. As fêmeas fecundadas ovipõem em média de 300 ovos por dia. Parte destes ovos atravessa a mucosa do intestino e caem na luz intestinal, sendo eliminados, juntos com as fezes, na água. Os ovos que não atravessam a mucosa intestinal ficam retidos na parede do intestino ou caem na circulação seguindo para outros tecidos, formando granulomas. Os ovos, contidos nas fezes, quando em contato com a água eclodem dando origem à larvas ciliadas denominadas miracídeos. Estes nadam até encontrarem um molusco do gênero *Biomphalaria* onde penetram em suas partes moles expostas, como pé, manto e tentáculos. No molusco, o miracídio se transforma em esporocisto primários e secundários, que por sua vez dão origem às cercárias de cauda bifurcada. Normalmente os moluscos eliminam as

cercárias após 30 a 35 dias de infecção, dependendo da espécie e condições ambientais. As cercárias deixam os moluscos por estímulos de luz e calor, atingindo a água, onde nadam até encontrarem um hospedeiro definitivo vertebrado. Ao penetrarem na pele do hospedeiro definitivo, as cercárias perdem a cauda e transformam-se em esquistossômulos, que podem ser destruídos na própria derme ou atingirem o sistema circulatório. Ao serem arrastados pela corrente sanguínea, os esquistossômulos alcançam o coração e pulmões, de onde migram para o fígado, alcançando a maturidade, dando início novamente ao ciclo (Cunha, 1970; Neves et al., 2005; Rey, 2008; Silva et al., 2008) (Figura 3).

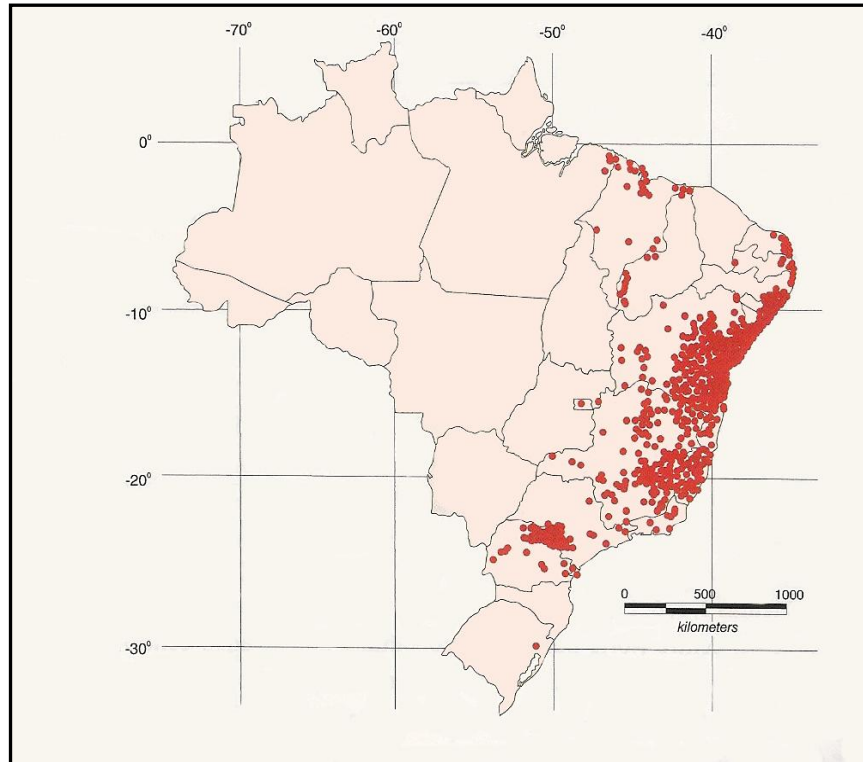


**Figura 3:** Ciclo evolutivo do *Schistosoma mansoni*. A – Vermes adultos acasalados; B – Homem (doente) defecando; C – Miracídio; D – Esporocistos; E – Cercária. Fonte: Rey (2008).

### 1.3. Hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni*

Os hospedeiros intermediários do *S. mansoni* são moluscos dulciaquícolas do gênero *Biomphalaria* (Planorbidae). São 11 espécies e uma subespécie com ocorrência para o Brasil (Teodoro, 2009; Caldeira et al., 2010). Dentre elas apenas *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) e *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) são encontradas infectadas por *S. mansoni* na natureza (Rey, 2008; Souza e Lima, 1990). A distribuição geográfica das bionfalarias é muito ampla devido a sua alta capacidade adaptativa às diversidades ambientais (Paraense, 2001; Ministério da Saúde, 2007).

*B. glabrata* é a mais eficiente espécie hospedeira intermediária do parasita. Está amplamente distribuída no país, sendo registrada para o Distrito Federal e 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 (Figura 4) (Neves et al., 2005; Rey, 2008; Carvalho et al., 2008). Esta espécie é responsável pela manutenção de focos nos mesmos estados citados anteriormente. No estado de São Paulo é responsável por focos na Bacia do Rio Paranapanema; nos municípios de Assis, Ibirarema, Ipaussu, Ourinhos, Palmital, na Bacia do Rio Tietê; nos municípios de São Paulo e Ribeirão Preto especificamente entre os rios Mogi-Guaçu e Pardo. (Teles, 2005; SUCEN, 2010; Ohlweiler et al., 2010).



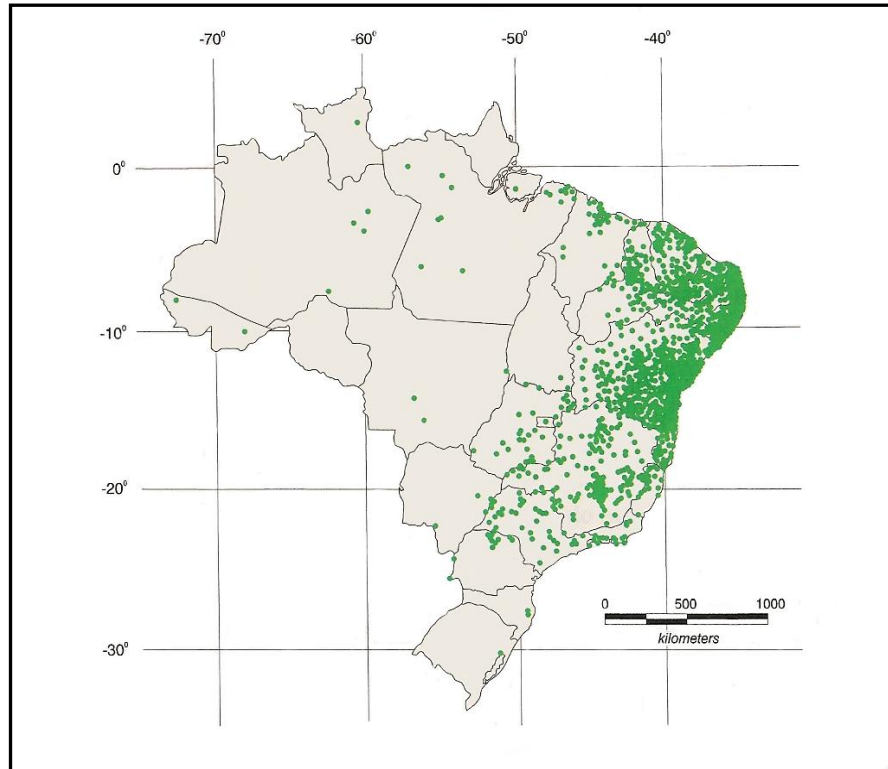
**Figura 4:** Distribuição espacial de *Biomphalaria glabrata*. Fonte: Carvalho et al., (2008).

*B. tenagophila* é registrada para o Distrito Federal e 10 estados brasileiros; Bahia, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Santa Catarina e São Paulo (Figura 5). Apresenta baixa taxa de infestação pelo *S. mansoni*, transmitindo a esquistossomose nos municípios de São Francisco do Sul, em Santa Catarina e em focos isolados de Minas Gerias e do Rio de Janeiro. Em São Paulo, tem importante papel na transmissão da esquistossomose no Vale do Paraíba, Vale do Ribeira e Baixada Santista (Teles, 2005; Neves et al., 2005; Rey, 2008; Carvalho et al., 2008).



**Figura 5:** Distribuição espacial de *Biomphalaria tenagophila*. Fonte: Carvalho et al. (2008).

*B. straminea* é encontrada em quase todas as bacias hidrográficas do Brasil. É a principal espécie responsável pela transmissão da esquistossomose no nordeste e em focos isolados no Pará e Goiás. Sua distribuição abrange todo o território brasileiro, não havendo registro somente para os estados de Amapá e Rondônia (Figura 6) (Ohlweiler et al., 2010; Rey, 2008; Carvalho et al., 2008). Em São Paulo, *B. straminea* atua como hospedeira intermediária do *S. mansoni* no município de Cruzeiro (Teles, 2005).



**Figura 6:** Distribuição espacial de *Biomphalaria straminea*. Fonte: Carvalho et al. (2008).

#### **1.4 Biologia e ecologia dos hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni***

*Biomphalaria* possui concha discoidal, planispiral e com uma depressão (umbigo) em cada lado. Nos indivíduos adultos, a concha pode variar de 7 a 40 mm de diâmetro (Figura 7). Possui sistema circulatório aberto; sistema digestivo completo e respiração pulmonar, tegumentar e por pseudobrânquias. O sistema excretor é simples com tubo renal em forma de J. (Storer et al., 2002; Paraense, 1975; Ministério da Saúde, 2007; Teles e Carvalho, 2008).



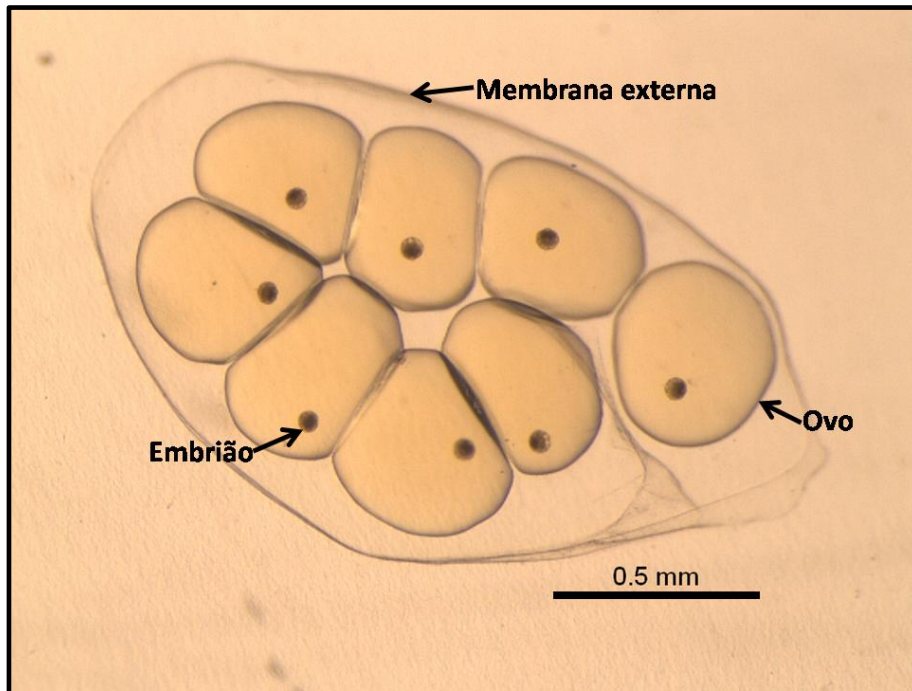
**Figura 7:** Adultos de *Biomphalaria glabrata*.

São hermafroditas, reproduzindo-se por autofecundação ou fecundação cruzada, sendo esta última o modo de reprodução preferencial. O hermafroditismo é vantajoso em situações de baixa densidade populacional (Dias, 1995; Guimarães, 2007).

*Biomphalaria* atinge a sua maturidade sexual em torno de 30 dias, podendo variar de acordo com a espécie e as condições ambientais (Dias, 1995).

Os ovos são envolvidos por uma membrana externa formando uma cápsula gelatinosa de coloração amarelada, denominada desova (Figura 8). Os moluscos depositam as desovas na vegetação aquática, conchas, pedras, pedaços de plásticos, isopor ou em qualquer substrato presente nas coleções hídricas (Souza e Lima, 1990; Neves et al., 2005). O número de ovos por desovas varia dentre as espécies, podendo ultrapassar a 100 (Souza e Lima, 1990). Estudo realizado por Camey e Verdonk (1970) comprovou que o desenvolvimento dos estádios embrionários de *B. glabrata* e *B. tenagophila* são idênticos.





**Figura 8:** Desova de *Biomphalaria glabrata* mostrando a membrana externa, ovos e embriões.

O ovo durante seu desenvolvimento sofre diversas clivagens, formando várias células denominadas blastômeros, até alcançar o estágio denominado blástula. Neste estágio é possível visualizar o corpúsculo polar. O estágio de blástula ocorre aproximadamente entre 10 a 23 horas após a primeira clivagem (Figura 9: 1) (Kawano et al., 1992).

O estágio de gástrula ocorre aproximadamente entre 24 e 39 horas após a primeira clivagem. Neste estágio o embrião apresenta três camadas celulares (ectoderme, mesoderme e endoderme). É possível visualizar o pólo animal, blastóporo e o pólo vegetal. É no estágio de gástrula que se inicia o crescimento, a diferenciação e a movimentação celular (Figura 9: 2 e 3) (Kawano et al., 1992).

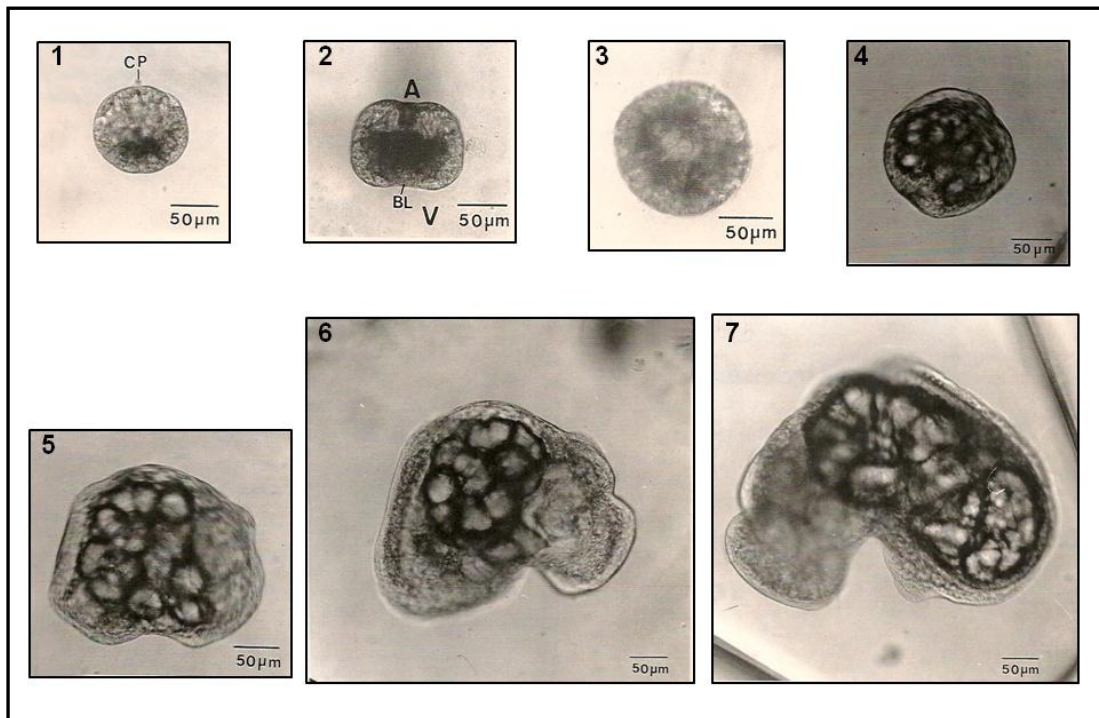
No estágio de trocófora ocorre a organogênese e uma fileira dupla de células situadas anteriormente a boca formando o prototróquio que é constituído por cílios e dá movimentação a larva. Esta fase ocorre entre 40 e 80 horas após a primeira clivagem (Figura 9: 4 e 5) (Kawano et al., 1992).

O estágio de véliger ocorre por volta de 120 horas após a primeira clivagem. Neste estágio já se observam os olhos, uma elevação da região cefálica, a boca, o pé e a concha (Figura 9: 6 e 7) (Kawano et al., 1992).

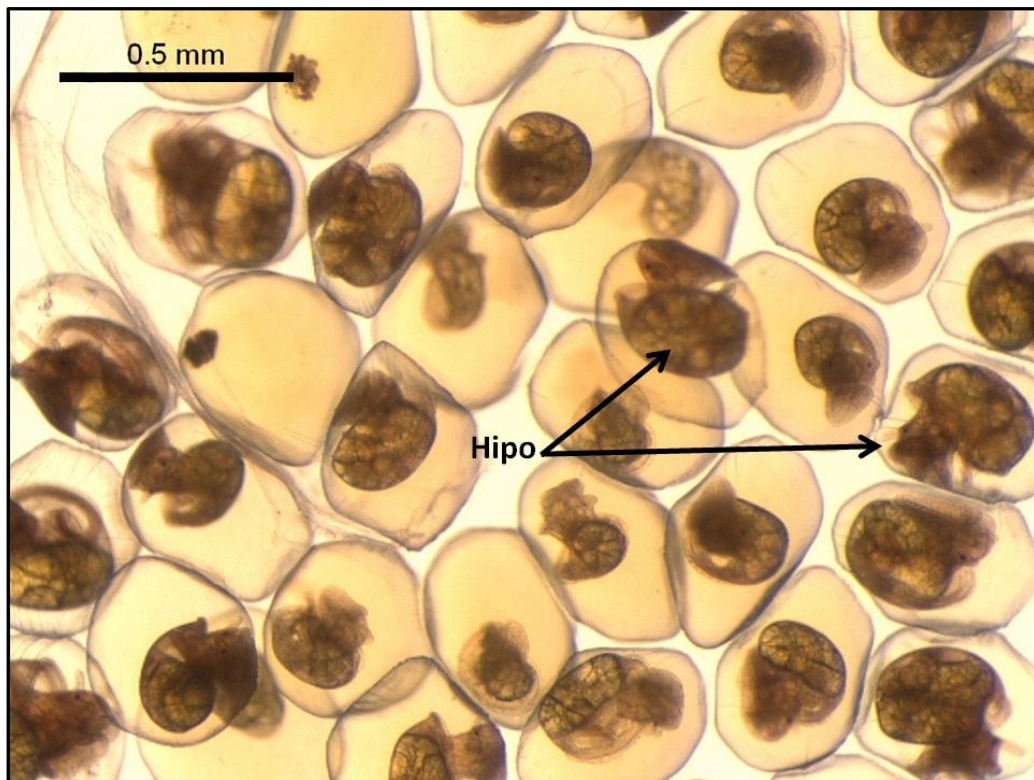
O estágio de hipo ocorre aproximadamente depois de 144 horas após a primeira clivagem. No início deste estágio observam-se os halos pigmentados dos olhos, os tentáculos já formados e a concha, inicia o seu enrolamento. No final deste estágio embrionário, observamos uma miniatura do adulto (Figura 10) (Kawano et al., 1992).

A eclosão dos ovos, em condições ambientais adequadas, ocorre 7 dias após a postura (Kawano et al., 1992; Souza e Lima, 1990).

O conhecimento da embriologia de *Biomphalaria* é importante, para estudos de toxicidade. O fato das bionfalárias apresentarem postura transparente facilita a identificação de efeitos morfogenéticos de substâncias sobre os embriões (Kawano, 1995; Tallarico, 2003; Kawano et al., 2008).



**Figura 9:** Imagem de microscopia eletrônica de varredura dos estádios embrionários de *Biomphalaria tenagophila*: 1 – Estádio de blástula, após 15 horas da primeira clivagem; 2 – Vista lateral do estágio de gástrula, após 26 horas; 3 – Estádio de gástrula; 4 – Estádio de trocófora jovem, após 43 horas; 5 – Estádio de trocófora, após 66 horas; 6 – Estádio de véliger jovem, após 96 horas; 7 – Estádio de véliger, após 120 horas. A, pólo animal; BL, blastóporo; CP, corpúsculo polar; V, pólo vegetativo. Fonte: Watanabe, 1997 (modificado)



**Figura 10:** Desova contendo *Biomphalaria glabrata* no estágio embrionário de hipo.

As bionfalárias vivem em ambientes de água doce, com vegetação aquática e rica em matéria orgânica. A temperatura ideal da água varia de 20°C a 26°C, com pH neutro tendendo para o alcalino, baixa salinidade e pouca turbidez. Alimentam-se da vegetação, algas microscópicas, lodo e matéria orgânica em decomposição (Barbosa e Barbosa, 1994; Ministério da Saúde, 2007; Rey, 2008).

*Biomphalaria* apresenta mecanismos de adaptação que possibilitam a sua sobrevivência mediante as adversidades ambientais, como durante os períodos de seca. Neste caso, o molusco retrai o corpo para o interior da concha, havendo baixa no metabolismo e deposição de muco na abertura da concha, o que evita a perda de água por parte do mesmo. Desta forma o molusco poupa energia garantindo a sua sobrevivência até que as condições ambientais voltem ao normal. Sabe-se que tanto *B. glabrata* como *B.*

*tenagophila* e *B. straminea* fazem uso deste mecanismo de sobrevivência (Ohlweiler e Kawano, 2002; Ministério da Saúde, 2007).

Em formas juvenis de *B. glabrata* observa-se ainda modificações morfológicas na concha como espessamento e a formação de lamelas junto à abertura. Isto, também contribui para a sobrevivência dos moluscos em períodos de seca ou mediante as adversidades ambientais (Dannemann e Pieri, 1989; Ministério da Saúde, 2007; Pieri e Fravre, 2008)

### **1.5 Profilaxia**

A transmissão da esquistossomose ocorre devido a falta de saneamento básico, problemas sócio-econômicos, contato do homem com coleções hídricas que contenham caramujos hospedeiros infestados e falta de tratamento de pessoas infectadas. A profilaxia consta de medidas ou estratégias adotadas, individualmente ou em conjunto, que diminuam ou impeçam a transmissão da doença, ou seja, estratégias que quebrem o ciclo do parasita.

Desde o final da década de 70 o Brasil realizou e manteve por um período o Programa Especial de Controle da Esquistossomose (PECE), criado pela Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (SUCAM). Este programa, que durou por volta de quatro anos, reduziu a prevalência e a transmissão da doença através do controle dos caramujos, tratamentos de doentes, abastecimento de água, entre outras medidas (Webbe, 1987; Amaral e Porto, 1994).

Em 1980 o PECE se tornou um programa de rotina do Ministério da Saúde, passando a ser chamado de Programa de Controle da Esquistossomose (PCE). O PCE se restringiu ao inquérito coprológico e quimioterapia em massa. Em 1990 o PCE passa a ser responsável por atividades de controle da esquistossomose no que diz respeito à educação

sanitária, saneamento, diagnóstico coproscópico, tratamento dos doentes e controle dos moluscos hospedeiros intermediários (Amaral e Porto, 1994).

Em 1993, o PCE foi descentralizado e a responsabilidade das atividades de controle da esquistossomose passou a ser do município. Como a maioria dos municípios não assumiu, de fato, as atividades propostas, observou-se deficiência no registro dos dados, comprometendo as ações de controle (Silveira, 1989; Amaral e Porto, 1994).

No Brasil vem sendo realizado, desde outubro de 2010, um inquérito nacional de prevalência da esquistossomose mansônica e geo-helmintoses, promovido pelo Serviço de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. O objetivo é atualizar a situação da esquistossomose e outros geohelmintoses no país. A expectativa é que este inquérito termine em 2012. Os testes incluem exames de Kato-Katz em alunos de 7 a 14 anos de idade e de ultrassonografia em adultos, em zonas de alta, média e baixa endemicidade e em municípios com uma média de 500 mil habitantes (FIOCRUZ, 2011).

No estado de São Paulo, em 2003, a Secretaria de Estado da Saúde colocou o PCE sob a responsabilidade da Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar do Centro de Vigilância Epidemiológica (DDTHA – CVE), que responde exclusivamente ao controle e vigilância dos casos humanos. O controle e vigilância dos moluscos hospedeiros intermediários ficou sob a responsabilidade da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) (Guimarães, 2007).

O estado de São Paulo conseguiu diminuir o número de casos da doença utilizando estratégias para promover e eliminar a autoctonia. Dentre as estratégias cita-se o aumento de inquéritos na população, a implantação de testes mais sensíveis para o diagnóstico (sorológicos e PCR), ampla divulgação na mídia, estratégias educativas, inserção de mais unidades Geo Sentinelas, melhoria no saneamento básico e mudanças ambientais (CVE, 2009a; CVE, 2009b; CVE, 2009c).

### 1.5.1 Saneamento básico e educação sanitária

No Brasil, o saneamento básico é bastante precário e, sem dúvida é uma medida que traz muitos benefícios, não só para redução da transmissão da esquistossomose, como também de outras doenças de veiculação hídrica como salmoneloses, giardíases, amebíases, hepatite, entre outras. A construção de rede de esgoto, tratamento de águas, além de prevenir doenças, acarreta uma melhor qualidade de vida para a população (Neves et al., 2005; Rey, 2008).

A educação sanitária tem um papel muito importante, na conscientização e esclarecimento da população sobre como prevenir as doenças. Enfatiza como a mudança de certos hábitos pode diminuir o risco de infecção da doença, com auxílio de medidas de saneamento, como por exemplo, não nadar em recursos hídricos desconhecidos ou lançar seus esgotos nos mesmos. A educação sanitária contribui para o sucesso dos inquéritos coprológicos e sorológicos realizados pelo serviço de saúde (Rey, 1987; Schall, 1987; Schall et al., 2008; Souza e Lima, 1990).

### 1.5.2 Quimioterapia e vacina

A quimioterapia reduz drasticamente as fontes de infecção humana. Atualmente são utilizados dois medicamentos para a quimioterapia da esquistossomose, o oxamniquine e o praziquantel.

Oxamniquine é ativo somente contra o *S. mansoni*, tendo efeito apenas sobre as formas adultas. Embora de baixo custo, este medicamento causa efeitos colaterais como vertigens, sonolência, dores de cabeça, desconforto abdominal, vômito e diarreia. É um derivado das tetraidroquinoléinas. Encontra-se a venda sob o nome de Mansil<sup>®</sup> ou Vansil<sup>®</sup> (Oliveira, 2005; Rey, 2008; Katz, 2008; Coura e Conceição, 2010).

O tratamento por oxamniquine nas Américas se dá em dose oral única de 15 mg/kg de peso do paciente. Em crianças com menos de 30 quilos,

recomenda-se 20 mg/kg de peso, administrada em duas doses, com intervalos de 4 a 6 horas entre uma dose e outra. Na África recomenda-se doses totais de 40 a 60 mg/kg de peso do paciente, administradas em 2 ou 3 doses equivalentes a 20m/kg (Rey, 2008; Katz, 2008). A taxa de cura do oxamniquine é de 78% a 93% em adultos e de 66% e 89% em crianças (Ferrari et al., 2003).

Prazinquantel é uma pirazino-isoquinolina, apresentado sob o nome de Bilcitrine<sup>®</sup>. Foi introduzido em 1975 e atualmente é o fármaco mais indicado para o tratamento contra a esquistossomose, devido ao seu baixo efeito colateral, baixo custo e eficácia contra outras espécies de *Schistosoma*, além do *S. mansoni*, tanto nas formas adultas como nas formas jovens (Rey, 2008).

O tratamento da esquistossomose mansônica por praziquantel se dá via oral, em dose única de 40 mg/kg de peso do paciente. A taxa de cura deste medicamento chega a 78% no Brasil. E de 70% a 100% em pacientes africanos tratados com dose de 60 mg/kg (Rey, 2008; Katz, 2008).

Apesar de o Prazinquantel ser o fármaco mais indicado, foi relatado no Egito e Senegal tolerância ou resistência ao medicamento pelo *S. mansoni*. A comunidade científica tem buscado pesquisar e desenvolver drogas para a prevenção e cura da doença (Ismail et al., 1999; Liang et al., 2000; Liang et al., 2003; Utzinger et al., 2001). Vem crescendo, também, a busca por vacinas. Uma vacina adequada para esquistossomose deve ser de baixo custo, eficiente em todas as fases de desenvolvimento do parasita e atuar em crianças, adultos e idosos. Mas as dificuldades de se encontrar uma vacina eficiente são devido a mecanismos de escape que o parasita possui e a diversidade antigênica do parasita. (Katz, 1999; Wilson e Coulson, 2006).

Atualmente temos um pouco mais do que sete proteínas candidata a vacina para esquistossomose, são elas: a SmTSP-2<sup>c</sup>, SmTSP-1, Sm29<sup>c</sup>, Sm23<sup>e</sup>, Sm-p80, Sm14<sup>e</sup>, Sm28-GST<sup>e</sup>, Sm28-TPI<sup>e</sup>, Sm97 paramiosina<sup>e</sup> e CT-



SOD. A Sm28-GST<sup>e</sup>, desenvolvida pelo Instituto Pasteur na França, está em fase de testes clínicos e tem demonstrado boa atividade imunogênica em paciente voluntários da França, Nigéria e Senegal (Katz, 1999; McManus e Loukas, 2008; Abath e Katz, 2008; WHO, 2010b).

A Sm14 vem sendo desenvolvida pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) do Rio de Janeiro e, foi reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como a única candidata com perspectivas de chegar ao mercado o mais breve possível. A Sm14 foi testada não apenas contra a esquistossomose, mas também contra a fasciolose. Em testes de laboratório, a Sm14 forneceu a camundongos uma proteção de 67% contra as cercarias de *S. mansoni* e 100% de proteção contra as metacercárias de *Fasciola hepatica*. Recentemente o laboratório Ourofino adquiriu a licença para explorar a tecnologia desenvolvida pela FIOCRUZ. O laboratório promete produzir a vacina para a fasciolose, cuja previsão de estar disponível no mercado é para daqui dois anos. A vacina para esquistossomose, ainda necessita passar por testes em humanos (FIOCRUZ, 2010; Meireles, 2010).

Em São Paulo, o Instituto Butantan, desde 2001, trabalha em busca de uma vacina para esquistossomose. As pesquisas tiveram início com o seqüenciamento feito no projeto genoma *S. mansoni* e seguiu com o projeto temático “Genoma funcional do *S. mansoni* aplicado ao desenvolvimento de vacinas”. Os pesquisadores do Instituto Butantan realizaram uma varredura de genes/proteínas para identificar aqueles com potencial de induzir uma resposta imune protetora. Foram selecionados 30 genes/proteínas, sendo que destes apenas três confirmaram proteção. A equipe de pesquisadores do Instituto Butantan investe na idéia de que serão necessários combinar vários antígenos para compor uma vacina eficaz contra a esquistossomose. (Reynol, 2009).

### **1.5.3 Controle dos hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni***

O controle dos caramujos hospedeiros intermediários em áreas endêmicas é promissor na redução ou eliminação da transmissão da esquistossomose, uma vez que estes caramujos são responsáveis pela transmissão do parasita para o homem (Liese, 1986; Lardans e Dissous, 1998).

O combate dos moluscos pode ser feito pelo uso de métodos ambientais, biológicos e através de moluscidas químicos e vegetais. O uso de um ou mais métodos em conjunto com obras de saneamento básico previne ou diminui a proliferação dos criadouros (WHO, 1984).

#### **1.5.3.1 Métodos ambientais**

As modificações ambientais consistem em pequenas alterações no ambiente sem causar grandes efeitos adversos, como por exemplo, alterar a velocidade do fluxo hídrico, fazer correções nas margens de rios e represas, aterro de valas e poços contaminados e remoção da vegetação das margens de coleções hídricas. Os métodos ambientais apesar de serem medidas eficazes, necessitam de investimentos dispendiosos, constante manutenção e promovem alterações drásticas nos habitats (WHO, 1980; Souza e Lima, 1990; Ré , 1990; Rapado, 2007).

#### **1.5.3.2 Métodos biológicos**

Os métodos biológicos consistem em introduzir outros agentes biológicos antagonistas, ocasionando competição pelo mesmo habitat, espaço e alimento (WHO, 1984; Ré, 1990; Ministério da Saúde, 2007; Rapado, 2007).

Muitos organismos já foram testados em campo, demonstrando pouca eficiência até o momento (WHO, 1984; McCullough, 1981). Dentre eles estão micropatógenos (bactérias, fungos e protozoários), peixes (*Serranochromis macrocephala*, *Tilapia melanopleura*, *Barbus conchoni*, *Cichlasoma biocellatum*, *Cichlasoma ocellatum*, *Astronotus ocellatus*, *Oreochromis niloticus*), aves aquáticas e quelônios (WHO, 1984; Ré, 1990; Souza e Lima, 1990; Ministério da Saúde, 2007).

Outro exemplo de controle biológico é a competição entre molusco, como a utilização do ampularídeo *Marisa cornuarietis*, que são competidores e predadores de planorbídeos jovens e ovos (Freitas e Santos, 1995). O tiarídeo *Melanoides tuberculatus* também foi utilizado no controle biológico, causando redução significativa, não apenas em população de *Biomphalaria*, mas de espécies nativas (Abílio, 1997). Mas, por tratar-se de hospedeiro intermediário de helmintos seu uso torna-se inviável.

### **1.5.3.3 Moluscidas**

São substâncias letais para caramujos adultos e embriões. O moluscicida ideal não pode afetar outros organismos aquáticos e mamíferos, deve ser baixo custo e não deve ser adverso para o ambiente. Os moluscidas constituem um dos métodos mais eficientes para controlar a esquistossomose, uma vez que eliminam ou reduzem as populações de moluscos hospedeiros intermediários do parasita. Existem moluscidas sintéticos e de origem vegetal (Ré, 1990; Ministério da Saúde, 2007; Weebbe, 1987).

#### **1.5.3.3.a Moluscidas sintéticos**

O combate do molusco hospedeiro até 1945 era feito principalmente com moluscidas químicos como cal, cianeto de cálcio e sulfato de cobre (Ducan, 1974). A partir da 2ª guerra mundial surgiram novos moluscidas como o pentaclorofenol, pentaclorofenato de sódio, N-tritilmorfolina e

niclosamida (Ritchie, 1963; Weebbe, 1987). Esses moluscidas além de serem de alto custo, não só diminuía e acabavam com a população de moluscos, mas causavam efeitos tóxicos sobre outros organismos aquáticos e no ambiente (WHO, 1973).

O pentaclorofenol (PCF) e pentaclorofenato de sódio (PCFNa) são produtos derivados de sais de fenol, que são altamente tóxicos devido a agir no processo de fosforilação oxidativa mitocondrial (ANVISA, 2006). Estes produtos foram muito utilizados como moluscidas, porém não agiam somente nos moluscos, mas também sobre outros organismos, motivo pelo qual a OMS não recomenda a sua utilização. O PCF e PCFNa são utilizados para preservação de madeira, devido a sua ação fungicida, inseticida e bactericida, porém estes produtos tem efeito residual, ou seja, produtos derivados desta madeira pode conter estas substâncias que são tóxicas ao homem (WHO, 1973; Souza, 2008).

N-tritilmorfolina (Frescon<sup>®</sup>) age sobre os moluscos em pequenas concentrações, como 0,1 a 0,5 mg/litro, durante uma hora. Não é tóxico para outros organismos aquáticos, mas pelo fato de não matar as desovas, não é considerado tão eficiente. Para uma maior eficiência deve-se aplicar ou reaplicar o produto em um curto período de tempo, tornando este tratamento caro. Este produto é recomendável para locais onde a preservação nutricional do recurso hídrico deve ser preservada (Rey, 1987 e 2008).

Niclosamida (Bayluscid) é o moluscida geralmente usado para o controle dos moluscos. Possui alta toxicidade para os moluscos na concentração de 1 mg/litro, causando 100% de mortalidade, quando o contato com o produto for no mínimo de 8 horas. É eficiente para desovas e formas larvárias do *Schistosoma*, se decompõe rapidamente e não apresenta efeitos cumulativos, mas tem o inconveniente de ser caro e tóxico para peixes e outros animais (Rey, 1987 e 2008; Ministério da Saúde, 2007).

### 1.5.3.3.b Moluscidas de origem vegetal

A Organização Mundial de Saúde (1983) define que um bom moluscicida deve ter efeito tóxico em moluscos adultos nas concentrações de 0.5 a 20 ppm do extrato solúvel (substâncias ativas) e igual ou menor a 100 ppm do extrato bruto e, ser atóxico para outros organismos. O uso de extratos de plantas vem sendo muito recomendado por cientistas para o combate dos moluscos, como uma forma de controlar a esquistossomose (Mott, 1987). O critério utilizado na escolha de um produto ou planta a ser utilizada como moluscicida é sua baixa ação tóxica ou irritante para peixes, mamíferos ou homem (WHO, 1973). Com isso, vêm surgindo muitas pesquisas em torno de extratos vegetais com diferentes princípios ativos (WHO, 1973; Kloos e McCullough, 1981; Jurberg et al., 1989).

A descoberta de plantas com o potencial moluscicida tem sido relatada desde 1930 (Archibald, 1933). Desde então, os estudos com espécies vegetais vem crescendo, com intuito de auxiliar o controle dos hospedeiros intermediários da esquistossomose (Kloos e McCullough, 1981)

Archibald (1933) e Anatarman (1955), sugeriram que fosse plantada *B. aegyptica* em áreas endêmicas no Sudão, pois devido a sua composição metabólica secundária ter atividade moluscicida, os frutos ao caírem na água, auxiliariam no controle dos caramujos sem alterar a potabilidade da água. O uso de extratos aquosos de frutos de *Balanites aegyptiaca* e *Balanites maughamii* (Balanitaceae) foi sugerido por Kloos e McCullough (1981) tanto no combate dos moluscos dos gêneros *Planorbis* e *Bulinus*, bem como dos miracídios e cercárias do *S. mansoni*, pois estes frutos apresentam isobutilamida e saponinas que determinam esta ação.

Os primeiros estudos sobre moluscidas de origem vegetal realizados no Brasil foram com extratos aquosos de caules de *Serjania spp.* (cipó-timbó) e de frutos de *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae) (saboneteira, sabão) que demonstraram atividade sobre *Biomphalaria glabrata*. Essa ação

foi atribuída às saponinas presentes nestes vegetais (Pinto e Almeida, 1944).

Várias espécies de plantas foram estudadas com relação a atividades moluscicida e larvicida. Luna (2005) estudou 23 plantas medicinais da região nordeste sobre *B. glabrata*; dessas, o extrato das folhas de *Annona muricata* (Annonaceae) apresentou atividade moluscicida na concentração de 100 ppm causando 100% de mortalidade e o extrato da casca de *Caesalpinia echinata* (Fabaceae) apresentou atividade ovicida, causando 100% na concentração de 100 ppm.

*Euphorbia cotinifolia* (Euphorbiaceae), é popularmente conhecido como leiteiro-vermelho, caracasana, barrabás, aiapana, açacuí, figueirinha-roxa e maleiteira. O extrato bruto do fruto, caule, casca da semente e látex desta planta foram aplicados sobre adultos de *B. glabrata* e desovas, apresentando toxicidade em concentrações abaixo de 50 ppm. Além dos testes laboratoriais, foram feitos testes em campo (Belo Horizonte – MG), onde foi observada uma melhor atividade moluscicida do extrato hexânico na concentração de 20 ppm. O produto, nesta mesma concentração mostrou ser tóxico para peixes, mas não para camundongos e seres humanos. Os autores acreditam que o extrato de *E. cotinifolia* deve ser mais bem investigado, pois pode vir a ser um meio eficaz de controle dos moluscos, uma vez que tem a vantagem de ser extraído de uma planta de crescimento rápido e de fácil obtenção da matéria prima (Pereira et al., 1978).

Os extratos de *Bidens pilosa* (nome popular: picão –preto, picão, amor de burro, carrapicho, carrapicho-agulha) e *Tagetes patula* (nome popular: cravo de defunto, botões de solteiros, cravo, cravo francês, rosa da índia), pertencentes à família Asteraceae, apresentam efeitos moluscicida, cercaricida e miracidial em *Physa occidentalis* (Physidae) (Graham et al., 1980).

A família Piperaceae tem sido bastante pesquisada com relação ao seu efeito tóxico. É típica de regiões tropicais e subtropicais, sendo muito

utilizada na medicina (*Piper sarmentosum* e *Piper methysticum* são utilizados como sedativo) e alimentação (*Piper nigrum* – pimenta-do-reino). Apresenta uma variedade de compostos bioativos resultante do seu metabolismo secundário, tendo sido observada a produção de óleos essenciais, amidas, pironas, flavonóides e lignóides (fenilpropanóides, lignanas e neolignanas) (Vieira et al., 1980; Giesbrecht et al., 1981; Chang et al., 1985; Dias et al., 1986; Maia et al., 1993; Pongmarutai, 1989; Tyagi et al., 1993; Gurib-Fakim, 1994; Tirillini et al., 1996; Baldoqui et al., 1999; Benevides et al., 1999; Ribeiro et al., 1999; Martins et al., 2000; Navickiene et al., 2000; Kato e Furlan, 2007 ).

A família Piperaceae é composta por 14 gêneros, sendo os gêneros *Piper* e *Peperomia* os mais abundantes em número de espécies (Barroso, 1986; Mabberley, 1997 e Dyer e Palmer, 2004). O gênero *Peperomia* é caracterizado morfológicamente por apresentarem plantas de pequeno porte, apresentam folhas com tecidos especializados em reserva de água e muito dos espécimes são epífitas. Já o gênero *Piper* é caracterizado por apresentarem plantas lenhosas, incluindo arbustos, trepadeiras e árvores de pequeno porte (Dyer e Palmer, 2004; Mota, 2007).

Devido a ampla diversidade de espécies no Brasil, a família Piperaceae tem sido grande alvo de estudos. Kloos e McCullough (1981) fornecem a citação de 58 extratos de plantas de diferentes famílias testados quanto à sua toxicidade em *Biomphalaria*, destes, dois extratos pertencem a família Piperaceae. Segundo os autores os extratos de óleos essenciais extraídos da folha de *Piper marginatum* provocaram mais de 60% de mortalidade em *B. glabrata*. Já, o extrato aquoso da raiz e da haste de *Piper tuberculatum*, na concentração de 200 ppm, apresentou taxa de mortalidade, em *B. glabrata* e *B. straminea*, de 40 a 80%, respectivamente.

O Laboratório de Química Fundamental da Universidade de São Paulo (USP) e o Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan vêm realizando, desde 1996, estudos fitoquímicos com diversas espécies de Piperaceae.

No laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan estão sendo desenvolvidos testes com Piperaceae, a fim de verificar o efeito moluscicida e ovicida dos extratos em adultos e embriões de *B. glabrata*. Rapado et al.(2011) determinam o efeito de extratos de Piperaceae em adultos e estádios embrionários de *B. glabrata*, verificando que os extratos de *Piper aduncum*, *Piper crassinervium*, *Piper cuyabanum*, *Piper diospyrifolium* e *Piper hostmannianum* apresentam atividade moluscicida nos adultos nas concentrações de 10 a 60 ppm e, *Piper cuyabanum* e *Piper hostmannianum* apresentam atividade ovicida nos estádios embrionários em concentrações de até 20ppm.

A busca por substâncias de origem vegetal que sejam capazes de reduzir ou controlar a população dos hospedeiros intermediários do *S. mansoni*, sem causar danos ao meio ambiente, é de suma importância para a interrupção do ciclo do parasita, conseqüentemente, para a redução da doença no país.

O presente trabalho, em parceria com o Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan e o Laboratório de Química Fundamental da USP, busca determinar o efeito de seis extratos e uma substância ativa de Piperacea em adultos e embriões de *B. glabrata*.



## 2. Objetivos

### 2.1. Geral

- Avaliar a ação moluscicida e ovicida de extratos de folhas de *Piper cubataonum*, *Piper caldense*, *Piper cernuum*, *Peperomia trineura*, *Peperomia rubricaulis*, *Peperomia blanda* e do ácido caldensínico (substância ativa) da família Piperaceae em *B. glabrata*.

### 2.2. Específicos

- Verificar o efeito das concentrações dos extratos e substância ativa, com relação à mortalidade, em adultos e estádios embrionários (blástula, gástrula, trocófora, véliger e hipo) de *B. glabrata*.
- Identificar possíveis alterações morfológicas, nos estádios embrionários de blástula, gástrula, trocófora, véliger e hipo de *B. glabrata*;

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Material de estudo

##### 3.1.1. Animais

Os caramujos *Biomphalaria glabrata* são provenientes de Barreiros de Baixo, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. A população de caramujos é mantida no Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan, desde 1982, em aquários de polietileno (20 litros), contendo água decolorada e temperatura média de 25°C, sendo alimentados com alface “in natura”.

Neste trabalho foram utilizados caramujos adultos com conchas íntegras com diâmetro de 10 a 18 mm e desovas com embriões nos estádios embrionários de blástula, gástrula, trocófora, véliger e hipo.

Para a obtenção das desovas foram colocadas folhas transparentes de polietileno de 10 cm x 5 cm nos aquários, para que os caramujos colocassem as desovas. Os plásticos, contendo as desovas, foram recolhidos diariamente e levados ao microscópio estereoscópico para a identificação dos estádios embrionários segundo Kawano et al., (1992).

##### 3.1.2 Extratos vegetais

Foram utilizados seis extratos brutos; *Piper cubataonum* C.DC., *Piper caldense* C.DC., *Piper cernuum* Vell., *Peperomia trineura* Miq., *Peperomia rubricaulis* Ness., *Peperomia blanda* Jacq., e uma substância ativa; ácido caldensínico da família Piperaceae, provenientes de folhas.

As Piperaceae são oriundas do campo do INPA / Manaus e estão sendo mantidas, desde 1998, em estufa de crescimento de 80 m<sup>2</sup> e 20 m<sup>2</sup>, com irrigação, no Laboratório de Química de Produtos Naturais da USP – SP.

A obtenção dos extratos e o isolamento da substância ativa foram realizados no Laboratório de Química e Produtos Naturais da USP, pelo Prof. Dr. Massuo Jorge Kato.

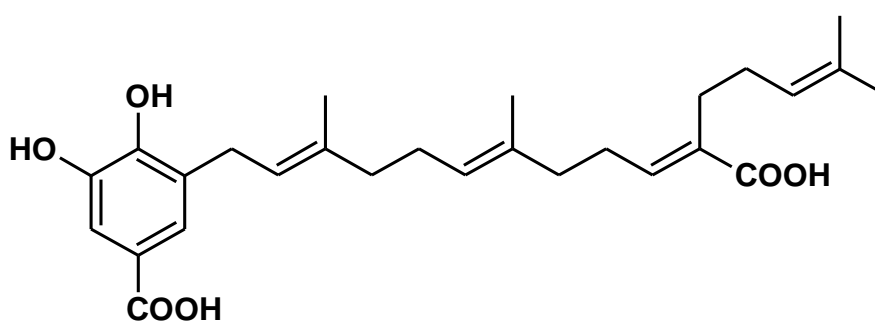
Para obtenção dos extratos de *P. cubataonum*, *P. cernuum*, *P. blanda*, *P. rubricaulis* e *P. trineura* foi seguido o seguinte protocolo: as folhas de cada espécie vegetal foram separadas e secas à sombra, em temperatura ambiente e levada para estufa a 45<sup>0</sup>C para finalizar o processo de secagem. Após a secagem, foram trituradas mecanicamente com auxílio de moinho de sacas para a preparação dos extratos brutos.

Para cada extrato foram utilizadas 5 g das folhas secas. Estas foram tratadas com 50 mL de metanol (MeOH) grau PA durante 24 horas, por 3 vezes, obtendo-se então os extratos. Utilizou-se o metanol por ser uma substância que extrai compostos apolares e polares. Após este procedimento, o solvente foi evaporado em um rota-evaporador, a partir do qual foram obtidos 0,75g, 0,8g, 0,4g, 0,7g e 0,4g de extratos brutos de *P. cubataonum*, *P. cernuum*, *P. blanda*, *P. rubricaulis* e *P. trineura*, respectivamente.

Para a obtenção do extrato de *P. caldense*, suas folhas (10g) foram secas em uma estufa à 50<sup>0</sup>C durante 48 horas, moídas em um moinho de sacas e tratadas com acetato de etila (AcOet), por 3 dias, à temperatura ambiente. Após este procedimento, filtra-se o extrato, para a obtenção de uma parte sólida e outra líquida. A parte líquida foi concentrada e levada para o evaporador rotativo (Büchi). O produto sólido resultante desta última evaporação foi novamente dissolvido com acetato de etila e concentrado junto com o extrato sólido obtido anteriormente resultando o extrato bruto final. Utilizou-se o acetato de etila por ser um solvente de média polaridade para apolar, com intuito de obter compostos metabólico apolares das folhas.

A obtenção da substância ativa ácido caldensínico foi feita através do fracionamento do extrato bruto de folhas de *P. caldense*. O extrato em acetato de etila de *P. caldense* foi fracionado por cromatografia líquida à

vácuo utilizando eluição gradiente com os solventes hexano, acetato de etila e metanol. A fase estacionária utilizada foi Sílica gel PF<sub>254</sub> da Merck, obtendo 12 frações. Após análise das frações por cromatográfica em camada delgada analítica uma das frações, que foi denominada fração K-842FA 6, foi fracionada por cromatografia em coluna utilizando eluição gradiente com os solventes hexano, acetato de etila e metanol. A fase estacionária utilizada foi Sílica gel 60 comum levando à purificação do ácido caldensínico (Figura 11). A fração K-842FA 6 foi escolhida por ser a fração mais pura e obtida em maior quantidade.



**Figura 11:** Fórmula estrutural do ácido caldensínico. Fonte: Freitas et al., (2009).

### 3.2 Protocolo com moluscos e desovas

Para os testes realizados neste trabalho foram considerados os critérios recomendados pela WHO (1983) em que um moluscicida é eficiente quando apresenta efeito tóxico em moluscos adultos nas concentrações de 0,5 a 20 ppm para substâncias ativas e igual ou menor que 100ppm do extrato bruto, onde 100mg/l equivale a 100 ppm.

Os extratos e a substância ativa foram diluídos em Dimetil sulfóxido (DMSO) a 1%. Para cada experimento foram feitos três grupos de estudo: grupo experimental, grupo controle de DMSO 1% e grupo controle de água. Foi feito três repetições, de cada experimento para obtermos um maior número amostral e viabilizar a análises estatísticas.

Inicialmente todos os extratos e a substância ativa foram testados nas concentrações de 100 ppm e 20 ppm, respectivamente. Procurou-se determinar para cada extrato as concentrações responsáveis pela mortalidade de no mínimo 50% da população, o que não foi possível verificar para o extrato de *P. caldense*, por não termos extratos suficiente para a realização dos experimentos. Outra dificuldade no estudo foi a impossibilidade de observar os experimentos nos finais de semanas.

### **3.2.1 Ensaio biológicos com moluscos**

Nos ensaios biológicos utilizou-se 10 caramujos por grupo, os quais foram divididos em dois subgrupos e, colocados em recipientes de vidro (3,5 cm diâmetro x 5,0 cm de altura) com capacidade de até 50 ml do extrato ou princípio ativo. Os recipientes foram tampados com placas de petri para que os moluscos ficassem totalmente imersos na substância testada (Figura 12). A exposição foi de 24 horas, com temperatura controlada, em média de 25° C. Após a exposição, os moluscos foram lavados em água decolorada e transferidos para um recipiente de vidro (7 cm de diâmetro e 11 cm de altura) contendo 200ml de água decolorada. Foram feitas observações individuais, durante 10 dias (Figura 13). Para cada concentração foram feitos três experimentos distintos, totalizando 30 exemplares por concentração. A toxicidade das substâncias testadas foram avaliadas pela mortalidade dos caramujos, que foi detectada pela perda de movimentos, liberação de hemolinfa, retração total do corpo para o interior da concha e ausência de batimentos cardíacos visualizados sob microscópio estereoscópico. Para o cálculo da mortalidade foi empregada a seguinte fórmula:

$M = (100 \times P2) \div P1$ , onde M é a taxa de mortalidade (%), P1 o número de indivíduos antes da exposição aos extratos e P2 o número de indivíduos sobreviventes após a exposição.



**Figura 12:** Exposição dos moluscos adultos a extratos de Piperaceae.

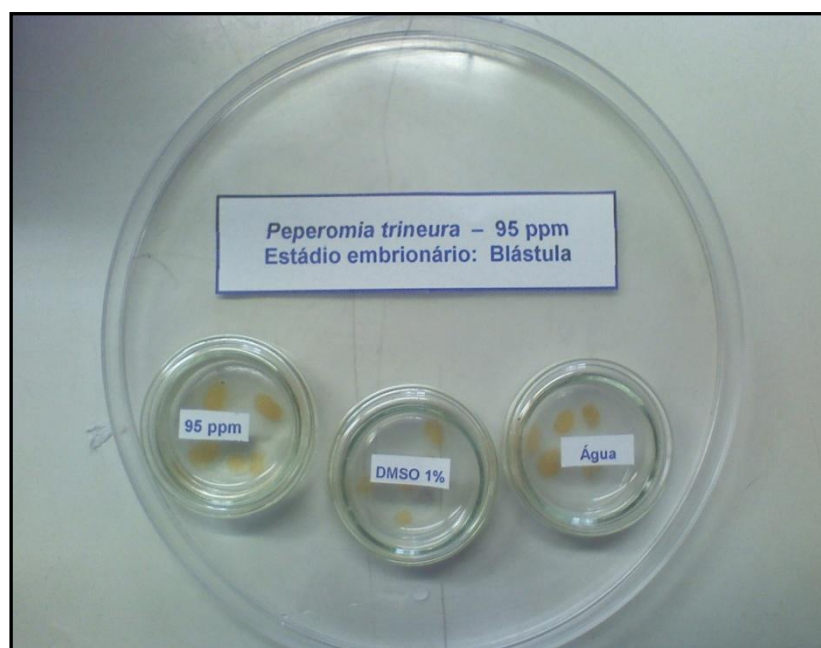


**Figura 13:** Moluscos individualizados e mantidos na água declorada, após as 24 horas de exposição a extratos de Piperaceae.

### **3.2.2 Ensaios biológicos com embriões**

Para a obtenção de desovas, como referido anteriormente, foram colocadas folhas transparentes de polietileno (10 cm X 5 cm) nos aquários, que serviram como substrato para que os caramujos realizassem a

oviposição. A coleta das desovas foi realizada diariamente. Para isso, os plásticos contendo as desovas foram cuidadosamente retirados dos aquários e recortados em torno das desovas, as quais foram identificadas sob o microscópio estereoscópico de acordo com Kawano et al., (1992). Após a identificação, as desovas foram expostas nas concentrações desejada da substância ativa e dos extratos de Piperaceae. Utilizou-se 5 desovas para cada grupo (experimental, DMSO 1% e água). A Metodologia segue o mesmo padrão utilizado com os moluscos adultos. As desovas foram expostas em placas de vidros (3,5 cm diâmetro x 1,0 cm de altura) (Figura 14). Após a exposição, as desovas foram lavadas e colocadas em placas de cultura de células de 24 poços contendo água declorada (Figura 15) e, mantida em estufa incubadora a 25° C. As observações foram feitas durante 7 dias, pois após este período se dá a eclosão dos ovos.



**Figura 14:** Exposição de desovas a extrato de Piperaceae.



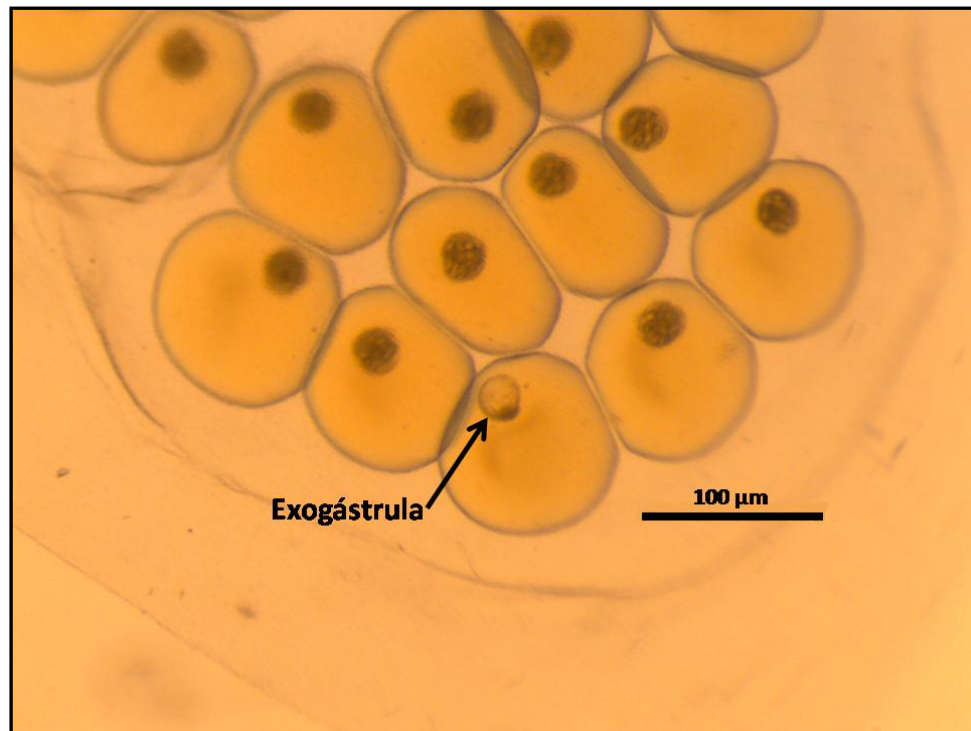
**Figura 15:** Desovas individualizadas, mantidas em água dechlorada, em placa de cultura de células, após as 24 horas de exposição à extrato de Piperaceae.

A avaliação da toxicidade dos extratos foi determinada pela morte do embrião e malformações dos tipos exogástrulas e inespecífica.

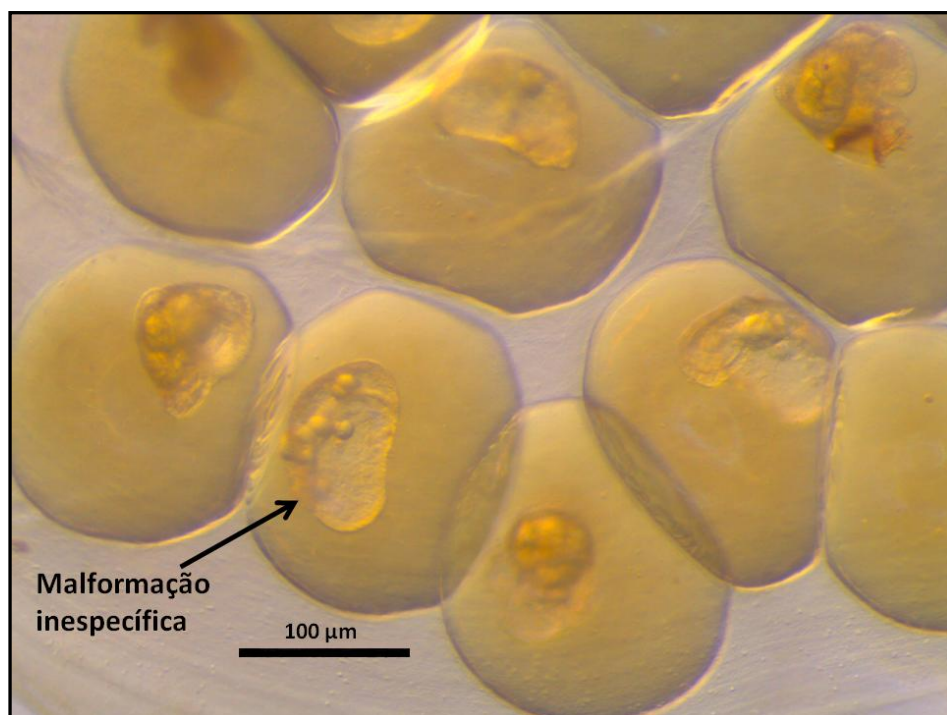
Malformação do tipo exogástrula: são embriões vesiculares, que não sofreram invaginação do arquêntero e geralmente morrem nos primeiros dias de desenvolvimento (Figura 16) (Tallarico, 2003).

Malformação inespecífica: são embriões com desenvolvimento anormal, nos quais não se identifica o tipo de malformação (Figura 17) (Tallarico, 2003).





**Figura 16:** Embriões de *Biomphalaria glabrata* no estágio embrionário de trocófora jovem apresentando malformação do tipo exogastrula.



**Figura 17:** Embriões de *Biomphalaria glabrata* no estágio embrionário de véliger, apresentando malformações inespecíficas.

### 3.3 Experimentos com Bayluscide WP70<sup>®</sup>

Pelo fato da população de *B. glabrata* estudada ser proveniente de uma população mantida em laboratório, desde 1982, foram feitos experimentos para avaliar a sua suscetibilidade, com o moluscicida químico niclosamida (etanolamida de 2', 5 dicloro-4'-nitrosalicilanilida), de nome comercial Bayluscide WP70<sup>®</sup>. Os moluscos foram expostos as concentrações de 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06; 0,07; 0,08; 0,09 e 0,1 ppm a partir da solução de Bayluscide WP70<sup>®</sup> a 1%. A metodologia usada foi a mesma estabelecida para a substância ativa. Os experimentos foram realizados em adultos.

### 3.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada pela Dra. Regiane Maria Tironi de Menezes do Laboratório de Entomologia Médica da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN). Foram verificados os efeitos das concentrações dos extratos e da substância ativa na mortalidade em adultos.

Não foi possível analisar estatisticamente o efeito das concentrações em embriões de *B. glabrata* devido os grupos experimentais e grupos controles água e DMSO 1% apresentarem diferença no número de embriões. Esta diferença ocorreu devido à dificuldade de se obter desovas com o mesmo número de embriões em um mesmo estágio embrionário.

#### 3.4.1 Análises dos dados

Os percentuais de mortalidade, sobrevivência e malformações de adultos e embriões de *B. glabrata* foram confeccionados a partir do banco de dados que foi formado contendo as variáveis de estudo, por meio do programa Excel para Windows versão 2003. Esta planilha também permitiu a seleção de algumas variáveis para a confecção de bancos que foram utilizados nas análises descritas nos parágrafos seguintes.

Os dados de mortalidade de adultos de *B.glabrata* submetidas a uma determinada concentração de extrato de Piperaceae, e do ácido caldensínico, além dos controles água e DMSO (1%), foram submetidos à análise de Probit, utilizando o programa Statistica para Windows versão 8.0 com o objetivo de estimar a CL 50 e CL 90. Apenas os dados de mortalidade das bionfalárias submetidas ao ácido caldensínico, *P. trineura* e *P.caldense*, foram analisados, visto que, somente nestes extratos foi possível realizar experimentos em diferentes concentrações nos exemplares de *B.glabrata* e por haver variação entre mortos e sobreviventes em cada experimento, condição necessária para a variável dependente.

Análise de regressão linear simples foi utilizada para verificar qual foi o efeito das concentrações de extratos de *P.trineura*, *P.caldense* e do ácido caldensínico em relação ao número de mortos de adultos de *B.glabrata* para cada experimento realizado. A variável dependente (y) foi representada pelo número de mortos de *B. glabrata* e as variáveis independentes (x) foram representadas pelas diferentes concentrações dos extratos de Piperaceae e do ácido caldensínico. Foram consideradas significantes as análises de regressão que apresentaram distribuição de Fischer e Snedecor (F) com  $p < 0,05$ . Para as análises de regressão linear foi utilizado o programa estatístico BIOESTAT versão 5.0 para Windows.

Só houve condições de análise de regressão linear quando a variável dependente “y” variou em pelo menos uma das concentrações nos experimentos observados. No caso dos experimentos em que foram utilizados os extratos de *Piper cubataonum*, *Piper cernuum*, *Peperomia rubricaulis* e *Peperomia blanda* não houve condições de análise pela não variação da variável dependente nº de mortos de *B. glabrata*, ou morriam todos os exemplares no primeiro dia de observação de cada experimento ou sobreviviam todos.

A distribuição qui-quadrado foi utilizada na comparação de mortos e sobreviventes de adultos de *B. glabrata*, submetidos à diferentes concentrações de ácido caldensínico. A mesma análise foi utilizada na

comparação de mortos e sobreviventes de *B. glabrata* submetidos a 50 ppm de *Piper caldense* e *Peperomia trineura*.

O nível de significância adotado para as análises foi de 5% ( $\alpha = 0,05$ ). Como um complemento da análise de qui-quadrado utilizou-se análise de resíduos segundo Pereira (1999), para verificar diferenças entre as frequências esperadas e observadas expressas em unidades de desvio padrão, ou seja, para o nível de significância de 5% ( $\alpha = 0,05$ ), houve excesso de ocorrências quando o resíduo foi superior a 1,96 e falta de ocorrências quando o resíduo foi inferior a  $-1,96$ . A aplicação da análise de resíduos só foi pertinente nas tabelas de qui-quadrado que apresentaram algum tipo de associação significativa.

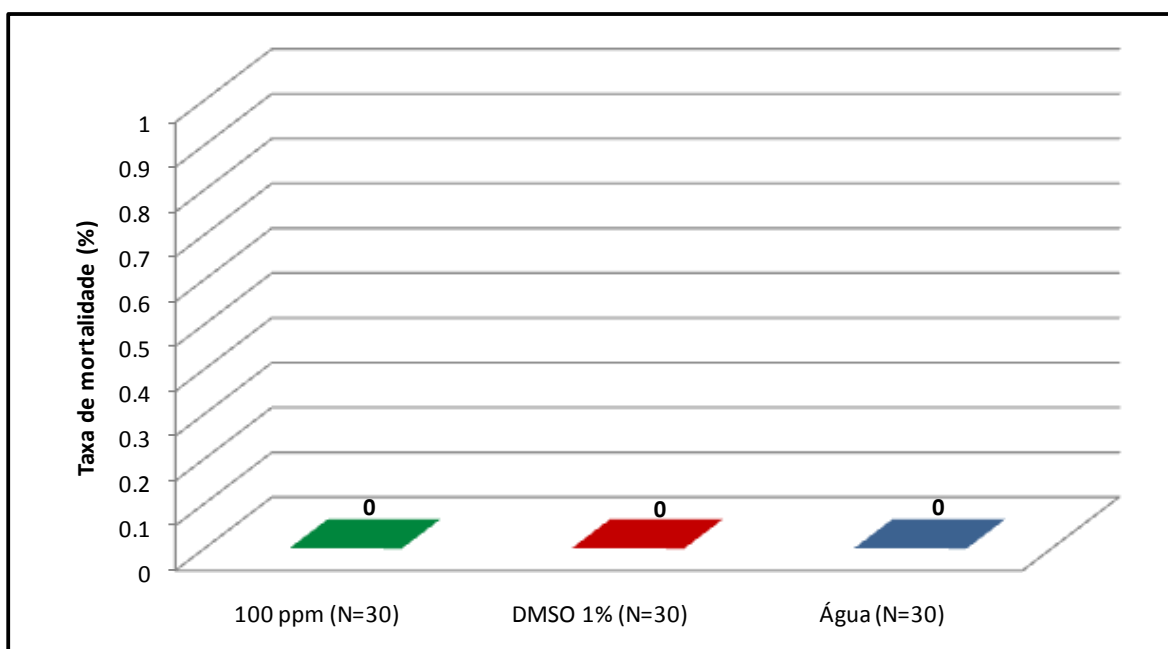
Para a análise de qui-quadrado com análise de resíduos, também foi utilizado o programa estatístico BIOESTAT versão 5.0 para Windows.

## 4. Resultados

### 4.1 Experimentos com moluscos adultos

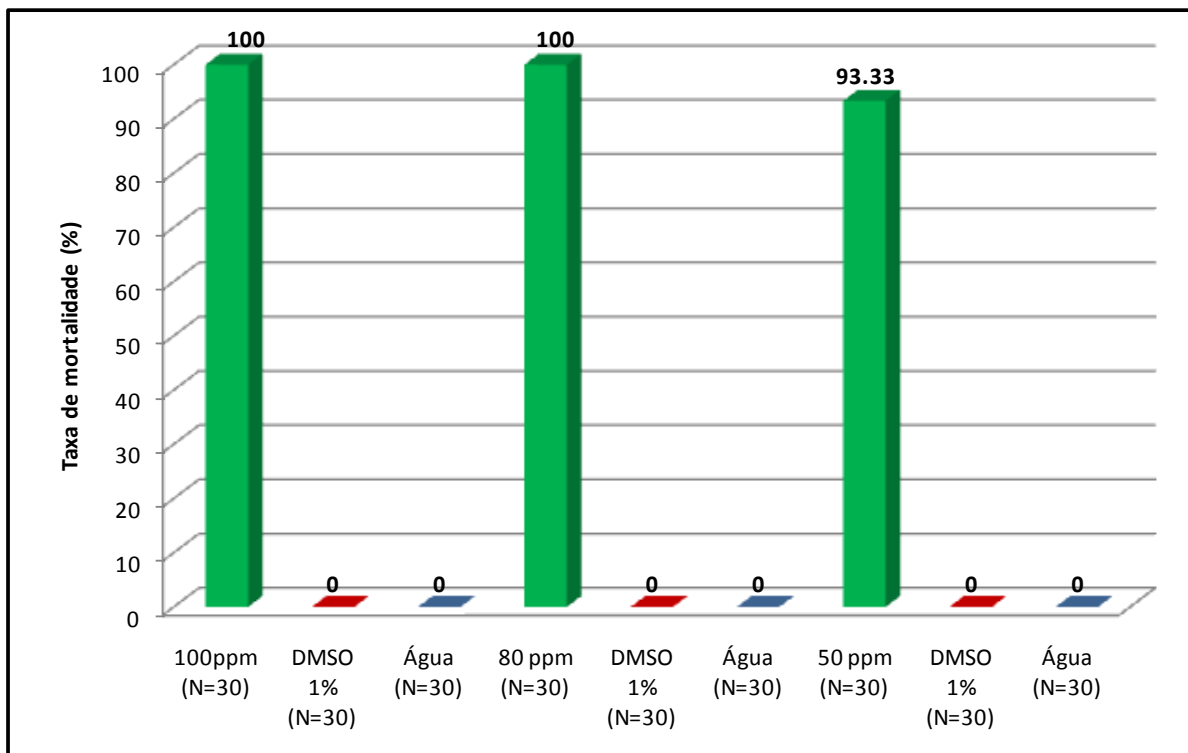
Os moluscos adultos foram expostos aos extratos brutos *Piper cubataonum*, *Piper caldense*, *Piper cernuum*, *Peperomia trineura*, *Peperomia rubricaulis*, *Peperomia blanda* e à substância pura ácido caldensínico, em diferentes concentrações.

O extrato de folhas de *Piper cubataonum*, na concentração de 100 ppm (anexo 1), não causou mortalidade ao longo dos 10 dias de observação após à exposição dos moluscos ao extrato (Figura 18).



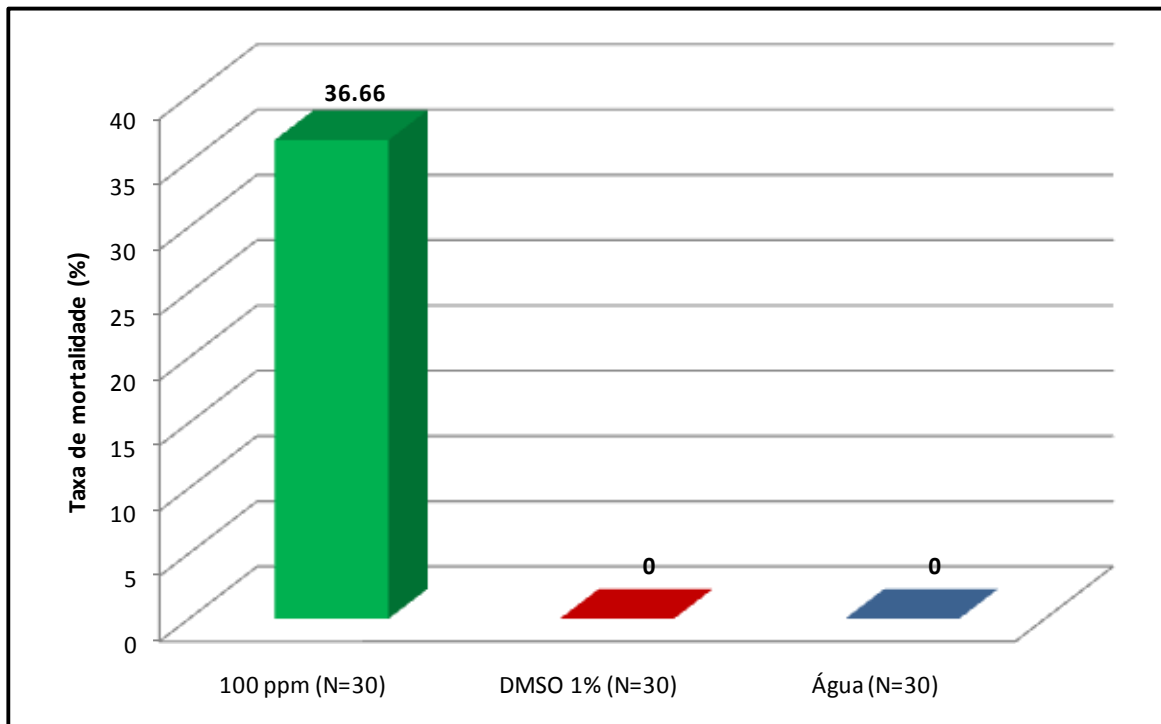
**Figura 18:** Atividade moluscicida do extrato de folhas de *Piper cubataonum* em *Biomphalaria glabrata* na concentração de 100 ppm, verificada ao longo de 10 dias de observação.

O extrato de folhas de *Piper caldense* foi testado nas concentrações de 100, 80 e 50 ppm (anexo 2). Durante as 24 horas de exposição dos moluscos ao extrato, observou-se 100% de mortalidade nas concentrações de 100 e 80 ppm e de 93,33% na concentração de 50 ppm (Figura 19).



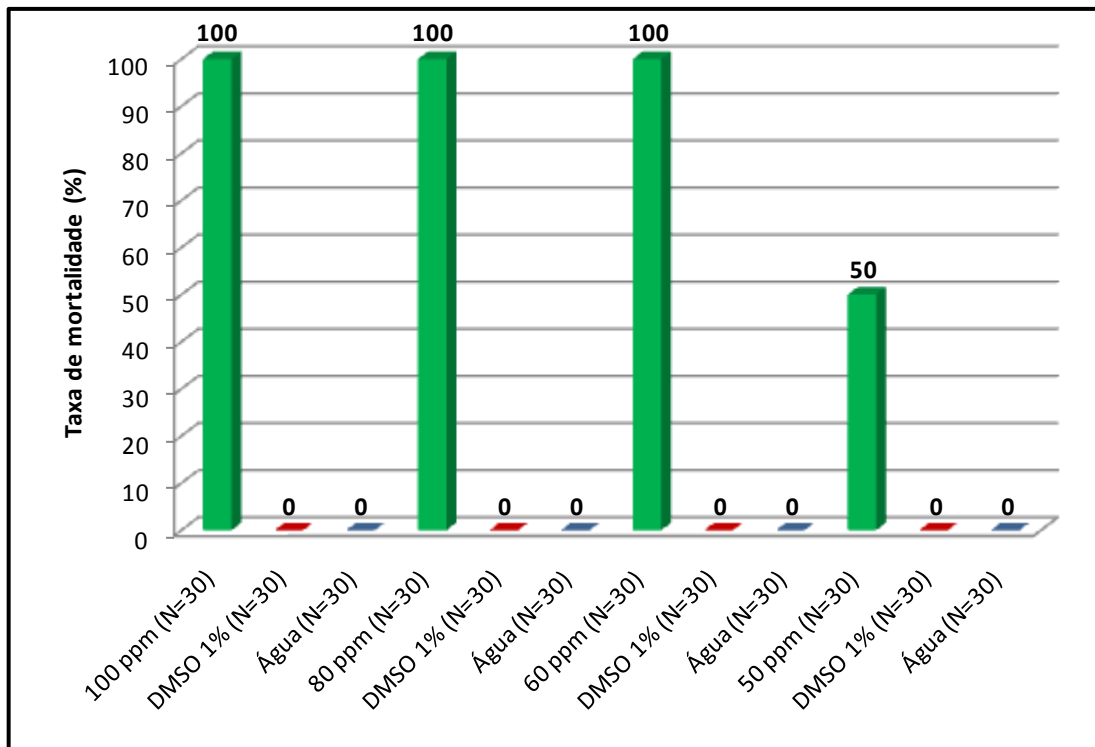
**Figura 19:** Atividade moluscicida do extrato de folhas de *Piper caldense* em *Biomphalaria glabrata*, nas concentrações de 100 ppm, 80 ppm e 50 ppm, verificada ao longo de 10 dias de observação.

O extrato de folhas de *Piper cernuum* foi testado na concentração de 100ppm (anexo 1), sendo observado 36.66 % de mortalidade após as 24 horas de exposição, ou seja ao longo dos 10 dias de observações (Figura 20).



**Figura 20:** Atividade moluscicida do extrato de folhas de *Piper cernuum* em *Biomphalaria glabrata*, na concentração de 100 ppm, observada, verificada ao longo de 10 dias de observação.

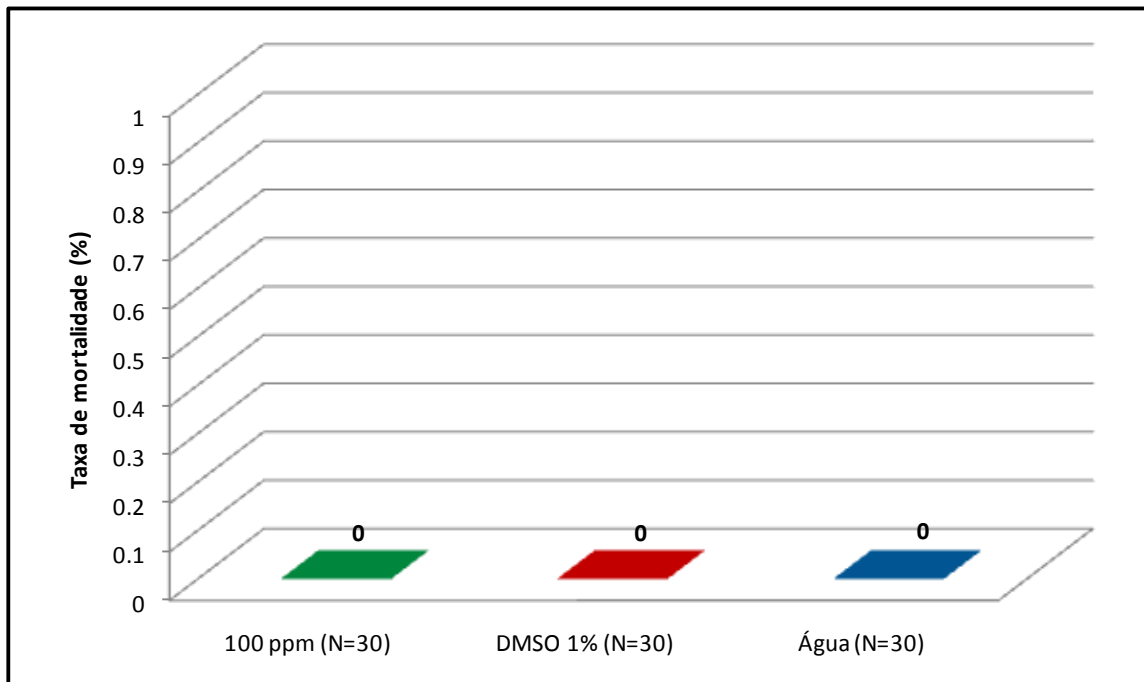
O extrato de folhas de *Peperomia trineura* foi avaliado nas concentrações de 100, 80, 60 e 50 ppm (anexo 3). Observou-se 100% de mortalidade nas concentrações de 100, 80 e 60 ppm e 50% de mortalidade na concentração de 50 ppm, durante as 24 horas de exposição (Figura 21) .



**Figura 21:** Atividade moluscicida do extrato de folhas de *Peperomia trineura* em *Biomphalaria glabrata*, nas concentrações de 100 ppm, 80 ppm, 60 ppm e 50 ppm, verificada ao longo de 10 dias de observação.

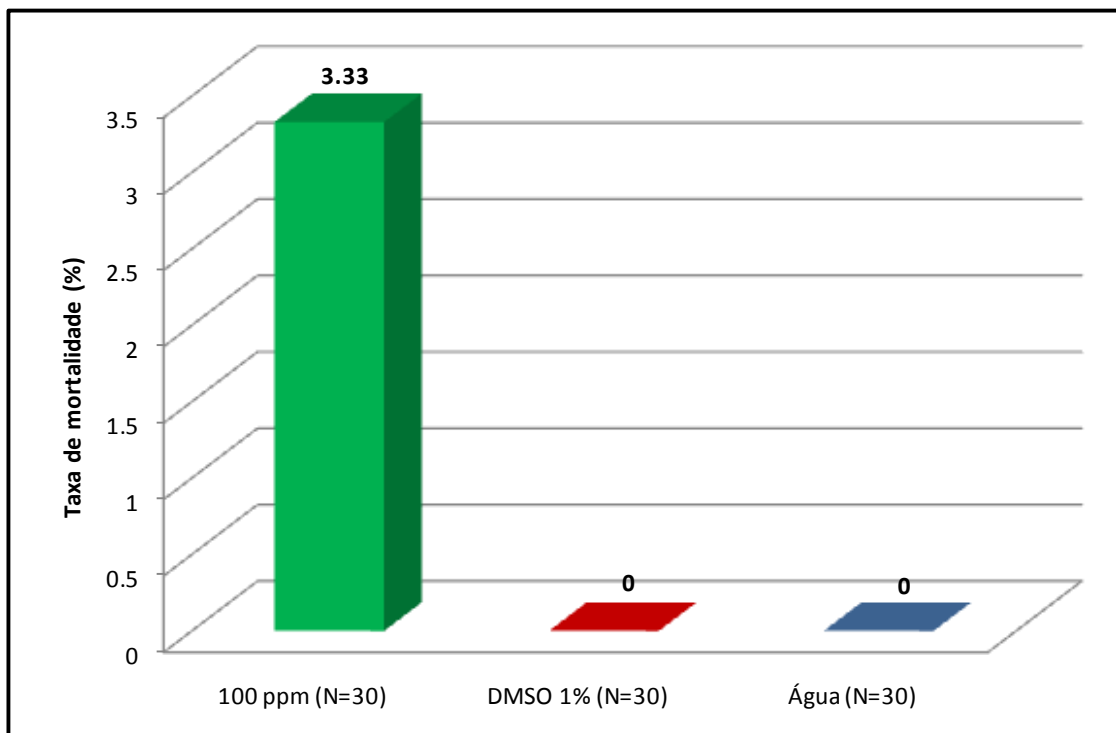
O extrato de folhas de *Peperomia rubricaulis* foi testado na concentração de 100ppm (anexo 4), não sendo observado mortalidade dos moluscos ao longo de 10 dias de observação (Figura 22).





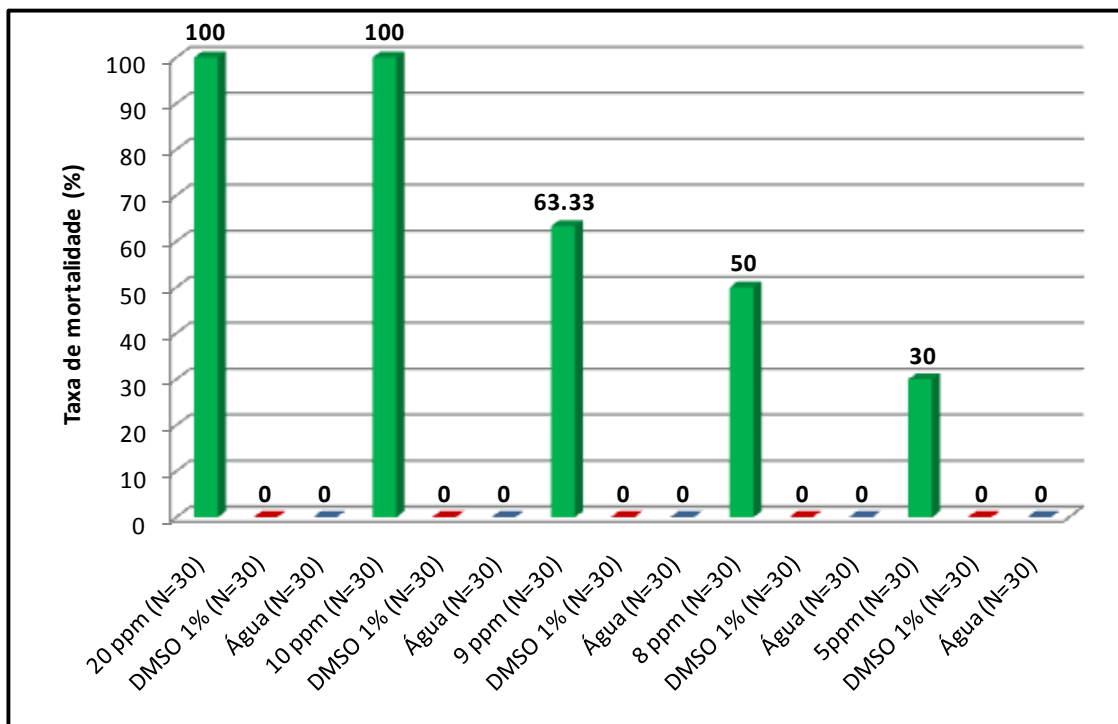
**Figura 22:** Atividade moluscicida do extrato de folhas de *Peperomia rubricaulis* em *Biomphalaria glabrata*, na concentração de 100 ppm, verificada ao longo de 10 dias de observação.

O extrato de folhas de *Peperomia blanda* foi analisado na concentração de 100 ppm (anexo 4), sendo a taxa de mortalidade de 3,33% após as 24 horas de exposição (Figura 23).



**Figura 23:** Atividade moluscicida do extrato de folhas de *Peperomia blanda* em *Biomphalaria glabrata*, na concentração de 100 ppm, verificada ao longo de 10 dias de observação.

A substância ativa, ácido caldensínico, foi testada nas concentrações 20, 10, 9, 8 e 5 ppm (anexo 5). Observou-se 100% de mortalidade dos moluscos nas concentrações de 20 e 10 ppm, 63,33% de mortalidade na concentração de 9 ppm, 50% de mortalidade na concentração de 8 ppm e 30% de mortalidade na concentração de 5 ppm, durante as 24 horas de exposição (Figura 24).

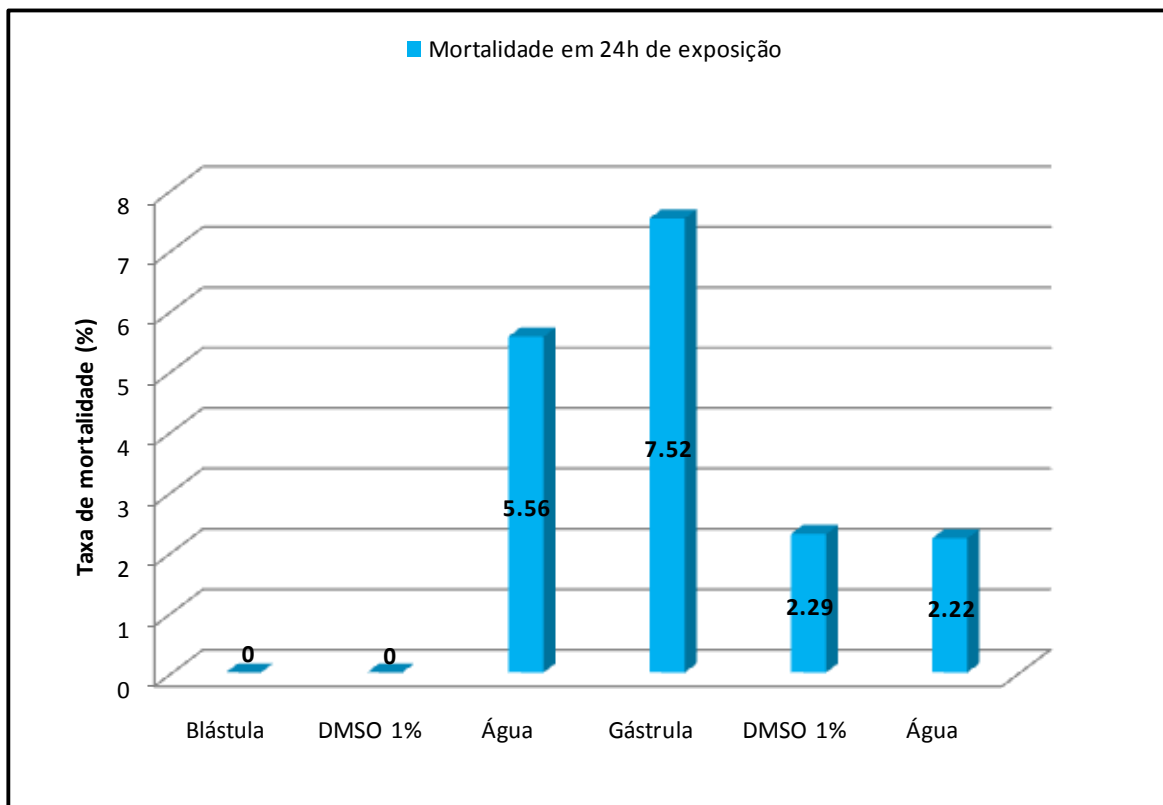


**Figura 24:** Atividade moluscicida do ácido caldensínico em *Biomphalaria glabrata*, nas concentrações de 20 ppm, 10 ppm, 9 ppm, 8 ppm e 5 ppm, verificada ao longo de 10 dias de observação.

## 4.2 Experimentos com embriões

Os embriões foram expostos aos extratos brutos *Piper cubataonum*, *Piper caldense*, *Piper cernuum*, *Peperomia trineura*, *Peperomia rubricaulis* e *Peperomia blanda* e à substância ativa ácido caldensínico, em diferentes concentrações.

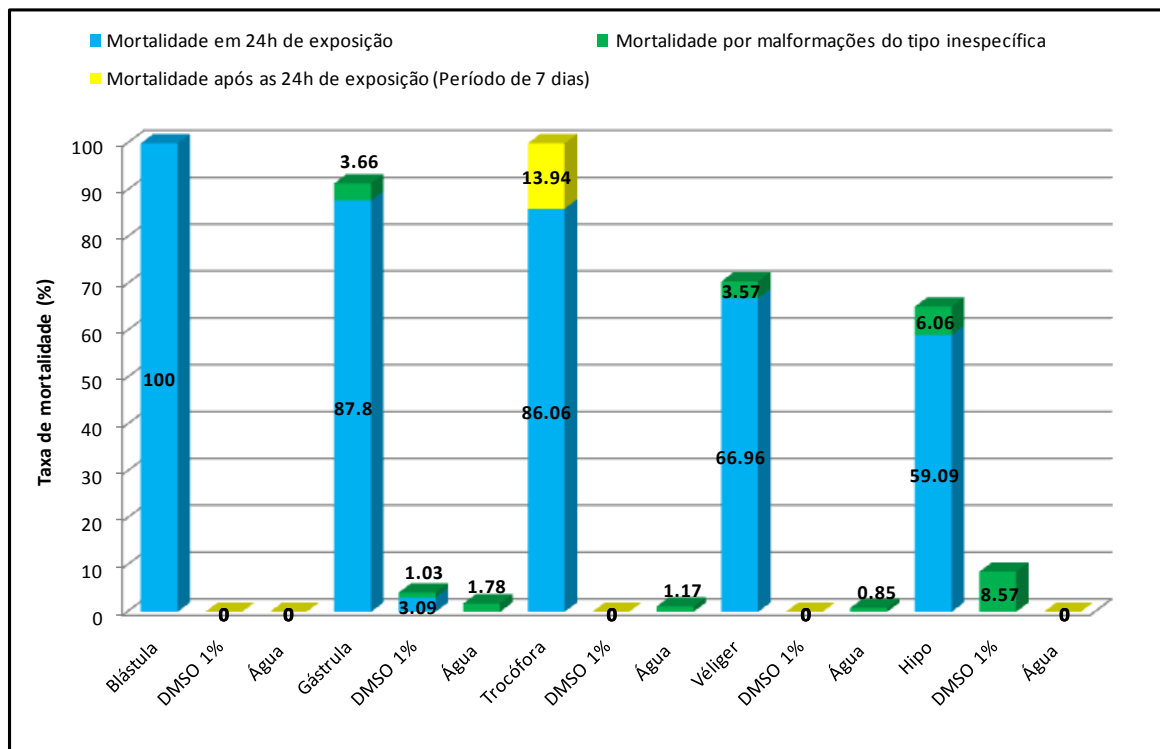
O extrato de folhas de *Piper cubataonum* na concentração de 100 ppm foi testado nos estádios embrionários de blástula e gástrula (anexo 6). Em blástula não se observou mortalidade, enquanto que no estágio de gástrula houve 7,52% de mortalidade, em 24 horas de exposição. (Figura 25). Não foram feitos testes nos demais estágios embrionários, pelo fato de não ter sido observado malformações e mortalidade significativa até o estágio gástrula, que são os estádios embrionários mais sensíveis.



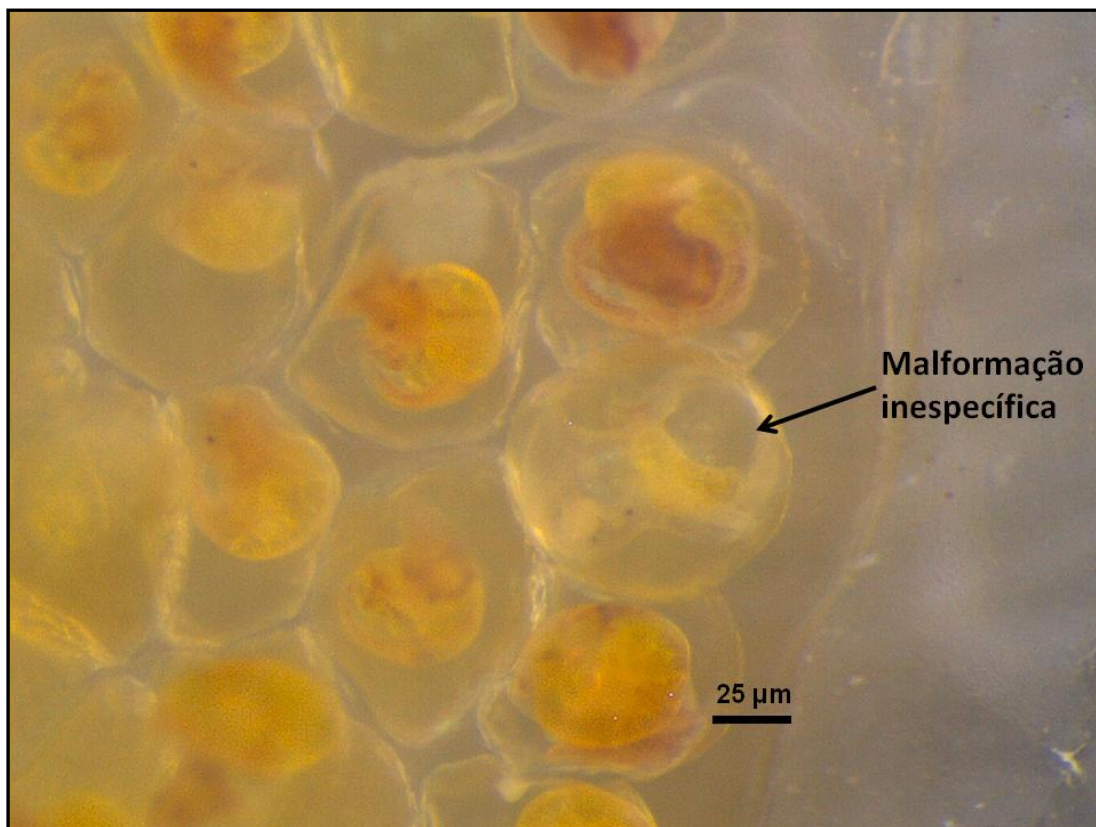
**Figura 25:** Atividade ovicida do extrato de folhas de *Piper cubataonum* a 100 ppm em embriões de *Biomphalaria glabrata*, nos estádios de blástula e gástrula.

O extrato de *Piper caldense*, na concentração de 100 ppm, foi avaliado nos estádios embrionários de blástula, gástrula, trocófora, véliger e hipo (Figura 26) (anexo 7). No estágio de blástula observou-se 100% de mortalidade nas 24 horas de exposição. Em gástrula observou-se 87,8% de mortalidade nas 24 horas de exposição e 3,65% de mortalidade, durante os sete dias de observações, devido a malformações inespecíficas, totalizando um índice de mortalidade de 91,46%. No estágio de trocófora observou-se mortalidade de 86,06% nas 24 horas de exposição. Os demais 13,94% dos embriões desenvolveram-se até o estágio de hipo, mas como não conseguiram eclodir, acabaram morrendo, totalizando 100% de mortalidade. No estágio de véliger observou-se 66,96% de mortalidade nas 24 horas de exposição e 3,57% de mortalidade devido a malformações inespecíficas, totalizando 70,53% de mortalidade até o final dos 7 dias de observações. No estágio de hipo observou-se 59,09% de mortalidade nas 24 horas de

exposição e 6,06% de mortalidade devido a malformações inespecíficas (Figura 27), totalizando, até o final das observações, índice de mortalidade de 65,15%.



**Figura 26:** Atividade ovicida de folhas de *Piper caldense* a 100 ppm em embriões de *Biomphalaria glabrata*, nos estádios de blástula, gástrula, trocófora, véliger e hipo.



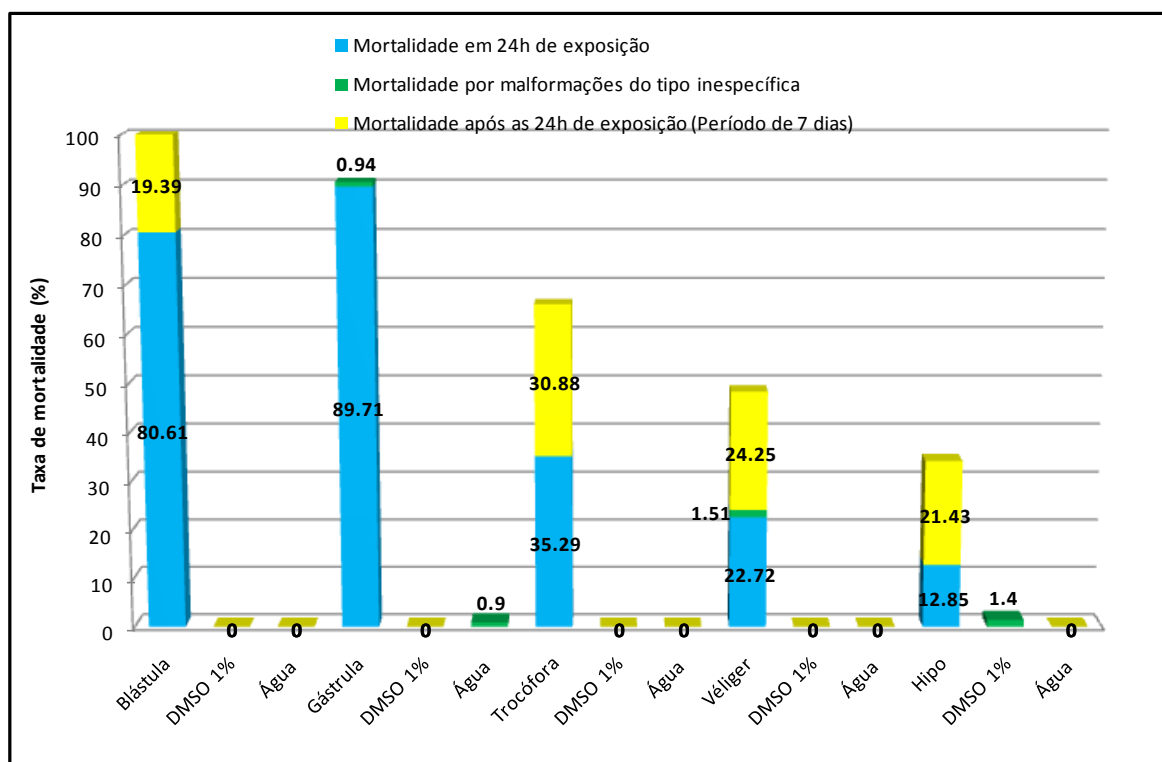
**Figura 27:** Embrião no estágio embrionário de hipo com malformação inespecífica, após exposição a 100 ppm do extrato de folhas de *Piper caldense*.

O extrato de *Piper caldense* foi testado, também à 80 ppm, nos estádios embrionários de blástula, gástrula, trocófora, véliger e hipo (Figura 28) (anexo 8).

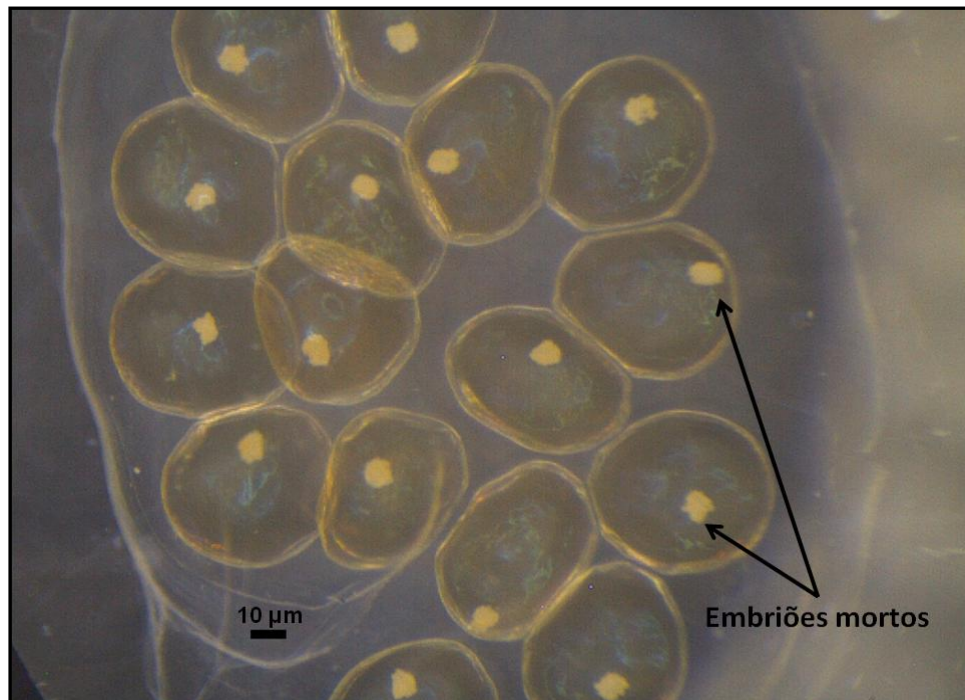
No estágio de blástula houve 100% de mortalidade (Figura 29), sendo que 80,61% dos embriões morreram durante as 24 horas de exposição e 19,39% morreram após as 24 horas de exposição, neste caso, ao longo dos sete dias de observação. Em gástrula houve 89,71% de mortalidade durante as 24 horas de exposição e 0,94% de mortalidade devido a malformações inespecíficas, totalizando 90,65% de mortalidade no decorrer dos sete dias de observação. No estágio de trocófora houve 35,29% de mortalidade nas 24 horas de exposição, sendo que até o final dos sete dias de observações a mortalidade subiu para 66,17%. Em véliger houve 22,72% de mortalidade

durante as 24 horas de exposição e 25,76% de mortalidade ao longo dos sete dias de observações, sendo que destes, 1,51% foram devido a malformações.

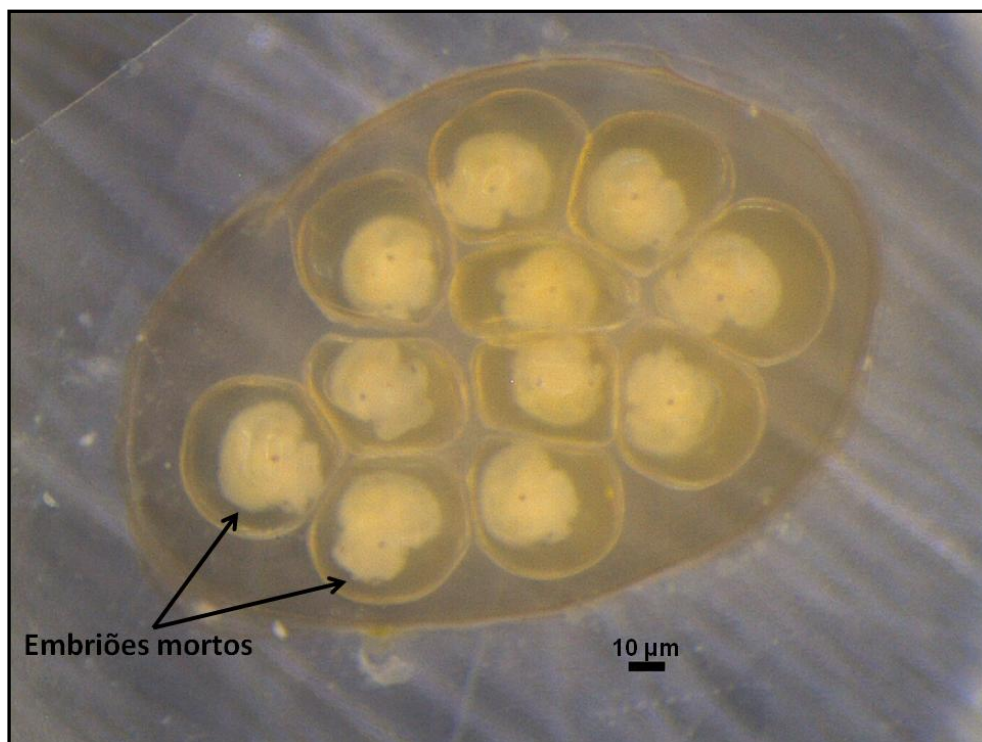
Em Hipo, 12,85% dos embriões morreram com 24 horas de exposição (Figura 30) e 21,43% ao longo dos sete dias de observações, totalizando 34,28% de taxa de mortalidade.



**Figura 28:** Atividade ovicida de folhas de *Piper caldense* a 80 ppm em embriões de *Biomphalaria glabrata*, nos estádios de blástula, gástrula, trocófora, véliger e hipo.



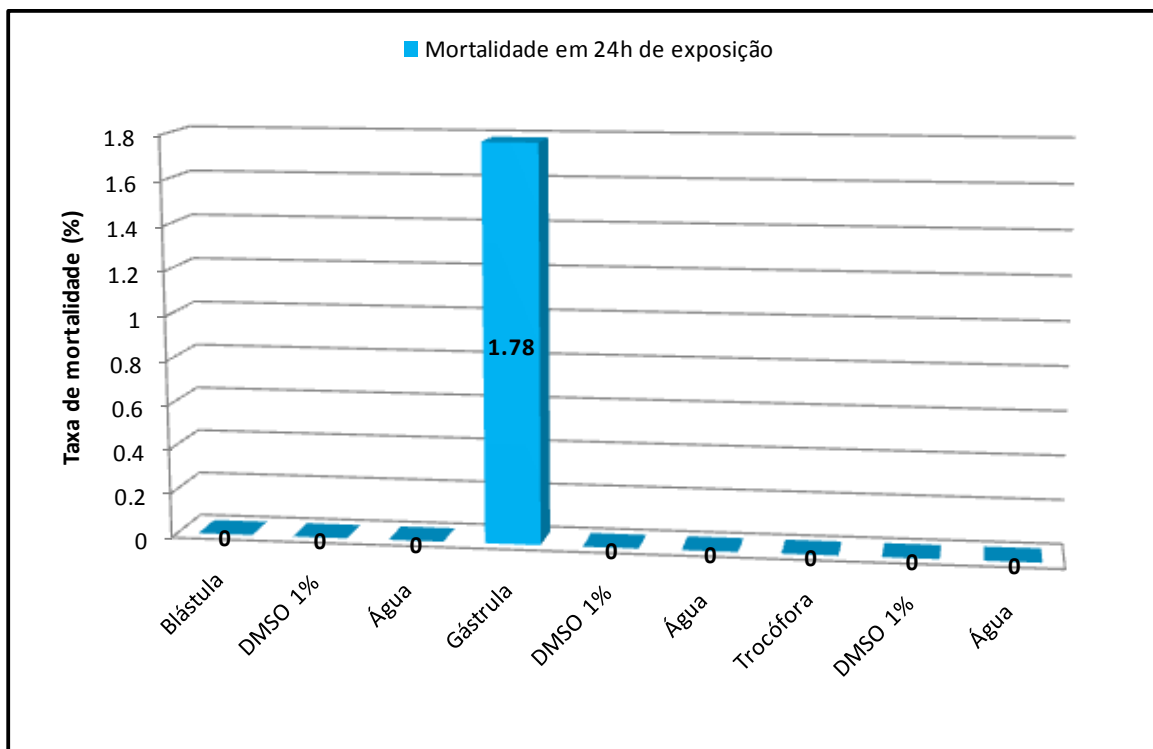
**Figura 29:** Embriões no estágio embrionário de blástula, mortos após a exposição de 80 ppm do extrato de folhas de *Piper caldense*.



**Figura 30:** Embriões no estágio embrionário de hipo mortos após exposição de 80 ppm do extrato de folhas de *Piper caldense*.



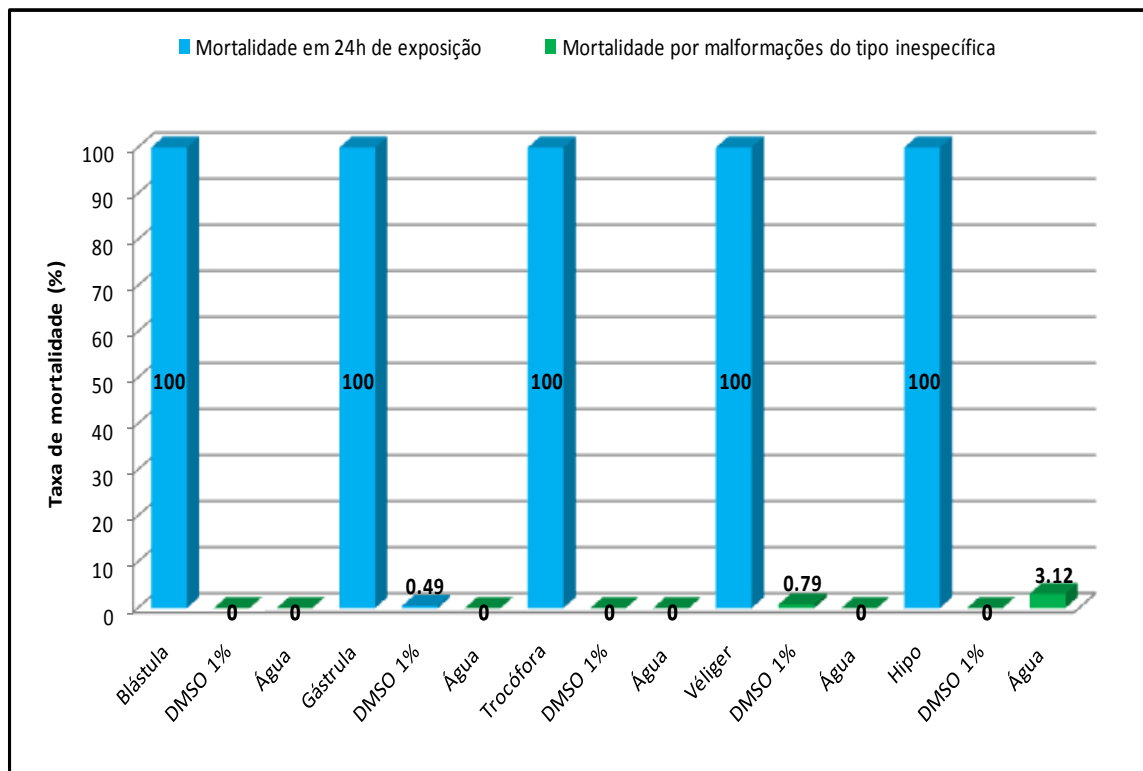
O extrato de *Piper cernuum* foi avaliado na concentração de 100 ppm nos estádios embrionários de blástula, gástrula e trocófora (anexo 9). Apenas no estágio de gástrula houve 1,78% de mortalidade durante as 24 horas de exposição (Figura 31).



**Figura 31:** Atividade ovicida de folhas de *Piper cernuum* a 100 ppm em embriões de *Biomphalaria glabrata*, nos estádios de blástula, gástrula e trocófora.

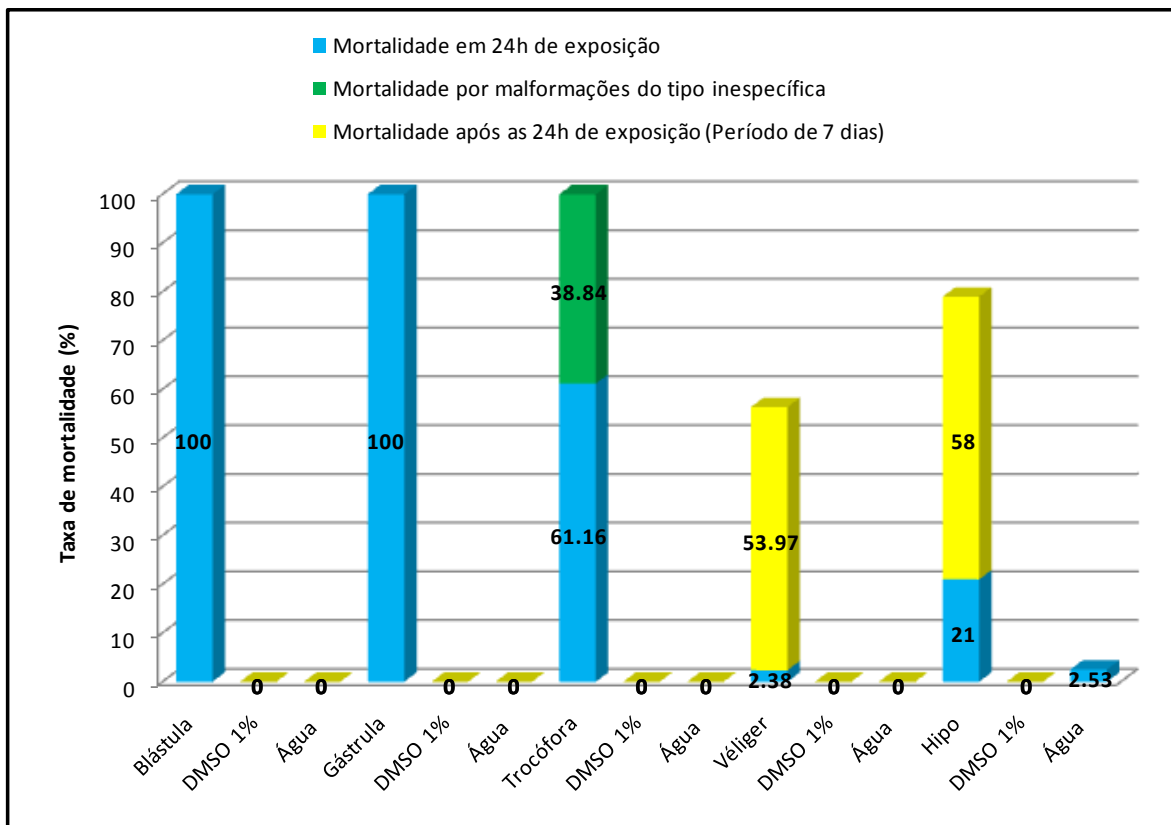
O extrato de *Peperomia trineura* foi avaliado nas concentrações de 100ppm, 95 ppm, 90 ppm, 80 ppm, 60 ppm e 50ppm.

Na concentração de 100 ppm observou-se 100% de mortalidade com 24 horas de exposição em todos os estádios embrionários (Figura 32) (anexo 10).



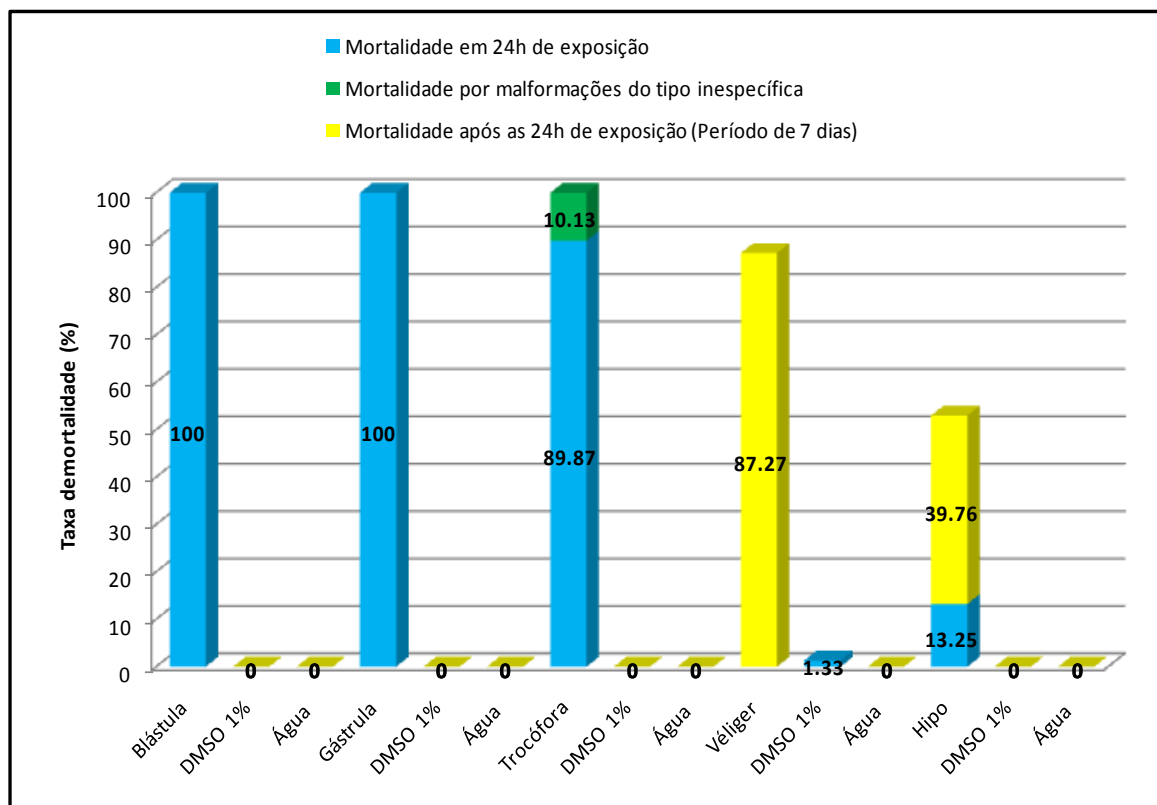
**Figura 32:** Atividade ovicida de folhas de *Peperomia trineura* a 100 ppm em embriões de *Biomphalaria glabrata*, nos estádios de blástula, gástrula, trocófora, véliger e hipo.

Na concentração de 95 ppm observou-se 100% de mortalidade nos estádios de blástula e gástrula, durante as 24 horas de observações. No estágio de trocófora houve 61,16% de mortalidade durante as 24 horas de exposição e 38,84% de mortalidade devido a malformações inespecíficas, totalizando no final dos sete dias de observações um índice de 100% de mortalidade. No estágio de véliger observou-se 2,38% de mortalidade com 24 horas de exposição e até o final dos sete dias de observações mais 53,57% de mortalidade. No estágio de hipo observou-se 21% de mortalidade com 24 horas de exposição e até o final dos sete dias de observações mais 58% de mortalidade, totalizando uma taxa de mortalidade de 79% (Figura 33) (anexo 11).



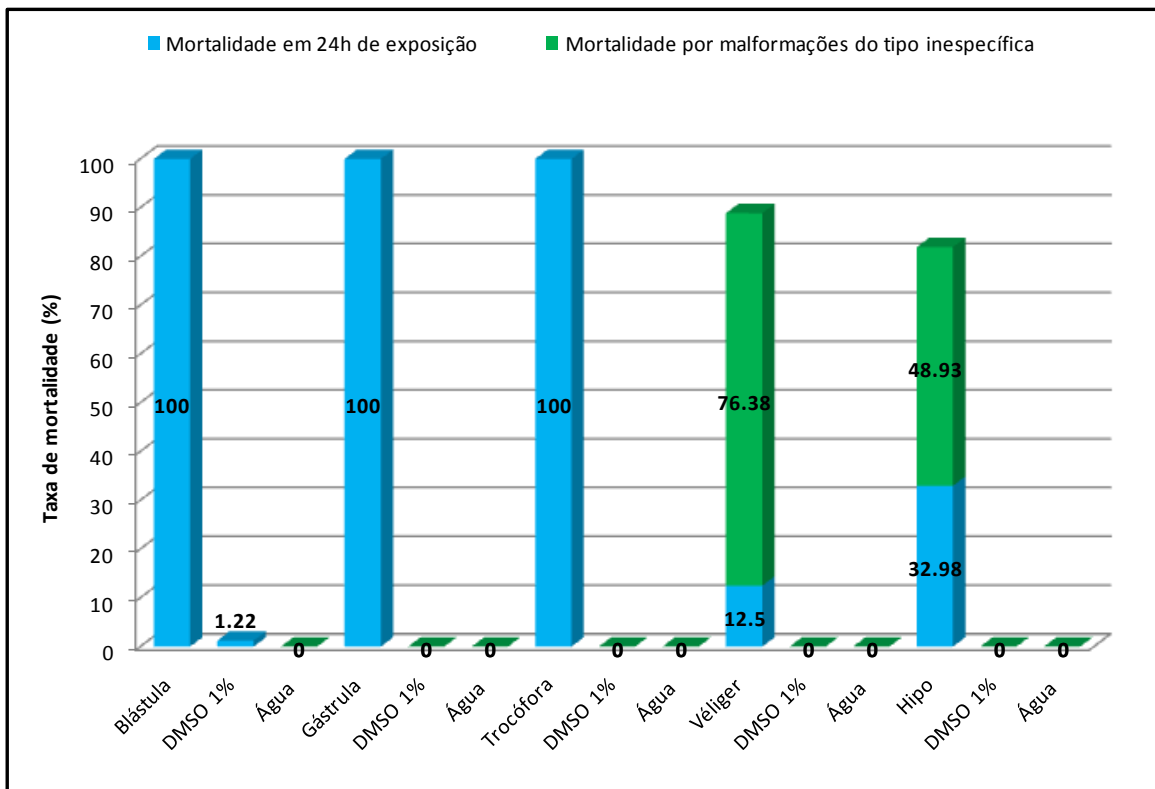
**Figura 33:** Atividade ovicida de folhas de *Peperomia trineura* a 95 ppm em embriões de *Biomphalaria glabrata*, nos estádios de blástula, gástrula, trocófora, véliger e hipo.

Na concentração de 90ppm observou-se 100% de mortalidade nos estádios de blástula e gástrula, durante as 24 horas de exposição. Em trocófora observou-se 89,87% de mortalidade com 24 horas de exposição, acrescido de mais 10,13% de mortalidade devido a malformações inespecíficas, totalizando, no final dos sete dias de observações, 100% de mortalidade. No estádio de véliger o índice de mortalidade foi de 87,27% até o final dos sete dias de observações. Em hipo observou-se 13,25% de mortalidade durante as 24 horas de exposição e 39,76% de mortalidade ao longo dos sete dias de observações, totalizando 53,01% de mortalidade (Figura 34) (anexo 12).



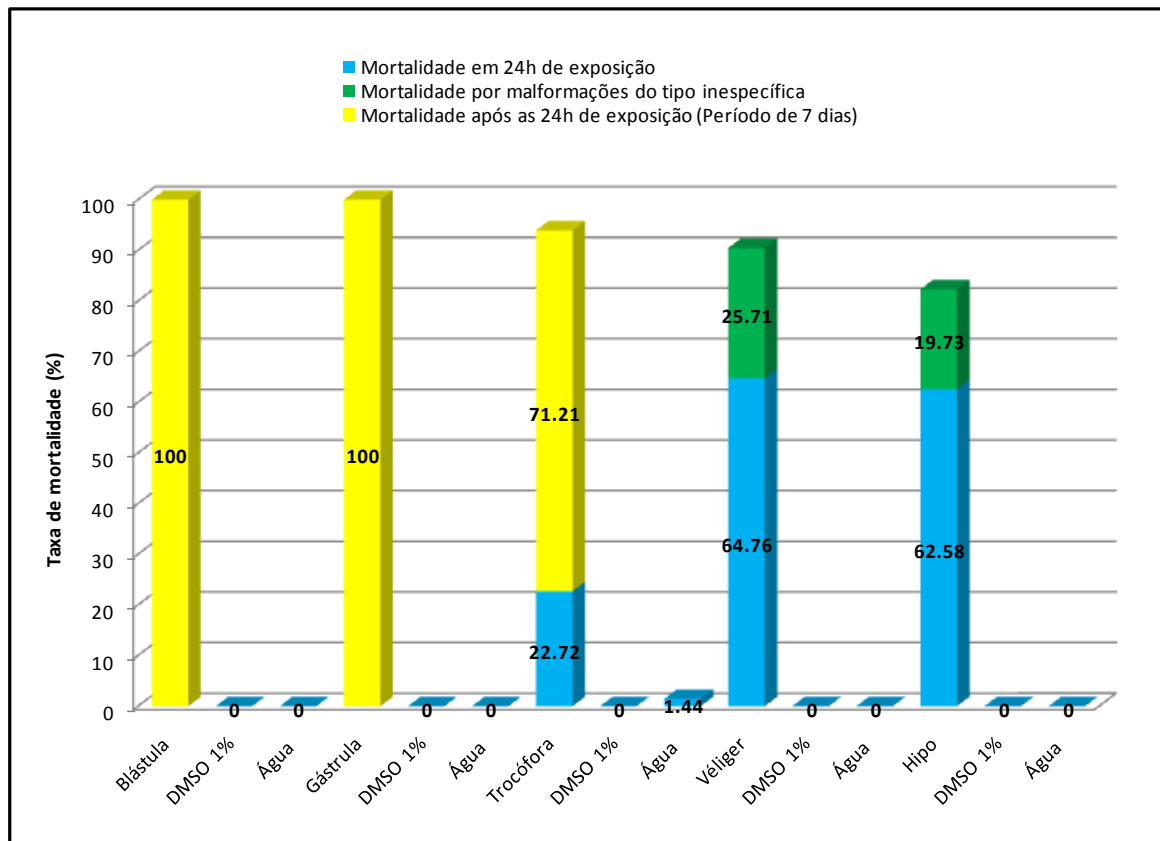
**Figura 34:** Atividade ovicida de folhas de *Peperomia trineura* a 90 ppm em embriões de *Biomphalaria glabrata*, nos estádios de blástula, gástrula, trocófora, véliger e hipo.

Na concentração de 80ppm houve mortalidade de 100% nos estádios embrionários de blástula, gástrula e trocófora durante as 24 horas de exposição. No estágio de véliger houve 12,5% de mortalidade com 24 horas de exposição e 76,38% de mortalidade devido à malformações inespecíficas, totalizando 88,88% de mortalidade. No estágio de hipo observou-se 32,98% de mortalidade com 24 horas de exposição e 48,93% de mortalidade devido à malformações inespecíficas, totalizando 81,91% de mortalidade (Figura 35) (anexo 13).



**Figura 35:** Atividade ovicida de folhas de *Peperomia trineura* a 80 ppm em embriões de *Biomphalaria glabrata*, nos estádios de blástula, gástrula, trocófora, véliger e hipo.

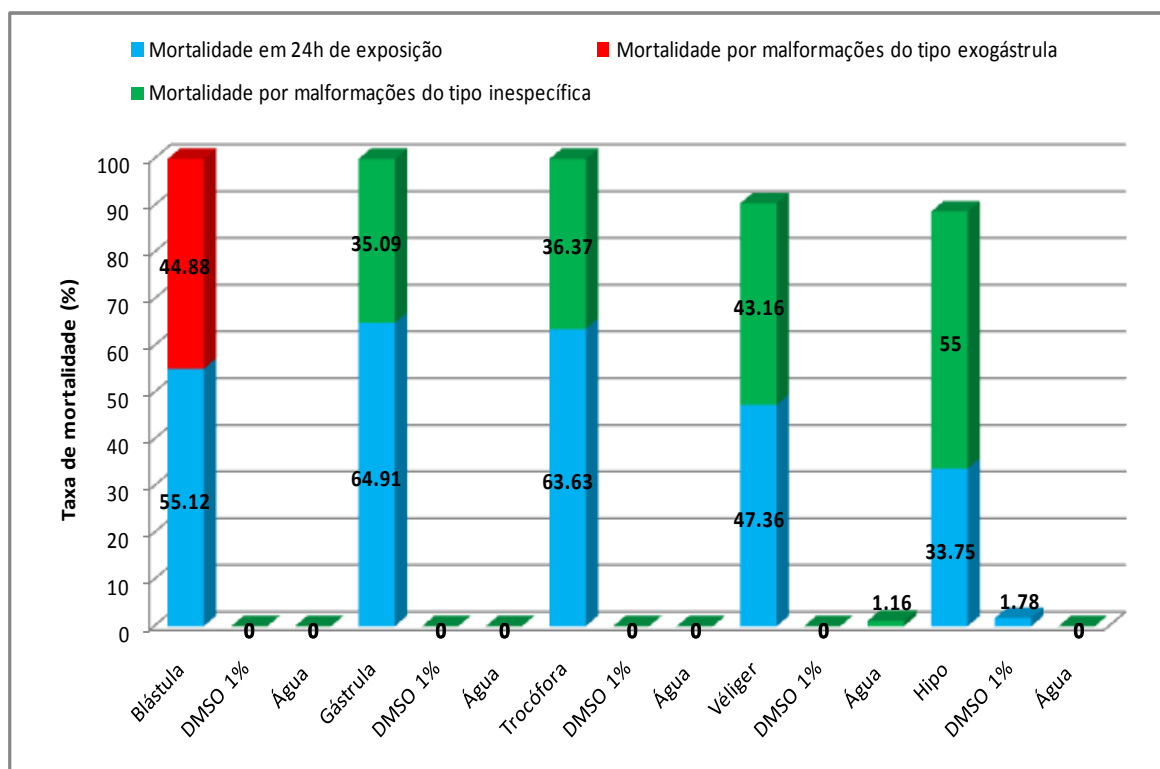
Na concentração de 60 ppm observou-se 100% de mortalidade nos estádios de blástula e gástrula, ao longo dos sete dias de observações. No estágio de trocófora houve 22,72% de mortalidade com 24 horas de exposição sendo que no final dos 7 dias de observações a mortalidade teve um acréscimo de 71,21%, totalizando 93,93% de mortalidade. No estágio de véliger observou-se 64,76% de mortalidade durante as 24 horas de exposição e 25,71% de mortalidade em decorrência de malformações inespecíficas, totalizando 90,47% de mortalidade. No estágio de hipo observou-se 62,58% de mortalidade com 24 horas de exposição e 19,73% de mortalidade em decorrência de malformações inespecíficas, totalizando até o final das observações 82,31% de mortalidade (Figura 36) (anexo 14).



**Figura 36:** Atividade ovicida de folhas de *Peperomia trineura* a 60 ppm em embriões de *Biomphalaria glabrata*, nos estádios de blástula, gástrula, trocófora, véliger e hipo.

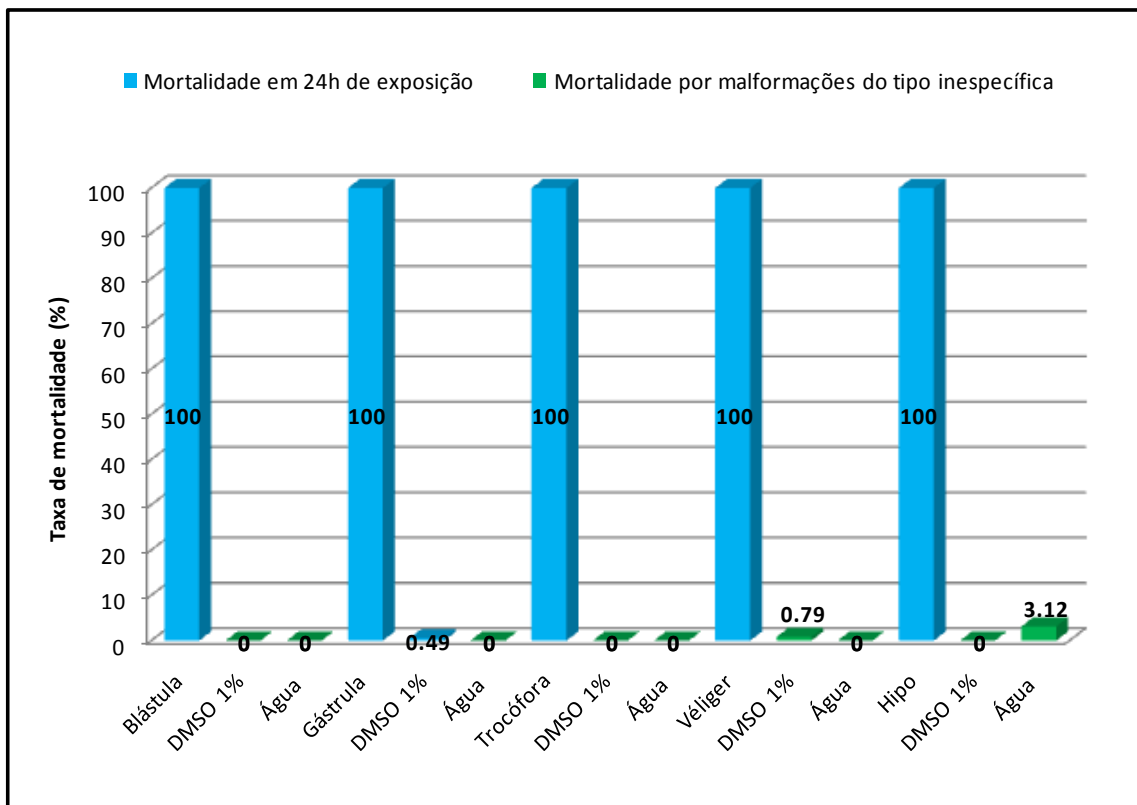
Na concentração de 50 ppm o estágio de blástula apresentou 55,12% de mortalidade em 24 horas de exposição e 44,88% de mortos em decorrência de malformações do tipo exogástrula, sendo 100% o índice de mortalidade. No estágio de gástrula o índice de mortalidade durante as 24 horas de exposição foi de 64,91%, neste mesmo estágio observou-se 35,09% de malformações inespecíficas, que acarretaram no final das observações, índice de 100% de mortalidade. No estágio de trocófora houve 63,63% de mortalidade durante as 24 horas de exposição e 36,37% de mortalidade em decorrência de malformações inespecíficas, totalizando 100% de mortalidade. No estágio de véliger observou-se 47,36% de mortalidade durante as 24 horas de exposição e 43,15% de mortalidade em decorrência de malformações inespecíficas, totalizando um índice de

90,52% de mortalidade. No estágio de hipo, houve 37,75% de mortalidade com 24 horas de exposição e 55% de mortalidade em decorrência de malformações inespecíficas, totalizando 88,75% de mortalidade (Figura 37) (anexo 15).



**Figura 37:** Atividade ovicida de folhas de *Peperomia trineura* a 50 ppm em embriões de *Biomphalaria glabrata*, nos estádios de blástula, gástrula, trocófora, véliger e hipo.

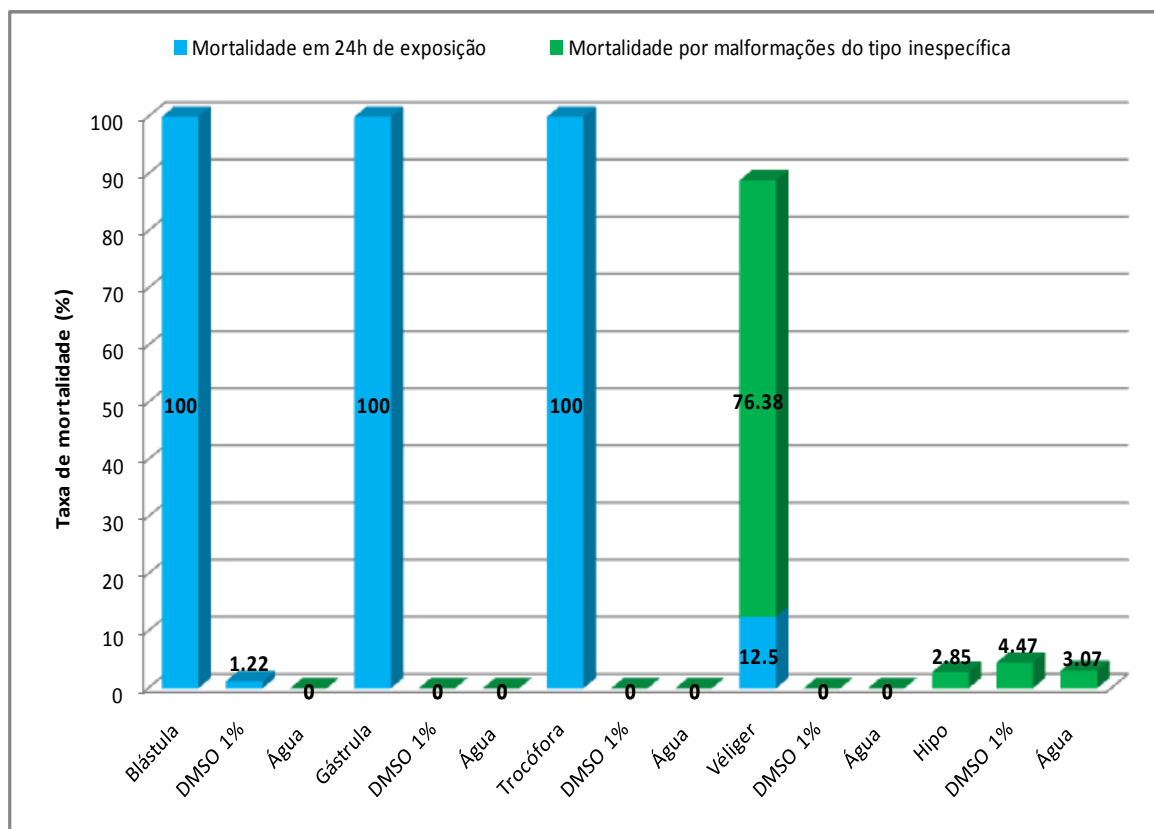
O extrato de *Peperomia rubricaulis* foi avaliado nas concentrações de 100, 80, 70 e 60 ppm. Na concentração de 100 ppm observou-se 100% de mortalidades nos cinco estádios embrionários, durante as 24 horas de exposição (Figura 38) (anexo 16).



**Figura 38:** Atividade ovicida de folhas de *Peperomia rubricaulis* a 100 ppm em embriões de *Biomphalaria glabrata*, nos estádios de blástula, gástrula, trocófora, véliger e hipo.

Nos estádios embrionários de blástula, gástrula e trocófora exposto à 80 ppm, observou-se 100% de mortalidade durante as 24 horas de exposição. No estádio de véliger houve 12,5% de mortalidade durante as 24 horas de exposição e 76,38% de mortalidade em decorrência a malformações inespecíficas, sendo que ao final dos sete dias de observações, a mortalidade alcançou 88,88%. No estádio de hipo o índice de mortalidade foi de apenas 2,85% devido à malformações inespecíficas (Figura 39) (anexo 17).

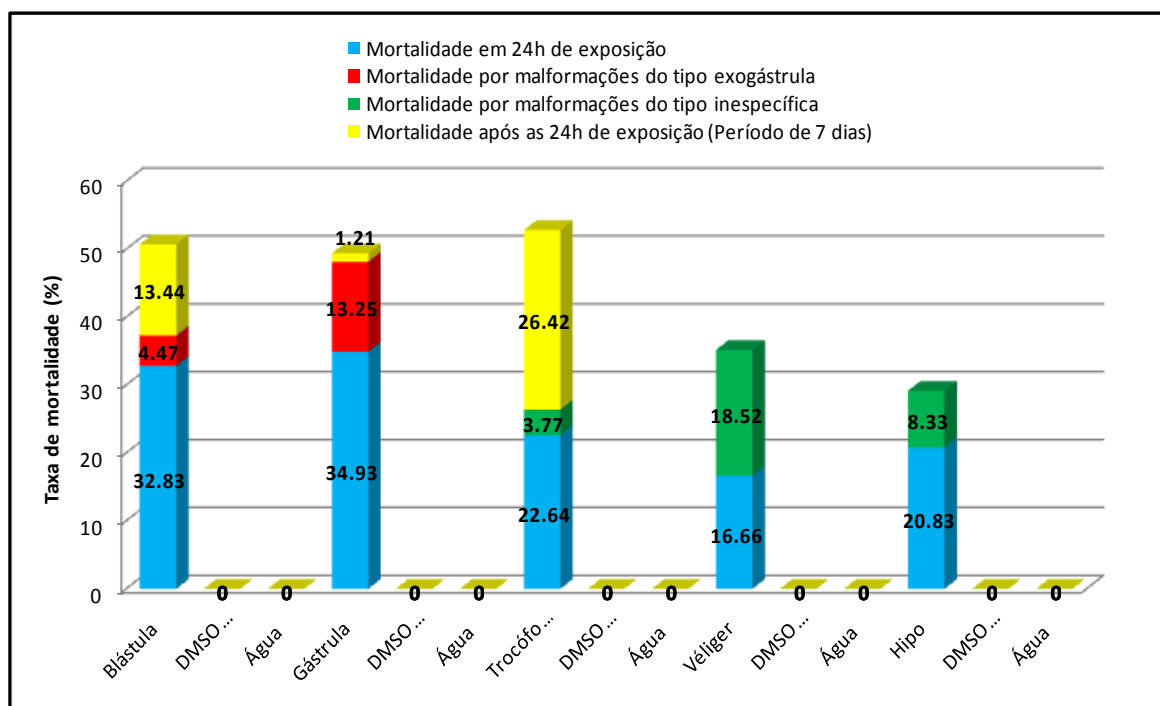




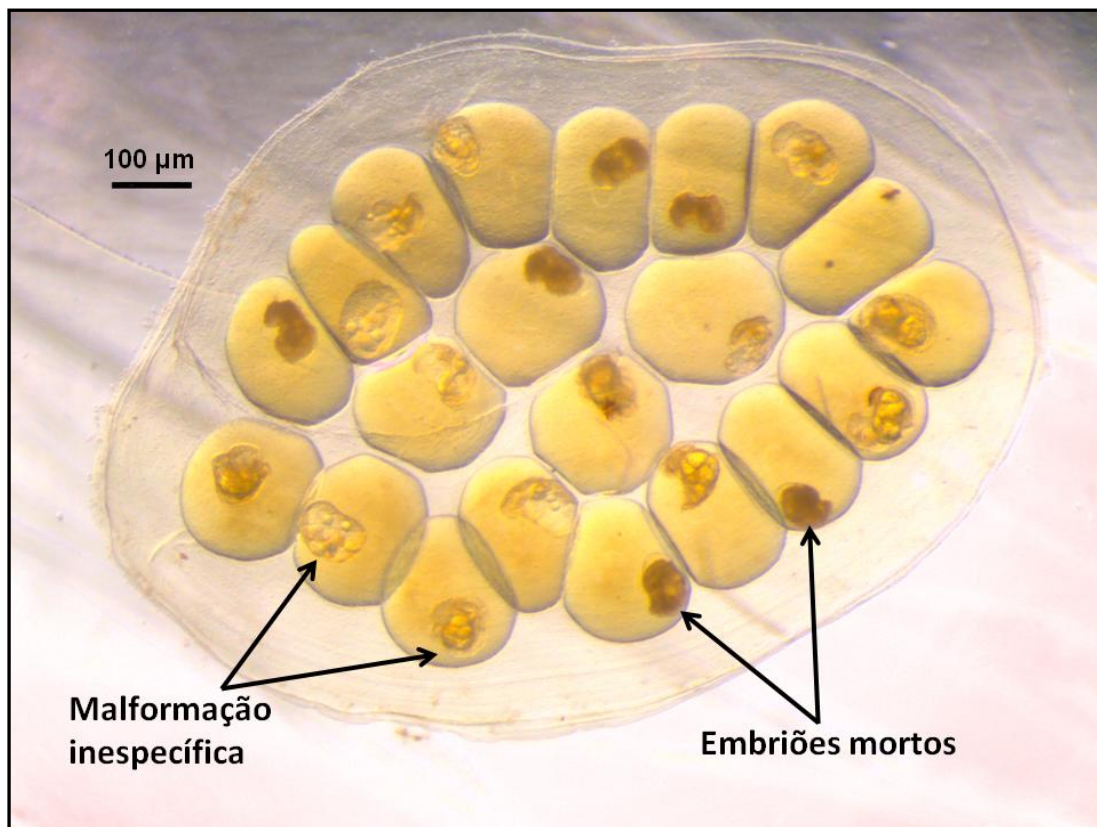
**Figura 39:** Atividade ovicida de folhas de *Peperomia rubricaulis* a 80 ppm em embriões de *Biomphalaria glabrata*, nos estádios de blástula, gástrula, trocófora, véliger e hipo.

Na concentração de 70 ppm observou-se que no estágio de blástula houve 32,83% de mortalidade com 24 horas de exposição, 4,47% de mortalidade em decorrência de malformações do tipo exogástrula e 13,44% de mortalidade até o final das observações, totalizando 50,74% de mortalidade. Em gástrula observou-se índice de mortalidade de 34,93% com 24 horas de exposição, 13,25% de mortalidade em decorrência de malformações do tipo exogástrula e 1,21% de mortalidade até o final dos sete dias de observações, totalizando no final do período 49,39% de mortos. No estágio de trocófora observou-se 34,93% de mortalidade durante as 24 horas de exposição e 3,77% de mortalidade em função de malformações inespecíficas. Neste estágio, ao final dos sete dias de observações, a taxa de mortalidade teve um acréscimo de 26,42%, totalizando um índice de

52,83%. Em véliger, verificou-se mortalidade de 16,66% com 24 horas de exposição e de 18,52% devido às malformações inespecíficas, totalizando 35,18% de mortos (Figura 41). Em Hipo observou-se 20,83% de mortalidade com 24 horas de exposição e 8,33% de mortos devido à malformações inespecíficas (Figura 40) (anexo 18).

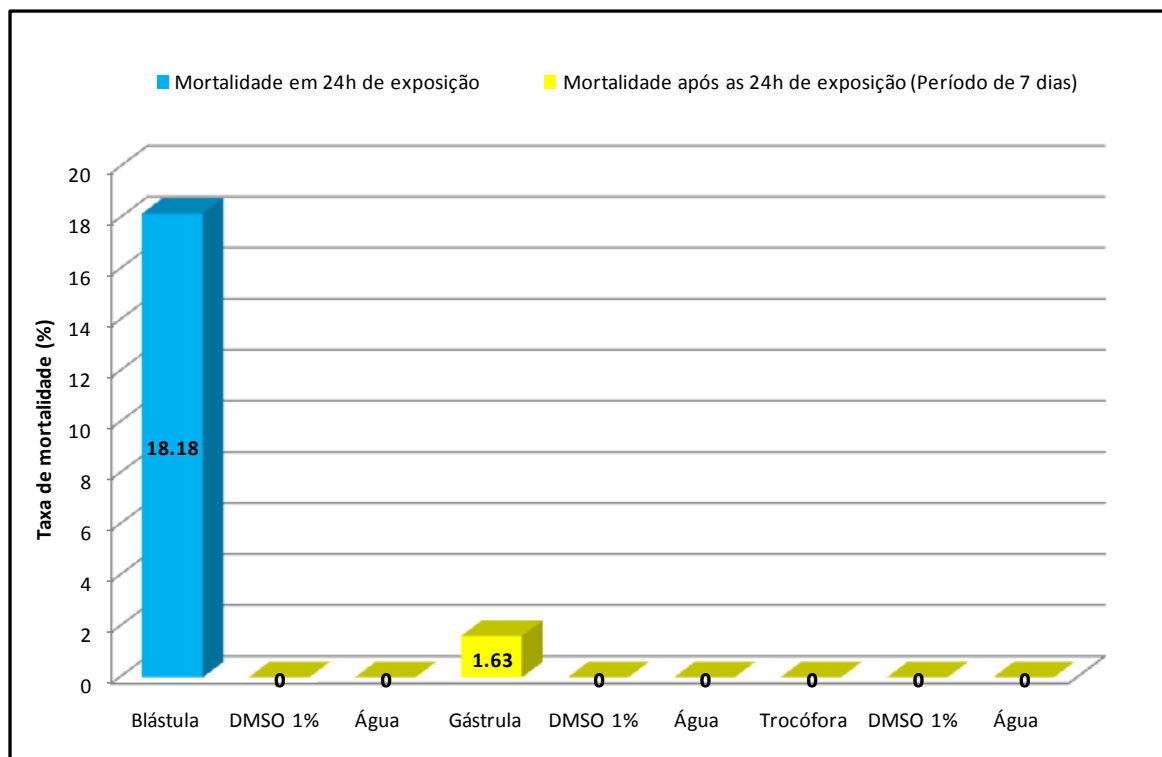


**Figura 40:** Atividade ovicida de folhas de *Peperomia rubricaulis* a 70 ppm em embriões de *Biomphalaria glabrata*, nos estádios de blástula, gástrula, trocófora, véliger e hipo.



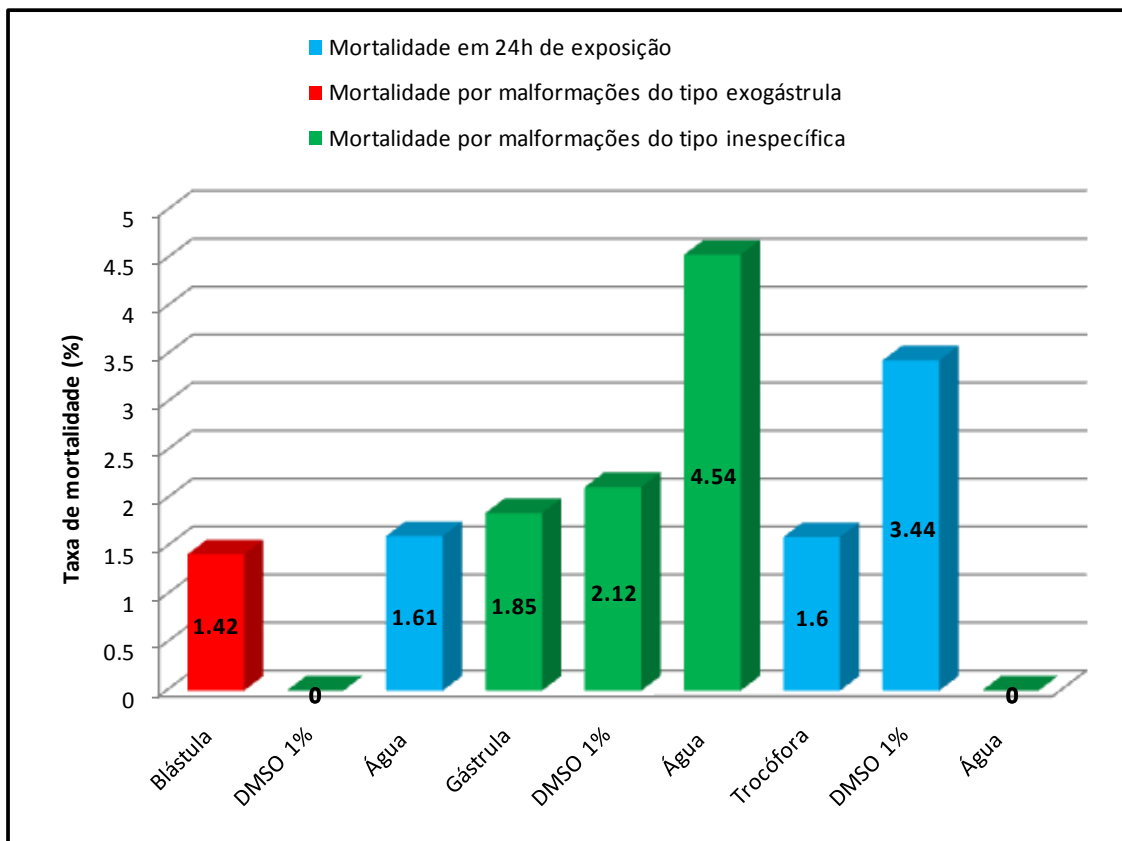
**Figura 41:** Embriões mortos e com malformações inespecíficas no estágio de véliger, devido à exposição pelo extrato de folhas de *Peperomia rubricaulis*, na concentração de 70 ppm.

Na concentração de 60 ppm observou-se, no estágio de blástula, 18,18% de mortalidade durante as 24 horas de exposição, mantendo o mesmo índice até o final das observações. No estágio de gástrula houve apenas 1,63% de mortalidade durante todo o período observado. Em trocófora não se observou mortalidade até o final das observações (Figura 42) (anexo 19). Em virtude do baixo índice de mortalidade nos estádios iniciais, não foram realizados exposições nos estádios de véliger e hipo.



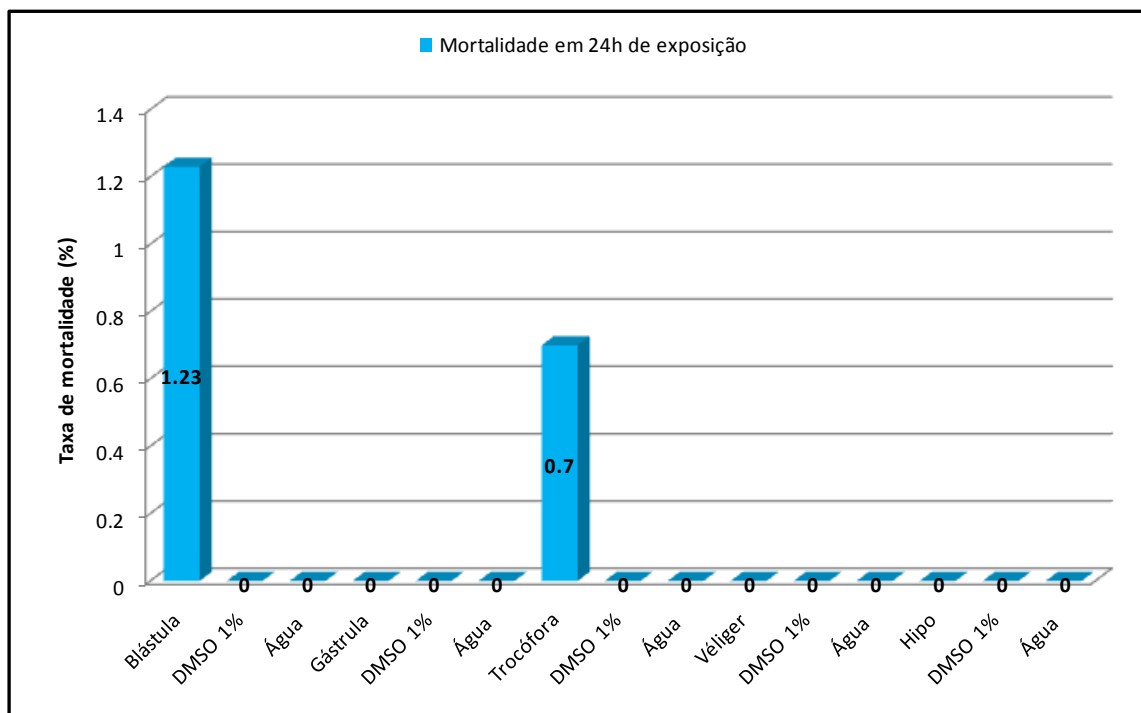
**Figura 42:** Atividade ovicida de folhas de *Peperomia rubricaulis* a 60 ppm em embriões de *Biomphalaria glabrata*, nos estádios de blástula, gástrula e trocófora.

O extrato de *Peperomia blanda* foi avaliado na concentração de 100 ppm, nos estádios embrionários de blástula, gástrula e trocófora. Em blástula observamos 1,42% de mortalidade devido às malformações do tipo exogástrula. No estágio de gástrula observou-se 1,85% de índice de mortalidade devido a malformações inespecíficas. Em trocófora houve mortalidade de 1,6% durante as 24 horas de exposição (Figura 43) (anexo 20). Não foram realizados testes nos demais estádios embrionários, já que os estádios de blástula, gástrula e trocófora apresentaram baixos índices de mortalidade.



**Figura 43:** Atividade ovicida de folhas de *Peperomia blanda* a 100 ppm em embriões de *Biomphalaria glabrata*, nos estádios de blástula, gástrula e trocófora.

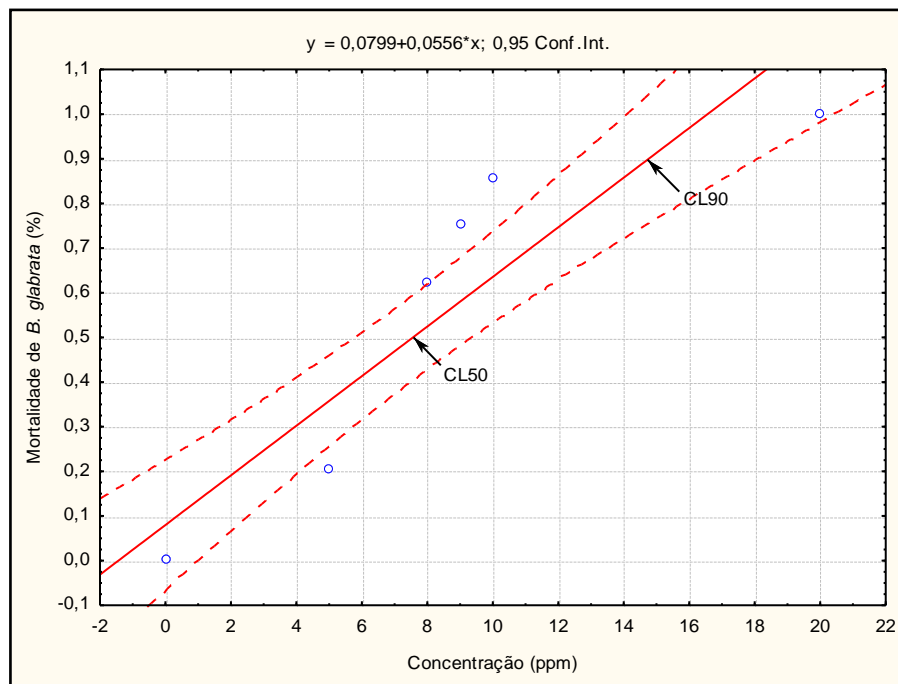
O ácido caldensínico foi avaliado na concentração de 20 ppm nos estádios embrionários de blástula, gástrula, trocófora, véliger e hipo. Observou-se mortalidade de 1,23% e 0,7%, apenas em blástula e trocófora, respectivamente. (Figura 44) (anexo 21).



**Figura 44:** Atividade ovicida da substância ativa ácido caldensínico, a 20 ppm em embriões de *Biomphalaria glabrata*, nos estádios de blástula, gástrula, trocófora, véliger e hipo.

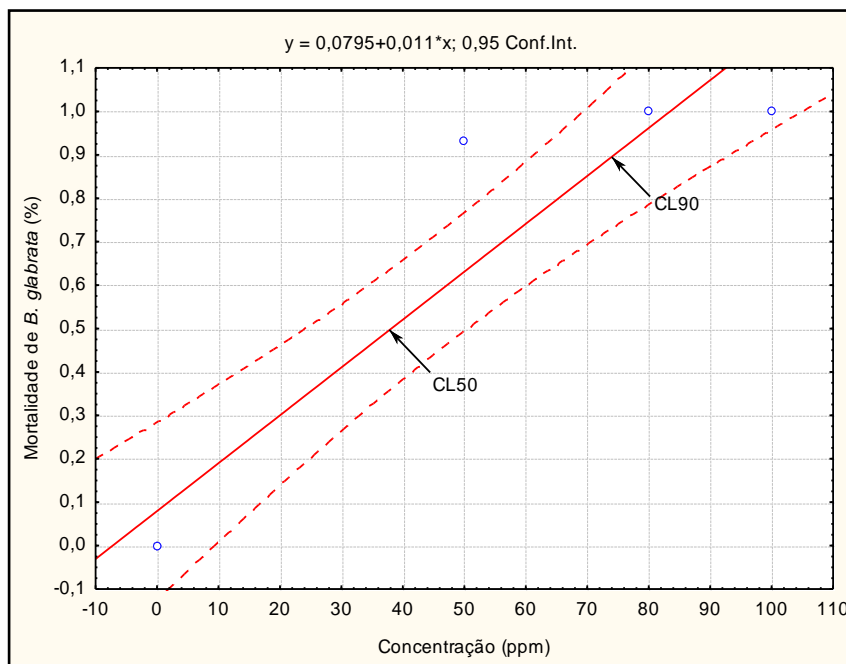
#### 4.3 Obtenções de CL50 e CL90 para adultos de *Biomphalaria glabrata*

A análise de probito que mostra o efeito de diferentes concentrações de ácido caldensínico sobre o percentual de mortalidade de adultos de *B. glabrata* pode ser visto na figura 45, bem como a equação do modelo de regressão que permite prever o percentual de mortos (valor de y) de adultos de *B. glabrata* quando submetidos a diferentes concentrações de ácido caldensínico (valor de x). A análise mostrou que a concentração de ácido caldensínico capaz de causar a mortalidade de 50% (CL50) da população de *B. glabrata* foi de 7,54 ppm com intervalo de confiança de 95% [5,97 – 9,17] ppm. Os resultados também mostraram que é necessário uma concentração maior para causar a mortalidade de 90% (CL90) de *B. glabrata*. Esta concentração foi de 13,62 ppm com intervalo de confiança de 95% [11,33 – 15,92] ppm.



**Figura 45:** Concentração letal (ppm) do ácido caldensínico contra percentual de mortalidade de *Biomphalaria glabrata*.

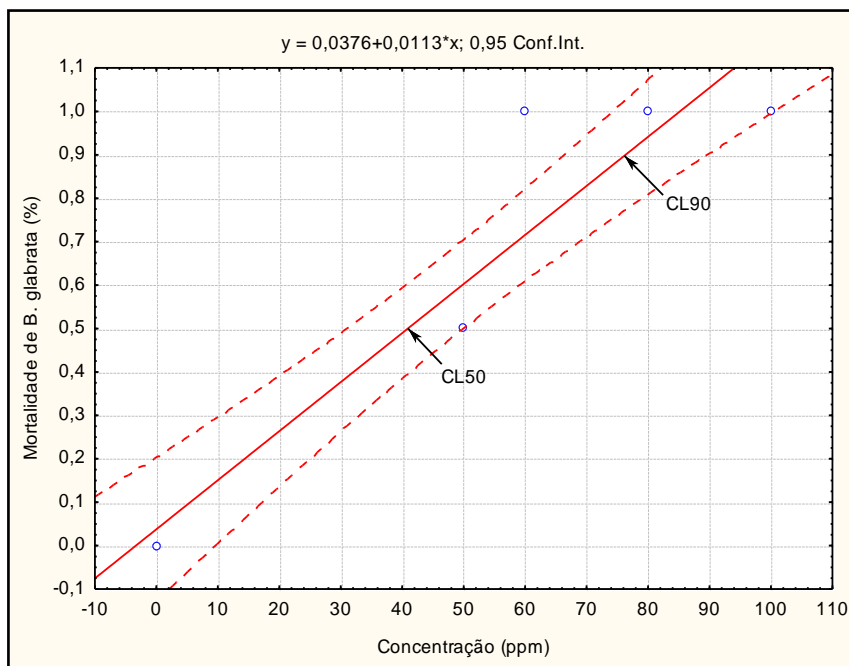
Na figura 46 observa-se o efeito de diferentes concentrações de *P. caldense*, sobre os adultos de *B. glabrata*, causando a mortalidade dos mesmos. Os resultados da análise de probito, mostraram que as concentrações letais, com intervalo de 95%, para causar a mortalidade de 50% da população (CL50) para este extrato foi de 39,09 ppm [27,35 – 50,83] ppm e a CL90 foi de 70,99 ppm [57,19 – 84,79] ppm. Da mesma forma a equação da reta poderá ser utilizada para previsões de mortalidade de *B. glabrata* causada por diferentes concentrações de *P. caldense*.



**Figura 46:** Concentração letal (ppm) de *Piper caldense* contra percentual de mortalidade de *Biomphalaria glabrata*.

Quanto ao extrato de *P. trineura* verificou-se que a CL50 foi de 41,70 ppm com intervalo de confiança de 95% de [33,01 – 50,38] ppm e a CL90 foi de 73,43 ppm com intervalo de confiança de 95% de [62,99 – 83,87] ppm (Figura 47). Observa-se que valores maiores da concentração do extrato foram necessários para matar os mesmos percentuais da população comparados ao extrato de *P. caldense*.





**Figura 47:** Concentração letal (ppm) de *Peperomia trineura* contra percentual de mortalidade de *Biomphalaria glabrata*.

#### 4.4 Associação entre mortos e sobreviventes de adultos de *Biomphalaria glabrata* expostos aos extratos de Piperaceae

Os resultados mostram os moluscos adultos de *B. glabrata* submetidos a diferentes concentrações de extratos de plantas da família Piperaceae e a substância ativa representada pelo ácido caldensínico.

Na tabela 1 observa-se um número maior de mortos de adultos de *B. glabrata* comparado ao número de sobreviventes, quando submetidos a concentrações decrescentes do ácido caldensínico. A ocorrência crescente de sobreviventes foi observada a partir da concentração de 9 ppm. Nas concentrações de 20 ppm e 10 ppm a mortalidade foi total. A análise de qui-quadrado revelou que a diferença entre mortos e sobreviventes submetidos a concentrações decrescentes de ácido caldensínico foi significativa ( $X^2$  obs. =53.5; gl=4;  $p < 0.0001$ ).

**Tabela 1: Distribuição dos mortos e sobreviventes de adultos de *Biomphalaria glabrata* submetidos a substância ativa, ácido caldensínico.**

Concentrações	Mortos		Sobreviventes		Total
	Nº	%	Nº	%	
20 ppm	30	29.1	0	0	30
10 ppm	30	29.1	0	0	30
9 ppm	19	18.4	11	23.4	30
8 ppm	15	14.6	15	31.9	30
5 ppm	9	8.7	21	44.7	30
Total	103	100.0	47	100.0	150
X <sup>2</sup> obs = 53.841			X <sup>2</sup> crit. (4g.l) =9.488	(α = 0,05)	

A análise de resíduos mostrou que o excesso de ocorrências de mortes de *B. glabrata* nas concentrações de 20 e 10 ppm ( $Z_{res} = 4.1366$ ) e conseqüentemente a falta de sobreviventes nestas concentrações ( $Z_{res} = -4.1366$ ), bem como, a falta de mortes na concentração de 5 ppm ( $Z_{res} = -5.1048$ ) e conseqüentemente o excesso de sobreviventes nesta concentração ( $Z_{res} = 5.1048$ ), contribuíram com o valor muito significativo da análise de qui-quadrado.

Não foi possível a utilização da mesma análise de qui-quadrado nas comparações de mortos e sobreviventes submetidos as diferentes concentrações dos extratos de plantas, visto que, 100% dos adultos morreram ou sobreviveram quando submetidos a diferentes concentrações, como por exemplo, 100% de mortalidade foram registradas nas concentrações de 100, 80 e 60 ppm de *P. trineura* e em 100 e 80 ppm de *P. caldense*, como também foram observadas 100% de sobrevivência nas concentrações de 100 ppm de *P. cubataonum* e *P. rubricaulis*. Faz exceção a comparação de mortos e sobreviventes de *B. glabrata* submetidos a diferentes extratos na mesma concentração de 50 ppm (tabela 2). Nesta observa-se que a mortalidade de *B. glabrata* é maior quando submetidas a concentração de 50 ppm de *Piper caldense* comparada a mortalidade quando submetida a mesma concentração de *Peperomia trineura*. Este último extrato matou apenas 34.1% da população de *B. glabrata* comparado

ao extrato de *P. caldense* que matou 65.9% das bionfalárias. A sobrevivência de *B. glabrata* foi muito maior quando submetida a *P. trineura* (93.8%) do que quando submetida a *P. caldense* (6.3%). A Análise de qui-quadrado mostrou que essa diferença foi estatisticamente significativa ( $X^2$  obs. =16.7; gl=1;  $p<0.0001$ ).

**Tabela 2: Distribuição dos mortos e sobreviventes de adultos de *Biomphalaria glabrata* submetidos a *Piper caldense* e *Peperomia trineura* a 50 ppm.**

Extratos 50 ppm	Mortos		Sobreviventes		Total
	Nº	%	Nº	%	
<i>Piper caldense</i>	29	65.9	1	6.2	30
<i>Peperomia trineura</i>	15	34.1	15	93.8	30
Total	44	100.0	16	100.0	60
$X^2$ obs = 16.705			$X^2$ crit. (1g.l) = 3.841		( $\alpha = 0,05$ )

Como não foi possível avaliar a mortalidade e a sobrevivências nos demais extratos de Piperaceae em moluscos adultos de *B. glabrata*, optou-se então, por analisar as variáveis, número de mortos e as concentrações dos extratos por meio de regressão linear simples.

#### **4.5 Efeito de diferentes concentrações de extratos de Piperaceae sob a população adulta de *Biomphalaria glabrata*.**

Na análise do modelo dos números de mortos de adultos de *B. glabrata* em função das concentrações de extrato de *P. trineura* verificou-se que o modelo foi adequado, visto que o coeficiente de regressão ( $\beta_1$ ) é diferente de zero com  $p<0,05$ . A regressão explicou 45% ( $R^2=0,45$ ) da variabilidade do número de mortos de *B. glabrata* ( $y$ ) em relação a sua média. Quanto ao resíduo à média foi igual a zero ( $p=0.2746$ ) (Figura 48).

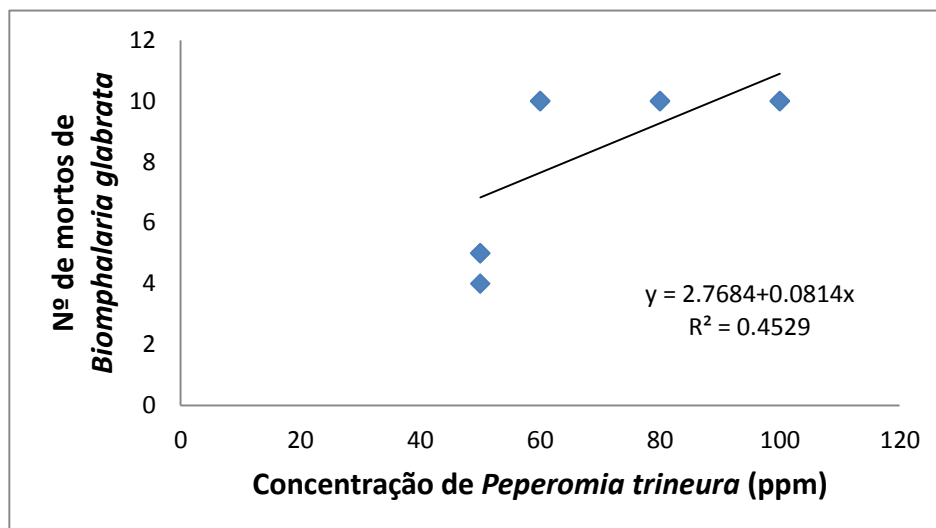
Equação estimada da reta:  $Y=2.7684+0.0814x$

Indica que um aumento de 10 ppm na concentração de *P.trineura* aumenta em 0.0814 o número de mortos de *B.glabrata*. Na concentração de 50 ppm do extrato morrem 6.8384 indivíduos e 100% de mortalidade ocorre a partir de 60 ppm.

Estatística de Fisher e Snedecor:  $F=8.2785$ ;  $p=0.0159$  ( $p<0,05$ )

Coeficiente de correlação:  $r=0,6730$

Coeficiente de determinação:  $R^2=0.4529$



**Figura 48:** Mortalidade de *Biomphalaria glabrata* em função da concentração do extrato de *Peperomia trineura*.

Analisando o modelo da mortalidade de *B. glabrata* em função da concentração do ácido caldensínico verificou-se que o modelo foi adequado, já que  $\beta_1$  foi diferente de zero e  $p=0.0009$ . A regressão explicou 60% ( $R^2=0.60$ ) da variabilidade de números de mortes de *B. glabrata* ( $y$ ) em relação a sua média. Quanto ao resíduo a média foi igual a zero, porém o  $p=0.02$ , considerou-se de tendência normal por ter se analisado trinta

indivíduos de *B. glabrata* neste experimento, o que viabilizou esta análise (Figura 49).

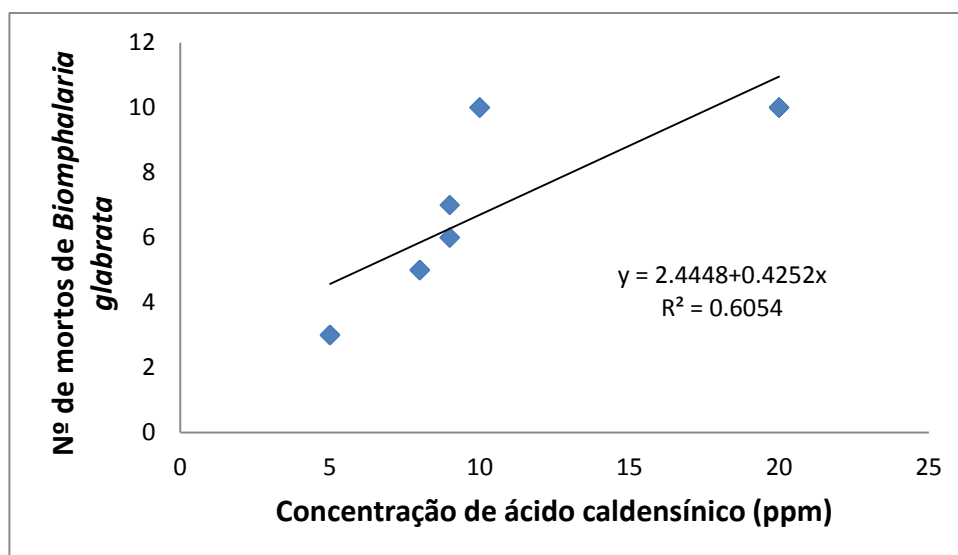
Equação estimada da reta:  $Y=2.4448+0.4252x$

A cada 1ppm da concentração de ácido caldensínico aumenta em 0,4252 o número de mortos de *B. glabrata*. Nas concentrações de 5ppm, 8ppm e 9ppm do ácido caldensínico tendem a morrer 4.5708, 5.8464, 6.2716 indivíduos para cada experimento respectivamente. A mortalidade foi de 100% a partir de 10ppm.

Estatística de Fisher e Snedecor:  $F=19.9482$ ;  $p=0.0009$  ( $p<0,05$ )

Coefficiente de correlação:  $r=0.7781$

Coefficiente de determinação:  $r^2=0.6054$



**Figura 49:** Mortalidade de *Biomphalaria glabrata* em função da concentração do ácido caldensínico.

Analisando-se o modelo do número de mortes de *B. glabrata* em função das concentrações de *P. caldense* verificou-se que a regressão

explicou apenas 21% ( $R^2=0.21$ ) da variabilidade de números de mortos de *B.glabrata* (y) em relação a sua média. A função concentração não se explicou pelo modelo. O coeficiente de regressão  $\beta_1$  ficou muito próximo de zero com  $p>0.05$ , indicando que o modelo é inadequado; o efeito da variação da concentração da variável x sobre a variável y não foi considerado adequado. A partir de 50 ppm verificou-se alta mortalidade, que se manteve constante nas concentrações subseqüentes, 80ppm e 100ppm mostrando que o extrato é eficiente.

Equação estimada da reta:  $Y=9.3509+0.0070x$

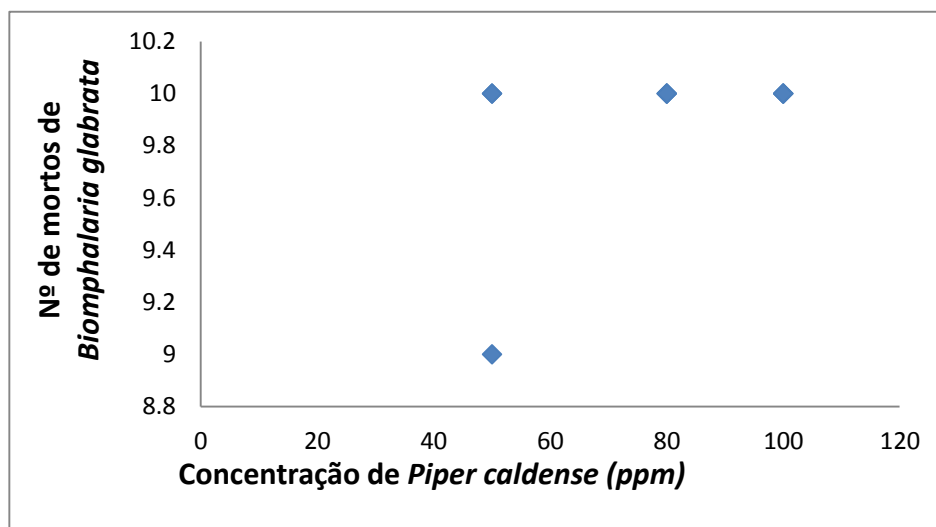
A cada aumento de 10ppm aumenta apenas 0,07 mortos de *B. glabrata*. Resultando em um modelo não significativo como mostra a estatística abaixo.

Estatística de Fisher e Snedecor:  $F=1.8667$ ;  $p=0,2128$  ( $p>0,05$ )

Coefficiente de correlação:  $r=0.4588$

Coefficiente de determinação:  $R^2=0.2105$

Da análise de regressão para mortalidade *B. glabrata* em função da concentração de *P. caldense* obteve-se o coeficiente de correlação de Pearson ( $r=0.45$ ) indicando que existe 45% de correlação positiva entre as duas variáveis (Figura 50).

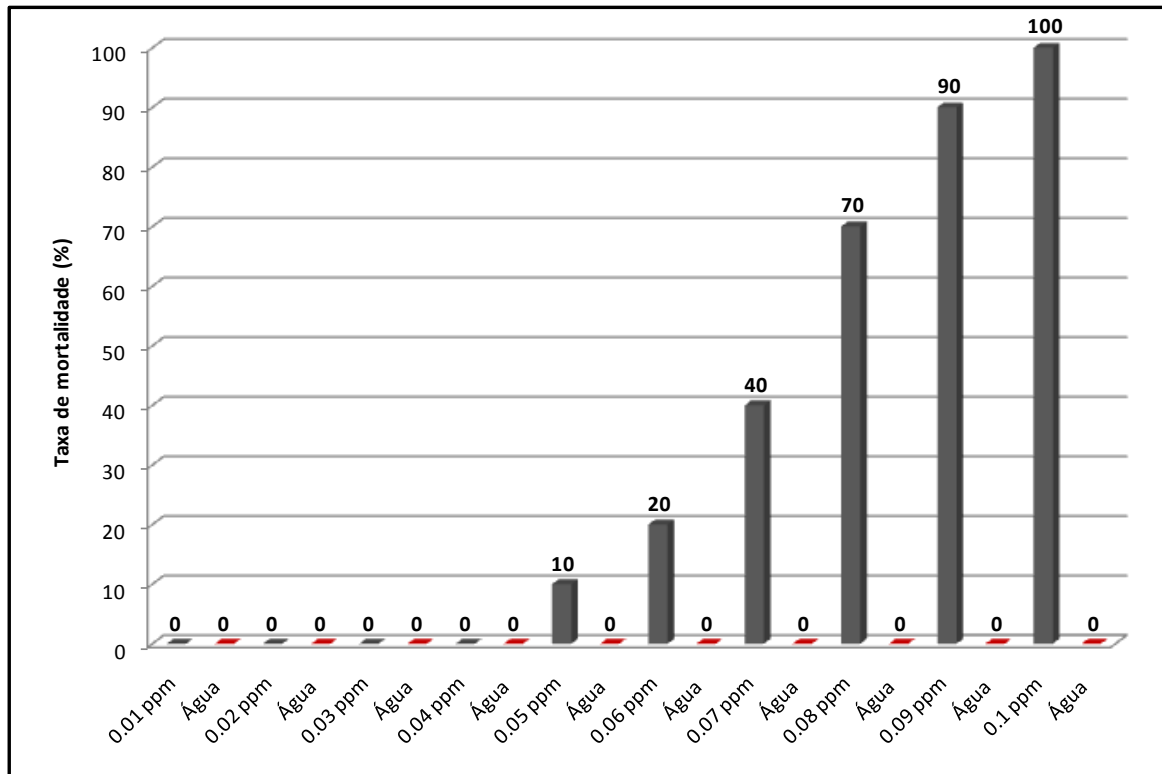


**Figura 50:** Correlação entre a mortalidade de *Biomphalaria glabrata* em função da concentração do extrato de *Piper caldense*.

#### 4.6 Suscetibilidade da população de *Biomphalaria glabrata* pelo Bayluscide WP70<sup>®</sup>

A população de moluscos estudada é proveniente do Laboratório de Malacologia do Instituto Butantan e, vem sendo mantida desde 1982. Para testar a sua suscetibilidade foram realizados testes com Bayluscide WP70<sup>®</sup> nas concentrações de 0,01 ppm a 0,1 ppm em moluscos adultos e nos estádios embrionários de *B. glabrata*.

Na figura 51 observamos a atividade moluscicida de Bayluscide nas concentrações de 0,01 a 0,1 ppm. Nas concentrações de 0,01 ppm a 0,04 ppm não se observa mortalidade. Em 0,05 ppm houve 10% de mortalidade, em 0,06 ppm houve 20% de mortalidade, em 0,07 ppm houve 40% de mortalidade, em 0,08 ppm, 0,09 ppm e 0,1 ppm houve 100% de mortalidade (Figura 51) (anexo 22).



**Figura 51:** Atividade moluscicida de bayluscide nas concentrações de 0,01 ppm a 0,1 ppm, observada no período de 10 dias, em moluscos adultos de *Biomphalaria glabrata*.



## 5. Discussão

O Controle das populações dos caramujos do gênero *Biomphalaria* é extremamente importante para a saúde pública, visto serem moluscos hospedeiros intermediários do *S. mansoni* e responsáveis pela eliminação da forma larval do parasita infectante para o homem.

A profilaxia da esquistossomose é o conjunto de medidas que envolvem saneamento básico, educação sanitária, tratamento de indivíduos infectados e o controle dos caramujos hospedeiros intermediários do parasita, que pode ser feito pelo uso de moluscidas químicos ou de origem vegetal. Os moluscidas químicos não são indicados por serem tóxicos, não apenas para as bionfálarias, mas também para outros organismos, causando inúmeros prejuízos ao meio ambiente. Além disso, as bionfálarias dispõem de mecanismos de escape quando as condições do ambiente se tornam desfavoráveis. Em condições adversas do ambiente, os caramujos tendem a sair da água ou enterram-se no substrato para se protegerem, como por exemplo, quando em contato com os moluscidas químicos. Nestes casos, são necessárias várias aplicações do moluscida químico, tornando o controle muito complexo e dispendioso (Chitsulo et al., 2000; Coura e Amaral, 2004; Engels, 2002).

A busca por alternativas no controle das bionfálarias, que não agrida o ambiente e outros organismos, cresceu muito nestes anos. Os estudos de plantas com ação moluscicida vêm desde 1933, com os trabalhos de Archibald (1933), Jurberg (1987) e Kloos e McCullough (1981), o que permitiu o uso de extratos de plantas em programas de controle de caramujos. Estes autores mostram que plantas de regiões onde a esquistossomose ocorre de forma endêmica, por serem abundantes na região, tornam baixo o custo do controle dos caramujos.

Dentre as plantas de maior interesse estão às pertencentes à família Piperaceae, que tem sido bastante pesquisada com relação ao seu efeito tóxico. A família é típica de regiões tropicais e subtropicais, sendo muito

utilizada na medicina (*Piper sarmentosum* e *Piper methysticum* são utilizados como sedativo) e alimentação (*Piper nigrum* – pimenta-do-reino). Além disso, conduzem à produção de substâncias biologicamente ativas bastante diversificadas, tendo sido observada a produção de óleos essenciais, amidas, pironas, flavonóides e lignóides (fenilpropanóides, lignanas e neolignanas) (Kato e Furlan, 2007).

A família Piperaceae é composta por 14 gêneros, sendo os gêneros *Piper* e *Peperomia* os mais abundantes em número de espécies (Mabberley, 1997 e Dyer & Palmer, 2004).

Os gêneros *Piper* e *Peperomia* foram tratados neste trabalho em vista da importância quanto à produção de componentes resultantes de seu metabolismo secundário, abundância e, por serem mantidos no Laboratório de Química e Produtos Naturais da USP, o que facilitou a aquisição do material de estudo.

O gênero *Piper* apresenta mais de 1.000 espécies, sendo que destas 266 são registradas para o Brasil. É formado por plantas lenhosas, como arbustos, trepadeiras e pequenas árvores e apresenta boa representatividade comercial e destaque no cenário econômico (Dyer & Palmer, 2004; Guimarães & Giordano, 2004; Nunes et al., 2007). Sua importância econômica é devido à produção de óleos essenciais e à produção de inseticidas, importantes para a indústria farmacêutica e alimentícia. Isto se deve a substâncias como alcalóide, ácidos benzóicos, cromones, flavonóide e lignanas produzidas por algumas espécies (Navickiene et al., 2000; Kato e Furlan, 2007; Rapado, 2011).

O gênero *Peperomia* apresenta cerca de 1.000 espécies, das quais 200 são registradas para o Brasil. É formado por plantas suculentas, do tipo ervas terrestre ou epífita. É comumente utilizado como plantas ornamentais, na culinária e no tratamento de doenças (antiinflamatório, antiasmático, analgésico, antibacteriano, úlcera gástrica, esterelidade e antimalárica)

(Milliken, 1997; Dyer & Palmer, 2004; Wanker et al., 2006; Felipe et al., 2008; Monteiro e Guimarães, 2008).

Os resultados dos efeitos dos extratos (*Piper cubataonum*, *Piper caldense*, *Piper cernuum*, *Peperomia trineura*, *Peperomia rubricaulis* e *Peperomia blanda*) e da substância ativa (ácido caldensínico) sobre as formas adultas e embrionárias de *B. glabrata* são discutidos nos parágrafos seguintes.

*Piper caldense*, popularmente conhecida como pimenta d'arda, é comumente encontrada em locais úmidos remanescentes da Mata Atlântica. É muito utilizada no estado da Paraíba como sedativo, antídoto para picadas de cobras e dor de dente. *P. caldense* foi utilizado contra espécimes de fungos do gênero *Cladosporium* demonstrando ação fungicida (Chaves e Cardozo Jr, 2002). É verificado, neste trabalho, que o extrato bruto de folhas de *Piper caldense* apresenta ação tóxica sobre as formas adultas de *B. glabrata*, nas concentrações de 100ppm, 80 ppm e 50 ppm. Com relação aos estádios embrionários, observou-se que blástula, gástrula e trocófora foram os estádios mais sensíveis, quando expostos à 100 ppm e 80 ppm do extrato de *P. caldense*, sendo que nestas concentrações constatou-se, também, efeito nos estádios de véliger e hipo. Este é o primeiro estudo de *Piper caldense* em moluscos. Acredita-se que a ação moluscicida e ovicida possa ser atribuída a uma flavona denominada 7,3'- di-O-metilluteolina, recentemente isolada das folhas de *P. caldense* por Freitas e Kato (2007). As flavonas, segundo Rapado (2007), são compostos tóxicos para caramujos.

O ácido caldensínico isolado de folhas de *Piper caldense* possui um grupo carboxila na cadeia lateral, sendo esta estrutura inédita para as espécies de Piperaceae, a qual foi vista apenas em algumas espécies de Myristicaceae (Freitas et al., 2009). Kim et al (2008) ao estudar o ácido sargaquinóico que apresenta componentes similares ao do ácido caldensínico, por apresentar um conjugado  $\alpha,\beta$  no grupo carboxila, verificou que esta estrutura foi a responsável na ativação dos receptores nucleares

ativos da proliferação de peroxissomas que regula a homeostase da glicose. Este fato é importante, pois a utilização deste ácido pode auxiliar no tratamento da diabetes. Silva et. al (2007) verificou atividade antioxidante ao estudar os tocotrienóis, que também possuem um grupo carboxila em sua cadeia lateral, mas estes são isômeros do ácido caldensínico, portanto os dois tem a mesma fórmula química, mas diferem na sua fórmula estrutural. Até o momento não existem estudos que demonstrem a ação moluscicida e ovicida do ácido caldensínico. Neste estudo o ácido caldensínico apresentou efeito tóxico agudo em adultos nas concentrações de 20 e 10 ppm. Os testes feitos com embriões não demonstraram efeito ovicida.

*Piper cernuum* é conhecida popularmente como arvoleta, bojubú, pau-de-cobra-cipó, jaborandi-cepoti e pimenta-de-morcego (Guimarães e Giordano, 2004). Das folhas de *P. cernuum* foram isolados derivados do ácido cinâmico, lignana cubebina e óleo volátil. Este óleo volátil apresentou atividade inibitória contra *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. (Danelutte et al, 2005; Constantin, 2001). Não existem estudos até o momento que demonstrem atividade moluscicida e ovicida de *P. cernuum* em moluscos. Os resultados deste estudo mostraram que o extrato das folhas de *P. cernuum*, na concentração de 100 ppm não foi eficiente em adultos de *B. glabrata*. O mesmo foi observado com relação aos estádios embrionários de blástula, gástrula e trocófora.

*Peperomia trineura* é uma planta epífita ou rupestre, conhecida popularmente como erva de vidro (Monteiro e Guimarães, 2008). Mota (2007) realizou um estudo químico e biológico com *Peperomia obtusifolia* e *Peperomia trineura*. Dos extratos e frações obtidas de *P. obtusifolia*, verificou que o extrato bruto, frações n-butanol de caule e folhas desta espécie apresentaram inibição  $\geq 90\%$  sobre células tumorais HL-60 (leucemia). A fração hexânica apresentou potente atividade frente a *C. krusei* e *C. neoformans* e atividade moderada para *C. albicans* e *C. parapsilosis*. De *P. trineura*, o autor obteve várias frações e substâncias. Dentre as frações obtidas, a fração hexânica apresentou potente atividade frente a *Candida*

*krusei* e *Cryptococcus neoformans* e fraca atividade frente a *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*. Esta também apresentou inibição ao crescimento celular de 96% para as células tumorais HCT-8 (colo). A fração hidroalcoólica apresentou forte atividade frente à maioria das leveduras testadas, com exceção de *C. albicans*, que obteve moderada atividade.

Ferreira (2009) ao isolar cinco tipos de policetídeos de *Peperomia trineura* observou que estes apresentaram atividade fungicida sobre *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*. No mesmo estudo o autor verificou atividade antitumoral em células leucêmicas K562 e Nalm 6 após exposição as frações do extrato bruto.

Não existe na literatura estudos que utilizem extrato de *P. trineura* como moluscicida e ovicida. O extrato de folhas de *P. trineura*, aqui estudado, teve efeito agudo tóxico em adultos de *B. glabrata*, nas concentrações de 100 ppm, 80 ppm e 60ppm. Nos embriões, o mesmo extrato na concentração de 100 ppm, apresentou atividade ovicida sobre todos os estádios embrionários, com 100% de mortalidade. Nas concentrações inferiores (95 ppm, 90 ppm, 80 ppm, 60 ppm e 50 ppm), a que os embriões foram expostos, também verificou-se efeito ovicida em praticamente todos os estádios.

*Peperomia rubricaulis* é uma planta rupestre, com ramos são avermelhados, podendo atingir de 20 a 40 cm de altura (Monteiro e Guimarães, 2008). Esta espécie não possui caracterização química e estudos sobre sua ação em animais. Neste estudo *P. rubricaulis* não apresentou efeito tóxico para adultos de *B. glabrata*. Observou-se efeito agudo tóxico de *P. rubricaulis* em todos os estádios embrionários, nas concentrações de 100 ppm e 80 ppm, exceto em hipo exposto à 80 ppm, onde a mortalidade foi de 2,8%. Nas concentrações de 70 ppm e 60 ppm não foi verificado efeito ovicida.

*Peperomia blanda* é uma planta epífita, rupestre, umbrófila ou heliófila, sem nome popular conhecido (Montiro e Guimarães, 2008). Felipe

(2008) isolaram das folhas de *P. blanda*, lignanas e tetraidrofurâncias, que apresentaram atividade tripanocida. Dignani (2009) ao estudar o extratos frações e substâncias isoladas de *P. blanda*, observou que policetídeos, lignanas e flavonóides de *P. blanda* apresentou atividade antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus*. Neste mesmo estudo foi observado atividade oxidante sobre o radical ABTS, HOCl e taurina-cloramina. A partir dos experimentos realizados com adultos e embriões de *B. glabrata*, não foi possível verificar efeito tóxico na concentração de 100ppm.

A espécie *Piper cubataonum* não tem descrita sua caracterização química e ação em animais. O extrato, obtido das folhas, foi utilizado pela primeira vez aqui neste trabalho e não demonstrou atividade moluscicida e ovicida em *B. glabrata*.

Os resultados referentes ao modelo de regressão linear e correlação para observar, respectivamente, o efeito ou a tendência de uma determinada concentração de extrato sob a população adulta de *B. glabrata*, mostrou que muito provavelmente 50 ppm de *P. trineura* e de *P. caldense* é a concentração mínima requerida para matar adultos de *B. glabrata*.

O modelo do efeito da concentração do extrato de *P. trineura* sobre *B. glabrata* explicou que 50% destes morrem a partir da concentração de 50 ppm do extrato. O modelo evidenciou que o efeito do aumento desta concentração implica em 100% de mortalidade de *B. glabrata*, desta forma, ressalta-se que concentrações iguais e acima de 60 ppm podem matar 100% da população.

No caso da correlação do extrato de *P. caldense* em relação à mortalidade de *B. glabrata*, os resultados indicaram que 50 ppm do extrato, além de ter sido a concentração mínima requerida para causar a mortalidade de *B. glabrata*, foi também a que matou quase 100% da população e, aparentemente aumentos acima desta concentração continuariam implicando em 100% de mortalidade.

Com relação ao ácido caldensínico pode-se observar que com o aumento de sua concentração ocorre o aumento da mortalidade de *B. glabrata*. Entre 8 e 9 ppm a mortalidade registrada é praticamente de 50 %, e, provavelmente 10 ppm é a concentração mínima requerida para matar 100% de adultos de *B. glabrata*.

Os resultados da análise de probito mostraram que uma pequena concentração de ácido caldensínico já pode causar a mortalidade de 50% de adultos de *B. glabrata*. Ressalta-se que devido esta ser uma substância pura, portanto, mais concentrada quando comparada ao extrato bruto, era esperado que uma pequena concentração fosse mais eficiente.

Com relação aos extratos brutos de *P. caldense* e *P. trineura*, pode-se prever pela análise de probito que o primeiro extrato foi um pouco mais eficiente que o segundo, tanto para causar a morte de 50% da população adulta de *B. glabrata* como para causar a morte de 90% desta população.

Contudo, a análise de qui-quadrado mostrou que a diferença entre mortos e sobreviventes, de adultos de *B. glabrata*, tratados com 50 ppm dos dois extratos foi muito significativa ( $p < 0.001$ ), indicando aparentemente que *P. caldense* causa maior mortalidade que *P. trineura*. Já para o ácido caldensínico a análise de resíduos do qui-quadrado indicou que o excesso de mortes das bionfálarias, 100% da população, submetidas a 10 ppm e 20 ppm, bem como, a falta de mortes para as submetidas a 5 ppm foi responsável pelo resultado significativo na comparação entre mortos e sobreviventes. A análise de probito reforça este resultado, visto que prevê que apenas 7.54 ppm do ácido já é suficiente para matar 50% da população adulta de *B. glabrata* e, 13.62 ppm matou 90% da população.

Os extratos de *P. trineura* e *P. caldense* demonstraram causar a mortalidade de adultos e embriões de *B. glabrata*. O ácido caldensínico e *Peperomia rubricaulis* foram tóxicas para adultos e embriões de *B. glabrata*, respectivamente. Não há como fazer comparações com outros estudos visto que não existem relatos do efeito destes extratos sobre populações de

moluscos. Todavia os resultados aqui apresentados comprovam o potencial de atividade moluscicida e ovicida destes extratos sobre *B. glabrata*. Faz-se necessário, entretanto, testar em laboratório previamente a toxicidade destes extratos em outros organismos aquáticos. E, posteriormente, verificar com maior segurança, o efeito de tais extratos em condições de campo, afim de determinar a possibilidade da utilização segura nos diferentes criadouros do caramujo, comprovando se tais extratos não causam efeito letal na fauna que compõem o criadouro como fitoplâncton, zooplâncton, peixes e insetos, causando desequilíbrio ao ecossistema que comportam tais criadouros. Sugere-se que outras partes das plantas da família Piperaceae que apresentaram atividade moluscicida, sejam utilizadas na elaboração destes extratos, ou ainda que diferentes frações destes extratos aqui estudados fossem testados em moluscos, assim como em outros organismos, como, por exemplo, em *Daphnia* sp e peixes. Os resultados aqui apresentados são promissores na busca de moluscicidas naturais, cabendo ressaltar que, de acordo com WHO (1973), a composição química dos produtos vegetais, geralmente, não causa deposição no ambiente e degradam mais rápido na natureza comparado aos sintéticos.



## 6. Conclusão

Das espécies de Piperaceae estudadas, os extratos brutos de *Peperomia trineura*, *Piper caldense* e a substância ativa, ácido caldensínico, apresentaram atividade moluscicida em adultos de *B. glabrata*. Os extratos brutos apresentaram atividade moluscicida em concentrações de 100 ppm a 50ppm e o ácido caldensínico em 20 ppm e 10 ppm.

Em embriões de *B. glabrata*, as Piperaceae que apresentaram atividade ovicida foram *Peperomia trineura* nas concentrações de 100ppm a 50ppm e *Peperomia rubricaulis* e *Piper caldense* nas concentrações de 100 ppm e 80 ppm.

*P.caldense* mostrou ser mais eficiente que *P. trineura* para causar a mortalidade em *B. glabrata* à 50 ppm.

Os extratos de *Piper caldense*, *Piper rubricaulis* e *Peperomia trineura*, que apresentaram atividade moluscicida e/ou ovicida, devem ser testados em outros organismos, fracionados e terem suas estruturas químicas elucidadas.

## 7. Referências Bibliográficas

- Abath FGC, Katz N. Desenvolvimento de vacinas para esquistossomose mansoni: estado atual e perspectivas. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL, organizadores. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose – Uma visão Multidisciplinar. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2008. p.1009-1028.
- Abílio FJP. Aspectos bio-ecológicos da fauna malacológica com ênfase a *Melanoides tuberculata* Müller, 1774 (Gastropoda: Thiaridae) em corpos aquáticos do Estado da Paraíba. [Dissertação] Paraíba: Universidade Federal da Paraíba; 1997.
- Amaral RS, Porto MAS. Evolução e situação atual do controle da esquistossomose no Brasil. *Rev. da Soc. Bras. de Med. Trop.* 1994; out-dez 27 (supl. 3): 73-90.
- Amaral RS, Tauil PL, Lima DD, Engels D. An analysis of the impact of the Schistosomiasis Control Programme in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2006; 101 (supl. 1): 79-85.
- Anantaraman M. Biological control of aquatic snails. *Indian J. Vet. Sci.* 1955; 25: 65- 67.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota técnica sobre a reavaliação toxicológica do ingrediente ativo pentaclorofenol e seus sais. [Nota técnica on line] 2006. [acesso em 10 jul 2011]. Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)
- Archibal RG. The use of the fruit of the tree *Balanites aegyptiaca* in the control of schistosomiasis in the Sudan. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1933; 27: 207.
- Baldoqui DC, Kato MJ, Cavalheiro AJ, Bolzani V da S, Young MCM, Furlan M. New chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. *Phytochemistry.* 1999; 51: 899- 902.

- Barbosa CS, Fravre TC, Amaral RS, Pieri OS. Epidemiologia e controle da esquistossomose mansoni. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL, organizadores. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose – Uma visão Multidisciplinar. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2008. p. 965-1008.
- Barbosa FS, Barbosa CS. The bioecology of snail vectors for Schistosomiasis in Brazil. *Cad. Saúde Plub.* 1994; 10(2): 200-209.
- Barroso GM. Sistemática de Angiospermas do Brasil. Volume 3. Imprensa da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil, 1986.
- Benevides PJC, Sartorelli P, Kato MJ. Phenylpropanoids and neolignans from *Piper regnellii*. *Phytochemistry.* 1999; 52 (2): 339 - 343.
- Caldeira RL, Teodoro TM, Gomes MFB, Carvalho OS. Preliminary studies investigating the occurrence of *Biomphalaria cousini* in Brazil. *Mem Inst. Oswaldo Cruz.* 2010; 105 (4): 485 - 487.
- Camey, T; Verdonk, N. H. The early development of the snail *Biomphalaria glabrata* (Say) and the origin of the head organs. *Netherlands Journal of Zoology.* 1970; 20(1): 93-121.
- Carvalho OS, Amaral RS, Dutra LV, Scholte RGC, Guerra MAM. Distribuição espacial de *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea*, *B. tenagophila*, hospedeiros intermediários de *Schistosoma mansoni* no Brasil. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL, organizadores. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose – Uma visão Multidisciplinar. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2008. p. 393-418.
- Chang MN, Han GQ, Arison BH, Springer JP, Hwang SB, Shen YT. Neolignans from *Piper futokadsura*, *Phytochemistry.* 1985; 24(9): 2079-82.
- Chaves COM, Cardozo Jr EL. Caldensin, a New Natural N-Methyl-Aristolactam from *Piper caldense*. *Pharmaceutical Biology.* 2002; 41: 216-218.
- Chieffi PP, Waldman EA. Aspectos particulares do comportamento epidemiológico da Esquistossomose Mansônica no Estado de São Paulo, Brazil. *Cad. de Saúde Pública.* 1988; 4 (3): 257-275.

- Chitsulo L, Engels D, Montresor A, Savioli L. The global status of schistosomiasis and control. *Acta Tropica*. 2000; 77: 41-51.
- Constantin MB, Sartorelli P, Limberger R, Henriques AT, Steppe M, Ferreira MJP, Ohara MT, Emerenciano VP, Kato MJ. Essential oils from *Piper cernuum* and *Piper regnellii*: Antimicrobial activities and analysis by GC/MS and <sup>13</sup>C-NMR. *Planta Med*. 2001; 67: 771-773.
- Coura JR, Amaral RS. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazil endemic áreas. *Mem Inst. Oswaldo Cruz*. 2004; 99 (sup.1): 13-9.
- Coura JR, Conceição MJ. Specific schistosomiasis treatment as a strategy for disease control. *Mem Inst. Oswaldo Cruz*. 2010; 105 (4): 598-603.
- Cunha AS. Esquistossomose mansoni. 1ª Edição. São Paulo: EDUSP; 1970.
- CVE – Centro de Vigilância Epidemiológica. Vigilância Epidemiológica e Controle da Esquistossomose / Normas e Instruções. São Paulo. 2007. Disponível em: [http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/cve\\_manual.htm](http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/cve_manual.htm)
- CVE – Centro de Vigilância Epidemiológica – Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Informe Técnico – 2009: Esquistossomose. São Paulo: SES, 2009a. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br>
- CVE – Centro de Vigilância Epidemiológica – Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Situação epidemiológica da esquistossomose no estado de São Paulo. Resumo: Esquistossomose. São Paulo: SES, 2009b. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br>
- CVE – Centro de Vigilância Epidemiológica – Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Novas estratégias para a vigilância epidemiológica da esquistossomose no estado de São Paulo. *Rev Saúde Pública*. 2009c; 43 (4): 728-30.
- Danelutte AP, Constantin MB, Delgado GE, Braz-Filho R, Kato MJ. Divergency of secondary metabolism in cell suspension cultures and differentiated plants

- of *Piper cernuum* and *P. crassinervium*. J. Braz. Chem. Soc. 2005; 16(6B): 1425-30.
- Dannemann RDA, Pieri OS. Anidrobiose e diapausa em *Biomphalaria glabrata* (Say), caramujo transmissor da esquistossomose, na Região Nordeste. Biotemas. 1989; 2 (1): 57-68.
- Dias MLF. Padrões comportamentais da Reprodução de *Biomphalaria tenagophila* (ORBIGNY) (Mollusca, Planorbidae). [Tese] – Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.
- Dias PP, Ramos BC, Matta GE. New C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> compounds from *Piper lenticellosum*. J. Nat. Prod. 1986; 49: 690-691.
- Dignani DF. Peperomia blanda (Piperaceae): Avaliação das atividades antibacteriana e antioxidante. [Dissertação]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Faculdade de Ciências Farmacêuticas; 2009.
- Duncan J. A review of the development and application of molluscicidal in schistosomiasis control. In: Molluscicidal in Schistosomiasis Control, ed. T. C. Cheng, London: Academic Press. 1974; 9- 40.
- Duncan J. The toxicology of plants molluscicides. Pharmacol. Ther. 1985; 27: 243-264.
- Dyer LA, Palmer ADN. Piper: A model genus for studies of pytochemistry, ecology and evolution. Kluwer Academic Publisher. New York, USA. 2004; 214 p.
- Engels D, Chitsulo L, Montresor A, Savioli L. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. Acta Tropica. 2002; 82: 139-146.

- Felippe LG, Baldoqui DC, Kato MJ, Bolzani VS, Guimarães EF, Cicarelli RMB, Furlan M. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from *Peperomia blanda*. *Phytochemistry*, 2008; 69(2): 445-450.
- Ferrari MLA, Coelho PMZ, Antunes CMF, Tavares CAP, Cunha AS. Efficacy of oxamniquine and praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* infection: a controlled trial. *Bulletin of the World Health Organization*. 2003; 81 (3): 190-6.
- Ferreira EA. 2-Acil-cicloexano-1,3-dionas de *Peperomia trineura* (Miq.). [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2009.
- FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz – Agência FIOCRUZ de notícias : Fundação prepara levantamento da situação da esquistossomose no Brasil. [divulgação científica on line] 2011. [acesso em 23 jan 2011]. Disponível em: [www.cpqrr.fiocruz.br/pt-br/destaque/fundacao-prepara-levantamento-da-situacao-da-esquistossomose-no-brasil](http://www.cpqrr.fiocruz.br/pt-br/destaque/fundacao-prepara-levantamento-da-situacao-da-esquistossomose-no-brasil) (A)
- FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz – Agência FIOCRUZ de notícias : Fundação consegue avanços na vacina anti-helmintíca. [divulgação científica on line] 2010. [acesso em 05 jan 2011]. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?inoid=3462&sid=9>
- Freitas GC, Kato MJ. Flavona em folhas de *Piper caldense* C. DC. (Piperaceae). In: 30 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia. Livro de Resumos da 30 Reunião Anual da Soc. Bras. de Química, 2007.
- Freitas GC, Kitamura ROS, Lago JHG, Young MCM, Guimarães EF, Kato MJ. Caldensinic acid, a prenylated benzoic acid from *Piper caldense*. *Phytochemistry Letters*. 2009; 119-122.
- Freitas JR, Santos MCL. Current advances on the study of snail interactions, with special emphasis on competition process. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1995; 90 (2): 261-69

- Giesbrecht AM, Alvarenga MA, Gottlieb OR, Gottlieb HE. (2E-4E)-N-isobutyl-9-piperonyl-nona-2,4-dienoic amide from *Ottonia anisum*. *Planta Med.* 1981; 43, 375.
- Graham K, Graham EA, Towers GHN. Cercaricidal activity of phenylleptatryne and atertienyl, naturally occurring compounds in species of Asteraceae and Compositae. *J. Zool.* 1980; 58: 19-55.
- Guimarães EF, Giordano LCS. Piperaceae do nordeste brasileiro I: estado do Ceará. *Rodriguésia*, 2004; 55(84): 21-46.
- Guimarães MCA. Avaliação do controle e vigilância do hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*, no Vale do Ribeira, e observações do seu parasitismo. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2007.
- Gurib-Fakim A. Constituents of the essential oils from *Piper sylvestre* growing in Mauritius. *Planta Med.* 1994; 60: 376.
- Ismail M, Botros S, Metwally A, William S, Farghally A, Tao LF et al. Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from Egyptian villagers. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999; 60(6): 932-935.
- Jurberg P, Vasconcelos MC, Mendes NM. Plantas empregadas como moluscicidas: uma revisão crítica. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 1989; 84 (supl. 1): 76-83.
- Jurberg P. Why it is difficult to control *Biomphalaria glabrata*, the vector snail of schistosomiasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1987; 82 (supl. 4): 203-7.
- Kato MJ, Furlan M. Chemistry and evolution of the Piperaceae. *Pure Appl. Chem.* 2007; 79:(4) 529–538.
- Katz N. Dificuldades no desenvolvimento de uma vacina para a esquistossomose mansoni. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1999 nov-dec; 32(6): 705-711.

- Katz N. Terapêutica clínica na esquistossomose mansoni. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL, organizadores. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose – Uma visão Multidisciplinar. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2008. p. 849-870.
- Katz N, Peixoto SV. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2000; 33(3): 303-308.
- Kawano T. Embriologia. In: Barbosa, FS, organizador. Tópicos em Malacologia Médica. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ; 1995; 157-200.
- Kawano T, Nakano E, Watanabe LC. Estudo do desenvolvimento embrionário de *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Planorbidae) e suas aplicações. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL, organizadores. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose – Uma visão Multidisciplinar. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2008. p. 347-391.
- Kawano T, Okazaki K, Ré L. Embryonic development of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Mollusca, Gastropoda, Planorbidae): A practical guide to the main stages. *Malacologia.* 1992; 34(1-2): 25-32.
- Kim SN, Choi HY, Lee WJ, Park GM, Shin WS, Kim YK. Sargaquinoic acid and sargahydroquinoic acid from *Sargassum yezoense* stimulate adipocyte differentiation through PPAR alpha/gamma activation in 3T3-L1 cells. *FEBS Letters.* 2008; 582: 3465–3472.
- Kloos H, McCulloch FS. Plant Molluscicides: a review. *Wld Hlth Org.*, 1981.
- Lardans V; Dissous C. Snail control strategies for reduction of schistosomiasis transmission. *Parasitology Today.* 1998; 14(10): 413-7.
- Liang YS, Coles GC, Doenhoff MJ. Detection of praziquantel resistance in Schistosomes. *Trop. Med. Int. Health.* 2000; 5(1): 72.



- Liang YS, Dai JR, Zhu YC, Coles GC, Doenhoff MJ. Genetic analysis of praziquantel resistance in *Schistosoma mansoni*. *Southeast Asian Trop. Med. Publ. Health*. 2003; 34(2): 274-280.
- Liese B. The organization of schistosomiasis control programmes. *Parasitology Today*. 1986; 2 (12): 339-45.
- Luna JS, Santos AF, Lima MRF, Omena MC, Mendonça FAC, Bieber LW, Sant'Ana AEG. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. *J. of Ethnopharmacology*. 2005; 97: 199-206.
- Maia JS, Green CL, Milchard MJ. New sources of natural safrole. *Perfumer e Flavorist*, 1993; 18-19.
- Mabberley D. *The plant-book: A portable dictionary of the vascular plants*. New York, USA. 1997; 858.
- Martins RC, Sartorellii P, Latorre LR, Kato MJ. Phenylpropanoids and tetrahydrofuran lignans from *Piper solmsianum*. *Phytochemistry*, 2000; 7: 843- 846.
- Mccullough FS. Biological control of the snail intermediate hosts of human *Schistosoma spp.*: a review of its present status and future prospects. *Acta Tropica*. 1981; 38: 5-13.
- McManus DP, Loukas A. Current status of vaccines for Schistosomiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2008; 21: 225-241.
- Meireles M. A doutora da vacina. *Revista Época*. [divulgação científica on line]. São Paulo: 2010. [acesso em 05 jan 2011]. Disponível em : <http://revistaepoca.globo.com/Revista/Epoca/0,,EMI169904-15224,00-A+DOUTORA+DA+VACINA.html>
- Milliken W. *Plants for Malaria, Plants for Fever: Medicinal species in Latin America – a bibliographic survey*. The Royal Botanic Gardens. 1997; 116p.

- Ministério da Saúde - Secretaria da Vigilância e Saúde - Departamento de Vigilância Epidemiológica. Vigilância e Controle de Moluscos de Importância epidemiológica. (Diretrizes Técnicas: Programa da Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE)). 2ª Ed. Brasília: Editora MS; 2007.
- Monteiro D, Guimarães EF. Flora do Parque Nacional do Itatiaia – Brasil: *Peperomia* (Piperaceae). Rodriguésia. 2008; 59(1): 161-195.
- Mota, JS. Estudo químico e biológico das espécies *Peperomia obtusifolia* e *Peperomia trineura* (Piperaceae). [Tese]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Instituto de Química de Araraquara; 2007.
- Mott KE. Plant molluscicides. 1ª Edição. Grã Bretanha: UNDP/ WORLD BANK/ WHO; 1987.
- Muniz C. Levantamento da malacofauna límnic e aspectos ecológicos de focos de esquistossomose em Ana Dias, Vale do Ribeira – SP. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2007.
- Navickiene HMD, Alécio AC, Kato MJ, Bolzani VS, Young MC, Cavalheiro AJ, Furlan M. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. Phytochemistry, 2000; 6: 621- 626.
- Neves DP et al., Parasitologia Humana. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2005; 494p.
- Nunes JD, Torres GA, Davide LC, Salgado CC. Citogenética de *Piper hispidinervum* e *Piper aduncum*. Pesq. Agropec. Bras., Brasília. 2007; 42(7): 1049- 52.
- Ohlweiler FP, Kawano T. *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835): Adaptation to desiccation and susceptibility to infection with *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907. Rev. Inst. Med. Trop. 2002; 44(4): 191-201.
- Ohlweiler FP, Takahashi FY, Guimarães MCA, Gomes SR, Kawano T. Manual de gastrópodes límnicos e terrestres do estado de São Paulo associados às helmintoses. Porto Alegre: Redes Editora, 2010.

- Oliveira FA. Avaliação do efeito do praziquantel, da oxamniquina e da associação destas drogas sobre o verme adulto de *Schistosoma mansoni*. [Dissertação] Programa de Pós- Graduação do Centro de Pesquisas René Rachou; 2005.
- Paraense, WL. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros (Mollusca, Gastropoda). Arq. Mus. Nac. Rio de Janeiro. 1975; nov. 55: 105-127.
- Paraense WL. The schistosome vectors in the Américas. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2001; 96 (supl. 7-16): 7-16.
- Pereira JCR. Análise de dados qualitativos. Estratégias metodológicas para as Ciências da Saúde, Humanas e Sociais. São Paulo: Edusp; 1999.
- Pereira JP, Souza CP, Mendes MM. Molluscicidal properties of the *Euphorbia cotonifolia*. Rev. Brasil. Pesq. Méd. e Biol., 1978; 11: 345.
- Pieri OS, Fravre TC. Diapausa em *Biomphalaria glabrata*. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL, organizadores. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose – Uma visão Multidisciplinar. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2008. p. 419-433.
- Pinto C, Almeida AF. Um novo método para a profilaxia da esquistossomose mansoni. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1944; 40: 291-311.
- Pongmarutai M. Study on antidiabetic action of *Piper rostratum*. In: Research Abstract and Text Books 1969-1989. Prince of Songkhla University, Thailand, p.K15, 1989.
- Rapado LN. Efeito moluscicida de extratos de Piperaceae no vetor de esquistossomose *Biomphalaria glabrata*. [Dissertação]. Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 2007.
- Rapado LN, Nakano E, Ohlweiler FP, Kato MJ, Yamaguchi LF, Pereira CAB, et al. Molluscicidal and ovicidal activities of plant extracts of the Piperaceae on

- Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *Journal of Helminthology*. 2011; 85: 66-72.
- Ré L. Estudo da atividade moluscicida de extratos vegetais em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). [Dissertação]. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, SP, 189 pp, 1990.
- Ré L, Kawano T. Effects of *Laurus nobilis* (Laurácea) on *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1987; 82(IV): 315-320.
- Rey L. Estratégias e métodos de controle da esquistossomose. *Cad. Saúde Publ.* 1987; 3(1): 98-55.
- Rey L. Parasitologia. Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 2<sup>o</sup> edição. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 731 p., 1991.
- Rey L. Parasitologia. 4<sup>a</sup> Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A.; 2008.
- Reynol F. Vacina para esquistossomose. Agência FAPESP [divulgação científica on line] 2009. [acesso em 20 abr 2010]. Disponível em : <http://www.agencia.fapesp.br/materia/11321/especiais/vacina-para-esquistossomose.htm>
- Ribeiro JELS, Hopkins MJG, Vicentini A, Sothers CA, Costa MAS, Brito JM, Souza MAD, Martins LHP, Lohmann LG, Assunção PACL, Pereira, EC, Silva CF, Mesquita MR, Procópio LC. Flora da Reserva Ducke. Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. INPA, DFID editora, 816 p il., 1999.
- Ritchie LS, Hillyer GV, Cushing EC. Molluscicidal and cercaricidal activities of substances contained in tissues of certain plants. *Military Medicine*, 1963; 128: 795 - 8.
- Schall VT. Health Education for children in the control of Schistosomiasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1987; supplIV: 285-292.

- Schall VT, Massara CL, Diniz MCP. Educação em saúde no controle da esquistossomose. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL, organizadores. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose – Uma visão Multidisciplinar. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2008. p. 1029-1079.
- Silva DHS, Zhang YJ, Santos LA, Bolzani VS, Nair M. Lipoperoxidation and cyclooxygenases 1 and 2 inhibitory compounds from *Iryanthera juruensis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007; 55: 2569–2574.
- Silva JRM, Neves RH, Gomes DC. Filogenia, Co-evolução, aspectos morfológicos e biológicos das diferentes fases de desenvolvimento do *Schistosoma mansoni*. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL, organizadores. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose – Uma visão Multidisciplinar. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2008. p. 43-84.
- Silveira AC. Controle da esquistossomose no Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1989; 84 (suppl. I): 91-104
- SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação. [divulgação científica on line] 2011. [acesso em 23 ago 2011]. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/esquisto/bases/esquistobrnet.def>
- Souza CP, Lima, LC. Moluscos de interesse Parasitológico do Brasil. Belo Horizonte: FIOCRUZ/CPqRR, 1990. 76p.
- Souza RF. Investigação da presença de resíduos de pentaclorofenol em gelatina comestível por cromatografia a gás com captura de elétrons (CG/DCE). [Dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2008
- Storer TI, Usinger RL, Stebbins RC, Nybakken JW. *Zoologia Geral*. 6 ed. São Paulo: Nacional, 2002. 816p.

SUCEN – Superintendência de Controle de Endemias – Esquistossomose mansônica. [acesso em 27 mai 2010]. Disponível em: <http://www.sucen.sp.gov.br/atuac/esquis.html>

Tallarico LF. Efeito letal dominante da radiação gama de  $^{60}\text{Co}$  em *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818). [Dissertação]. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo. São Paulo; 2003.

Teles HMS. Distribuição geográfica das espécies dos caramujos transmissores de *Schistosoma mansoni* no estado de São Paulo. Rev. Soc. Bras. de Med. Tropical. 2005; 38(5):426-32.

Teles HMS, Carvalho, OS. Implicações da biologia de *Biomphalaria* no controle da esquistossomose. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL, organizadores. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose – Uma visão Multidisciplinar. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2008. p.459-484.

Teodoro TM. Investigação da ocorrência de *Biomphalaria cousini* no Brasil e sua suscetibilidade ao *Schistosoma mansoni*. [Dissertação]. Belo Horizonte: Program de Pós graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou; 2009.

Tirillini B, Velasquez ER, Pellegrino R. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Piper angustifolium*. Planta Méd. 1996; 62: 372.

Tyagi OD, Jensen S, Boll PM, Sharma NK, Bisht KS, Parmar VS. Lignans and neolignans from *Piper schmidtii*. Phytochemistry . 1993; 32: 445.

Utzinger J, Shuhua X, Goran EKN, Bergquist R, Tanner M. The potencial of artemether for the control of schistosomiasis. Int. J. for Parasitology. 2001; 31: 1549-62.

Vieira PC, Alvarenga MA, Gottlieb OR, Gottlieb HE. 4-Hexadecenylphenol and Flavonoids from *Piper hispidum*. Planta Med. 1980; 39: 153.

- Wanke S, Samain MS, Vanderschaeva L, Mathieu G, Goetghebeur P, Neinhuis C. Phylogeny of the genus *Peperomia* (Piperaceae) inferred from the trnk/matk region (cpDNA). *Plant Biology*. 2006; 8: 93-102.
- Watanabe LC. Desenvolvimento embrionário de *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny) (Mollusca, Planorbidae). [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1997.
- Webbe G. Molluscicidal in the control of schistosomiasis. In: *Plants Molluscicides*, ed. Kenneth E. Mott, UNDP/WORLD BANK/WHO, Special Program for research and Training in Tropical Diseases, 1987; 1-26.
- Wilson RA, Coulson PS. Schistosome vaccines: a critical appraisal. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006; 101(Suppl. I): 13-20.
- World Health Organization. Epidemiology and control of schistosomiasis. *Teach. Rep. Ser. Wld Hlth Org., Geneva*. 1980; 649: 1-76
- World Health Organization. Fact sheet. 2010a. Disponível em : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/index.html>
- World Health Organization. Informal Consultation on Schistosomiasis in low transmission areas: Control strategies and criteria for elimination. Report. 2001.
- World Health Organization. Molluscicides screening and evaluation. *Bull of The World Health Organ.,* 1965; 33 (4): 567- 81.
- World Health Organization. Parasitic Diseases – Schistosomiasis – Vaccine. [Acesso em: 10 abr 2010b] Disponível em: [http://www.who.int/vaccine\\_research/diseases/soa\\_parasitic/en/print.html](http://www.who.int/vaccine_research/diseases/soa_parasitic/en/print.html) .
- World Health Organization. Report of informal consultation on research on the biological control of snail intermediated hosts. *Wld Hlth Org., (TDR/BCV-SCH/SIH/84.3) Geneve*. 1984; 41.

World Health Organization. Report of the scientific working group on plant molluscicides. Wld Hlth Org., Geneve, 11p, 1983 (TDR/SCH-SWG (4)/83.3).

World Health Organization. Schistosomiasis control. Teach. Rep. Ser. Wld Hlth Org., Geneva. 1973; 515: 1-47.



**ANEXO 01**

Atividade moluscicida do extrato das folhas de *Piper cubataonum* em *Biomphalaria glabrata* na concentração de 100 ppm, observada ao longo de 10 dias da exposição.

<b>Concentração ppm</b>	<b>Nº de animais utilizados</b>	<b>Nº de animais mortos</b>	<b>Mortalidade (%)</b>
<b>100</b>	30	0	0
DMSO 1%	30	0	0
Água	30	0	0

Atividade moluscicida do extrato das folhas de *Piper cernuum* em *Biomphalaria glabrata* na concentração de 100 ppm, observada ao longo de 10 dias da exposição.

<b>Concentração ppm</b>	<b>Nº de animais utilizados</b>	<b>Nº de animais mortos</b>	<b>Mortalidade (%)</b>
<b>100</b>	30	11	36.66
DMSO 1%	30	0	0
Água	30	0	0

**ANEXO 02**

Atividade moluscicida do extrato das folhas de *Piper caldense* em *Biomphalaria glabrata* em diferentes concentrações, observada ao longo de 10 dias da exposição.

<b>Concentração</b>	<b>Nº de animais</b>	<b>Nº de animais</b>	<b>Mortalidade</b>
<b>ppm</b>	<b>utilizados</b>	<b>mortos</b>	<b>(%)</b>
<b>100</b>	30	30	100
DMSO 1%	30	0	0
Água	30	0	0
<b>80</b>	30	30	100
DMSO 1%	30	0	0
Água	30	0	0
<b>50</b>	30	28	93.33
DMSO 1%	30	0	0
Água	30	0	0

**ANEXO 03**

Atividade moluscicida do extrato das folhas de *Peperomia trineura* em *Biomphalaria glabrata* em diferentes concentrações, observada ao longo de 10 dias da exposição.

<b>Concentração</b>	<b>Nº de animais utilizados</b>	<b>Nº de animais mortos</b>	<b>Mortalidade (%)</b>
<b>100</b>	30	30	100
DMSO 1%	30	0	0
Água	30	0	0
<b>80</b>	30	30	100
DMSO 1%	30	0	0
Água	30	0	0
<b>60</b>	30	30	100
DMSO 1%	30	0	0
Água	30	0	0
<b>50</b>	30	15	50
DMSO 1%	30	0	0
Água	30	0	0

**ANEXO 04**

Atividade moluscicida do extrato das folhas de *Peperomia rubricaulis* em *Biomphalaria glabrata* na concentração de 100 ppm, observada ao longo de 10 dias da exposição.

<b>Concentração ppm</b>	<b>Nº de animais utilizados</b>	<b>Nº de animais mortos</b>	<b>Mortalidade (%)</b>
<b>100</b>	30	0	0
DMSO 1%	30	0	0
Água	30	0	0

Atividade moluscicida do extrato das folhas de *Peperomia blanda* em *Biomphalaria glabrata* na concentração de 100 ppm, observada ao longo de 10 dias da exposição.

<b>Concentração ppm</b>	<b>Nº de animais utilizados</b>	<b>Nº de animais mortos</b>	<b>Mortalidade (%)</b>
<b>100</b>	30	1	3.33
DMSO 1%	30	0	0
Água	30	0	0

**ANEXO 05**

Atividade moluscicida da substância ativa, ácido caldensínico, extraído de folhas de *Piper caldense*, em *Biomphalaria glabrata* em diferentes concentrações, observada ao longo de 10 dias da exposição.

<b>Concentração ppm</b>	<b>Nº de animais utilizados</b>	<b>Nº de animais mortos</b>	<b>Mortalidade (%)</b>
<b>20</b>	30	30	100
DMSO 1%	30	0	0
Água	30	0	0
<b>10</b>	30	30	100
DMSO 1%	30	0	0
Água	30	0	0
<b>9</b>	30	18	63,33
DMSO 1%	30	0	0
Água	30	0	0
<b>8</b>	30	15	50
DMSO 1%	30	0	0
Água	30	0	0
<b>5</b>	30	9	30
DMSO 1%	30	0	0
Água	30	0	0

**ANEXO 06**

Atividade ovicida do extrato das folhas de *Piper cubataonum* na concentração de 100 ppm, observada no período de 7 dias, a partir da exposição de 24 horas, nos estádios embrionários de blástula e gástrula de *Biomphalaria glabrata*.

<b>Estádio</b>	<b>Concentração ppm</b>	<b>Nº de embriões</b>	<b>Nº de embriões mortos em 24 horas (%)</b>	<b>Nº de embriões com malformações</b>	<b>Nº total de embriões mortos (%)</b>
	100	87	0	0	0
<b>Blástula</b>	DMSO 1%	54	0	0	0
	Água	57	5,56	0	5,56
	100	93	7,52	0	7,52
<b>Gástrula</b>	DMSO 1%	87	2,29	0	2,29
	Água	90	2,22	0	2,22

**ANEXO 07**

Atividade ovicida do extrato das folhas de *Piper caldense* na concentração de 100 ppm, observada no período de 7 dias, a partir da exposição de 24 horas, nos estádios embrionários de *Biomphalaria glabrata*.

<b>Estádio</b>	<b>Concentração ppm</b>	<b>Nº de embriões</b>	<b>Nº de embriões mortos em 24 horas (%)</b>	<b>Nº de embriões com malformações</b>	<b>Nº total de embriões mortos (%)</b>
	100	119	100	0	100
<b>Blástula</b>	DMSO 1%	88	0	0	0
	Água	77	0	0	0
	100	82	87,80	3,66	91,46
<b>Gástrula</b>	DMSO 1%	97	3,09	1,03	4,12
	Água	56	0	1,78	1,78
	100	122	86,06	0	100
<b>Trocófora</b>	DMSO 1%	70	0	0	0
	Água	85	0	1,17	1,17
	100	112	66,96	3,57	70,53
<b>Véliger</b>	DMSO 1%	92	0	0	0
	Água	117	0	0,85	0,85
	100	66	59,09	6,06	65,15
<b>Hipo</b>	DMSO 1%	70	8,57	0	8,57
	Água	43	0	0	0

## ANEXO 08

Atividade ovicida do extrato das folhas de *Piper caldensena* concentração de 80 ppm, observada no período de 7 dias, a partir da exposição de 24 horas, nos estádios embrionários de *Biomphalaria glabrata*.

Estádio	Concentração ppm	Nº de embriões	Nº de embriões mortos em 24 horas (%)	Nº de embriões com malformações	Nº total de embriões mortos (%)
	80	98	80,61	0	100
<b>Blástula</b>	DMSO 1%	85	0	0	0
	Água	86	0	0	0
	80	107	89,71	0,94	90,65
<b>Gástrula</b>	DMSO 1%	100	0	0	0
	Água	110	0	0,90	0,90
	80	68	35,29	0	66,17
<b>Trocófora</b>	DMSO 1%	67	0	0	0
	Água	67	0	0	0
	80	66	22,72	1,51	48,48
<b>Véliger</b>	DMSO 1%	58	0	0	0
	Água	53	0	0	0
	80	70	12,85	0	34,28
<b>Hipo</b>	DMSO 1%	71	0	1,40	1,40
	Água	68	0	0	0



**ANEXO 09**

Atividade ovicida do extrato das folhas de *Piper cernuum* na concentração de 100 ppm, observada no período de 7 dias, a partir da exposição de 24 horas, nos estádios embrionários de blástula, gástrula e trocófora de *Biomphalaria glabrata*.

<b>Estádio</b>	<b>Concentração ppm</b>	<b>Nº de embriões</b>	<b>Nº de embriões mortos em 24 horas (%)</b>	<b>Nº de embriões com malformações</b>	<b>Nº total de embriões mortos (%)</b>
	100	61	0	0	0
<b>Blástula</b>	DMSO 1%	59	0	0	0
	Água	53	0	0	0
	100	56	1,78	0	1,78
<b>Gástrula</b>	DMSO 1%	29	0	0	0
	Água	22	0	0	0
	100	70	0	0	0
<b>Trocófora</b>	DMSO 1%	25	0	0	0
	Água	39	0	0	0

## ANEXO 10

Atividade ovicida do extrato das folhas de *Peperomia trineura* na concentração de 100 ppm, observada no período de 7 dias, a partir da exposição de 24 horas, nos estádios embrionários de *Biomphalaria glabrata*.

Estádio	Concentração ppm	Nº de embriões	Nº de embriões mortos em 24 horas (%)	Nº de embriões com malformações	Nº total de embriões mortos (%)
	100	89	100	0	100
<b>Blástula</b>	DMSO 1%	53	0	0	0
	Água	55	0	0	0
	100	62	100	0	100
<b>Gástrula</b>	DMSO 1%	49	0,49	0	0,49
	Água	54	0	0	0
	100	81	100	0	100
<b>Trocófora</b>	DMSO 1%	55	0	0	0
	Água	75	0	0	0
	100	121	100	0	100
<b>Véliger</b>	DMSO 1%	79	0	0,79	0,79
	Água	99	0	0	0
	100	53	100	0	100
<b>Hipo</b>	DMSO 1%	26	0	0	0
	Água	32	0	3,12	3,12

## ANEXO 11

Atividade ovicida do extrato de folhas de *Peperomia trineura* na concentração de 95 ppm, observada no período de 7 dias, a partir da exposição de 24 horas, nos estádios embrionários de *Biomphalaria glabrata*.

Estádio	Concentração ppm	Nº de embriões	Nº de embriões mortos em 24 horas (%)	Nº de embriões com malformações	Nº total de embriões mortos (%)
	95	79	100	0	100
<b>Blástula</b>	DMSO 1%	74	0	0	0
	Água	141	0	0	0
	95	145	100	0	100
<b>Gástrula</b>	DMSO 1%	134	0	0	0
	Água	143	0	0	0
	95	103	61,16	38,84	100
<b>Trocófora</b>	DMSO 1%	107	0	0	0
	Água	95	0	0	0
	95	84	2,38	0	55,95
<b>Véliger</b>	DMSO 1%	79	0	0	0
	Água	77	0	0	0
	95	100	21	0	79
<b>Hipo</b>	DMSO 1%	77	0	0	0
	Água	79	2,53	0	2,53

## ANEXO 12

Atividade ovicida do extrato de folhas de *Peperomia trineura* na concentração de 90 ppm, observada no período de 7 dias, a partir da exposição de 24 horas, nos estádios embrionários de *Biomphalaria glabrata*.

Estádio	Concentração ppm	Nº de embriões	Nº de embriões mortos em 24 horas (%)	Nº de embriões com malformações	Nº total de embriões mortos (%)
	90	159	100	0	100
<b>Blástula</b>	DMSO 1%	99	0	0	0
	Água	132	0	0	0
	90	104	100	0	100
<b>Gástrula</b>	DMSO 1%	87	0	0	0
	Água	106	0	0	0
	90	79	89,87	10,13	100
<b>Trocófora</b>	DMSO 1%	80	0	0	0
	Água	58	0	0	0
	90	55	0	0	87,27
<b>Véliger</b>	DMSO 1%	75	1,33	0	1,33
	Água	73	0	0	0
	90	83	13,25	0	53,01
<b>Hipo</b>	DMSO 1%	78	0	0	0
	Água	86	0	0	0

**ANEXO 13**

Atividade ovicida do extrato de folhas de *Peperomia trineura* na concentração de 80 ppm, observada no período de 7 dias, a partir da exposição de 24 horas, nos estádios embrionários de *Biomphalaria glabrata*.

<b>Estádio</b>	<b>Concentração ppm</b>	<b>Nº de embriões</b>	<b>Nº de embriões mortos em 24 horas (%)</b>	<b>Nº de embriões com malformações</b>	<b>Nº total de embriões mortos (%)</b>
	80	122	100	0	100
<b>Blástula</b>	DMSO 1%	71	1,22	0	1,22
	Água	76	0	0	0
	80	116	100	0	100
<b>Gástrula</b>	DMSO 1%	79	0	0	0
	Água	73	0	0	0
	80	131	100	0	100
<b>Trocófora</b>	DMSO 1%	106	0	0	0
	Água	130	0	0	0
	80	73	12,5	76,38	88,88
<b>Véliger</b>	DMSO 1%	64	0	0	0
	Água	64	0	0	0
	80	94	32,98	48,93	81,91
<b>Hipo</b>	DMSO 1%	89	0	0	0
	Água	90	0	0	0

## ANEXO 14

Atividade ovicida do extrato de folhas de *Peperomia trineura* na concentração de 60 ppm, observada no período de 7 dias, a partir da exposição de 24 horas, nos estádios embrionários de blástula, gástrula e trocófora de *Biomphalaria glabrata*.

Estádio	Concentração ppm	Nº de embriões	Nº de embriões mortos em 24 horas (%)	Nº de embriões com malformações	Nº total de embriões mortos (%)
	60	56	0	0	100
<b>Blástula</b>	DMSO 1%	55	0	0	0
	Água	46	0	0	0
	60	66	0	0	100
<b>Gástrula</b>	DMSO 1%	60	0	0	0
	Água	59	0	0	0
	60	66	22,72	0	93,93
<b>Trocófora</b>	DMSO 1%	45	0	0	0
	Água	69	1,44	0	1,44
	60	105	64,76	25,71	90,47
<b>Véliger</b>	DMSO 1%	63	0	0	0
	Água	140	0	0	0
	60	147	62,58	19,73	82,31
<b>Hipo</b>	DMSO 1%	152	0	0	0
	Água	138	0	0	0

## ANEXO 15

Atividade ovicida do extrato de folhas de *Peperomia trineura* na concentração de 50 ppm, observada no período de 7 dias, a partir da exposição de 24 horas, nos estádios embrionários de *Biomphalaria glabrata*.

Estádio	Concentração ppm	Nº de embriões	Nº de embriões mortos em 24 horas (%)	Nº de embriões com malformações	Nº total de embriões mortos (%)
	50	78	55,12	44,88	100
<b>Blástula</b>	DMSO 1%	82	0	0	0
	Água	79	0	0	0
	50	57	64,91	35,09	100
<b>Gástrula</b>	DMSO 1%	47	0	0	0
	Água	50	0	0	0
	50	88	63,63	36,37	100
<b>Trocófora</b>	DMSO 1%	76	0	0	0
	Água	72	0	0	0
	50	95	47,36	43,16	90,52
<b>Véliger</b>	DMSO 1%	71	0	0	0
	Água	86	0	1,16%	1,16
	50	80	33,75	55%	88,75
<b>Hipo</b>	DMSO 1%	56	1,78	0	1,78
	Água	56	0	0	0

**ANEXO 16**

Atividade ovicida do extrato de folhas de *Peperomia rubricaulis* na concentração de 100 ppm, observada no período de 7 dias, a partir da exposição de 24 horas, nos estádios embrionários de *Biomphalaria glabrata*.

<b>Estádio</b>	<b>Concentração PPM</b>	<b>Nº de embriões</b>	<b>Nº de embriões mortos em 24 horas (%)</b>	<b>Nº de embriões com malformações</b>	<b>Nº total de embriões mortos (%)</b>
	100	89	100	0	100
<b>Blástula</b>	DMSO 1%	53	0	0	0
	Água	55	0	0	0
	100	62	100	0	100
<b>Gástrula</b>	DMSO 1%	49	0,49	0	0,49
	Água	54	0	0	0
	100	81	100	0	100
<b>Trocófora</b>	DMSO 1%	55	0	0	0
	Água	75	0	0	0
	100	121	100	0	100
<b>Véliger</b>	DMSO 1%	79	0	0,79	0,79
	Água	99	0	0	0
	100	53	100	0	100
<b>Hipo</b>	DMSO 1%	26	0	0	0
	Água	32	0	3,12	3,12



## ANEXO 17

Atividade ovicida do extrato de folhas de *Peperomia rubricaulis* na concentração de 80 ppm, observada no período de 7 dias, a partir da exposição de 24 horas, nos estádios embrionários de *Biomphalaria glabrata*.

Estádio	Concentração ppm	Nº de embriões	Nº de embriões mortos em 24 horas (%)	Nº de embriões com malformações	Nº total de embriões mortos (%)
	80	122	100	0	100
<b>Blástula</b>	DMSO 1%	71	1,22	0	1,22
	Água	76	0	0	0
	80	116	100	0	100
<b>Gástrula</b>	DMSO 1%	79	0	0	0
	Água	73	0	0	0
	80	131	100	0	100
<b>Trocófora</b>	DMSO 1%	106	0	0	0
	Água	130	0	0	0
	80	73	12,5	76,38	88,88
<b>Véliger</b>	DMSO 1%	64	0	0	0
	Água	64	0	0	0
	80	70	0	2,85	2,85
<b>Hipo</b>	DMSO 1%	67	0	4,47	4,47
	Água	65	0	3,07	3,07

**ANEXO 18**

Atividade ovicida do extrato de folhas de *Peperomia rubricaulis*na concentração de 70 ppm, observada no período de 7 dias, a partir da exposição de 24 horas, nos estádios embrionários de *Biomphalaria glabrata*.

<b>Estádio</b>	<b>Concentração ppm</b>	<b>Nº de embriões</b>	<b>Nº de embriões mortos em 24 horas (%)</b>	<b>Nº de embriões com malformações</b>	<b>Nº total de embriões mortos (%)</b>
	70	67	32,83	4,47	50,74
<b>Blástula</b>	DMSO 1%	67	0	0	0
	Água	63	0	0	0
	70	83	34,93	13,25	49,39
<b>Gástrula</b>	DMSO 1%	77	0	0	0
	Água	81	0	0	0
	70	53	22,64	3,77	52,83
<b>Trocófora</b>	DMSO 1%	53	0	0	0
	Água	57	0	0	0
	70	54	16,66	18,52	35,18
<b>Véliger</b>	DMSO 1%	58	0	0	0
	Água	53	0	0	0
	70	48	20,83	8,33	29,16
<b>Hipo</b>	DMSO 1%	50	0	0	0
	Água	50	0	0	0

**ANEXO 19**

Atividade ovicida do extrato de folhas de *Peperomia rubricaulis*na concentração de 60 ppm, observada no período de 7 dias, a partir da exposição de 24 horas, nos estádios embrionários de blástula, gástrula e trocófora de *Biomphalaria glabrata*.

<b>Estádio</b>	<b>Concentração ppm</b>	<b>Nº de embriões</b>	<b>Nº de embriões mortos em 24 horas (%)</b>	<b>Nº de embriões com malformações</b>	<b>Nº total de embriões mortos (%)</b>
	60	77	18,18	0	18,18
<b>Blástula</b>	DMSO 1%	63	0	0	0
	Água	61	0	0	0
	<b>60</b>	61	0	0	1,63
<b>Gástrula</b>	DMSO 1%	41	0	0	0
	ÁGUA	48	0	0	0
	60	79	0	0	0
<b>Trocófora</b>	DMSO 1%	63	0	0	0
	Água	71	0	0	0

## ANEXO 20

Atividade ovicida do extrato de folhas de *Peperomia blanda* na concentração de 100 ppm, observada no período de 7 dias, a partir da exposição de 24 horas, nos estádios embrionários de blástula, gástrula e trocófora de *Biomphalaria glabrata*.

<b>Estádio</b>	<b>Concentração ppm</b>	<b>Nº de embriões</b>	<b>Nº de embriões mortos em 24 horas (%)</b>	<b>Nº de embriões com malformações</b>	<b>Nº total de embriões mortos (%)</b>
	100	70		1,42	1,42
<b>Blástula</b>	DMSO 1%	53	0	0	0
	ÁGUA	62	1,61	0	1,61
	100	54	0	1,85	1,85
<b>Gástrula</b>	DMSO 1%	47	0	2,12	2,12
	ÁGUA	44	0	4,54	4,54
	100	187	1,60	0	1,60
<b>Trocófora</b>	DMSO 1%	58	3,44	0	3,44
	Água	55	0	0	0

## Anexo 21

Atividade ovicidado ácido caldensínico, na concentração de 20 ppm, observada no período de 7 dias, a partir da exposição de 24 horas, nos estádios embrionários de *Biomphalaria glabrata*.

Estádio	Concentração ppm	Nº de embriões	Nº de embriões mortos em 24 horas (%)	Nº de embriões com malformações	Nº total de embriões mortos (%)
	20	81	1,23	0	1,23
<b>Blástula</b>	DMSO 1%	103	0	0	0
	Água	91	0	0	0
	20	92	0	0	0
<b>Gástrula</b>	DMSO 1%	73	0	0	0
	Água	108	0	0	0
	20	142	0,70	0	0,70
<b>Trocófora</b>	DMSO 1%	99	0	0	0
	Água	129	0	0	0
	20	120	0	0	0
<b>Véliger</b>	DMSO 1%	84	0	0	0
	Água	100	0	0	0
	20	101	0	0	0
<b>Hipo</b>	DMSO 1%	93	0	0	0
	Água	89	0	0	0

## ANEXO 22

Atividade moluscicida de Bayluscide nas concentrações de 0,01% a 0,1%, observada no período de 10 dias, a partir da exposição de 24 horas, em moluscos adultos de *Biomphalaria glabrata*.

Concentração (%)	Nº de animais utilizados	Nº de animais mortos	Mortalidade (%)
<b>0,01</b>	10	0	0
Água	10	0	0
<b>0,02</b>	10	0	0
Água	10	0	0
<b>0,03</b>	10	0	0
Água	10	0	0
<b>0,04</b>	10	0	0
Água	10	0	0
<b>0,05</b>	10	1	10
Água	10	0	0
<b>0,06</b>	10	2	20
Água	10	0	0
<b>0,07</b>	10	4	40
Água	10	0	0
<b>0,08</b>	10	7	70
Água	10	0	0
<b>0,09</b>	10	9	90
Água	10	0	0
<b>0,1</b>	10	10	100
Água	10	0	0