



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

ELIANE SOUZA FIGUEIREDO

**Efeitos Tóxicos dos Extratos Aquosos e Hidroalcoólicos de
Indigofera suffruticosa Sobre *Biomphalaria glabrata*, Cercarias de
Schistosoma mansoni e Larvas de *Artemia salina***

ORIENTADORA: Prof^ª. DR^ª. MARIA TERESA
JANSEM DE ALMEIDA CATANHO
CO-ORIENTADORA: Prof^ª. DR^ª. VERA LÚCIA
DE MENEZES LIMA

RECIFE
FEVEREIRO, 2011

ELIANE SOUZA FIGUEIREDO

**Efeitos Tóxicos dos Extratos Aquosos e Hidroalcoólicos de
Indigofera suffruticosa Sobre *Biomphalaria glabrata*, Cercarias de
Schistosoma mansoni e Larvas de *Artemia salina***

Dissertação apresentada para o cumprimento
das exigências para obtenção do título de
Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco.

Orientadora: Prof^ª. DR^a Maria Teresa Janssem de Almeida Catanho
Co-Orientadora: Prof^ª. Dr^a Vera Lúcia de Menezes Lima

RECIFE
FEVEREIRO, 2011

Figueiredo, Eliane Souza

Efeitos tóxicos dos extratos aquosos e hidralcoólicos de *Indigofera Suffruticosa* sobre *Biomphalaria glabrata*, cercarias de *Schistosoma mansoni* e larvas de *Artemia salina*/ Eliane Souza Figueiredo. – Recife: O Autor, 2011.

86 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Maria Teresa Jansem de Almeida Catanho

Co-orientadora: Vera Lúcia de Menezes Lima

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Bioquímica e Fisiologia, 2011.

Inclui bibliografia e anexos

1. Fabaceae 2. *Biomphalaria glabrata* 3. Esquistossomose I. Título.

583.74

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2011-164

Eliane Souza Figueiredo

“Efeitos tóxicos dos extratos aquosos e hidroalcoólicos de *Indigofera suffruticosa* sobre *Biomphalaria glabrata*, cercarias de *Schistosoma mansoni* e larvas de *Artemia salina*”

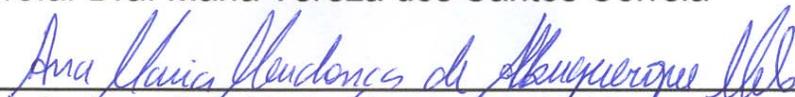
Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco

Aprovado por:

Prof. Dr. Vera Lúcia de Menezes Lima
Presidente

Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho


Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia


Profa. Dra. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo

Data: 23 / 02 / 2011

Dedico este trabalho a minha
mãe, minhas irmãs e ao meu
namorado.

AGRADECIMENTOS

A criação deste trabalho se deu pelas contribuições prestadas por diversas pessoas, as quais desejo agradecer e reconhecer que sem elas nada teria sido possível.

A Deus por sempre me dar forças nos momentos difíceis da vida e me ajudar na conquista de meus objetivos.

À minha orientadora Dr^a Maria Teresa Jansem de Almeida Catanho pelo incentivo, carinho e orientação neste trabalho.

À minha co-orientadora Dr^a Vera Lúcia de Menezes Lima a quem admiro pela inteligência, competência e profissionalismo.

À professora Dr^a Ana Maria Mendonça por toda dedicação, carinho, compreensão, disponibilidade e colaboração na realização deste trabalho, que, apesar das suas inúmeras atividades, apresentou-se sempre receptiva às minhas solicitações.

Ao professor Francisco Fernandes Amâncio por todo carinho e simpatia.

À professora Dr^a Mônica Camelo pela colaboração na avaliação da atividade cercaricida.

Aos meus pais, Heleno e Josefa, pelo amor e apoio e por sempre me darem exemplos de força, coragem e determinação.

Às minhas irmãs Lúcia, Odete, Marinez, Luciene, Adenilza, Verônica e Patrícia que tanto amo, e embora muitas vezes não estando juntas fisicamente sempre me incentivaram em minhas lutas e conquistas.

Ao meu namorado Giancarlo pelo apoio recebido e pela compreensão em dividir a atenção merecida com os tempos de estudo e pelo carinho, amor e dedicação.

À minha grande amiga Renata que sempre esteve ao meu lado me apoiando e ajudando em todos os momentos, pelos ensinamentos e por acreditar e me fazer crer que era possível.

Às amigas Dalila e Natália, que caminharam comigo durante o mestrado, pelo carinho e companheirismo.

Aos colegas do Laboratório, Luana, Renata e Dewson, os quais de alguma forma me ajudaram

Ao colega Thiago pela sua ajuda indispensável na realização da análise estatística deste trabalho.

A CAPES pelo apoio e incentivo à pesquisa.

A todos os colegas dos Laboratórios de Biofísica e Radiobiologia, Imunologia e Lipídeos.

Aos amigos que conquistei ao longo da minha vida agradeço a fidelidade, o carinho que encontro sempre que procuro e todos os instantes que me apoiaram e incentivaram.

A todos que de forma direta ou indiretamente contribuíram neste trabalho. Saibam que mesmo não citados, vocês não deixaram de ser importantes nesta conclusão.

RESUMO

Indigofera suffruticosa Mill é um arbusto da família Fabaceae conhecido popularmente como anil. É uma planta distribuída em regiões tropicais e subtropicais, sendo utilizada na medicina popular contra diversos problemas de saúde. Este trabalho avalia a atividade tóxica de extrato aquoso e hidroalcoólico das folhas da *I. suffruticosa* sobre caramujos adultos e na fase embrionária de *B. glabrata* expostos as concentrações de 0, 125, 250, 500, 750 e 1000 ppm por 96 horas. Outros aspectos observados foram à atividade cercaricida dos extratos após 120 minutos (min) de exposição nas mesmas concentrações acima citadas e a análise da atividade artemicida dos extratos após 24 horas de exposição, nas mesmas concentrações acima citadas. Após o término do período de exposição observou-se que o extrato aquoso na concentração de 500 ppm provocou redução na taxa de fecundidade e fertilidade dos caramujos adultos para 53,9% e 49,6 %, respectivamente, e o extrato hidroalcoólico, para 44,7% e 40,4%, respectivamente. O estudo da embriotoxicidade mostrou que na concentração de 250 ppm do extrato aquoso apresentou 26,0% de inviabilidade enquanto que o hidroalcoólico apresentou 53,0%. A atividade cercaricida do extrato aquoso apresentou forte toxicidade na concentração de 250 ppm e após 120 min de exposição, enquanto o extrato hidroalcoólico apresentou forte toxicidade na concentração de 125 ppm e após 120 min. Em relação à atividade artemicida o extrato aquoso na concentração de 250 ppm provocou a morte de 36,3% das larvas, enquanto o hidroalcoólico, 64,0%. O estudo mostrou que os extratos aquosos e hidroalcoólicos das folhas da *I. suffruticosa* reduz as taxas de fecundidade e fertilidade, além de possuir propriedades embriotóxicas e cercaricida, indicando uma possível utilização desse material biodegradável ou uma fração dela derivada em programas de controle da Esquistossomose mansônica.

Palavras-chave: *Indigofera suffruticosa*; *Biomphalaria glabrata*; *Artemia salina*; atividade cercaricida; toxicidade.

ABSTRACT

Indigofera suffruticosa Mill is a shrub of the Fabaceae popularly known as indigo. It is a plant distributed in tropical and subtropical regions, being used in folk medicine against various health problems. This study evaluates the toxic activity of hydroalcoholic and aqueous extracts of leaves of *I. suffruticosa* on adult snails and in the early stage of *B. glabrata* exposed to concentrations of 0, 125, 250, 500, 750 and 1000 ppm for 96 hours. Other aspects were observed cercaricide activity of the extracts after 120 minutes (min) exposure of the same concentrations mentioned above and analysis of the activity of the extracts artemicida after 24 hours of exposure at the same concentrations above. Upon completion of the exposure period showed that the aqueous extract at a concentration of 500 ppm caused a reduction in fertility rate and fertility of adult snails to 53.9% and 49.6%, respectively, and hydroalcoholic to 44.7% and 40.4% respectively. The study showed embryotoxicity at a concentration of 250 ppm of the aqueous extract showed 26.0% of infeasibility while the hydroalcoholic showed 53.0%. Cercaricide activity of aqueous extract showed strong cytotoxicity at a concentration of 250 ppm and after 120 I exposure, while the hydroalcoholic extract showed strong toxicity at concentration of 125 ppm and 120 after me. Regarding artemicida activity in the aqueous concentration of 250 ppm caused the death of 36.3% larvae, while the hydroalcoholic, 64.0%. The study showed that hydroalcoholic and aqueous extracts of leaves of *I. suffruticosa* reduces fertility rates and fertility, also has embryotoxic properties and cercaricide, indicating a possible use of biodegradable material or a fraction derived therefrom in control program of Schistosomiasis mansoni.

Keywords: *Indigofera suffruticosa*, *Biomphalaria glabrata*, *Artemia salina*; cercaricide activity, toxicity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01.** Distribuição do *Schistosoma mansoni* e *Biomphalaria* nos continentes americanos, africanos e asiáticos (Morgan *et al.*, 2001). 15
- Figura 02.** Distribuição geográfica da esquistossomose mansônica no Brasil (Rey, 2001). 16
- Figura 03.** Distribuição dos vetores da esquistossomose na América do Sul (Paraense, 2001). 17
- Figura 04:** Caramujo adulto (A); Embriões no estágio de blátula (B). 19
- Figura 05.** Principais estádios embrionários de *Biomphalaria tenagophila* (Microscopia Eletrônica de Varredura) cujo desenvolvimento é igual ao de *B. glabrata* (Camey & Verdonk, 1970). 1A – ovo indiviso; 1B – primeira clivagem; 2 - estágio de dois blastômeros; 3, 4 e 5 - sequência de aproximação dos blastômeros e aparecimento da cavidade de clivagem; 6 – início da segunda clivagem; 7 e 8 – estádios de quatro blastômeros; 9 e 10 – estádios de oito células; 11 – estágio de doze células; 12 – estágio de blástula, 15 horas após a 1ª clivagem; 13 e 14 – estádios de gástrula, após 26 horas; 15 – estágio de trocófora jovem, após 43 horas; 16 – estágio de trocófora, após 66 horas; 17 – estágio de véliger jovem, após 96 horas; 18 – estágio de véliger, após 120 horas. A, pólo animal; BL, blastóporo; CC, cavidade de clivagem; CP, corpúsculo polar; mi, micrômeros; ma, macrômeros; V, pólo vegetativo. 21
- Figura 06.** Ciclo evolutivo do *Schistosoma mansoni*. A – Parasitos adultos; B – Indivíduo portador da esquistossomose eliminando fezes próximo a um rio; C – Ovo eclode na água e libera o miracídio; D – Penetração e transformação do miracídio no interior do hospedeiro; E – Liberação de cercaria (Rey, 2001). 22
- Figura 07.** *Artemia salina* 34
- Figura 08.** *Indigofera suffruticosa* Mill. **A:** Ramos com folhas; **B:** Ramos com folhas e sementes; **C:** Ramos de flores; **D:** Vista parcial de um indivíduo adulto. 37
- Figura 09.** Fórmula estrutural do índigo. 39

ARTIGO

- Figure 1** -Analysis of fecundity and fertility of *B. glabrata* adults exposed for 96 hours at different concentrations of aqueous extract of *I. suffruticosa*. 66
- Figure 2-** Analysis of fertility and fecundity *B. glabrata* adults exposed for 96 hours at different concentrations of hydroalcoholic extract of *I. suffruticosa*. 67

Figure 3 - Analysis of feasibility and infeasibility of embryos of *B. glabrata* in the blastocyst stage for 96 hours exposed to aqueous (A) and hydroalcoholic (B) *I. suffruticosa*. 68

Figure 4 - Analysis of the toxicity of aqueous extracts (A) and hydroalcoholic (B) of leaves of *I. suffruticosa* on larvae of *A. salina* exposed for 24 hours..... 71

LISTA DE TABELAS

Table 1: Mortality of adult snails of *B. glabrata* exposed for 96 hours at different Concentrations of aqueous and hydroalcoholic extracts of leaves *I. suffruticosa*..... 65

Table 2 - Analysis of the number of cercariae exposed to aqueous extract of leaves of *I. suffruticosa* for 120min. 70

Table 3 - Analysis of the number of cercariae exposed to the hydroalcoholic extract of leaves of *I. suffruticosa* por 120min. 70

Sumário

1. INTRODUÇÃO	12
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	14
2.1 Esquistossomose.....	14
2.2 Esquistossomose mansônica no Brasil.....	15
2.3 Parasito e hospedeiro intermediário do <i>Schistosoma mansoni</i>.....	16
2.3.1 Biologia do <i>B. glabrata</i>	18
2.3.2 Embrionários do <i>B. glabrata</i>	19
2.3.3 Ciclo evolutivo do <i>S. mansoni</i> e profilaxia	21
2.4 Controle do Caramujo Hospedeiro.....	26
2.4.1 Métodos ambientais.....	27
2.4.2 Métodos biológicos	27
2.4.3 Métodos químicos	29
2.4.4 Moluscidas naturais ou de origem vegetal.....	30
2.5 Testes ecotoxicológicos	32
2.5.1 Toxicidade Aguda	32
2.5.2 Toxicidade Crônica	33
2.6 Bioensaio com <i>Artemia salina</i>	33
2.7 <i>Indigofera suffruticosa</i>	35
3. OBJETIVOS	40
3.1 Objetivo geral.....	40
3.2 Objetivos específicos.....	40
4. REFERÊNCIAS	41
5. ARTIGO.....	55
6. CONCLUSÃO.....	83

1. INTRODUÇÃO

A esquistossomose ocupa o segundo lugar no ranking das enfermidades com maior área de endemismo e prevalência no mundo. Ocorre em 74 países tropicais e subtropicais dos continentes Americano, Africano e Asiático, e estima-se que 200 milhões de pessoas estejam infectadas e 600 milhões sujeitas ao risco de infecção devido a problemas econômicos, culturais e de saúde pública (WHO, 1993; CHITSULO et al., 2000).

A elevada prevalência dessa doença está diretamente relacionada ao contato humano com águas infestadas por cercarias. Parte desse contato é de natureza profissional e, até certo ponto, inevitável, mas a grande incidência na transmissão da esquistossomose ocorre durante a utilização da água para fins domésticos e de recreação (SANTOS, 1997).

Uma das ações recomendadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para o controle da esquistossomose, além da implementação de medidas de saneamento e do tratamento dos doentes, é o emprego de moluscicidas para reduzir as populações dos caramujos adultos hospedeiros intermediários, em locais onde a doença é endêmica (WHO, 1993). A niclosamida, comercializada com o nome de Bayluscide WP70[®], na forma de pó, contém 70% de sal de etanolamina, sendo o moluscicida sintético mais indicado por apresentar ação letal em todos os estádios do ciclo de vida do caramujo e ser atóxico para plantas aquáticas, animais domésticos e homem. Porém, é caro, tóxico para peixes e outros organismos aquáticos, decompõem-se sob ação da luz solar e sua aplicação não previne a recolonização pelos caramujos, devido aos seus mecanismos de escape (GIOVANELLI et al., 2002).

Desde 1930, propriedades moluscicidas de extratos de plantas têm sido estudadas, com o intuito de desenvolver tecnologias acessíveis e baratas apropriadas para o uso local em comunidade no controle do caramujo vetor da esquistossomose (MENDES et al., 1997)

A espécie *Indigofera suffruticosa* Mill é uma planta da Antilha e América Central (ALMEIDA, 1993) e encontra-se distribuída por toda América tropical

(CESÁRIO, 1980). No Brasil há registro da espécie nos estados do Mato Grosso (FERNANDES, 1987), Alagoas (RIBEIRO et al., 1984), Paraíba (RIET-CORREA, 2000), Ceará, Rio Grande do Norte, Pará e Pernambuco (NETO et al., 2001).

Típicos em leguminosas, as *Indigoferas* têm alto teor em proteínas, têm habilidade para tolerar a seca, inundações e elevadas salinidades, (SHERMAN, 1982). A origem do nome *Indigofera* provém da palavra alemã Índigo, que significa produção de pigmento azul (Índigo Blue) (PENSAVENTO, 2005).

Segundo PARRISH (1995) testes de toxicidade aguda com organismos aquáticos têm sido amplamente utilizados para determinar os efeitos de substâncias potencialmente tóxicas desde a Segunda Guerra Mundial.

A toxicidade aguda produz efeitos adversos, correspondendo a uma resposta severa e rápida (poucas horas a poucos dias), após a administração de uma única dose ou doses múltiplas de um composto, ocasionando geralmente uma elevada mortalidade (ABEL, 1989). A dose única é utilizada para determinar um efeito tóxico mensurável (SILVA, 2002).

A *Artemia salina*, também conhecida como camarão de água salgada, se encaixa na ordem Anostraca da classe Branchiopoda. Juntamente com outros Branchiopodas, a Anostraca representa a mais primitiva forma de vida crustácea. Devido a sua grande sensibilidade frente a uma grande variedade de compostos, a possibilidade de estocar seus ovos por anos à temperatura ambiente e, a obtenção de suas larvas entre 24-48 horas, a *A. salina* tem sido muito utilizada como organismo-alvo indicador de toxicidade em bioensaios. Por ser um indicador de toxicidade, este bioensaio consegue detectar uma grande variedade de bioatividades que podem ser inerentes à planta e, possivelmente seriam ignorados em testes biológicos específicos (SANTOS, 1997).

A busca por substâncias naturais e biodegradáveis visando combater a transmissão da esquistossomose justifica a investigação das propriedades tóxicas sobre *B. glabrata*, da atividade cercaricida e artemicida dos extratos aquosos e hidroalcoólicos da *I. suffruticosa*.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Esquistossomose

A esquistossomose é uma doença endêmica, silenciosa, parasitária que ocorre em 74 países tropicais e subtropicais dos continentes americano, africano e asiático. Estima-se que 200 milhões de pessoas estejam infectadas e 600 milhões sujeitas ao risco de infecção devido a problemas econômicos, culturais e de saúde pública (WHO, 1993) e (WHO, 2010).

É uma doença transmitida por caramujos que habitam a África e as Américas, e tem como principais agentes etiológicos as espécies *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium* e *Schistosoma japonicum* (BRICKER & BRUCE, 1978).

Nos últimos 50 anos, projetos têm sido realizados visando o controle da doença. Estudos geraram bons resultados, no entanto, a constante migração ocasionando mudança na distribuição dos portadores da doença fez com que o número de pessoas infectadas e com risco de infecção não fosse reduzido (ENGELS et al., 2002).

A esquistossomose mansônica, causada pelo parasito *Schistosoma mansoni*, ocorre em 54 países e territórios, principalmente na América do Sul, região do Caribe, África e leste do Mediterrâneo (CHISTSULO et al 2000; FUNASA, 2002) (Figura 01). É uma doença autóctone da África, onde concentra 85% dos doentes (UTZINGER et al., 2001). Nas Américas, a doença surgiu inicialmente nos territórios coloniais onde as metrópoles basearam a economia na exploração escravagista, importando mão-de-obra africana. O tráfico de escravos africanos provavelmente introduziu a esquistossomose no Brasil. Dos focos iniciais, relacionados provavelmente com os portos de ingresso e mercados de escravos, a doença se propagou para outras regiões devido ao fluxo de migração com a expansão da agricultura, mineração e pela presença de caramujos hospedeiros suscetíveis, juntamente com as condições ecológicas que favoreceram o ciclo evolutivo do parasito. Assim a endemia instalou-se e a

doença se difundiu para o interior do país (COURA & AMARAL, 2004; REY, 2001).

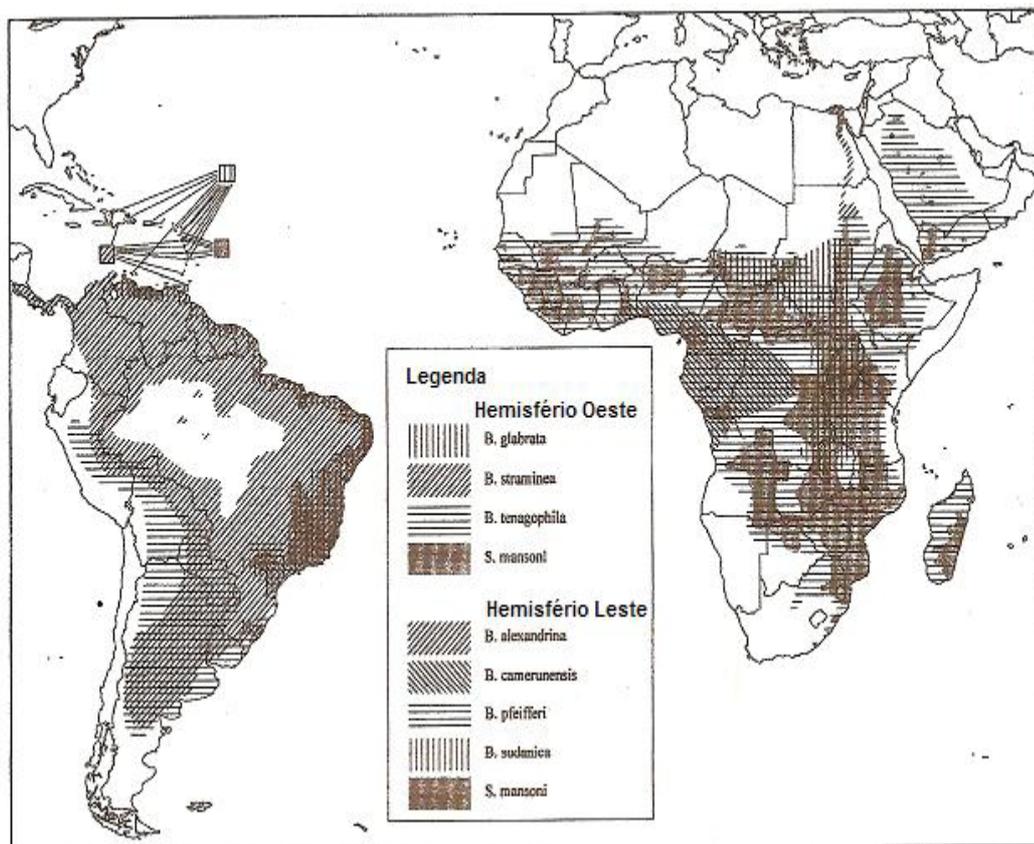


Figura 01. Distribuição do *Schistosoma mansoni* e *Biomphalaria* nos continentes americanos, africanos e asiáticos (MORGAN et al., 2001).

2.2 Esquistossomose mansônica no Brasil

A doença instalou-se no Brasil e a presença do *S. mansoni* foi registrada por Pirajá da Silva, em 1908 na Bahia, com quatro casos (COURA & AMARAL, 2004). No Brasil, a esquistossomose é um problema de saúde, amplamente disseminada, e estima-se que o número de casos da doença esteja entre seis e sete milhões, isto é, cerca de 20% do total de 42 milhões de pessoas que vivem nas áreas endêmicas sob risco da infecção (COURA & AMARAL, 2004; WHO, 2010).

A transmissão da doença ocorre em 19 estados com diferentes intensidades. São regiões endêmicas os estados do Rio Grande do Norte,

Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Minas Gerais e Espírito Santo. Os estados do Ceará, Piauí, Maranhão, Pará, Goiás, Distrito Federal, São Paulo e Rio de Janeiro apresentam focos isolados e, atualmente, focos novos surgiram nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Figura 02) (REY, 2001; FUNASA, 2002; COURA & AMARAL, 2004).

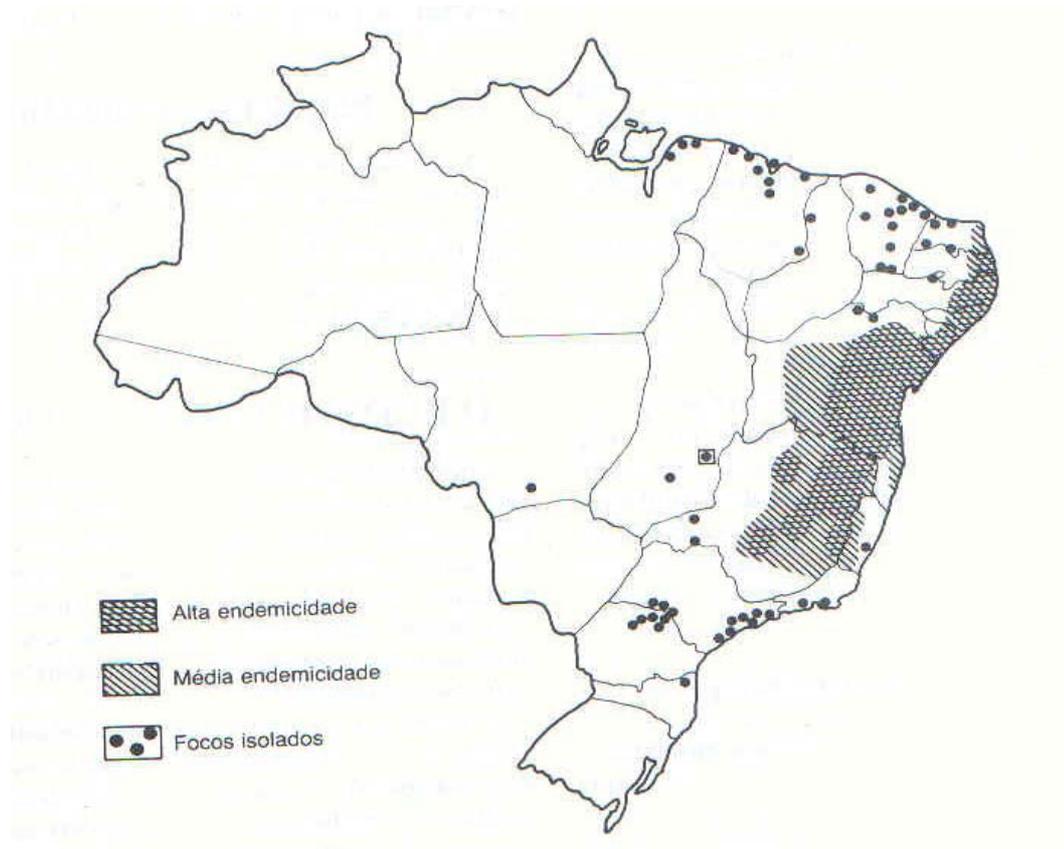


Figura 02. Distribuição geográfica da esquistossomose mansônica no Brasil (REY, 2001).

2.3 Parasito e hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*

O *S. mansoni*, parasito causador da esquistossomose mansônica nas Américas, é um trematódeo digenético que, quando adulto, vive nos vasos sanguíneos do sistema porta-hepático do homem e de alguns mamíferos roedores e marsupiais (CUNHA, 1970; REY, 2001).

Os hospedeiros intermediários do parasito pertencem ao Filo *Mollusca*, Classe *Gastropoda*, Subclasse *Pulmonata*, Ordem *Basommatophora*, Família *Planorbidae* e Gênero *Biomphalaria* (REY, 1991; NEVES, 2004; LUNA et al., 2005). Das 10 espécies de *Biomphalaria* registradas, apenas *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea* são suscetíveis à infecção natural por *S. mansoni* (SOUZA & LIMA, 1990).

Os caramujos hospedeiros podem ocupar vasta área geográfica devido à capacidade de adequação a diversas condições ambientais (Figura 03).



Figura 03. Distribuição dos vetores da esquistossomose na América do Sul (PARAENSE, 2001).

Biomphalaria glabrata é encontrada em todos os estados brasileiros desde a Paraíba até o Rio Grande do Sul e também em algumas áreas do Pará, Maranhão e Piauí, ao norte de Goiás e Mato Grosso no Centro-Oeste. Constitui o mais eficiente vetor da esquistossomose mansônica nas Américas, sendo responsável pelos focos mais ativos. Em laboratório infecta-se, geralmente, com

muita facilidade, em proporções próximas de 100% e nos ambientes naturais já foi encontrada com taxas de positividade da ordem de 70% (REY, 2001).

A distribuição geográfica de *B. tenagophila* abrange os estados do sul do Brasil, desde Mato Grosso a oeste, sul da Bahia e Rio de Janeiro a leste, até o Rio Grande do Sul. Em Geral, é encontrada com taxas de infecção natural muito baixa, mesmo nos períodos mais favoráveis (REY, 2001).

Biomphalaria straminea é encontrada com frequência em quase todas as bacias hidrográficas do Brasil. No Nordeste do país, desempenha importante papel na transmissão da esquistossomose, pois sua abundância em criadouros naturais compensa o fato de apresentar baixas taxas de infecção (REY, 2001).

2.3.1 Biologia do *B. glabrata*

Os caramujos hospedeiros intermediários habitam diversas coleções hídricas de água doce. São hermafroditas, capazes de se reproduzir por autofecundação, mas a cópula entre dois indivíduos, um atuando como macho e outro como fêmea resulta em maior número de descendentes (REY, 2001). Os ovos são postos um a um e envoltos por uma substância gelatinosa transparente.

Devido à cor amarelada da substância gelatinosa dos ovos (Figura 04), o conjunto adquire um aspecto de cápsula amarelada denominada desova, que é oviposta, principalmente, sob folhas de plantas aquáticas submersas. O número de ovos presentes em uma desova pode variar de um a mais de cem. A eclosão em condições de laboratório e a 25°C inicia-se normalmente sete dias após a postura; com cerca de trinta dias, os caramujos podem alcançar a maturidade sexual e começar a desovar, podendo um só indivíduo produzir aproximadamente 10 milhões de descendentes (SOUZA & LIMA, 1990).

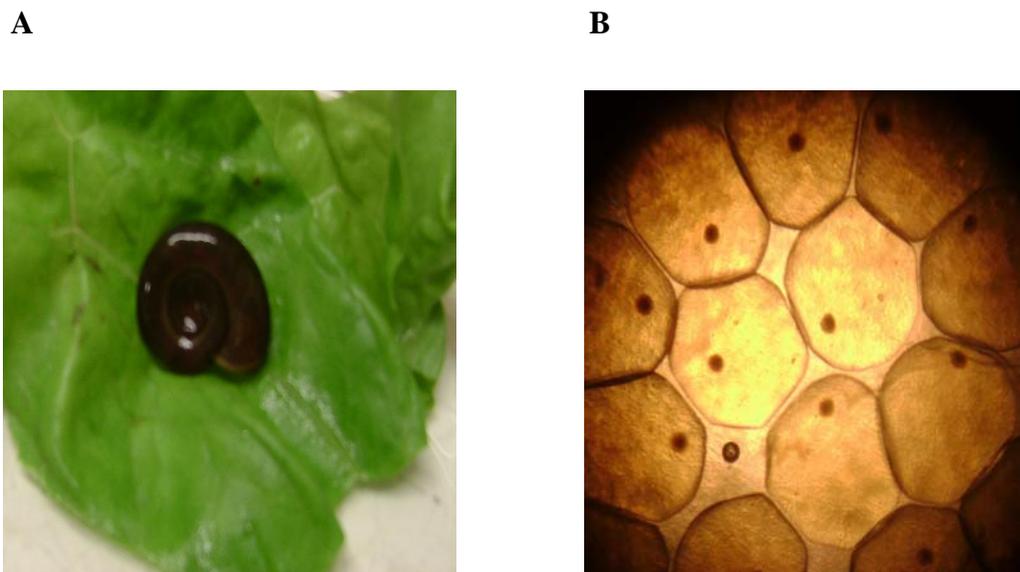


Figura 04: Caramujo adulto (A); Embriões no estágio de blástula (B) (FIGUEIREDO, E. S., 2011)

2.3.2 Embriões do *B. glabrata*

CAMEY & VERDONK (1970) realizaram um estudo da linhagem celular de *B. glabrata* a partir das primeiras clivagens até a ruptura da cápsula da desova e liberação dos caramujos jovens. De acordo com os autores, a primeira clivagem deve ser o ponto de referência temporal para as posteriores observações do desenvolvimento embrionário, devido à variação no tempo que decorre entre a oviposição e a primeira clivagem.

Baseado em KAWANO et al., 1992 e KAWANO et al., 2004 segue abaixo a descrição dos principais eventos que serviram de base para a identificação dos estádios embrionários.

O ovo inicialmente sofre diversas clivagens até alcançar o estágio de blástula, que ocorre aproximadamente entre a 10^a a 23^a hora da primeira clivagem. Nesse estágio ocorrem apenas mitoses, sem aumento de volume celular (Figura 05 – 1A a 12)

No estágio seguinte, de gástrula, que ocorre de 24 a 39 horas após a 1^a clivagem, o embrião sofre um achatamento na região do pólo vegetativo em direção ao pólo animal e ocorre o início de movimentação celular. Nessa fase, o

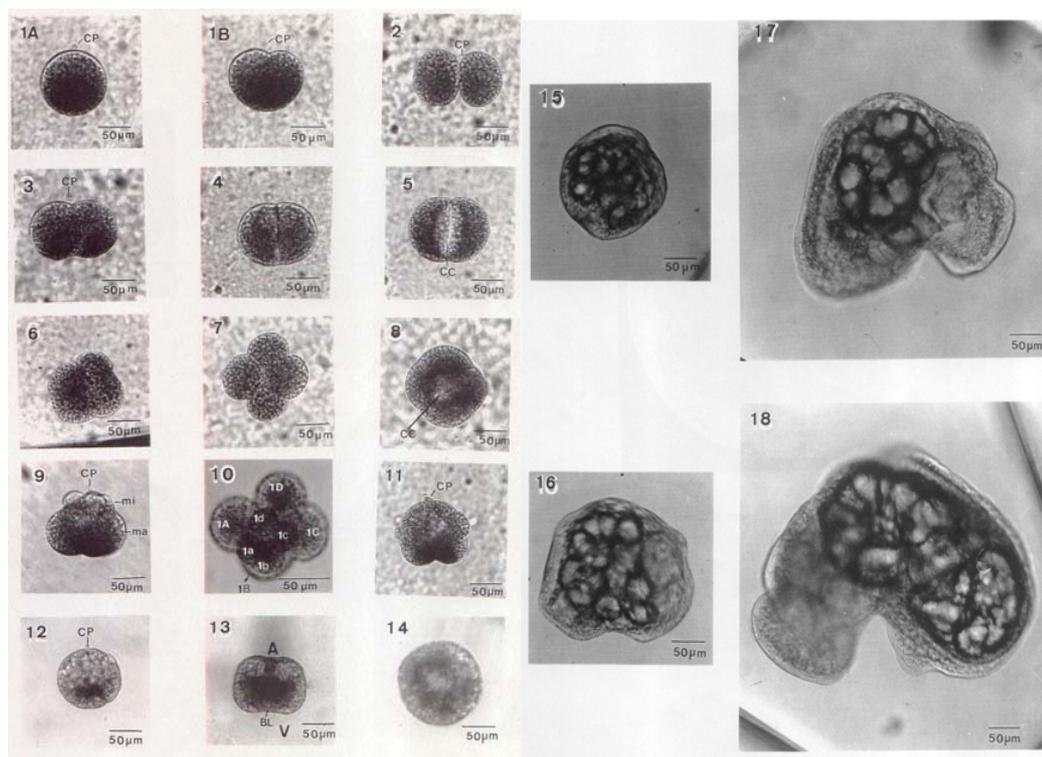
embrião apresenta três camadas celulares: ectoderme, mesoderme e endoderme (Figura 05 – 13 e 14).

O estágio de trocófora ocorre entre as 40^a e 80^a horas após a 1^a clivagem. Nessa fase, ocorre a organogênese. Uma dupla fileira celular situada na região anterior à boca forma o prototróquio, o qual é constituído por um cinturão de cílios que auxiliam na movimentação da larva (Figura 05 – 15 e 16).

O estágio de véliger ocorre entre as 80^a e 120^a horas após a primeira clivagem. Há um desenvolvimento maior da concha e do pé, formação dos olhos, aumento do tamanho dos tentáculos, a concha inicia o enrolamento e cobre todo o corpo; o caramujo possui formação quase completa (Figura 05 – 17 e 18).

O desenvolvimento embrionário de *B. glabrata* é igual ao de *B. tenagophila* (CAMEY & VERDONK, 1970) e *B. straminea* (KAWANO et al., 2004).

O conhecimento da embriologia das espécies de *Biomphalaria* serve de base para estudos de toxicidade. Esses caramujos são bons bioindicadores de efeitos de teratogênicos, pois, além de terem seu desenvolvimento embrionário bem descrito apresentam vantagens como a transparência das cápsulas de desovas e dos ovos e postura em mono camada que facilita a identificação dos efeitos morfogênicos de substâncias diversas sobre os embriões (KAWANO, 1983; KAWANO & SIMÕES, 1987; KAWANO et al., 1992; TALLARICO et al., 2004; ESTEVAM et al., 2006; SILVA et al., 2008).



Fonte: (WATTANABE, 1997)

Figura 05. Principais estádios embrionários de *Biomphalaria tenagophila* (Microscopia Eletrônica de Varredura) cujo desenvolvimento é igual ao de *B. glabrata* (CAMEY & VERDONK, 1970). 1A – ovo indiviso; 1B – primeira clivagem; 2 - estágio de dois blastômeros; 3, 4 e 5 - sequência de aproximação dos blastômeros e aparecimento da cavidade de clivagem; 6 – início da segunda clivagem; 7 e 8 – estádios de quatro blastômeros; 9 e 10 – estádios de oito células; 11 – estágio de doze células; 12 – estágio de blástula, 15 horas após a 1ª clivagem; 13 e 14 – estádios de gástrula, após 26 horas; 15 – estágio de trocófora jovem, após 43 horas; 16 – estágio de trocófora, após 66 horas; 17 – estágio de véliger jovem, após 96 horas; 18 – estágio de véliger, após 120 horas. A, pólo animal; BL, blastóporo; CC, cavidade de clivagem; CP, corpúsculo polar; mi, micrômeros; ma, macrômeros; V, pólo vegetativo.

2.3.3 Ciclo evolutivo do *S. mansoni* e profilaxia

Os ovos de *S. mansoni* postos pelas fêmeas que migram em direção ao intestino no interior dos vasos sanguíneos do sistema porta hepático atravessam a mucosa intestinal do indivíduo portador da esquistossomose mansônica e são eliminados com as fezes. Em contato com a água, os miracídios liberam-se dos ovos durante o período de vida de 24 a 36 horas, nadam até encontrar o caramujo hospedeiro, onde penetram pelo tegumento. Por reprodução assexuada, os miracídios transformam-se em esporocistos primários, que produzem internamente esporocistos secundários; estes desenvolvem cercarias de cauda bifurcada após 25 a 35 dias. As cercarias, por estímulo de luz e calor, deixam o

caramujo e passam para a água, onde nadam à procura de contato com o hospedeiro vertebrado; neste penetram ativamente através da pele e perdem a cauda. Após a penetração no vertebrado, as cercarias dão origem a esquistossômulos, que podem ser destruídos na derme ou ganhar a circulação geral, sendo arrastadas para o coração e pulmões, de onde migram ativamente até o fígado. Ao chegar ao sistema porta intra-hepático, os esquistossômulos desenvolvem-se até a fase adulta 28 a 48 dias após a penetração no órgão. Os vermes adultos machos e fêmeas acasalam-se e migram para as vênulas da parede intestinal, caminhando contra a corrente sanguínea da veia porta e das veias mesentéricas. As fêmeas eliminam ovos um a um, em fila, até 300 por dia. Cerca de 22% dos ovos chegam a luz intestinal e saem com as fezes, e o restante fica retido nos tecidos do fígado e paredes do intestino, dando origem a granulomas. Os parasitos podem viver 20 a 25 anos no organismo humano não tratado (Figura 06) (CUNHA, 1970; SOUZA & LIMA, 1990; REY, 2001).

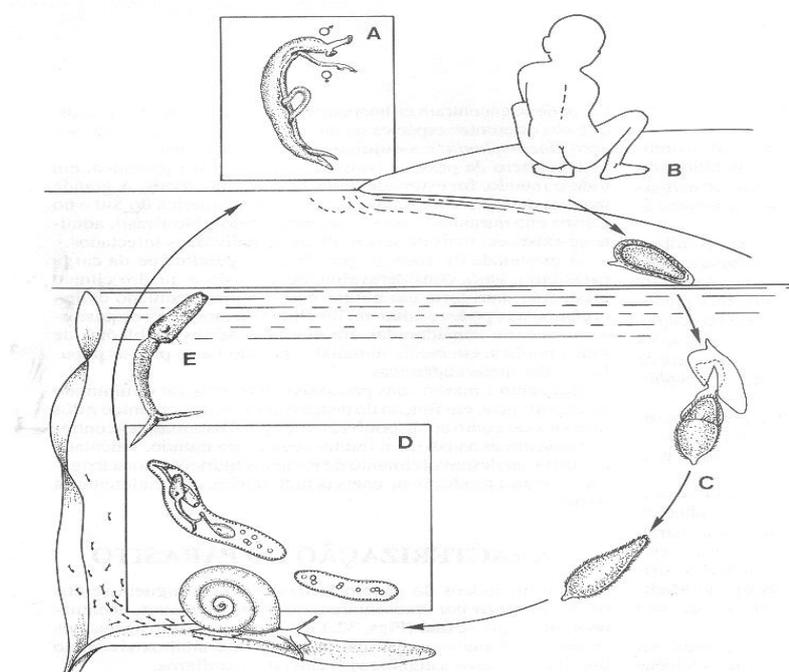


Figura 06. Ciclo evolutivo do *Schistosoma mansoni*. A – Parasitos adultos; B – Indivíduo portador da esquistossomose eliminando fezes próximo a um rio; C – Ovo eclode na água e libera o miracídio; D – Penetração e transformação do miracídio no interior do hospedeiro; E – Liberação de cercaria (REY, 2001).

A esquistossomose mansônica é uma das poucas doenças parasitárias cuja distribuição e prevalência, em escala mundial, continuam a aumentar. É típica de regiões carentes de saneamento básico, regiões que utilizam água contaminada na agricultura, regiões com pouco acesso às medidas de controle, contato da população com coleções hídricas com caramujos infectados, como margens de rios, lagos e lagoas, canais de irrigação e drenagem, bem como locais onde se acumulam água para higiene pessoal, trabalhos domésticos e lazer. Esses fatores, além de contribuir para a transmissão da doença promovem o desenvolvimento de novos e maiores focos de transmissão (DIAS et al., 1995; KATZ & PEIXOTO, 2000; REY, 2001; ENGELS et al., 2002).

A transmissão do parasito pode ser reduzida consideravelmente ou impedida por meio da implantação de medidas de controle. Essas são realizadas pelo combate ao caramujo por métodos químicos, mediante o uso de moluscidas biológicas e ambientais, obras de engenharia, saneamento básico, educação sanitária, diagnóstico e tratamento da população infectada. Contudo, é sabido que nenhum método de controle isolado é capaz de controlar a transmissão da doença, sendo necessária uma associação de medidas de controle, as quais devem ser mantidas por longo prazo, o que encarece e muitas vezes inviabilizam a implantação do programa (JURBERG et al., 1989; SOUZA & LIMA, 1990; COURA-FILHO et al., 1994; COURA, 1995; REY, 2001).

O Brasil, em 1976, realizou e manteve por 4 anos o Programa de Controle da Esquistossomose (PECE) devido aos altos índices de infecção detectados àquela época. Durante os quatro anos do programa, foram realizadas medidas de controle associadas, que envolveram o uso do moluscida Bayluscide, tratamento quimioterápico com oxamniquine, implantação de instalações sanitárias, abastecimento de água e educação sanitária. O programa reduziu a prevalência, intensidade de transmissão e morbidade da doença, mas esses índices foram alterados a longo prazo devido à ausência de acompanhamento da população após o término do programa (WHO, 1980; WEBBE, 1987; KATZ, 1998).

Segundo COURA & AMARAL (2004) no Brasil, apesar dos programas e medidas de controle empregadas, novas infecções ocorreram devido a cinco

fatores: 1- a larga disseminação do caramujo hospedeiro e seus mecanismos de escape dos controles biológicos e químico; 2- dificuldade na implementação de condições sanitárias e abastecimento de água domiciliar devido aos altos custos, resultando em frequente contato da população com águas contaminadas; 3- o longo prazo necessário para a execução de programas de educação sanitária e desenvolvimento de programas de controle; 4- o tratamento em massa e individual, que tem possibilitado eficiente controle da morbidade, mas não a redução da prevalência e reinfecção; 5- o uso de equipamento de proteção individual não é usual, exceto a um grupo específico de expostos ao risco de infecção.

As medidas de saneamento empregadas de forma isolada exercem pouco impacto sobre a transmissão, mas associadas a outro método de controle podem reduzir a prevalência e controlar a intensidade de transmissão da doença na região (COURA, 1995); DIAS et al., 1995; ENGELS et al., 2002; COURA & AMARAL, 2004).

Os educadores em saúde executam um importante trabalho na conscientização e esclarecimento da população, sobre a importância da mudança de hábitos e costumes que levam ao risco de infecção, da implantação e permanência de medidas de saneamento, bem como os problemas da construção de privadas ou esgotos domésticos que lancem as fezes diretamente em coleções hídricas (SOUZA & LIMA, 1990).

O abastecimento de água tratada, as instalações sanitárias e o destino adequado dos esgotos sanitários são os recursos básicos de saneamento que, associados à educação sanitária, constituem o melhor método de controle da doença a médio e longo prazo. Infelizmente, esse método é caro e difícil de ser implantado, uma vez que o Brasil tem uma extensa área endêmica, com aproximadamente 1.000.000Km² (COURA, 1995).

Em área de alta prevalência, onde o abastecimento adequado de água e o saneamento básico são inexequíveis, deve-se enfatizar a quimioterapia, com tratamento individual ou em massa da população humana e a educação em saúde (BARBOSA, 1995; COURA, 1995).

São poucos os fármacos atualmente empregados no tratamento da esquistossomose. Esses apresentam níveis de toxicidade e eficácia variados, possibilitando redução drástica das fontes de infecção humanas e, quando empregados em associação com um sistema de vigilância epidemiológica, limitam consideravelmente as taxas de transmissão.

Até o momento, quatro fármacos foram indicados para o tratamento da população.

Hycantone, utilizado comercialmente a partir de 1967, apresentou no Brasil em 1973 e no Quênia em 1987, casos de resistência de linhagens de *S. mansoni* isolados de pacientes que, apesar de tratados, não obtiveram cura patológica (ROGERS & BUEDIN, 1971). A taxa de cura é alta e promove considerável redução na eliminação de ovos, sendo a droga com menor tempo de terapêutica. Entretanto, apresentam altos efeitos colaterais como danos hepáticos e pode estar associada a efeitos mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos.

Metrifonate, eficaz apenas contra *S. haematobium*, foi retirado do mercado em 1988 devido a problemas terapêuticos e por apresentar, no Quênia, casos de resistência do parasito ao fármaco (FELDMEIER & CHTSULO, 1999; WHO, 1999).

O Oxamniquine, ativo somente contra o *S. mansoni*, tem efeito esquistossomicida contra machos adultos, sendo inativo contra formas larvárias (esquistossômulos), de modo que, em pacientes reinfestados, pouco antes do tratamento, existe a possibilidade das formas juvenis escaparem ao efeito terapêutico e transformar-se em vermes adultos, reiniciando a liberação de ovos nas fezes. O medicamento é de baixo custo, mas causa efeitos colaterais severos. Em pacientes não curados ocorre redução de ovos nas fezes de ordem de 80 a 90%. A dificuldade na determinação da dose ideal para cura em diferentes regiões, devido a diferenças na suscetibilidade das linhagens do parasito, não favorece seu uso (DELGADO et al., 1992). Estudos realizados no Quênia mostraram que vermes resistentes, possivelmente, surgiram após extensiva quimioterapia com doses altas de oxamniquine (BRUCE et al., 1987; COLES et al., 1987; LIANG et al., 2001).

O Praziquantel, introduzido em 1975, é atualmente o fármaco mais indicado para o tratamento, porque causa poucos efeitos colaterais. É de baixo custo e altamente eficaz contra as formas jovens e adultas do *Schistosoma* em humanos e animais, com melhor efeito esquistossomicida em fêmeas. A taxa de cura com doses de 40mg/Kg chega a 78% em tratamentos feitos no Brasil, e de 70 a 100% em pacientes africanos (XIAO et al., 1985; DELGADO et al., 1992). Essa droga promove o controle da morbidade devido à diminuição da carga parasitária e níveis de reinfecção quando usada repetidas vezes em áreas endêmicas. Todavia, a carga parasitária e os níveis de reinfecção, após a interrupção da terapia, são mais intensos em crianças, indicando que apenas a terapia não é capaz de interromper a transmissão (COURA, 1995). A resistência/tolerância à droga foi relatada no Brasil, Egito e Senegal, onde tem sido utilizada intensamente no tratamento em massa da população em áreas endêmicas (FALLON et al., 1996; LARDANS & DISSOUS, 1998; ISMAIL et al., 1999; UTZINGER et al., 2001).

Apesar do tratamento da população com bons quimioterápicos, os níveis de transmissão e incidência permanecem altos (BERGQUIST, 1998). A resistência do parasito aos fármacos atualmente empregados e a rápida reinfecção estimula o estudo de uma vacina. Até o momento cinco candidatos vacinais induziram 50% de proteção em animais experimentais e reduziram a produção de ovos do parasito, mas esses fatos não justificam uma vacinação em larga escala devido ao alto custo (BERGQUIST & COLLEY, 1998). A dificuldade em encontrar uma vacina ideal provém dos mecanismos de escape que o parasito apresenta em nosso organismo e da não definição do tipo de resposta imune adequada contra a esquistossomose, uma vez que o parasito passa por uma série de transformações que acarretam diferentes respostas do sistema imune do hospedeiro (RIVEAU et al., 1998).

2.4 Controle do Caramujo Hospedeiro

O controle do caramujo é difícil devido seu alto potencial reprodutivo, capacidade de repovoar criadouros após tratamento, sobrevivência à dessecação,

alimentação onívora, adaptações respiratórias que possibilitam a sobrevivência em habitats aquáticos e terrestres, resistência à dessecação e comportamentos de proteção que possibilitam eventual escape da ação das medidas de controle (JURBERG, 1989; SOUZA & LIMA, 1970).

Caramujos do gênero *Biomphalaria* são responsáveis pela maior parte da transmissão da doença, pois, em seu interior, ocorre a multiplicação e formação da fase infectante do parasito. Dessa forma, as estratégias que envolvem o controle do caramujo são prioritárias para a redução da transmissão da doença em locais endêmicos (WHO, 1984; LARDANS & DISSOUS, 1998).

2.4.1 Métodos ambientais

O método ambiental consiste em alterar as condições naturais do local habitado pelo caramujo, por meio de mudanças físicas da terra, água ou vegetação, direcionadas a prevenir, eliminar ou reduzir os habitats dos caramujos hospedeiros, sem causar efeitos adversos ao meio ambiente (WHO, 1980).

Os principais métodos de controle ambiental são alterações na velocidade do fluxo hídrico, canalização de recursos d'água, correção das margens dos rios e represas, eliminação ou modificações de criadouros, aterro de valas ou poços contaminados, retificação de margem de córregos com água parada, drenagem por meio de valas de terrenos pantanosos, remoção periódica de plantas aquáticas de lagoas, açudes, poços e construção de fossas (SOUZA & LIMA, 1990).

Os métodos ambientais podem ser medidas eficazes quando associados a outros métodos de controle ou em pequenas áreas, entretanto, necessitam de investimentos dispendiosos e constante manutenção (BARBOSA, 1995).

2.4.2 Métodos biológicos

O método biológico é baseado na introdução de agentes antagonistas que eliminam ou controlam o crescimento da população de caramujos devido à competição pelo mesmo habitat (WHO, 1984). Diversos organismos foram estudados e introduzidos em campo com êxito, até o momento, como micropatógenos (bactérias, fungos, vírus e protozoários), parasitas (*Echinostoma malayanum*, *Angiostrongilus cantonensis*, *Ribeiroia guadeloupensis*) que esterilizam o caramujo, predadores vertebrados como peixes (*Tilapia melanopleura* e *Astronotus ocellatus*), aves aquáticas (patos e marrecos) e quelônios (tartarugas e cágados) (PAULINI, 1959; MCCULLOUGH, 1981; WHO, 1984; SOUZA & LIMA, 1990; POINTIER & JOURDANE, 2000).

A competição inter-molusco pela introdução, no local, de prosobrânquios amplexurídeos e pulmonados é indicada, apesar de cara quando comparada ao controle químico por moluscicida (MCCULLOUGH, 1981). A introdução dos prosobrânquios *Pomacea haustorium*, *Marisa cornuarietis* e *Helisoma duryi* diminuem e eventualmente eliminam a infecção do hospedeiro intermediário devido à redução nos níveis de penetração dos miracídios (WHO, 1984). O uso de *Biomphalaria* sp como competidora inter-específica é indicado, uma vez que a seleção natural pode favorecer uma cepa de caramujo não suscetível ao *S. mansoni*, possibilitando o desenvolvimento de um método de controle biológico entre cepas resistentes e suscetíveis. Estudos relatam que a exclusão competitiva entre *B. glabrata* (suscetível) e *B. straminea* linhagem albina (resistente) podem apresentar bons resultados quando induzidas em condições experimentais em campo (BARBOSA, 1995). Todavia, o limiar da população de caramujos hospedeiros permite a transmissão do parasito, sendo necessária adoção de método de controle auxiliar juntamente com um programa de controle a longo prazo (POINTIER & JOURDANE, 2000). Não há qualquer espécie com eficácia predatória comprovada contra os moluscos e que tenha sido utilizada em campanhas de controle (BRASIL, 2005).

2.4.3 Métodos químicos

Os métodos químicos consistem no emprego de substâncias denominadas moluscicidas, que, em baixas concentrações na água, exercem efeito letal aos caramujos, hospedeiros intermediários (PAULINI, 1959). A aplicação de moluscicida pode diminuir ou eliminar a população de caramujos, interrompendo o ciclo do parasito. A erradicação do caramujo para um controle efetivo é impossível, sendo assim, o controle se faz por meio da eliminação do hospedeiro intermediário de áreas onde poderia ser infectado por miracídios (PAULINI, 1966; WHO, 1973, 1980; WEBBE, 1987).

O uso de moluscicida associado à quimioterapia ou a outro método de controle é considerado o melhor meio para o controle da doença, principalmente na fase de intensa transmissão (PAULINI, 1966; WHO, 1973, 1980, 1985; ALMEIDA MACHADO, 1982; MCCULLOUGH & MOTT, 1983; WEBBE, 1987; SILVEIRA, 1989).

Os moluscicidas sintéticos são utilizados desde 1913-1915, sendo que, inicialmente, foram empregadas várias substâncias não específicas para esse fim, tais como cal, cianeto de cálcio e sulfato de cobre (DUNCAN, 1985). Posteriormente, de 1945 a 1955, devido aos soldados americanos terem contraído esquistossomose durante a Segunda Guerra Mundial, pesquisas foram incentivadas e vários produtos desenvolvidos como o pentaclorofenol, o pentaclorofenato de sódio e a niclosamida (JURBERG, 1989).

O pentaclorofenol (PCF) e o pentaclorofenato de sódio (PCFNa) são compostos derivados de fenol que agem interferindo em processos enzimáticos indispensáveis à vida das espécies de *Biomphalaria*. São tóxicos também para cogumelos, plantas, insetos, outros caramujos e homem, apresentam efeito residual e precipitação na lama (WHO, 1973).

A niclosamida, comercializada com o nome de Bayluscide WP70[®], na forma de pó, contém 70% de sal de etanolamina, sendo o moluscicida sintético mais indicado por apresentar ação letal em todos os estádios do ciclo de vida do caramujo e atóxico para plantas aquáticas, animais domésticos e homem. Porém é caro, tóxico para peixes e outros organismos aquáticos, decompõe-se sob ação

da luz solar e sua aplicação não previne a recolonização pelos caramujos, devido aos seus mecanismos de escape (GIOVANELLI et al., 2002).

2.4.4 Moluscidas naturais ou de origem vegetal

A pesquisa de compostos naturais biologicamente ativos complementa os métodos químicos tradicionais e aponta para a busca por fitoquímicos bioativos, uma vez que o tratamento humano e de criadouros é a melhor forma de controle da esquistossomose.

Um moluscida é considerado ideal quando, em baixas concentrações, elimina todas as fases do ciclo de vida do caramujo, desde o ovo até o adulto, nas condições ambientais em que o animal vive; apresenta baixo custo; é estável no armazenamento em condições tropicais; fácil de transportar e aplicar; não apresenta risco no transporte, manuseio e aplicação; tem ação letal seletiva a moluscos; é inócuo para o homem, animais domésticos, peixes e plantas; não sofre decomposição na água e no solo e é estável em condições de temperatura e irradiação solar (PAULINI, 1965; WHO, 1961, 1965, 1985).

A inexistência de um método efetivo para o controle da doença, o alto custo, a recorrente resistência do caramujo aos moluscidas sintéticos disponíveis até o momento e a busca de soluções alternativas não poluidoras, visando à preservação ambiental têm incentivado a pesquisa de moluscidas de origem vegetal (WHO, 1965; BARBOSA & MELLO, 1969; KLOOS & MCCULLOUGH, 1982; DUNCAN, 1987; JURBERG, 1989; HAMBURGER & HOSTETTMANN, 1991; SOUZA et al., 1992; WHO, 1992; BAPTISTA et al., 1994; BARBOSA, 1995; COURA, 1995; DE-CARVALHO et al., 1998; DOENHOFF & RUPPEL, 1998; SCHALL et al., 1998; BILIA et al., 2000; OLIVEIRA-FILHO & PAUMGARTTEN, 2000; RUG & RUPPEL, 2000; SCHALL et al., 2001; BEZERRA et al., 2002; WEI et al., 2002; LEYTON et al., 2005; LUNA et al., 2005;).

Os extratos de plantas de áreas endêmicas da esquistossomose, de fácil propagação, ciclo reprodutivo curto, com componentes bioativos baratos e biodegradáveis, são alvo de estudos dos cientistas para o combate dos caramujos e das fases larvais do esquistossomo como uma forma de controlar a doença

(MOTT, 1987; BEZERRA et al., 2002; LYARDDIARD et al., 2002; MELÉNDEZ & CAPRILES, 2002; LUNA et al., 2005). Assim, vêm surgindo pesquisas com extratos vegetais com diferentes princípios ativos (KLOOS & MCCULLOUGH, 1981; MARTON & HOSTETTMAN, 1985; DUNCAN, 1985; KAWANO & SIMÕES, 1986; RÉ & KAWANO, 1987; JURBERG et al., 1989; RÉ, 1990; LEYTON, 1995; YAMAMOTO et al., 1996; CYSNE et al., 2005).

A ação moluscicida das plantas tem sido estudada desde 1930, e a descoberta de vegetais com potencial moluscicida permitiu o uso de algumas espécies em programas de controle. ARCHIBALD (1933) usou os frutos das espécies *Balanites aegyptica* e *Balanites maughamii* em extrato aquoso, cuja composição apresenta isobutilamida e saponina spirostanol, ambos óleos cercaricidas, para matar caramujos dos gêneros *Bullinus*, *Planorbis*, miracídio e cercária de *S. mansoni* no Sudão (KLOOS & MCCULLOUGH, 1981). ARCHIBALD (1933) E ANANTARAMAM (1955) recomendaram que *B. aegyptica* fosse plantada ao redor de áreas endêmicas da esquistossomose, pois os frutos dessa árvore ao cair na água suprimiam a população de caramujos transmissores sem alterar a potabilidade da água. Mais tarde, as espécies *Ambrosia marítima* e *Sapindus saponaria* foram empregadas em campo com a mesma finalidade (KLOOS E MCCULLOUGH 1987; JURBERG et al., 1989).

No Brasil ocorrem várias espécies de plantas com atividades moluscicida e larvicida conhecidas. LUNA (2005) realizou um estudo da atividade moluscicida de 23 plantas medicinais da região nordeste sobre *B. glabrata*; dessas, o extrato das folhas de *Annona muricata* (graviola – Annonaceae) na concentração de 100 ppm causou 100% de mortalidade dos caramujos adultos e o extrato da casca de *Caesalpinia echinata* (Pau-Brasil – Fabaceae) foi eficaz apenas sobre desovas (100% mortalidade a 100ppm). Portanto, o uso de plantas com atividade moluscicida pode representar uma alternativa barata, além de evitar a poluição do meio ambiente, pelo fato de serem biodegradáveis (MARSTON et al., 1985).

2.5 Testes ecotoxicológicos

Os testes ecotoxicológicos têm por finalidade saber se as substâncias químicas, isoladas ou como misturas complexas, são nocivas a sistemas vivos e como e onde se manifestam seus efeitos (DELMATRICE, 2005; FORBES E FORBES, 1994).

Os efeitos são determinados, em geral, nos bioensaios, que consistem na exposição do organismo teste a diferentes concentrações de uma ou mais substâncias ou fatores ambientais por um determinado período de tempo, visando observar esses efeitos sobre as funções biológicas fundamentais: mudança de apetite, crescimento, metabolismo reprodutivo, diminuição da taxa de natalidade em decorrência de alterações nas fases meióticas das células reprodutoras e/ou por anomalias no processo de desenvolvimento embrio-larval, bem como mutações ou morte (SILVA, 2002).

2.5.1 Toxicidade Aguda

Os testes de toxicidade aguda são assim caracterizados pela curta duração da exposição (usualmente 2 a 4 dias) e por terem delineamentos experimentais menos elaborados, nos quais a letalidade e a imobilização de organismos jovens são os indicadores de efeitos mais comumente avaliados. Segundo MALTBY & CALOW (1989), cerca de 80% dos estudos de ecotoxicidade realizados até 1987, envolviam apenas uma espécie e tinham a letalidade como único critério de efeito tóxico avaliado.

A toxicidade aguda produz efeitos adversos, correspondendo a uma resposta severa e rápida (poucos dias a poucas horas), após a administração de uma única dose ou doses múltiplas de um composto, ocasionando geralmente uma elevada mortalidade (ABEL, 1989). A dose única é utilizada para determinar a potência da substância (OGA, 2005).

2.5.2 Toxicidade Crônica

A toxicidade crônica corresponde à resposta a um estímulo prolongado ou contínuo por um longo período de tempo, podendo abranger parte ou todo o ciclo de vida do organismo. O efeito crônico deve ser objeto de verificação quando os testes de toxicidade aguda não forem suficientes para caracterizar um efeito tóxico mensurável (SILVA, 2002).

O emprego dos testes de toxicidade tem aumentado nos últimos anos, e hoje se encontram padronizados pelos órgãos ou institutos ambientais, podendo-se detectar a toxicidade de efluentes líquidos, por exemplo, em organismos aquáticos vivos, permitindo inclusive ação de controle.

2.6 Bioensaio com *Artemia salina*

A *Artemia salina* é um invertebrado que possui de 8 a 10 mm de comprimento, pertence ao filo Arthropode, classe Crustácea, subclasse Brachiopoda, ordem Anostraca, família Artemiidae (BARBIERI-JUNIOR E NETO, 2001). Possuem quatro estágios de desenvolvimento: náuplio, metanáuplio, pré-adulto e adulto. O Náuplio é a larva recém-eclodida, caracteriza-se por possuir elevadas quantidades de reservas vitelinas (Lipídeos e carboidratos) e por não apresentar segmentos no corpo (BARBIERI-JUNIOR E NETO, 2001) (Figura 07).

Os microcrustáceos *Artemia salina* são considerados consumidores primários ou secundários e constituem um importante elo entre os níveis inferiores e superiores da cadeia alimentar de um ecossistema (ZAGATTO, 2000). Os náuplios de *Artemia salina* são utilizados internacionalmente em testes de toxicidade por apresentarem características significativas, como: os seus organismos adultos têm um grande potencial reprodutivo; são de fácil aquisição no mercado e manutenção em laboratórios; os cistos (ovos) são de fácil eclosão; e os testes apresentam uma boa reprodutividade (FEEMA, 1993; WEIDEBORG, 1997). O bioensaio com *A. salina* tem sido estabelecido como

um método seguro, prático e econômico para a determinação de bioatividade de componentes sintéticos (ALMEIDA et al, 2002) assim como também produtos de planta (MEYER et al., 1982; MCLAUGHLIN et al., 1991; LHULLIER et al., 2006; STEFANELLO et al., 2006).



Fonte: <http://www.naturamediterraneo.com>

Figura 07. *Artemia salina*

O bioensaio tem uma boa correlação com atividade citotóxica em alguns tumores humanos sólidos e com atividade pesticida (MCLAUGHLIN et al, 1998). A relação entre o bioensaio com *A. salina* e a inibição de tumores humanos sólidos é significativa porque mostra o valor do bioensaio como uma ferramenta de pré-seleção para pesquisa de drogas antitumorais (ANDERSON et al., 1991), larga distribuição de propriedades anticancerosas dos glicoalcalóides (KUPCHAN et al., 1965; CHAM et al., 1987; CHAM, 1994; DAUNTER e CHAM, 1990; HU et al., 1999; ESTEVES-SOUZA et al., 2002; LEE et al., 2004; FRIEDMAN et al., 2005) e de atividade moluscicida (SILVA et al., 2005).

2.7 *Indigofera suffruticosa*

A família Fabaceae, também conhecida como Leguminosae, pertence à ordem Fabalis, subclasse Rosidae e possui cerca de 670 gêneros com 18.000 espécies, subordinadas a três subfamílias: Mimosoideae, Caesalpinioideae e Papilionoideae (BARROSO, 1984; LEWIS, 1987). É a terceira maior família das angiospermas (CHAPPILL, 1995), muitas delas possuindo importância econômica pela produção de alimentos como soja, ervilha, feijão, alfafa (TUCKER, 2003).

Típicos das leguminosas, as *Indigoferas* têm alto teor em proteínas, têm habilidade para tolerar seca, inundações e elevadas salinidades tornando-se assim agronomicamente muito desejáveis (SHERMAN, 1982). Muitas espécies são usadas em países como África e Ásia, como forrageiras (*Indigofera hirsuta*, *Indigofera pilosa*, *Indigofera schimperi* Sym, *Indigofera oblongifolia*, *Indigofera spicat*, *Indigofera subulata* Sym e *Indigofera trita*), também como adubo verde e cobertura de solo no caso da *Indigofera hirsuta* e *Indigofera trita* (FRÖMAN, 1975). No Brasil, a espécie *I. hirsuta* é usada como adubo verde e forragem e tem sido recomendada como potencialmente controladora de nematóides. Como forragem é bem aceita pelos animais após a fenação (ALLEN E ALLEN, 1981; AYLWARD et al., 1987). Informações etnofarmacológicas indicam que espécies do gênero *Indigofera* são utilizadas para o tratamento de infecções gastrointestinais. Outros atributos significantes, os quais espécies arbustivas como *Indigofera spinosa*, valiosa como planta forrageira, são o seu ciclo de vida perene, palatabilidade, resistência para herbívoros e habilidade para resposta a pequenos eventos de chuva (COPPOCK et al., 1986, 1988; BAMBERG, 1986; COUGHENOUR et al., 1990). Esta combinação de peculiaridade é ideal para adaptação em ambiente árido e semi-árido.

No semi-árido nordestino a subfamília Papilionoideae é um táxon bem representado e apresenta um grande número de gêneros dentro da Família Fabaceae, e entre eles está incluído o gênero *Indigofera* (EMPAIRE, 1989; RODAL, 1992; ALCOFORADO FILHO, 1993; OLIVEIRA et al., 1997; FERRAZ et al., 1998; LEMOS, 1999). A origem do nome *Indigofera* provém da

palavra alemã Índigo, que significa produção de pigmento azul (Índigo Blue); que pode ser extraído de *Indigofera suffruticosa* Mill, *Indigofera truxillensis* (PENSAVENTO, 2005), *Indigofera tinctoria* L., *Indigofera arrecta* Hoschst, *Indigofera argêntea* L. e *Indigofera suffruticosa* guatemalensis de Kort y Thijise (THOMAS, 1998).

O gênero *Indigofera* compreende aproximadamente 700 espécies herbáceas e arbustivas fitogeograficamente distribuídas na África tropical, Ásia, Austrália e América do Norte e Sul (HASSEN et al., 2007). No Brasil há apenas três espécies: *Indigofera suffruticosa*, *Indigofera truxillensis* e *Indigofera hirsuta* (PENSAVENTO, 2005). São grupos de plantas silvestres (não cultivadas) que crescem espontaneamente em todos os solos agrícolas, principalmente nas imediações de cidades e vilas e em outras áreas de interesse do homem (PESAVENTO, 2005).

A espécie *Indigofera suffruticosa* Mill é uma planta originária da Antilha e América Central (ALMEIDA, 1993), encontra-se distribuída por toda a América tropical, (CESÁRIO, 1980). No Brasil há registro da espécie nos estados do Mato Grosso (FERNANDES, 1987), Alagoas (RIBEIRO, 1984), Paraíba (RIET-CORREA, 2000), Ceará, Rio Grande do Norte, Pará e Pernambuco (NETO et al., 2001).

Apresentam-se como arbustos e subarbustos, ereto e ramificado, atingindo no máximo 2,5 m de altura, com abundante ramagem verde-esbranquiçada, revestida de pêlos e folhas compridas com formato de palmas. Suas flores róseas e pequenas desabrocham em pequenos cachos e seus frutos assemelham-se ao formato de vargens arredondadas e recurvas, sendo semelhante às sementes de feijão (MOREIRA & TOZZI, 1997; BARROSO, 1984). Floresce em novembro a abril e frutifica de fevereiro a junho (PAIVA, 1987; DUTRA et al., 2005; FERNANDES, 2007) (Figura 08).

A



Fonte: <http://b-and-t-world-seeds.com>

B



Fonte: <http://www.lookfordiagnosis.com>

C



Fonte: <http://aoki2.si.gunma-u.ac.jp>

D



Fonte: SILVA, 2007

Figura 08. *Indigofera suffruticosa* Mill. **A:** Ramos com folhas; **B:** Ramos com folhas e sementes; **C:** Ramos com flores; **D:** Vista parcial de um indivíduo adulto.

Miller e Smith (1973) fizeram as primeiras investigações a respeito da composição do gênero *Indigofera*, utilizando extratos de sementes da espécie *Indigofera suffruticosa*, sendo atribuída à mesma, uma fonte rica em aminoácidos com prováveis ações tóxicas. Ésteres de glicose de ácido 3-nitropropanóico foram isolados das espécies *Indigofera oblongifolia*, *Indigofera linnaei*, *Indigofera spicata* (Syn. *I. endecaphylla*) e na *Indigofera suffruticosa* (LOHDA et al., 1997; MAJAK et al., 1992; GARCEZ et al., 1989, 2002), os quais evidenciam em outros membros de leguminosas efeitos tóxicos desse composto em animais domésticos, insetos e outros animais devido à sua conversão para ácido 3-nitropropanóico, uma toxina respiratória que inibe enzimas mitocondriais (ANDERSON et al., 1998). Foram, também, isoladas três furano-flavanóides e um raro flavonol glicosídeo da *Indigofera tinctoria* (NARENDER et al., 2006).

PAIVA (1987) realizou análise de proteína e fibra bruta de *Indigofera suffruticosa* e considerou a mesma boa para forragem de ruminantes. KAMAL E MANGLA (1993) identificaram, caracterizaram e quantificaram seis rotenóides de diferentes órgãos como raiz, caule, sementes e folhas de *Indigofera suffruticosa* e verificaram que essa planta tem bioeficácia contra larvas de *Anopheles* e *Callosobruchus chinensis* adultos. Estudos fitoquímicos das folhas, caule e sementes de *Indigofera suffruticosa*, demonstrou abundante presença de alcalóides apenas nas folhas, polifenóis (cumarina e ácido clorogênico) e flavanóides também presentes apenas nas folhas; triterpenóides e/ou esteróides (abundantes nas folhas e, em menor extensão, no caule e semente) e oses redutoras (em todas as partes estudadas do vegetal) (LEITE, 2003). Também foi constatada a presença do índigo (Figura 09) principalmente nas sementes, apresentando-se como uma molécula com forte fluorescência, sugerindo algo bastante singular e, de certa forma, a presença dessa molécula confirma o táxon.

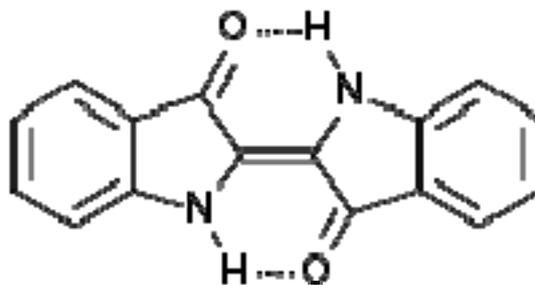


Figura 09. Fórmula estrutural do índigo.

Indigofera suffruticosa Mill é popularmente usada em diferentes países contra diversos problemas da saúde. Suas folhas têm sido usadas para problemas estomacais (AGRA et al., 1996), antiespasmódica, sedativo, diuréticos, purgativos, enquanto a raiz tem sido usada como odontálgica (LORENZI, 1982) e útil na cura da icterícia (LAINETTI E BRTIO, 1980 E CORREA, 1984). Empregada também nas mordeduras de cobras e insetífuga, sendo esta última propriedade extensiva às sementes depois de pulverizadas (PIO CORREIA, 1926). Possui propriedades medicinais no tratamento de febres, parasitoses, doenças de pele e problemas cardíacos (ALLEN E ALLEN, 1981). Estudos farmacológicos mostraram que extratos de *Indigofera suffruticosa* apresentaram atividade anticonvulsivante (ALEJO et al., 1996), antigenotóxica (BADELL et al., 1998) e antiépilética (ROING E MESA, 1974).

Recentes estudos com extrato aquoso de folhas de *Indigofera suffruticosa* demonstraram possuir atividade antimicrobiana contra a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* e contra os fungos dermatófitos *Microsporium canis* e *Trichophyton rubrum* (LEITE et al., 2006); atividade citotóxica em células embrionárias de ratos, que inibiu a reprodução celular a partir do estágio de mórula e blástula (LEITE et al., 2004) e atividade antiinflamatória na redução de edema de pata de camundongos (LEITE et al., 2003) e significativa atividade antitumoral de carcinoma de Ehrlich em camundongos marcados, quando administrado por via intraperitoneal e após sete dias de tratamento nas concentrações de 50 e 100mg/Kg/dia (SILVA, 2007). Até o momento, não foi encontrado na literatura estudos que relatem a utilização da *I. suffruticosa* frente a moluscos de *B. glabrata*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos tóxicos de extratos aquosos e hidroalcoólicos das folhas da *Indigofera suffruticosa* sobre *Biomphalaria glabrata*, cercarias e *Artemia salina*.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar os efeitos tóxicos do extrato aquoso e hidroalcoólico das folhas da *I. suffruticosa* sobre moluscos *B. glabrata* em estágio embrionário e na fase adulta, por meio dos seguintes parâmetros: fecundidade, fertilidade, mortalidade e malformação.
- Verificar a toxicidade dos extratos aquosos e hidroalcoólicos das folhas da *I. suffruticosa* sobre cercarias de *S. mansoni*, em diferentes concentrações.
- Estudar toxicidade dos extratos aquosos e hidroalcoólicos das folhas da *I. suffruticosa* sobre a *A. salina*, em diferentes concentrações.

4. REFERÊNCIAS

- ABEL, P. D. Water Pollution Biology. Ellis Horwood Ltda, Publishers. Chichester. P. 231, 1989.
- AGRA, M. F., LOCATELLI, E., ROCHA, E. A., BARACHO, G. S., FORMIGA, S. C. Plantas medicinais dos Cariris Velhos, Paraíba, Brasil, parte II: subclasses Magnoliidae, Caryophylliidae, Dilleniidae e Rosidae. Ver. Bras. Farmácia 77, PP. 97-102, 1996.
- ALCOFORADO-FILHO, F. G. Composição florística e fitossociologia de uma área de caatinga arbórea no município de Caruaru-PE, Recife. UFPE, p.220, Dissertação de mestrado, 1993.
- ALEJO, J. P., MIRANDA, R., RODRIGUES, G. Actividad Anticonvulsivante; (Antiepileptica) del extrato fluido de *Indigofera suffruticosa* (Anil Cimarrón). Ver. Cubana Plant Med, 1 (2):PP. 7-10, 1996.
- ALLEN AND ALLEN; RODRIGUES-KABANA. Leguminosa, University of Wisconsin Press, Madison; Nematropica 18 (1): 137-142, 1981.
- ALMEIDA, P. A., SILVA, T. M. S., ECHEVARRIA, A. Mesoionic 5-alkyl-1,3-dithiolium 4-thiolates: Synthesis and brine shrimp toxicity. *Heterocycl Comm* 8: 593-600, 2002.
- ALMEIDA, E. R. Plantas Mediciniais Brasileiras: Conhecimento populares e científicos. Hemus Editora LTDA. São Paulo, 341p, 1993.
- ALMEIDA-MACHADO, P. The brazilian program for schistosomiasis control. *Am. J. Trp. Med. Hyg.*; 31(1): 76-86, 1982.
- ANANTARAMAN, M. Biological control of aquatic snails. *Indian J. Vet. Sci.*; 25: 65- 67, 1955.
- ANDERSON, R. C., MAJAK, W., RASMUSSEN, M. A., ALLISON, M. J. Detoxification potential of a new species of ruminal bacteria that metabolize nitrate and naturally occurring nitrotoxins. In: Garland, T., Bar, A. C. (Eds.), Toxic Plants and Other Natural Toxicants. CAB International, Wallington, Oxon, PP. 154-158. 1998.
- ANDERSON, J.E., GOETZ, C. M., MCLAUGHLIN, J. L., SUFFNESS, M. A blind comparison of simple bench-top bioassay and human tumour cell cytotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochem Analysis* 2: 107-111, 1991.
- ARCHIBALD, R. G. The use of the fruit of the tree *Balanites aegyptiaca* in the control of schistosomiasis in the Sudan. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*; 27: 207, 1933.

AYLWARD, J. H., COURT, R. D., HAYDOCK, K. P., STRICKLAND, R. W., HERGALY, M. P. *Indigofera* species with agronomic potencial in the tropics. Rait toxicity studies. Aust J. Agric Res; 38; 177, 1987.

BADELL, J. B., RUIZ, A. R., PARRA, A. B., MICHELENA, M. J. M., ARMENTEROS, A. E. Evaluación genotóxica Del extracto fluido de *Indigofera suffruticosa* Mill (anil ciamarrón) mediante el ensayo de anomalias em La cabeza de los espermatozoides. Ver. Cubana Plant Med, 3 (2), 58-61, 1998.

BAMBERG, I. E. Effect of clipping and watering frequency on production of the *Africandwarf shrub*, *Indigofera spinosa*. M. Sc. Thesis. Colorado State University, Fort Collins, CO, USA, 1986.

BAPTISTA, D. F., VASCONCELLOS, M. C., LOPES, F. E., SILVA, I. P., SCHALL, V. T. Perspectives of using *Euphorbia splendens* as a molluscicide in schistosomiasis control programs. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health; 25(3): 419-24, 1994.

BARBIERE-JUNIOR, R. C., NETO, A. O. Camarões Marinhos: Reprodução, Maturação e Larvicultura. Editora Aprenda Fácil, Virçosa – MG. V. 1, 2001.

BARBOSA, F. S. & MELLO, D. A. Moluscicidal activity of vegetal products. Ver. Bras. Pesq. Med. Biológica; 2(5-6): 364-6, 1969.

BARBOSA, F. S. Tópicos em Malacologia Médica. 1ª Edição. Rio de Janeiro: Editora da FIOCRUZ; 1995.

BARROSO, G. M. Sistemática das Angiospermas do Brasil. São Paulo: EDUSP, v. 2, 1984.

BERGQUIST, N. R. & COLLEY, D. G. Schistosomiasis Vaccines: Research to Development. Parasitology Today; 14(3): 99-104,1998.

BERGQUIST, N. R. Schistosomiasis Vaccine Development: Progress and Prospects. Mem. Inst. Oswaldo Cruz; 93 (Suppl. I): 95-101, 1998.

BEZERRA, J. C. B, SILVA, I. A, FERREIRA, H. D, FERRI, P. H. & SANTOS, S. C. Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal plants. Fitoterapia; 73: 428-30, 2002.

BILIA, A. R, NIERI, E., BRACA, A., MORELLI, I. Screening of Mediterranean Rosaceae plants for their molluscicidal and piscicidal activities. Phytoterapy Research; 14: 126-9, 2000.

BRAGA, R. Plantas do Nordeste Especialmente do Ceará. 3ª edição, Escola Superior de agricultura. Rio Grande do Norte, Mossoró, Brasil, 1976.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de vigilância em saúde Esquistossomose. Disponível: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivo/pdf/esquit_o_77_04.pdf>.2005.

BRUCE, J. I, DIAS, L. C. S, LIANG, Y. S, COLES, G. C. Drug resistance in schistosomiasis: a review. *Mem Inst. Oswaldo Cruz*; 82(4): 143-50, 1987.

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*; 20(1): 93-121, 1970.

CESÁRIO DE MELLO, A. Presença de uma substância com atividade semelhante à acetilcolina na folha de *Indigofera suffruticosa* (vulgarmente conhecida como anil), anais do VI simpósio de plantas medicinais do Brasil. Setembro, Fortaleza-CE, 1980.

CHAM, B. E. Solasodine glycosides as anti-cancer agents: preclinical and clinical studies. *Asian Pac J Pharmacol* 9: 113-118, 1994.

CHAM, B. E, GILLIVER, M., WILSON, L. Antitumor effects of glycoalkaloids isolated from *Solanum sodomaeum*. *Planta Med* 53: 34-36, 1987.

CHAPPILL, J. A. Cladistic analysis of the Leguminosae: The development of an explicit hypothesis. In: CRISP, M. D., DOYLE, J. J. (Ed.) *Advances in legumes systematic*. Richmond: Royal Botanic Gardens, Kew, PP. 1-10. 1995.

CYSNE, J. B., CANUTO, K. M., PESSOA, O. D., NUNES, E. P., SILVEIRA, E. R. Leaf essential oils of four *Piper* species from the state of Ceará- Northeast of Brazil. *J. Braz. Chem. Soc.*; 16(6B): 1378-81, 2005.

CHITSULO, L., ENGELS, D., MONTRESOR, A., SAVIOLI, L. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Tropica*; 77: 41-51, 2000.

COLES, G. C., MUTAHI, W. T., KINOTI, G.K., BRUCE, J.I., KATZ, N. Tolerance of Kenyan *Schistosoma mansoni* to oxamniquine. *Trans. of Royal Society of Trop. Med. Hyg.*; 81, 782-85, 1987.

COPOOCK, D. L., ELLIS, J. E., SWIFT, D. M. A comparative in vitro digestion trial using inocula of livestock from Turkana and Kitale, Kenya. *J. Agr. Sci. (Cambridge)* 110, pp. 61-63. 1988.

COPOOCK, D. L., ELLIS, J. E., SWIFT, D. M. Seasonal nutritional characteristics of livestock diets in a nomadic pastoral ecosystem. *J. Appl. Ecol.* 23, pp. 573-583, 1986.

CORREA, M. P. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. IBDF. MA. Rio de Janeiro, RJ. 1:130-3, 1984.

COUGHENOUR, M. B., COPOOCK, D. L., ROWLAND, M., ELLIS, J. E. Dwarf shrub ecology in Kenya's arid zone: *Indigofera spinosa* as a key forage resource. *J. Arid Env.* 18, pp. 301-312, 1990.

- COURA, J. R. & AMARAL, R. S. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazil endemic areas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*; 99 (supl. 1): 13-9, 2004.
- COURA, J. R. Control of schistosomiasis in Brazil: Perspectives and proposals. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*; 90 (2): 257-60, 1995.
- COURA-FILHO, P., ROCHA, R. S., FARAH, M. W., SILVA, G. C., KATZ, N. Identification of factors and groups at risk of infection with *Schistosoma mansoni*: a strategy for the implementation of control measures? *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*; 36(3):245-53, 1994.
- CUNHA, A. S. Esquistossomose mansoni. 1ª Edição. São Paulo: EDUSP; 1970.
- DAUNTER, B., CHAM, B. E. Solasodine glycosides. *In vitro* preferential toxicity for human cancer cells. *Câncer Lett* 55: 209-220, 1990.
- DE-CARVALHO, R. R., MALDONADO, J. A., OLIVEIRA-FILHO, E.C., RIBEIRO, A. C. PAUMGARTTEN FJR, REY L. Effects of *Euphorbia milii* látex on *Schistosoma mansoni* eggs, miracidia and cercariae. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*; 93 (Suppl. I): 235-7, 1998.
- DELGADO, V. S., SUÁREZ, D. P., CESARI, I. M., INCANI, R. N. Experimental chemotherapy of *Schistosoma mansoni* with Praziquantel and Oxamniquine: Differential effect of single or combined formulations of drugs on various strains and both sexes of the parasite. *Parasitol Res.*; 78: 648-654, 1992.
- DELMATRICE, P. M. Biodegradação e toxicidade de corantes testeis e efluentes da Estação de Tratamento de Água, 2005. Residuárias de americana, SP. 137p. Tese de Doutorado, Escola Superior de agricultura Luis de Queiros, Universidade São Paulo, Piracicaba-SP, 2005.
- DIAS, L. C. S., MARÇAL, O. J., GLASSER, C. M. Control of schistosomiasis transmissiom. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*; 90 (2): 285-8, 1995.
- DOENHOFF, M. J., RUPPEL, A. Vector Biology and the control of parasitic diseases. *Parasitology Today*; 14(8): 299-300, 1998.
- DUNCAN, J. & STURROCH, R. F. Labotatory evaluation of potencial plant molluscicides. In; plant molluscicides (K. E. Mott), pp.251-265, New York: John Wiley & Sons, 1987.
- DUNCAN, J. The toxicology of plants molluscicides. *Pharmacol. Ther.*; 27:243-264, 1985.
- DUTRA, V. F.; MESSIAS, M. C. T. B.; GARCIA, F. C. *Papilionoideae (Legumonosae)* nos campos ferruginosos do Parque Estadual do Itacolomi, Minas Gerais, Brasil: florística e fenologia. **Revista Brasileira de Botânica**, 28 (30): 493-504. 2005.

EMPERAIRE, L. Vegetation et gestion des ressources naturelles dans la caatinga du sud-est du Piauí (Brésil). Doctorat d'Etat ès Sciences Naturelles: Université Pierre et Mari Curie, Paris, 1989.

ENGELS, D., CHITSULO, L., MONTRESOR, A., SAVIOLI, L. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. *Acta Tropica*; 82: 139-146, 2002.

ESTEVAM, E. C., NAKANO, E., KAWANO, T., PEREIRA, C. A. B., AMÂNCIO, F. F., MELO, A. M. M. A. Dominant lethal effects of 2,4-D in *Biomphalaria glabrata*. Genetic toxicology and Environmental Mutagenesis, 611: 83-88, 2006.

ESTEVEZ-SOUZA, A., SILVA, T. M. S., ALVES, C. C.F., DE CARVALHO, M. G., BRAZ-FILHO, R., ECHEVARRIA, A. Cytotoxic activities against Ehrlich carcinoma and human K562 leukemia of alkaloids and flavonoid from two *Solanum* species. *J Braz Chem Soc* 13: 838-842, 2002.

FALLON, P. G., TAO, L. F., ISMAIL, M. M., BENNETT, J. L. Schistosome resistance to Praziquantel: Fact or artifact? *Parasitology Today*; 12(8): 316-20, 1996.

FEEMA, Método de determinação do efeito agudo letal causado por agentes tóxicos em crustáceos da espécie *Artemia salina* – método estático. Fundação Estadual de Engenharia do meio ambiente, Rio de Janeiro, Brasil, MF-454 ed., 1993.

FELDMEIER, H. & CHITSULO, L. Therapeutic and operation profiles of Metrifonate and Praziquantel in *Schistosoma haematobium* infection. 49(7):557-65, 1999.

FERNANDES, A. Noções de toxicologia e plantas tóxicas. 2ª ed. Fortaleza: BNB, 80p., Monografia, 1987.

FERNANDES, J. M. Taxonomia e Etnobotânica de *Leguminosae* Adans. em fragmentos florestais e sistemas agroflorestais na Zona da mata Mineira. Universidade de Viçosa, Minas Gerais. 2007.

FERRAZ, E. M. N., RODAL, M. J. N., SAMPAIO, E. V. B. E PEREIRA, R. C. A. Composição florística em trechos de vegetação de caatinga e brejo de altitude na região do Vale do Pajeú, Pernambuco. *Revista Brasileira de Botânica*, 2, p. 7-15, 1998.

FORBES, V. E., FORBES, T. L. *Ecotoxicology in Theory and Practice*. Chapman and Hall. Londres. P.247, 1994.

FROMAN, B. Na illustrateg guide to the pasture legumes of Ethiopia. Rural Development Studies N° 3. Rural Development Section and Department of Plant Husbandary, College of Agriculture. S750 07, Uppsala, Sweden, 1975.

FRIEDMAN, M., LEE, K. R., KIM, H. J., LEE, I. S., KOZUKUE, N. Anticarcinogenic effects of glycoalkaloids from potatoes against human cervical, liver, lymphoma, and stomach cancer cells. *J Agric Food Chem* 53: 6162-6169, 2005.

FUNASA. Guia de Vigilância Epidemiológica/Fundação Nacional de Saúde. Brasília: 5ª edição; volume 1, 842p, 2002.

GARCEZ, W. S., GRACEZ, F. R., BARISON, A. Additional 3-nitropropanoyl ésteres of glucose from *Indigofera suffruticosa* (Leguminosae). *Biochemical systematics and ecology*. V.31, 207-209, 2002.

GARCEZ, W. S., GARCEZ, F. R., HONDA, N. K., SILVA, A. J. R. *Phytochemistry* 28, 1251, 1989.

GIOVANELLI, A., SILVA, C. L. P. A. C., MEDEIROS, L., VASCONCELLOS, M. The molluscicidal activity of niclosamide (Bayluscide WP70®) on *Melanoides tuberculata* (Thiaridae), a snail associated with habitats of *Biomphalaria glabrata* (Planorbidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*; 97 (5): 743-5, 2002.

HAMBURGER, M. & HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: The link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*; 30(12): 3864-74, 1991.

HASSEN, A., RETHMAN, N. F. G., NIEKERK, W. A. VAN, TIELELE, T. J. Influence of season/year and species on chemical composition and *in vitro* digestibility of Five *Indigofera* accessions. *Animal Feed science and Technology*, 136, PP. 312-322. 2007.

HU, K., KOBAYASHI, H., DONG, A., JING, Y., IWASAKI, S., YAO, X. Antineoplastic agents III: steroidal glycosides from *Solanum nigrum*. *Planta Med* 65: 35-38, 1999.

ISMAIL, M., BOTROS, S., METWALLY, A., WILLIAM, S., FARGHALLY, A., TAO, L., DAY, T. A., BENNETT, J. A. Resistance to Praziquantel: Direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from egyptian villagers. *Am. J. Trop. Med. Hyg*; 60(6): 932-35, 1999.

JURBERG, P., VASCONCELLOS, M. C., MENDES, N. M. Plantas empregadas como moluscidas: Uma visão crítica. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*; 84 (supl. I): 76-83, 1989.

KAMAL, R., MANGLA, M. *In vivo In vitro*, Investigation on rotenoids from *Indigofera suffruticosa* and their biofficacy against the larvae of *Anopheles stephensi* and adults of *Callosobruchus chinensis*. *J Biosc.* 18 (1): PP. 93-110. 1993.

KATZ, N. & PEIXOTO, S. V. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*; 33(3): 303-308, 2000.

KATZ, N. Schistosomiasis control in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*; 93 (supl. 1): 33-35, 1998.

KAWANO, T., WATANABE, L. C., NAKANO, E., MEDEIROS, Y., ARAÚJO, C. M., CALDEIRA, W. Observation of some key stages of the embryonic development of *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) (Mollusca, Planorbidae). *Invertebrate Reproduction and Development*; 46(2-3): 85-91, 2004.

KAWANO, T., OKAZAKI, K., RÉ L. Embryonic development of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Mollusca, Gastropoda, Planorbidae): A practical guide to the main stages. *Malacologia*; 34(1-2): 25-32, 1992.

KAWANO, T., SIMÕES, L. C. G. Morphogenetic effects of caffeine on *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata, Planorbidae) *Proceedings C.*; 90(3): 281-302, 1987.

KAWANO, T., SIMÕES, L. C. G. Efeito da *Stevia rebaudiana* em *Biomphalaria glabrata*. *Rev. Brasil. Biol.* 1986; 46(3): 555-562. Kawano T. Agentes que atuam sobre a morfogênese da região cefálica de alguns moluscos. *Ciência e Cultura*; 116-66, 1983.

KLOOS, H. & MCCULLOUGH, F. S. Plant with recognized molluscicidal activity. In: Mott KE ed. *Plant molluscicides*; 45-108, 1987.

KLOOS, H. & MCCULLOUGH, F. S. Plant molluscicides. *J. of Med. Plant Research.*; 46:195-209, 1982.

KLOOS, H. & MCCULLOUGH, F. S. *Plant Molluscicides: a review.* *Wld Hlth Org.*; 1981.

KUPCHAN, S. M., BARBOUTIS, S. J., KNOX, J. R., LAU, C. A. M. C. A. α -Solamarine tumor inhibitor isolated from *Solanum dulcamara*. *Science* 150: 1827-1829, 1965.

LAINETTI, R. E BRITO, N. R. S. *A saúde pelas plantas e ervas do mundo inteiro.* Ed. Tecnoprint, Rio de Janeiro, RJ. 37p, 1980.

LARDANS, V. & DISSOUS, C. Snail control strategies for reduction of schistosomiasis transmission. *Parasitology Today*; 14(10): 413-7, 1998.

LEE, K.R., KOZUKUE, N., HAN, J. S., PARK, J.H., CHANG, E.Y., BAEK, E. J., CHANG, J. S., FRIEDMAN, M. Glycoalkaloids and metabolites inhibit the growth of human colon (HT29) and liver (HepG2) cancer cells. *J Agric Food Chem* 52: 2832-2839, 2004.

LEITE, S. P., VIEIRA, J. R. C., MEDEIROS, P. L., LEITE, R. M. P., LIMA, V. L. M., XAVIER, H. S., LIMA, E. O. Antimicrobial activity of *Indigofera suffruticosa*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v.3, n.2, p.261-65, 2006.

LEITE, S. P., MEDEIROS, P. L., SILVA, E. C., MAIA, M. B. S., LIMA, V. L. M., SAUL, D. E. Embryotoxicity in vitro with extract of *Indigofera suffruticosa* leaves. Toxicology 18(701-705), 2004.

LEITE, S. P., SILVA, L. L. S., CATANHO, M. T. J. A., LIMA, E. O., LIMA, V. L. M. Anti-inflammatory activity of *Indigofera suffruticosa* extract. REBRASA 7:45-52., 2003.

LEMOS, J. R. Fitossociologia do componente lenhoso de um trecho de vegetação arbustiva caducifolia espinhosa no Parque Nacional Serra da Capivara, Piauí, Brasil. Recife: UFPE, 55p. Dissertação de Mestrado, 1999.

LEWIS, J. P. Legumes of Bahia. Kew: Royal Botanic Garden.1987.

LEYTON, V., HENDERSON, T.O., MASCARA, D., KAWANO, T. Atividade moluscicida de princípios ativos de folhas de *Lycopersicon esculentum* (Solanales, Solanaceae) em *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Planorbidae). Iheringia, Sér. Zool. 95(2): 213-16, 2005

LEYTON, V. Atividade moluscicida de princípios ativos de folhas de *Lycopersicon esculentum* cv. Cereja em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). Tese de Doutorado. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo; 1995.

LHULLIER, C., HORTA, P. A., FALKENBERG. M. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. Rev Bras Farmacogn 16: 158-163, 2006.

LIANG, Y., COLES, G. C., DOENHOFF, M. J., SOUTHGATE, V. R. In vitro responses of praziquantel-resistant and-susceptible *Schistosoma mansoni* to praziquantel. Int Journ. For Parasitology; 31-1227-1235, 2001

LOHDA, V., KHAN, H. A., GHANIM, A. J. 1997. Indian Chem. Soc. 74, 425, 1997.

LORENZI, H. plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais. Nova Odessa, SP. Edição do Autor, p. 271-2, 1982.

LUNA, J. S., SANTOS, A. F., LIMA, M. R. F., OMENA, M. C., MENDONÇA, F. A. C., BIEBER. L. W., SANT'ANA, A. E. G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. J. of Ethnopharmacology; 97: 199-206, 2005

LYARDDIARD, J. R. A, WHITFIELD, P. J., BARTLETT, A. Antischistosomal bioactivity of isoflavonoids from *Millettia thonningii* (Leguminosae). *J. Parasitol.*; 88 (1): 163- 170, 2002.

MAJAK, W., BENN, M., MCEWAN, D., PASS, M. A. Three nitropropanoyl esters of glucose from *Indigofera linnae*. *Phytochemistry* 31, 2393-5, 1992.

MALTBY, L & CALOW, P. The application of bioassays in the resolution of environmental problems; past, present and future. *Hydrobiologia*, 188/189: 65-76, 1989.

MARTSON, A. & HOSTETTMAN, K. Plant molluscicides. *Phytochemistry*; 24: 639-652, 1985.

MENDES, N.M., VASCONCELOS, M.C., BAPTISTA, D.F., ROCHA, R.S., SCHALL, V.T. Evaluation of the molluscicidal properties of *Euphorbia splendens* var. *Hisloppi* (N. E. Br.) latex: experimental test in an endemic area in the state of Minas Gerais, Brazil. *Men. Inst. Oswaldo Cruz* 92, 719-724, 1997.

MCCULLOUGH, F. & MOTT, K. E. The role of molluscicides in schistosomiasis control. *Bull. Wld Hlth Org.*, Geneva, (WHO / VBC / 83. 879. WHO / SCHISTO / 83. 72); 1-13, 1983.

MCCULLOUGH, F. S. Biological control of the snail intermediate hosts of human *Schistosoma spp.*: a review of its present status and future prospects. *Acta Tropica*; 38: 5-13, 1981.

MCLAUGHLIN, J. L., CHANG, C. J., SMITH, D. L. Bench-top bioassays for the discovery of bioactivity natural products: an update. In: Rahman, a U. (Ed.), *studies in natural products chemistry*. Elsevier, Amsterdam, 1991.

MCLAUGHLIN, J. L., ROGERES, L. L., ANDERSON, J. E. The use of Biological Assays to Evaluate Botanicals. *Drug Information Journal* 32:513-524, 1998.

MELÉNDEZ, P. A. & CAPRILES, V. A. Molluscicidal activity of plants from Puerto Rico. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*; 96(2): 209-18, 2002.

MEYER, B. M., FERRIGNI, N. R., PUTNAM, J. E., JACOBSN, L. B., NICHOLS, D. E., MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp, a convenient general bioassay for active – plant constituents. *Planta med.* 45, 31-34, 1982.

MILLER, R. W., SMITH, J. R. Seeds of *Indigofera* species: Their content of amino acids that may be deleterious. *J. Agr Food Chem* 21 (5): 909-912. 1973.

MOREIRA, J. L. A. TOZZI, A. M. G. A. *Indigofera* L. (Leguminosae Papilinoideae) no estado de São Paulo, Brasil. **Revista brasileira de Botânica**, 20: 97-117. 1997.

MORGAN, J.A.T., DEJONG, R. J., SNYDER, S. D., MKOJI, G.M., LOKER, E. S. *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria*: past history and future trends. *Parasitology*; 123, S211-S228, 2001.

MOTT, K. E. Plant molluscicides. 1ª Edição. Grã Bretanha: UNDP/ WORLD BANK/ WHO; 1987.

NARENDER, T., KHALIG, T., PURIB, A., CHANDER, R. Antidyslipidemic activity off urano-flavonoids isolated from *Indigofera tinctoria*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. V.16, 3411-3414. 2006.

NETO, J. D. B., OLIVEIRA, C. M. C., PEIXOTO, P. V., BARBOSA, I. B. P., ÁVILA, S. C., TOKARNIA, C. H. Anemia hemolítica causada por *Indigofera suffruticosa* (Leg. Papilionoideae) em bovinos. *Pesq. Ver. Bras.* 21(1):18-22, 2001.

NEVES, D.P. *Parasitologia humana*. 10ª Ed. São Paulo: Editora Atheneu.p.194-202, 2004.

OGA, S. *Fundamentos de Toxicologia*. 2ª ed. São Paulo: Atheneu Editora. Oliveira, D. m. T., Paiva, E. A. S. Anatomy and ontogeny of pterodon emarginatus seed, 2003. *Braz. J. Biol.*, v.65, n. 3, 483-494, 2005.

OLIVEIRA, M. E. A., SAMPAIO, E. V. S. B., CASTRO, A. A. J. F., RODAL, M. J. N. Flora e fitossociologia de uma transição carrasco-caatinga de areia em Padre Marcos. *Piauí Naturalia*, 22, 131-150, 1997.

OLIVEIRA-FILHO, E. C, PAUMGARTTEN, J. R. Toxicity of *Euphorbia milii* látex and niclosamide to snails and nontarget aquatic species. *Ecotoxicology and environmental safety*; 46: 342-350, 2000.

PAIVA, M. A. S., BARBOSA, A. C. D., ALVES, H. L. J. *Indigofera suffruticosa* Mill (Leguminosa) com potencial forrageiro em uma região de Caatinga no Semi-árido de Pernambuco. (Alagoinha). *Proceedings of the XXXVIII Congresso Nacional de Botânica*. São Paulo, Brasil: Sociedade Nacional de Botânica, 422, 1987.

PARAENSE, W. L. The schistosome vectors in the Américas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*; 96 (supl. 7-16): 7-16, 2001.

PARRISH, P.R. Acute toxicity tests. In: *Fundamentals of aquatic toxicology: Effects, environmental fate and risk assessment* (G. M. Rand), pp. 947-973,1995.

PAULINI, E. Estado atual do conhecimento sobre moluscidas. *Rev. Bras. Malariologia e Doenças Tropicais*; 4(15):355-62, 1965.

PAULINI, E. Moluscidas e outros métodos profiláticos. *Rev. Bras. Malariologia e Doenças Tropicais*; 11(2-): 595-623, 1959.

- PESAVENTO, F. O azul fluminense: Um estudo sobre o comércio do anil no Rio de Janeiro Colonial, 1749-1818. *Econômica*, Rio de Janeiro, v.7, (1), 207-231, 2005.
- PIO CORREA, M. Dicionário de plantas úteis no Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, v. 1. 1926.
- POINTIER, J.P. & JOURDANE, J. Biological control of the snail hosts of schistosomiasis in areas of low transmission: the example of the Caribbean area. *Acta Tropica*; 77: 53-60, 2000.
- RÉ L & KAWANO, T. Effects of *Laurus nobilis* (Lauraceae) on *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*; 82(IV): 315-320, 1987.
- REY, L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.p.109,665-677, 1991.
- REY, L. Parasitologia. 3ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.; 2001
- RIBEIRO, I. M. S., SILVA, M. A., RANGEL, J. H. A. R. Levantamento Botânico de Leguminosas Forrageiras Nativas da Bacia Leiteira do Estado de Alagoas. Maceió, EPEAL, 5p., 1984.
- RIET-COREA, F. Comunicação pessoal (Lab. Diagnósticos UFPel, Pelotas, RS). Roig Y Mesa, J. T. Plantas Medicinales aromáticas y venenosas de Cuba. La Habana, 1974. Editorial Ciência y Técnica, 163-5, 2000.
- RIVEAU, G., POULAIN-GODEFROY, O., DUPRÉ, L., REMOUÉ, F., MIELCAREK, N., LOCHT, C., CAPRON, A. Glutathione S-Transferases of 28kDa as major Vaccine candidates against Schistosomiasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*; Suppl. I:87-94, 1998.
- RODAL, M. J. N. Fitossociologia da vegetação arbustiva-arborea em quatro áreas de caatinga em Pernambuco. Campinas: UNICAMP, 224p. Tese de Doutorado, 1992.
- ROGERS, S. H & BUEDIN, E. Hycantone resistance: development in *Schistosoma mansoni*. *Science*; 172(3987): 1057-8, 1971.
- ROIG, T., MESA, J. T. Plantas medicinales Aromáticas y Venenosas de Cuba. La Habana Cuba: Editorial Ciência y Técnica Intituto Del Libro, 315-16, 1974.
- RUG, M. & RUPPEL, A. Toxic activities of the plant *Jatropha curcas* against Intermediate snail hosts and larvae of schistosomoses. *Tropical medicine and international health*; 5(6): 422-30, 2000.
- SANTOS, A.F. Estudo de plantas com atividade nematicida e/ou moluscicida e reexame da *Jatropha elliptica* Muel Arg. Tese de mestrado em Química, Universidade Federal de Alagoas – Maceió, 1997.

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

SCHALL, V.T., VASCONCELLOS, M. C., SOUZA, C.P., BAPTISTA, D.F. The molluscicidal activity of crown of Christ (*Euphorbia splendens* var. *hislopii*) latex on snails acting as intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*;58(1): 7-10, 1998.

SHERMAN, P. J. Tropical Forae Legumes. Food and Agricultural Organization, Rome, Italy, 1982.

SILVA, C. B. avaliação da atividade antitumoral em extrato de *Indigofera suffruticosa* Mill. Tese de mestrado em Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco – Recife, 2007.

SILVA, R.C., MOTTA, M.A., AMÂNCIO, F.F., MELO, A.M.M.A. Efeitos do oxifluorfem na fecundação e no teor de proteínas do caramujo *Biomphalaria glabrata*. *Pesticidas: r. ecotoxicol. e meio ambiente*, Curitiba, v. 18, jan./dez. 2008.

SILVA, T. M. S., COSTA, R. A., OLIVEIRA, E. J., BARBOSA-FILHO, J. M., AGRA, M. F., CAMARA, C. A. Complete ¹H and ¹³C NMR assignments of isojuvipidine from *Solanum asterophorum* Mart. *J Braz Chem Soc* 16(6B): 1467-1471, 2005a.

SILVA, T. M. S., AGRA, M. F., BHATTACHARYYA, J. Studies on the alkaloids of *Solanum* of northeastern Brazil. *Rev Brás Farmacogn* 15: 292-293, 2005b.

SILVA, T. M. S., BATISTA, M. M., CAMARA, C. A., AGRA, M. F. Molluscicidal activity of some Brazilian *Solanum* spp. (Solanaceae) against *Biomphalaria glabrata*. *Ann Trop Med Parasitol* 99: 419-425, 2005c.

SILVA, A. C. Tratamento de Percolato de Aterro Sanitário e Avaliação da Toxicidade. Tese de Mestrado, Engenharia Civil, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ, 2002.

SILVA, R. V., NAVICKIENE, H. M. D., KATO, M.J., BOLZANI, V. S., MEDA, C.I., YOUNG, M. C. M., et al. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry*; 59:521-27, 2002.

SILVEIRA, A. C. Controle da esquistossomose no Brasil. *Mems Inst. Oswaldo Cruz*; 84 (supl. 1): 91-104, 1989.

SOUZA, C. P., MENDES, N. M., JANNOTTI-PASSOS, L. K., PEREIRA, J. P. O uso da casca da castanha do caju *Anacardium occidentale*, como moluscicida alternativo. *Rev. Inst. Med. Trop.*; 34(5): 459-66,1992.

Souza, C. P & Lima, L. C. Moluscos de interesse parasitológico do Brasil. 1ª Edição. Belo Horizonte: Editora da FIOCRUZ/CPqRR; 1990.

STEFANELLO, M. E. A., SALVADOR, M. J., ITO, I.Y., MACARI, P. A. T. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos de *Gochnatia polymorpha* ssp. *fl occosa*. *Ver Bras Farmacogn* 16: 525-530, 2006

TALARICO, L. F., OKAZAKI K, KAWANO, T., PEREIRA, C. A B., NAKANO, E. Dominant lethal effect of ⁶⁰Co gamma radiation in *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *Mutation Research*: 139-145, 2004.

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

THOMAS, Y., ETUDE, E. T. Mise au point de diferentes methods d'analyses des pignts indigoides presents dans *Indigofera suffruticosa* M. Rapport de stage. Lab. Sciences des Agroressources, ENSACT, INPT. 90p., 1998.

TUCKER, S. C. Floral development in legumes. *Plant Physiology*, v. 131, 911-926, 2003.

UTZINGER, J., SHUHUA, X., GORAN, E. K. N., BERGQUIST, R., TANNER, M. The potencial of artemether for the control of schistosomiasis. *Int. J. for Parasitology*; 31: 1549-62, 2001.

WASHINGTON: TAYLOR & FRANCIS. PAULINI, E. Moluscidas e erradicação do *S. mansoni*: Considerações epidemiológicas. *Rev. Bras. Malariologia e Doenças Tropicais*; 1(18):153-158, 1966.

WATTANABE, L. C. Desenvolvimento Embrionário de *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny) (Mollusca, Planorbidae). Tese de mestrado, São Paulo: Universidade de São Paulo; 1997.

WEBBE, G. Molluscicide in the control of schistosomiasis. Apud MOTT, K. E., ed. *Plant Molluscicides*. Chichester, John Wisley; 1-26, 1987.

WEI, F. H., XU, X. J., LUI, J.B., DAI, Y.H., DUSSART, G. Toxicology of potential molluscicide derived from the plant *Solanum xanthocaroum*: a preliminary study. *An. Of Trop. Med. & Parasitology*; 96 (3) 325-331, 2002.

WEIDEBORG, M., VIK, E. A., OFJORD, G. D., KJONNO, O. Comparison of three marine screening tests and four Oslo and Paris commission procedures to evaluate toxicity of offshore chemicals, *Environmental Technology and Chemistry*, vol.16, pp. 384-389, 1997.

WHO (World Health Organization). *Molluscicides*. Teach. Rep. Ser. Wld Hlth Org., Geneva; 214:1-59, 1961.

WHO (World Health Organization). Molluscicide screening and evaluation. Geneva; 3(4):567-81, 1965.

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

WHO (World Health Organization). Epidemiology and control of schistosomiasis. Teach. Rep. Ser. Wld Hlth Org., Geneva; 649: 1-76, 1980.

WHO (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; 41, 1984.

WHO (World Health Organization). The control of schistosomiasis. Tech. Rep. Ser. Wld Hlth Org., Geneva; 728:1-113, 1985.

WHO (World Health Organization). Guidelines for the Assesment of Hebal Medicines. Fitoterapia; 63 (2) 99-111, 1992.

WHO (World Health Organization). The Conrol of Schistosomiasis: second report of the WHO Expert Committee. 1993.

WHO (World Health Organization). *Triphenyltin compounds*. CICAD-Concise International Chemical Assessment Document 13. Geneva: WHO.1999.

WHO (World Health Organization). www.who.int/mediacentre/factsheets. 2010.

XIAO, S., CATTO, B. A., WEBSTER, L. T. Effects of praziquantel on different developmental stages of *Schistosoma mansoni* in vitro and in vivo. The J. of Infec. Diseases; 151(6) 1130-37, 1985.

YAMAMOTO, M. M., KAWANO, T., YOUNG, M. C. M., HARAGUCHI, M., HIROKI, K. Molluscicidal activity of three Brazilian plant species. Fitoterapia; 57(1): 59-62, 1996.

ZAGATTO, P. A., Ecotoxicologia e desenvolvimento sustentável: Perspectivas para o século XXI, in VI Encontro de Ecotoxicologia, Mini Curso: ecotoxicologia Aquática, São Carlos – SP, Brasil, 2000.

O presente trabalho será submetido à publicação na revista Toxicology.

Toxic effects of aqueous and hydroalcoholic extracts of *Indigofera suffruticosa* on *Biomphalaria glabrata*, cercariae of *Schistosoma mansoni* and larvae of *Artemia salina*

Eliane Souza Figueiredo^a, Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo^b, Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque^c, Vera Lúcia de Menezes Lima^a, Maria Teresa Janssem de Almeida Catanho^a

^aDepartamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, 50670-420, Recife-Pe, Brasil.

^bDepartamento de Biofísica e Radiobiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, Brasil.

^cLaboratório de Imunologia Kesio Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, 50670-901, Recife-Pe, Brasil. 50670-90.

*Corresponding author: Tel: +558121268540 ; Fax: +558121268576

E-mail address: mariajanssem@hotmail.com (M.T.J.A. Catanho)

Abstract

Indigofera suffruticosa Mill is a shrub of the Fabaceae popularly known as indigo. It is a plant distributed in tropical and subtropical regions, being used in folk medicine against various health problems. This study evaluates the toxic activity of hydroalcoholic and aqueous extracts of leaves of *I. suffruticosa* on adult snails and in the early stage of *B. glabrata* exposed to concentrations of 0, 125, 250, 500, 750 and 1000 ppm for 96 hours. Other aspects were observed cercaricide activity of the extracts after 120 minutes (min) exposure of the same concentrations mentioned above and analysis of the activity of the extracts artemicida after 24 hours of exposure at the same concentrations above. Upon completion of the exposure period showed that the aqueous extract at a concentration of 500 ppm caused a reduction in fertility rate and fertility of adult snails to 53.9% and 49.6%, respectively, and hydroalcoholic to 44.7% and 40.4% respectively. The study showed embryotoxicity at a concentration of 250 ppm of the aqueous extract showed 26.0% of infeasibility while the hydroalcoholic showed 53.0%. Cercaricide activity of aqueous extract showed strong cytotoxicity at a concentration of 250 ppm and after 120 min exposure, while the hydroalcoholic extract showed strong toxicity at concentration of 125 ppm and 120 min after exposure. Regarding artemicida activity in the aqueous concentration of 250 ppm caused the death of 36.3% larvae, while the hydroalcoholic, 64.0%. The study showed that hydroalcoholic and aqueous extracts of leaves of *I. suffruticosa* reduces fertility rates and fertility, also has embryotoxic properties and cercaricide, indicating a possible use of biodegradable material or a fraction derived therefrom in control programs of Schistosomiasis mansoni.

Keywords: *Indigofera suffruticosa*, *Biomphalaria glabrata*, *Artemia salina*; cercaricide activity, toxicity.

1.Introduction

Brazil has a great diversity of plant species, but less than 10% has established their phytochemical properties. Therefore studies to evaluate biological activities of products extracted from plants are of great importance to society. New compounds can be used to combat different diseases that affect humans, the development of herbal medicine, as well as the control or eradication of tropical diseases like dengue and schistosomiasis (Luna et al., 2005).

The Schistosomiasis is one of major source of morbidity and mortality in developing countries including Africa, South America, Caribbean, Middle East and Asia. However, with the increase in immigration and tourism to endemic areas, cases of the disease are occurring in developed countries (Chitsulo, et al 2000).

Brazil constitutes one of the most important zones of disease occurrence in the world, not only by the number of patients but also because of gravity by some of them (Santos, 1997). Transmission of the disease occurs in 19 states with different intensities (Rey, 2001; FUNASA, 2002; Coura & Amaral, 2004).

Second, Prata 1987, the spread of this disease depends primarily on three factors: the presence of individual eggs removed; existence of an intermediate host and connect people with untreated water, infested with cercariae. Therefore, fighting this disease may follow two paths: The treatment of infected individuals and prophylaxis by destroying the cercariae and hosts snail by means of products with these activities.

Over the years, various substances were used in order to control populations of snails *Biomphalaria glabrata* (Oliveira-Filho, 2003). The lack of an effective method to control the disease, the high cost, the applicant snail resistance to synthetic molluscicides available so far and the search for non-polluting alternatives aimed at environmental protection have encouraged the research for products of plant origin (WHO, 1992, Wei et al., 2002).

The plant extracts found in endemic areas of schistosomiasis, easy propagation, short reproductive cycle, with cheap bioactive components and biodegradable are targets for studies of scientists to combat the snails and schistosome larval stages as a way of controlling the disease (Mott, 1987; Bezerra et al., 2002; Lyarddiard et al., 2002; Meléndez & Capriles, 2002; Luna et al., 2005). Luna et al., 2005 studied the larvicidal and molluscicidal activity of some medicinal plants from northeast Brazil.

The *Indigofera suffruticosa* Mill, also known as “Anil” (Neto et al., 2001), is a plant found in tropical and subtropical areas and is well adapted to growth in semi-arid regions and on soils of low fertility (Pio Correa, 1926; Braga, 1976; Paiva et al., 1987). Popularly is used in different countries against various health problems. Its leaves have been used for stomach problems (Agra et al., 1996), antispasmodic, sedative, diuretic, purgative, while the root has been used as a toothache (Lorenzi, 1982) and useful in cure jaundice (Lainetti and Brito, 1980; Correa, 1984). Also used in snake bites and how insecticide (Pio Correa, 1926). It has medicinal properties in treating fevers, parasites, skin diseases and heart problems (Allen and Allen, 1981). Pharmacological studies show that extracts of *I. suffruticosa* have anticonvulsant activity (Alejo et al., 1996), antigenotoxic (Badell et al., 1998) and antiepileptic (Roing and Mesa, 1974), and that the ingestion of leaves of *I. suffruticosa* causes anemia hemolytic in cattle (Neto et al., 2001).

Recent studies on the effects of aqueous extract of leaves of *I. suffruticosa* proved possessing antimicrobial activity against gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus* and against the dermatophytes fungi *Trichophyton rubrum* and *Microsporium canis* (Leite et al., 2006); cytotoxic activity in embryonic cells of rats (Leite et al., 2004); anti-inflammatory activity in reducing mouse paw edema (Leite et al., 2003); and significant antitumor activity in Ehrlich carcinoma in camundogos marked, (Silva, 2007).

In this context, the study aimed to analyze the toxic activity of hydroalcoholic and aqueous extracts of leaves of *I. suffruticosa* Mill on adult snails of *B. glabrata* and its spawns, to analyze the cercaricide activity and the

artemicida activity, given that toxicity tests with shellfish are held in the aquatic environment, so you need a toxicity test.

For this purpose we used the *Artemia salina* which is an important link between the lower and upper levels of the food chain of an ecosystem (Zagatto, 2000). The brine shrimp *A. salina* are internationally used in toxicity tests due to their significant features, such as: their adult organisms have a large reproductive potential, are easily obtainable on the market and maintained in laboratories; eggs are easy to hatch and tests show good reproducibility (FEEMA, 1993; Weideborg, 1997). The bioassay with *A. salina* has been established as a safe method, practical and economical for the determination of synthetic compounds bioactivity's (Almeida et al, 2002) as well as plant extracts (Meyer et al., 1982; McLaughlin et al., 1991; Lhuillier et al., 2006; Stefanello et al., 2006).

2. Materials and methods

2.1 Plant used

The leaves of *I. suffruticosa* were collected in Sao Caetano city from Pernambuco - Brazil. The plant was taxonomically identified by Dr. Marlene Barbosa Carvalho de Alencar, Department of Botany, Federal University of Pernambuco (UFPE), Brazil. The voucher specimen has been kept in the Herbarium the UFPE Geraldo Mariz (number 45217).

2.2 Preparation of extracts from the leaves of *I. suffruticosa*

2.2.1 Aqueous extract

The dried leaves of *I. suffruticosa* were crushed in a blender and then weighed. The preparation of the aqueous extract was performed by means of two extractions. The first was used 50g of leaf powder to 300 ml of distilled water, placed in agitator for 15 hours at room temperature and was subsequently

made a simple filtration. The resulting material after filtration (powder) obtained was submitted to a second extraction by adding 100 ml of distilled water and taken to rombeira for 15 hours. Then the material was again filtered, and subjected to a vacuum filtration and lyophilized. After lyophilization, the resulting material was stored at -20°C until used in experiments.

2.2.2 Hidroalcoholic extract

Preparation of hydroalcoholic extract was also subjected to two extractions. First was placed 50g of leaf powder, alcohol and distilled water to 70, with the final volume was 200 ml and the ratio of 7:3, respectively, in an amount sufficient to cover all the dust. Then the material was placed in rombeira for 2 hours and subjected to simple filtration. The resulting powder was subjected to a second extraction under the same conditions, and subjected to a vacuum filtration. After this process the material was placed on the Rotavapor and then lyophilized. After lyophilization all material was stored at -20°C until their use in experiments.

2.3 Bioassays

2.3.1 Creation and maintenance of snails

Mollusc species *B. glabrata*, originating from descendants of São Lourenço da Mata, PE - Brazil, were obtained from the Department of Biophysics and Radiobiology, UFPE. The specimens were kept in plastic tubs 25x25x17 cm in distilled water, dechlorinated (Purity-Bella Source) at pH around 7.0 and temperature $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. The snails were fed daily with fresh lettuce leaves according to the technique de Andrade (1954) and Melo (1998), water exchange was performed twice a week. The study analyzed adult snails with shells intact, with a diameter between 10 and 18 mm.

2.3.2 Obtaining of spawns of snails

To study the embryotoxicity embryos were used for *B. glabrata*. To obtain the nests were placed the day before the start of the experiment, the water surface of the plastic tubs, transparent sheets of polyethylene of about 5x5 cm, which served as substrate for oviposition snails. The eggs were collected and selected using a stereoscopic microscope (Tecnival). Embryos were chosen that were in the blastula stage and had an intact membrane.

2.3.3 Cercariae

The cercariae used were obtained from snails of *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* BH strain (Belo Horizonte), exposed to artificial light according to Marston and Hostettmann (1991). The tests were performed in the Parasitology Department of UFPE and Laboratory of Parasitic Diseases, Immunology and Experimental Schistosomiasis – LIKA (Immunology of Laboratory Keizo Asami) with the use of an inverted microscope (LEICA DMIL).

2.3.4 *Artemia salina*

To obtain larvae of *Artemia salina* was used the technique of Meyer et al., 1982 and McLaughlin *et al.*, 1995. Were obtained in the laboratory of the Department of Biophysics and Radiobiology, UFPE. The eggs of *A. salina* were placed in a plastic container containing seawater at pH 8.0 and kept under aeration. After 48 hours the larvae were observed and counted under a microscope stereoscope (Tecnival). Larvae were selected that had motion. The experiment was conducted in the laboratory of Biophysics and Radiobiology, UFPE.

3. Toxicity tests

3.1 Toxicity to adult snails

For the toxicity experiment were used 120 adult snails young pre-selected. Then, a sample of 200 adult snails with a diameter between 10 and 18 mm, was placed in individual plastic containers, and to check the sexual maturity by the oviposition the snails were observed for three consecutive days and finally selected the 120. Two groups were formed (A and B) that contained six subgroups, each subgroup contained 10 snails. In group A the adult snails were submitted to aqueous extract of leaves of *I. suffruticosa* for 96 hours at concentrations of 125, 250, 500, 750 and 1000 ppm and one group served as a negative control and was kept in filtered water with pH 7.0. In group B, the snails were submitted to the hydroalcoholic extract of leaves of *I. suffruticosa* also for 96 hours and at the same concentrations of 125, 250, 500, 750 and 1000 ppm, and again one group served as a negative control group and were kept in filtered water with pH 7.0. During exposure the snails were kept in plastic cups with 50 mL of the extract at the concentrations indicated above for each group and the ambient temperature. After the period of exposure groups, the snails were placed in plastic tubs with filtered water and fed daily with fresh lettuce and observed for 30 days. The parameters analyzed were: mortality (number of snails dead adults), fecundity (number of embryos generated) and fertility (number of viable embryos). The eggs of the exposed snails were collected daily for 30 days, stored in 24-well microplates in an incubator B.O.D. at 25 ° and analyzed diariamnete at microscopy (Tecnival). The studies were performed in triplicate.

3.2 Embryotoxicity tests

Approximately 2.500 selected embryos at the blastocyst stage, the adult snails not exposed, were divided into two groups (A and B), each group contained six subgroups with approximately 200 embryos. In Group A, embryos were subjected to aqueous extract of leaves of *I. suffruticosa* for 96 hours the following concentrations: 125, 250, 500, 750 and 1000 ppm, and one group served as a negative control and were kept in filtered water with pH 7.0.

In group B embryos were submitted to the hydroalcoholic extract of leaves of *I. suffruticosa* for 96 hours to the concentrations of 125, 250, 500, 750 and 1000 ppm, and other group served as a negative control and were kept in filtered water with pH 7.0. During exposure the embryos were kept in petri dishes with 10 mL of the extract at the concentrations indicated above for each group and kept in an incubator B.O.D. at 25 ° C. After the period of exposure determined the extracts were removed and the spawns were placed in filtered water with pH 7.0 and again kept in an incubator B.O.D. at 25 ° C. The embryos were observed every 24 hours for a period of 10 days. The parameters analyzed were the inviability (malformed embryos and deaths) and viability through the frequency of hatching of embryos exposed to the extract. Were inviable embryos that had swollen to the point, and still showing no movement or heartbeat (dead) and the malformed, which were classified according to criteria of Geilenkirchen (1996). Were considered hatched embryos that managed to leave the egg capsule during the observation period of 10 days. The studies were performed in triplicate.

3.3 Activity cercaricide

The cercariae, a total of about 1.500, were divided into two groups (1 and 2), each group comprising six subgroups with approximately 100 cercariae. Group 1 was exposed to aqueous extract of leaves of *I. suffruticosa* for 2 hours at concentrations of 125, 250, 500, 750, 1000 ppm and one group served as a negative control and was kept in distilled water pH 7.0. The second group was exposed to the hydroalcoholic extract of leaves of *I. suffruticosa* also for 2 hours and at concentrations of 125, 250, 500, 750 and 1000 ppm and having a group as a negative control, kept in filtered water with pH 7.0. During exposure the cercariae were kept in beakers with 10 mL of the extracts at the concentrations indicated above for each group and kept at room temperature. The cercariae were observed by inverted microscope at intervals of pre-defined 15, 30, 60 and 120 min. The analysis of activity cercaricide was made according to the following parameters: Complete lethality: 100% of cercariae killed (++++); Strong toxicity: 90% of cercariae killed (+++); Medium toxicity: 50-

90% of cercariae killed (++); Inactive: less than 50% of dead cercariae (+) and control group: 100% of cercariae alive (-). The studies were performed in triplicate.

3.4 Activity artemicida

The larvae of *A. salina*, about 700, were divided into two groups (1 and 2). Each group consists of six subgroups that contained about 50 larvae of *A. salina*. Group 1 was submitted to aqueous extract of leaves of *I. suffruticosa* for a period of 24 hours at concentrations of 125, 250, 500, 750 and 1000 ppm and other group served as a negative control and was kept in seawater at pH 8.0. Group 2 was submitted to the hydroalcoholic extract of leaves of *I. suffruticosa* also at concentrations of 125, 250, 500, 750 and 1000 ppm with one another p as a negative control group kept in sea water with pH 8.0. During exposure, the *Artemias* were kept in tubes with 5 mL of the extract at the concentrations indicated above for each group and kept in an incubator B.O.D. at 25 ° C. After completion of the exposure period the larvae were observed under the microscope and analyzed for stereoscope lethality of the extract according to the number of *A. salina* dead. The studies were performed in triplicate.

3.5 Statistical analysis

The standard deviation was calculated using GraphPad Prism version 4 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA) and data were expressed as mean of replications \pm SD. Significant differences between groups were analyzed by Student's t-test (significance $p < 0.05$) using the program Origin 6.0. The lethal concentrations required to kill 50% (LC₅₀) of embryos in 96 h and larvae in 24 h were calculated by probit analysis using the computer software SatPuls[®] 2006 (AnalystSoft, Canada).

4. Results

4.1 Toxicity to adult snails

The toxicity of extracts of leaves of *I. suffruticosa* in adult snails can be seen in Table 1 and Figures 1 and 2.

According to the study you can see in Table 1 that the extracts of leaves of *I. suffruticosa* at different concentrations showed no toxic effect in relation to adult snails of *B. glabrata*, and also no significant difference between the aqueous extracts and hydroalcoholic.

Table 1: Mortality of adult snails of *B. glabrata* exposed for 96 hours at different Concentrations of aqueous and hydroalcoholic extracts of leaves *I. suffruticosa*.

Concentration (ppm)	Total Exposed Molluscs	Dead molluscs	
		Water extract	Hydroalcoholic extract
0	30	1	1
125	30	1	1
250	30	2	1
500	30	2	3
750	30	3	3
1000	30	3	3

Figure 1 shows the effects of different concentrations of aqueous extract of leaves of *I. suffruticosa* on fecundity and fertility of adult clam *B. glabrata* exposed for 96 hours.

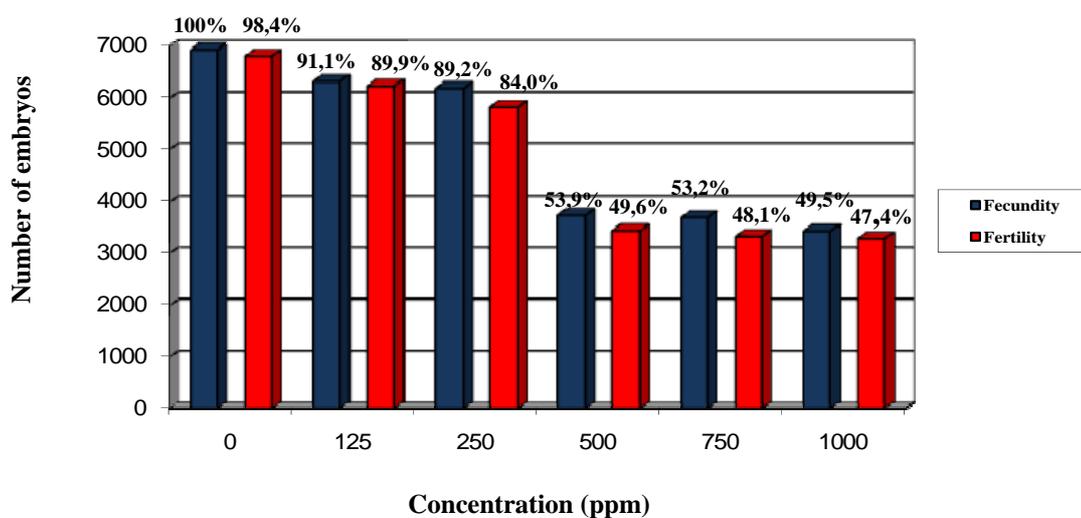


Figure 1 -Analysis of fecundity and fertility of *B. glabrata* adults exposed for 96 hours at different concentrations of aqueous extract of *I. suffruticosa*.

The study showed that the aqueous extract of leaves of *I. suffruticosa* showed decreased fecundity and fertility of adult molluscs exposed compared to control group. It was observed that concentrations of 500, 750 and 1000 ppm showed the lower fertility rates: 53.94, 53.25, 49.53% respectively.

When we observe the fertility rate of 49.65% (500 ppm); 48.1% (750 ppm) and 47.4% (1000 ppm), we see lower values when compared to fecundity. It can be observed that the concentration of 1000 ppm was more toxic to molluscs for both parameters. However, there was no significant difference between the concentrations of 125 and 250 ppm and between 500 and 750 ppm for the fecundity. Between 500 and 750 ppm concentrations was not significant difference in relation to fertility.

The action of the hydroalcoholic extract of leaves of *I. suffruticosa* on fecundity and fertility of adult snails of *B. glabrata* exposed for 96 hours at different concentrations can be seen in Figure 2.

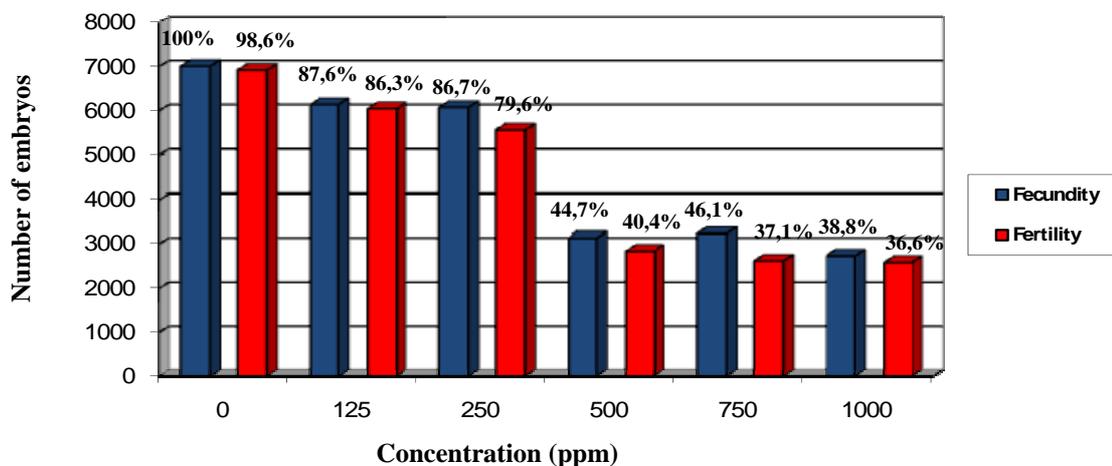


Figure 2- Analysis of fertility and fecundity *B. glabrata* adults exposed for 96 hours at different concentrations of hydroalcoholic extract of *I. suffruticosa*.

It can be observed that the hydroalcoholic extract of leaves of *I. suffruticosa* also had harmful effects on the fecundity and fertility of adult snails exposed at all concentrations when compared with the negative control. Between the concentrations of 125 and 250 ppm and concentrations between 500 and 750 ppm there was no significant difference in fecundity. Between the concentrations of 750 and 1000 ppm there was no significant difference in fertility. However, it was noted again that the concentrations of 500, 750 and 1000 ppm had the lowest fertility rates of 44.7, 46.1 and 38.8% and the lowest fertility rates of 40.0, 37.1 and 36.6%, respectively, compared to the control group. The fecundity rate of adult molluscs exposed to 750 ppm was greater than that of those exposed to 500 ppm and the fertility rate of adult mollusks exposed to 750 ppm was lower than that of those exposed to 500 ppm indicating that the adult molluscs exposed to 750 ppm led to more embryos, but there was a lower number of viable embryos. The hydroalcoholic extracts at all concentrations were more detrimental effect on the fecundity and fertility of adult molluscs exposed than to the clams exposed to aqueous extracts. The toxic effect of the extract showed dose-dependent relation for the concentrations 0, 125, 250, 500 and 1000 ppm.

4.2 Testing for embryotoxicity

The test results embryotoxicity using embryos of *B. galabrata* exposed for 96 hours at different concentrations of aqueous extract of leaves of *I. suffruticosa* can be seen in Figure 3.

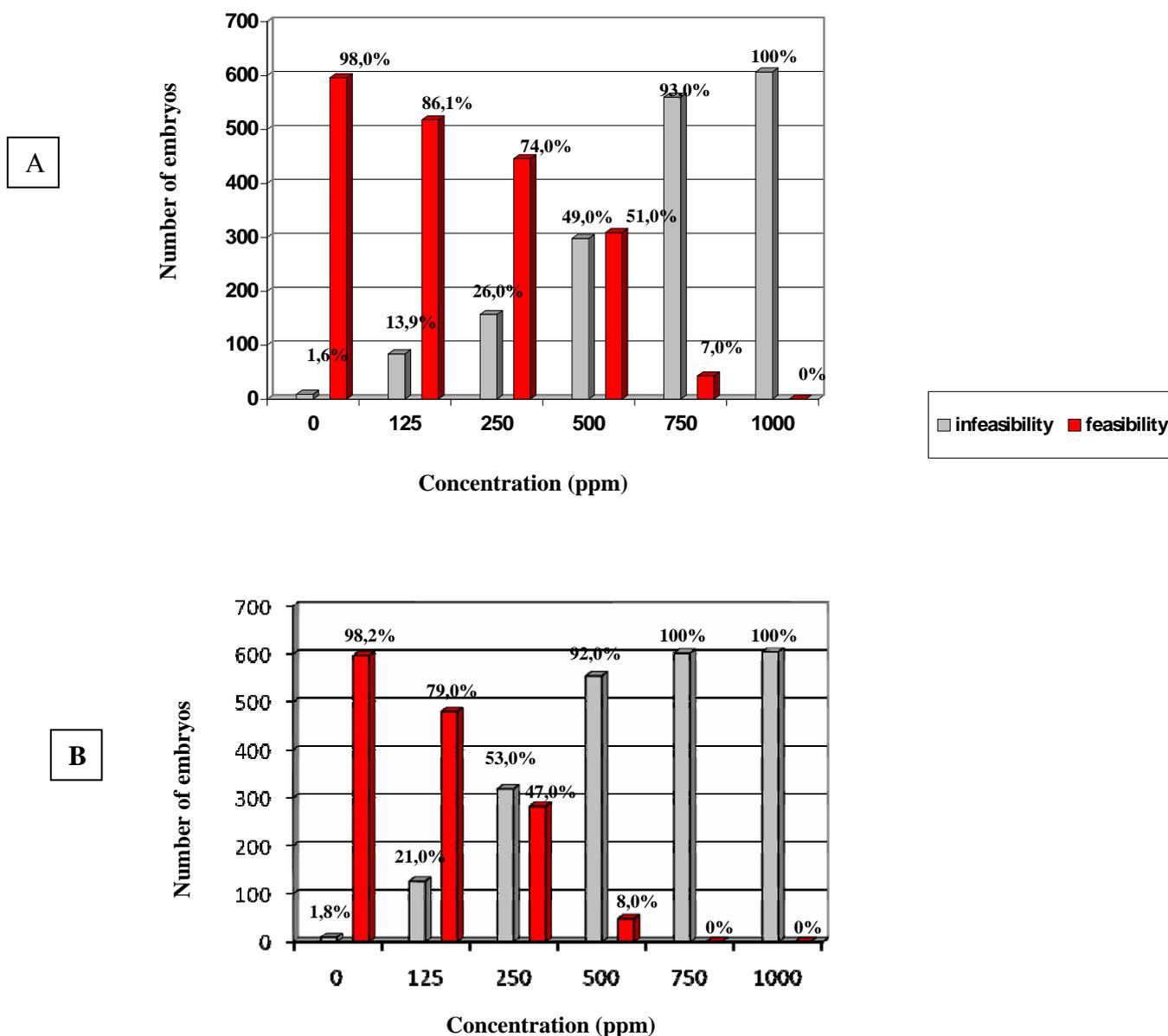


Figure 3 - Analysis of feasibility and infeasibility of embryos of *B. galabrata* in the blastocyst stage for 96 hours exposed to aqueous (A) and hydroalcoholic (B) *I. suffruticosa*.

The results showed that the aqueous extract and hydroalcoholic of leaves *I. suffruticosa* have toxic effects on embryos of *B. glabrata*. We can also verify that the toxic effects of these extracts showed dose-dependent and the concentrations of 500, 750 and 1000 ppm had the highest rates of infeasibility and thus lower rates of viability.

By comparing the two extracts, we observed that the hydroalcoholic extract showed a higher toxic effect on embryos of *B. glabrata* than the aqueous extract. Other aspect was the LC_{50} obtained for the aqueous extract equal to 354,03 ppm and 216,38 ppm for the hydroalcoholic.

4.3 Activity cercaricide

Cercaricide activity of aqueous and hydroalcoholic the leaves of *I. suffruticosa* can be seen in table 2 and 3.

Table 2 shows that during the 120 minutes of exposure to cercariae aqueous extract of leaves of *I. suffruticosa*, it was noted that at concentrations of 125 and 250 ppm in the extract medium toxicity (50 to 90% mortality) after 60 min of exposure and strong toxicity (over 90% mortality) from 120 min exposure. When we look at exposure to concentrations of 500, 750 and 1000 ppm had a medium toxicity extracts from 30 min and strong toxicity after 60 min exposure. Importantly, the control group throughout the experiment retained 100% of alive cercariae and mobile.

Table 2 - Analysis of the number of cercariae exposed to aqueous extract of leaves of *I. suffruticosa* for 120min.

Concentration (ppm)	N° of cercariae exposed	Exposure Time (in minutes)			
		15	30	60	120
0	300	-	-	-	-
125	300	-	+	++	++
250	300	-	+	++	+++
500	300	-	++	+++	+++
750	300	+	++	+++	+++
1000	300	+	++	+++	+++

(-) Control group: 100% of alive cercariae and mobile. ; (+) Inactive: less than 50% of cercariae killed; (++) Medium toxicity: 50-90% of cercariae killed; (+++) Strong toxicity: 90% more dead cercariae; (++++) Complete lethality: 100% of cercariae killed.

The effect of cercaricide activity after exposure to different concentrations of the hydroalcoholic extract of leaves of *I. suffruticosa* can be observed in Table 3.

Table 3 - Analysis of the number of cercariae exposed to the hydroalcoholic extract of leaves of *I. suffruticosa* por 120min.

Concentration (ppm)	N° of cercariae exposed	Exposure Time (in minutes)			
		15	30	60	120
0	300	-	-	-	-
125	300	+	+	++	+++
250	300	+	+	+++	+++
500	300	+	++	+++	++++
750	300	+	++	+++	++++
1000	300	+	+++	++++	++++

(-) Control group: 100% of alive cercariae; (+) Inactive: less than 50% of cercariae killed; (++) Medium toxicity: 50-90% of cercariae killed; (+++) Strong toxicity: 90% more dead cercariae; (++++) Complete lethality: 100% of cercariae killed.

The cercaria showed a mortality rate of 100% in 1000 ppm starting at 60 min remaining at concentrations of 500, 750 and 1000 ppm for the time of 120 min of exposure.

4.4 *Artemia salina* lethality assay

The analysis of the study with larvae (nauplii) of *Artemia Salina* exposed for 24 hours at different concentrations of aqueous and hydroalcoholic leaves of *I. suffruticosa* can be seen in Figure 5. The graphs demonstrate the aqueous extracts of leaves of *I. suffruticosa* showed toxic effects at concentrations of 500, 750 and 1000 ppm respectively 55.0, 76.0 and 100% mortality of larvae. Concentrations of 0, 125 and 250 ppm showed low toxicity.

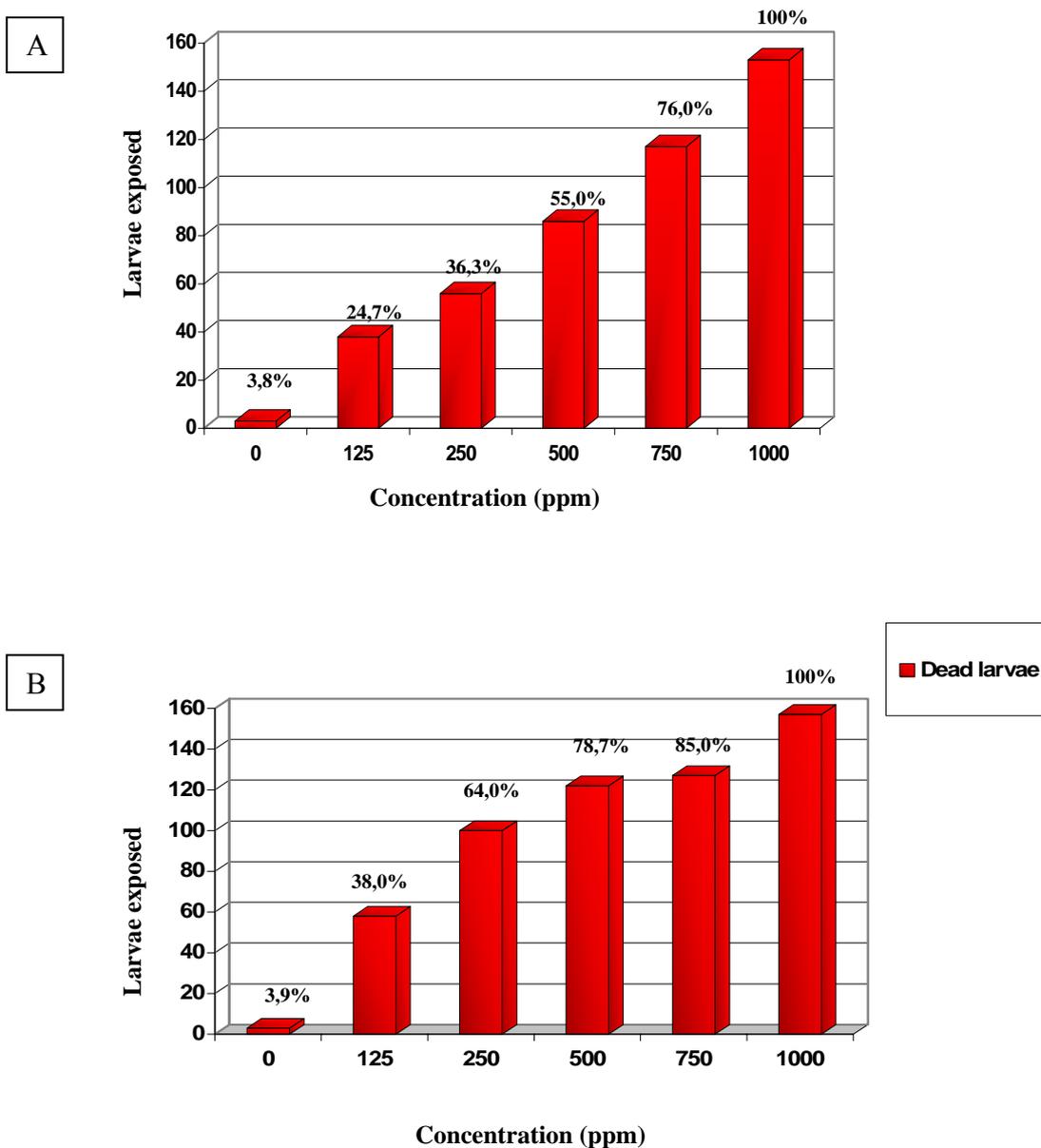


Figure 4 - Analysis of the toxicity of aqueous extracts (A) and hydroalcoholic (B) of leaves of *I. suffruticosa* on larvae of *A. salina* exposed for 24 hours.

By analyzing the toxic effects of hydroalcoholic extract of leaves of *I. suffruticosa* on *A. salina* larvae exposed for 24 hours at different concentrations observed an increased toxicity when compared to aqueous extract. We note that the cercariae exposed to concentrations of 500, 750 and 1000 ppm, again, showed the highest toxicity (78.7, 85.0 and 100% mortality of larvae, respectively). No significant differences were found between the concentrations of 500 and 750 ppm. Other aspect was the LC₅₀ obtained for the aqueous extract equal to 326,86 ppm and 185,5 ppm for the hydroalcoholic.

5. Discussion

Schistosomiasis mansoni is one of the few diseases caused by parasites that distribution and prevalence, in worldwide, continue to increase. The presence of snails *Biomphalaria* species, intermediate hosts in the life cycle of the parasite is a determining factor for the transmission of the disease, since the *Biomphalaria* is present throughout Brazil, presents reproduction by selfing and outcrossing, short reproductive cycle and large numbers of offspring per spawning. These factors contribute to the difficulties in eradicating the disease and requiring constant control of the snails to the incidence and prevalence rates are reduced (Rapado, 2007).

The results presented in this study on the toxicity of aqueous and hydroalcoholic leaves of *I. suffruticosa* adult snails showed that the concentrations used caused low mortality to adults, though we see biological changes in adults molluscs. We can say that the crude extracts used did not show molluscicidal activity. According to WHO (1983), a molluscicide of plant origin should be active at 100 ppm or less and kill 90% of snails exposed for 24 hours in water with temperature set. We suggest carrying out further studies analyzing the fractions of these substances, with the aim of elucidate properties in controlling diseases and pests.

Studies conducted by Mendes et al (1993) with ethanolic extracts of the pericarp of the fruit of *Guaiacum officinale* L. observed no activity on adult snails of *B. glabrata* at a concentration of 100 ppm. Rapado (2007) performed experiments with extracts of *Piperaceae* verified and there also did not observe the molluscicidal activity of extracts from leaves of *P. hoffmanseggianum*, *P. macedoi* and *P. macrostachya*, since it had 0% mortality of adult snails of *B. glabrata* subjected to 100 ppm. However, we can not say that these species do not exhibit the toxic action snails, as only the crude extract of the leaves was studied.

The location of the toxins in plants, in general, range, and the study of the distribution of molluscicidal principle in the plant parts is of fundamental importance. In species *Phytolacca dodecandra* (Phytolaccaceae), there is variation in molluscicidal activity where the toxins present in the extract of the berries are very active, the leaves extract is partially toxic and the extract of roots do not have toxic effects. In species *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae) this difference occurs between leaves and roots, whose extracts at 100 ppm caused 100% and 0% mortality in *B. glabrata* respectively (Bezerra et al., 2002). In most species of the family Euphorbiaceae, the toxins responsible for the molluscicidal seeds are already in Solanaceae in leaves and fruits. Thus, we reaffirm that it is important to perform tests to verify the molluscicidal activity of extracts from all plant parts, preferably the parts of easy regeneration, and not compromise the survival and integrity of the plant.

Other issue discussed was the changes encountered in biological fecundity and fertility of adults exposed to the extracts. The hydroalcoholic extracts at all concentrations were more detrimental effect on the fecundity and fertility than clams exposed to aqueous extracts. Changes in the reproductive system of molluscs can also represent a way to control this specimen without causing significant changes to environment.

The concern with control of snails intermediate hosts of schistosomiasis transmitters and seeking non-polluting alternatives to contain this endemic disease comes from many years, without having established an effective method (Barbosa, 1995; Coura, 1995; Doenhoff & Ruppel, 1998). According Jurberg

(1987), the use of plants from areas where schistosomiasis is endemic may facilitate control programs and reduce costs, this assertion is supported by Archibald (1933).

In this study we observed that in terms of embryotoxicity, the hydroalcoholic and aqueous extracts of leaves of *I. suffruticosa* showed great reduction in egg viability of *B. glabrata*, or were potentially ovicidal.

The susceptibility of embryos against natural products was also reported by Mendes et al., 1993, which found that 100% mortality of embryos of *B. glabrata* exposed to 100 ppm of aqueous suspension of the pericarp of the fruit of *Guaiacum officinale* L.

Different results regarding the susceptibility of the embryos exposed to natural extracts of plants were observed by Oliveira-Filho (2003) who studied the effects of the latex of *Euphorbia milli* on embryos of *B. glabrata* ovicidal observing a low potential of this substance. Although not causing immediate death of embryos, can be observed high toxicity due to induction of malformations (teratogenicity) and delay of hatching in the embryos of the mollusc studied. Similar results were obtained by Kawano and colleagues with extracts of *Stevia rebaudiana* plant and *Laurus nobilis*, in general, exhibited a slight lethal effect even at high concentrations, but induced malformations and retardation of hatching in the embryos of *Biomphalaria glabrata* exposed (Kawano & Simões, 1986; Ré & Kawano, 1987).

The low susceptibility of embryos of *B. glabrata* also was reported by Leyton et al., (2005) who analyzed the action of leaves extracts of *Lycopersicon esculentum* (tomato) on adult specimens of *B. glabrata* at concentrations above 100 ppm, the steroidal glycoalkaloid crude product, which detected the presence of tomatine, 90% of deaths caused by *B. glabrata* to 13,17 ppm (LC₉₀), but the crude extract and the active ingredient caused no ovicidal activity. Lemma et al., (1972), in studies of alcoholic extract of fruits of *Phytolacca dodecadra* (Phytolaccaceae), also found resistance of lungfish spawning of *B. glabrata*, *B. Bulinus truncatus* and *Alexandria*, when exposed to concentrations that were active in adult snails. Studies by Kloos & McCulloch (1987) suggest that the

lack of ovicidal activity possibly occurs due to high molecular weights of the substances found in crude extracts that can not cross the lipoprotein capsule that surrounds the egg and the egg membrane (Kloos & McCulloch, 1987).

In the specialized literature has not been reported earlier experiments with extracts of *Indigofera* for this reason the results found in this work are original and unpublished, which makes it important to study the control of molluscs, *B. glabrata* in the embryonic stage, this stage little affected by the synthetic molluscicides.

Other point examined in this study was to cercaricide activity of hydroalcoholic and aqueous extracts of leaves of *I. suffruticosa*. The cercariae of *S. mansoni* showed high susceptibility to aqueous and hydroalcoholic extracts of leaves of *I. suffruticosa*. Mendes et al., (1993), also noted the high susceptibility of cercariae to aqueous suspension of the pericarp of the fruit of *G. officinale* 1 ppm. Similar results were also observed by Santos et al., (2007), who contacted the lethality of fractions of latex and its derivatives from *Euphorbia conspicuous* on the concentration of cercariae 100µg/mL. Another study of natural plant extract was performed by Medina *et al.* (2009) who studied extracts of *Croton floribundus* and acid kaurenoic on cercariae of *S. mansoni*, found the mortality rate of 99.5% of cercariae to an exposure of 10 ppm of the extracts studied. Therefore, studies of natural plant extracts with potential cercaricide are very promising and important for breaking the cycle of schistosomiasis and consequently decrease the contamination of man, without causing major ecological imbalances.

The toxicity tests are designed to evaluate or predict the toxic effects on biological systems and measure the relative toxicity of substances (Forbes & Forbes, 1994). The lethality test with *Artemia salina* was developed to detect bioactive compounds in plant extracts, or chemical substances which may be employed in different ways, such as fungal activity, antimicrobial, parasiticide, among others (Meyer et al., 1982). Although natural molluscicides are biodegradable, at certain concentrations, even within the values required by the WHO, the extracts can reveal risks. In this context we can see that the hydroalcoholic and aqueous extracts of leaves of *I. suffruticosa* at

concentrations of 500, 750 and 1000 ppm showed high toxicity causing death of the larvae of *A. salina*. These concentrations are above those recommended by WHO, so we suggest that studies with fractions of the extracts are made in order to reduce the concentration of the solution, thereby decreasing the toxicity of the environment.

Already been reported in the literature some properties of aqueous extracts of leaves of *I. suffruticosa* as anti-inflammatory activity in reducing paw edema of mice (Leite et al., 2003); cytotoxic activity in embryonic cells by inhibiting cell reproduction from morula and blastocyst stage (Leite et al., 2004); activity antimicrobial against gram-positive *Staphylococcus aureus* and against dermatophyte fungi *Trichophyton rubrum* and *Microsporium canis* (Leite et al., 2006) and significant antitumor activity in Ehrlich carcinoma in marked mice when administered via intraperitoneal (Silva, 2008). But so far no data was found on the toxic activity of aqueous and hydroalcoholic extracts of leaves of *I. suffruticosa* bioassays conducted in this study.

Therefore, it would be require the development of research in an attempt to find the active ingredients of this plant, and thus expand the programs of schistosomiasis control by eliminating the larval stages of *S. mansoni* cercariae, and interfering with the proliferation of intermediate snail hosts, reducing the fecundity and fertility of the same, associating sanitation measures directed regions of risk.

6. Conclusions

The results of this study showed that the hydroalcoholic and aqueous extracts of leaves of *I. suffruticosa* reduces fecundity rates and fertility of adult molluscs, besides to have embryotoxic properties and cercaricide mainly at concentrations of 500, 750 and 1000 ppm. However, as the extract of poisonous plants necessarily contain physiologically active constituents, future research should carry out the purification and isolation of the compounds responsible for such toxicity. Thus, since the extracts showed toxic effects on adult snails and embryos of *B. glabrata* and cercariae of *S. mansoni* may be possible to employ such a biodegradable material or a fraction derived therefrom in control

programs of schistosomiasis mansoni. However, their use requires further investigation.

Referências

- Agra, M. F., Locatelli, E., Rocha, E. A., Baracho, G. S., Formiga, S. C, 1996. Plantas medicinais dos Cariris Velhos, Paraíba, Brasil, parte II: subclasses Magnoliidae, Caryophylliidae, Dilleniidae e Rosidae. Ver. Bras. Farmácia 77, PP. 97-102.
- Alejo, J. P., Miranda, R., Rodrigues, G., 1996. Actividad Anticonvulsivante; (Antiepileptica) del extrato fluido de *Indigofera suffruticosa* (Anil Cimarrón). Ver. Cubana Plant Med, 1 (2):PP. 7-10.
- Allen and Allen; Rodrigues-Kabana 1981. Leguminosa, University of Wisconsin Press, Madison; Nematropica 18 (1): 137-142.
- Almeida, P.A., Silva, T.M.S., Echevarria, A., 2002. Mesoionic 5-alkyl-1,3-dithiolium 4-thiolates: Synthesis and brine shrimp toxicity. *Heterocycl Comm* 8: 593-600.
- Andrade, R. M., 1954. Alguns dados histoquímicos de criadouros de Planorbídeos no Distrito Federal. Ver Brás. E Doen. Trop. 6 (4).
- Archibald, R.G., 1933. The use of the fruit of the tree *Balanites aegyptiaca* in the control of schistosomiasis in the Sudan. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 27: 207.
- Badell, J. B., Ruiz, A. R., Parra, A. B., michelena, M. J. M, Armenteros, A. E., 1998. Evaluación genotóxica Del extracto fluido de *Indigofera suffruticosa* Mill (anil ciamarrón) mediante el ensayo de anomalías em La cabeza de los espermatozoides. Ver. Cubana Plant Med, 3 (2), 58-61.
- Barbosa, F.S., 1995. Tópicos em Malacologia Médica. 1ª Edição. Rio de Janeiro: Editora da FIOCRUZ.
- Bezerra, J.C.B., Silva, I.A., Ferreira, H.D., Ferri, P.H. & Santos, S.C., 2002. Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal plants. *Fitoterapia*; 73: 428-30.
- Braga, R., 1976. Plantas do Nordeste Especialmente do Ceará. 3ª edição, Escola Superior de agricultura. Rio Grande do Norte, Mossoró, Brasil.

- Chitsulo, L., Engels, D., Montresor, A. & Savioli, L., 2000. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Tropica*; 77: 41-51.
- Correa, M. P., 1984. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. IBDF. MA. Rio de Janeiro, RJ. 1:130-3.
- Coura, JR., 1995. Control of schistosomiasis in Brazil: Perspectives and proposals. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*; 90 (2): 257-60.
- Coura, J.R. & Amaral, R.S., 2004. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazil endemic areas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*; 99 (supl. 1): 13-9.
- Doenhoff, M.J., Ruppel, A., 1998. Vector Biology and the control of parasitic diseases. *Parasitology Today*; 14(8): 299-300.
- FEEMA, 1993. Método de determinação do efeito agudo letal causado por agents tóxicos em crustáceos da espécie *Artemia salina* – método estático. Fundação Estadual de Engenharia do meio ambiente, Rio de Janeiro, Brasil, MF-454 ed.
- Forbes, V.E., Forbes, T.L., 1994. *Ecotoxicology in Theory and Practice*. Londres Chapman and Hall., 247p.
- Funasa, 2002. Guia de Vigilância Epidemiológica/Fundação Nacional de Saúde. Brasília: 5ª edição; volume 1, 842p.
- Geilenkirchen, W. L. M., 1966. Cell division and morfogenesis of *Limnaea* eggs after treatment with heat pulses at successive stage in early division cycles. *J. Embiol. Exp. Morphol.*, v. 16 (2), p.321-337.
- Jurberg, P., 1987. Why it is difficult to control *Biomphalaria glabrata*, the vector snail of schistosomiasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*; 82 (supl. 4): 203-7.
- Kawano, T., Simões, L.C.G., 1987. Morphogenetic effects of caffeine on *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata, Planorbidae) *Proceedings C.*; 90(3): 281-302
- Kawano, T., Simões, L.C.G., 1986. Efeito da *Stevia rebaudiana* em *Biomphalaria glabrata*. *Rev. Brasil. Biol.*; 46(3): 555-562.
- Kloos, H. & McCullough, F.S., 1987. Plant with recognized molluscicidal activity. In: Mott KE ed. *Plant molluscicides*; 45-108.
- Lainetti, R., e Brito, N. R. S., 1980. A saúde pelas plantas e ervas do mundo inteiro. Ed. TecnoPrint, Rio de Janeiro, RJ. 37p.

- Leite, S. P., Vieira, J. R. C., Medeiros, P. L., Leite, R. M. P., Lima, V. L. M., Xavier, H. S., Lima, E. O., 2006. Antimicrobial activity of *Indigofera suffruticosa*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v.3, n.2, p.261-65.
- Leite, S. P., Medeiros, P. L., Silva, E. C., Maia, M. B. S., Lima, V. L. M., Saul, D. E., 2004. Embryotoxicity in vitro with extract of *Indigofera suffruticosa* leaves. *Toxicology* 18(701-705).
- Leite, S. P., Silva, L. L. S., Catanho, M. T. J. A., Lima, E. O., Lima, V. L. M., 2003. Anti-inflammatory activity of *Indigofera suffruticosa* extract. *REBRASA* 7:45-52.
- Lemma, A., Goll, P., Newell, G.W., Parkhurst, R.M., Skinner, W.A., 1972. Studies on the molluscicidal properties of endod (*Phytolaca dodecandra*): I. Increased potency with butanol extraction. *J. parasit.*; 58(1): 104-7.
- Leyton, V., Henderson, T.O., Mascara, D., Kawano, T., 2005. Atividade moluscicida de princípios ativos de folhas de *Lycopersicon esculentum* (Solanales, Solanaceae) em *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Planorbidae). *Iheringia, Sér. Zool*; 95(2): 213-16.
- Lorenzi, H., 1982. Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais. Nova Odessa, SP. Edição do Autor, p. 271-2.
- Lhullier, C., Horta, P.A., Falkenberg, M., 2006. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. *Rev Bras Farmacogn* 16: 158-163.
- Luna, J.S., Santos, A.F., Lima, M.R.F., Omena, M.C., Mendonça, F.A.C., Bieber, L.W., Sant'Ana, A.E.G., 2005. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. *J. of Ethnopharmacology*; 97: 199-206.
- Lyarddiard, J.R.A., Whitfield, P.J., Bartlett, A., 2002. Antischistosomal bioactivity of isoflavonoids from *Millettia thonningii* (Leguminosae). *J. Parasitol*; 88 (1): 163- 170.
- Marston, A., Hostettmann, K., 1991. Assays for molluscicidal, cercaricidal, schistosomidal and piscicidal activities. In: Dey, P.M., Harbone, J.B. (Eds.), *Methods in Plant Biochemistry*, vol. 6. Academic Press, London, pp. 153-178.

- McLaughlin, J.L., Sizarbitori, T.C., Anderson, J.E., 1995. Tres bioensayos simples para químicos de productos naturales. *Ver Soc Venez Quim* 18: 13-18.
- McLaughlin, J. I., Chang, C. j., Smith, D. L. 1991. Bench-top bioassays for the discovery of bioactivity natural products: an update. In: Rahman, a U. (Ed.), studies in natural products chemistry. Elsevier, Amsterdam.
- Medina, J.M., Peixoto, J.L.B., Silva, A.A., Haraguchi, S.K., Falavigna, D.L.M., Zamuner, M.L.M., Sarragiotto, M.H., Vidotti, G.J. 2009. Evaluation of the molluscicidal and *Schistosoma mansoni* cercariae activity of *Croton floribundus* extracts and Kaurenoic acid. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 19(1B):207-211.
- Meléndez, P.A. & Capriles, V.A., 2002. Molluscicidal activity of plants from Puerto Rico. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*; 96(2): 209-18.
- Melo, A. M. M. A., 1998. Estudos dos efeitos a radiação gama de ^{60}Co sobre larvas de *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818). Tese de Doutorado, IPEN/USP.
- Mendes, N.M., Gomez, J.D., Araújo, N., Zani, C. L., Katz N., 1993. Ensaio preliminares do Guaiacum officinale L. como moluscicida. *Rev. Inst. trop. São Paulo*, 35(6): 509-513.
- Meyer, B. M., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsn, L. B., Nichols, D. E., Mclaughlin, J. L., 1982. Brine shrimp, a convenient general bioassay for active – plant constituents. *Planta med.* 45, 31-34.
- Mott, K.E., 1987. Plant molluscicides. 1ª Edição. Grã Bretanha: UNDP/ WORLD BANK/ WHO.
- Neto, J. D. B., Oliveira, C. M. C., Peixoto, P. V., Barbosa, I. B. P., Ávila, S. C., Tokarnia, C. H., 2001. Anemia hemolítica causada por *Indigofera suffruticosa* (Leg. Papilionoigeae) em bovinos. *Pesq. Ver. Bras.* 21(1):18-22.
- Oliveira-Filho, E. C., 2003. Efeitos de substancias químicas sobre a reprodução de moluscos de água doce: Estudos com caramujos do gênero *Biomphalaria*. Tese de Doutorado em Saúde Pública na Área Temática Toxicologia e Saúde.

- Oliveira-Filho, E.C., Paumgarten, J.R., 2000. Toxicity of *Euphorbia milii* látex and niclosamide to snails and nontarget aquatic species. *Ecotoxicology and environmental safety*; 46: 342-350.
- Paiva, M. A. S., Barbosa, A. C. D., Alves, H. L. J., 1987. *Indigofera suffruticosa* Mill (Leguminosa) com potencial forrageiro em uma região de Caatinga no Semi-árido de Pernambuco. (Alagoinha). Proceedings of the XXXVIII Congresso Nacional de Botânica. São Paulo, Brasil: Sociedade Nacional de Botânica, 422.
- Pio Correa, M., 1926. Dicionário de plantas úteis no Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, v. 1.
- Prata, A., 1987. Esquistossomose mansoni. In: Doenças infecciosas e parasitárias 7^o edition. Ed. R. Veronesi, Rio de Janeiro: Guanabara, p.885-904.
- Rapado, L. N., 2007. Efeito moluscicida de extratos de Piperaceae no vetor da esquistossomose *Biomphalaria glabrata*. Tese de Mestrado em Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.
- Rey, L., 2001. Parasitologia. 3^a Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.
- Roig, T., Mesa, J. T., 1974. Plantas medicinales Aromáticas y Venenosas de Cuba. La Habana Cuba: Editorial Ciência y Técnica Intituto Del Libro, 315-16.
- Santos, A.F., Azevedo, D.P.L., Mata, R.C.S., Mendonça, D.I.M.D., Sant'Ana, A.E.G., 2007. The lethality of *Euphorbia conspícua* to adults of *Biomphalaria glabrata*, cercaria of *Schistosoma mansoni* and larvae of *Artemia salina*. *Bioresource technology* 98 (2007) 135-139.
- Santos, A.F., 1997. Estudo de plantas com atividade nematicida e/ou moluscicida e reexame da *Jatropha elliptica* Muel Arg. Tese de mestrado em Química, Universidade Federal de Alagoas – Maceió.
- Silva, C. B., 2007. Avaliação da atividade antitumoral em extrato de *Indigofera suffruticosa* Mill. Tese de mestrado em Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco – Recife.
- Souza, C.P., Mendes, N.M., Jannotti-Passos, L.K., Pereira, J.P., 1992. O uso da casca da castanha do caju, *Anacardium occidentale*, como moluscicida alternativo. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 34 (5):459-466.

- Stefanello, M.E.A., Salvador, M.J., Ito, I.Y., Macari, P.A.T., 2006. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos de *Gochnatia polymorpha* ssp. *fl occosa*. *Ver Bras Farmacogn* 16: 525-530.
- Wei, F.H., Xu, X.J., Lui, J.B., Daí, Y.H., Dussart, G., 2002. Toxicology of potential molluscicide derived from the plant *Solanum xanthocaroum*: a preliminary study. *An. Of Trop. Med. & Parasitology* 96 (3) 325-331.
- Weideborg, M., VIK, E. A., Ofjord, G. D., Kjonno, O., 1997. Comparison of three marine screening tests and four Oslo and Paris commission procedures to evaluate toxicity of offshore chemicals, *Environmental Technology and Chemistry*, vol.16, pp. 384-389.
- WHO (World Health Organization),1992. Guidelines for the Assesment of Hebal Medicines. *Fitoterapia* 63 (2) 99-111.
- WHO (World Health Organization), 1983. Reporto scientific working group on plant molluscicide & guidelines for evaluation of plant molluscicides.
- Zagatto, P. A., 2000. Ecotoxicologia e desenvolvimento sustentável: Perspectivas para o século XXI, in VI Encontro de Ecotoxicologia, Mini Curso: ecotoxicologia Aquática, São Carlos – SP, Brasil.
- Yunes, R.A., Pedrosa, R.C., Cechinel-Filho, V., 2001. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Química Nova*; 24(1): 147-152.

6. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho demonstraram que os extratos aquosos e hidroalcoólicos das folhas da *I. suffruticosa* reduz as taxas de fecundidade e fertilidade dos moluscos adultos, além de possuir propriedades embriotóxicas e cercaricida, principalmente, nas concentrações de 500, 750 e 1000 ppm. No entanto, como o extrato de plantas tóxicas necessariamente contém constituintes fisiologicamente ativos, futuras pesquisas deverão realizar a purificação e isolamento das substâncias responsáveis por tal toxicidade. Dessa forma, uma vez que os extratos apresentaram efeitos tóxicos sobre moluscos adultos e embriões de *B. glabrata* e cercarias de *S. mansoni* pode ser possível empregar esse material biodegradável ou uma fração dela derivada em programas de controle da Esquistossomose mansônica. No entanto, seu uso exige uma investigação mais aprofundada.

ANEXOS

Tabela 1: Análise mortalidade, fecundidade, fertilidade dos caramujos adultos de *B. glabrata* expostos por 96 horas ao extrato aquoso da *I. suffruticosa* e percentual de embriões viáveis.

Concentrações do extrato aquoso (ppm)	Nº de caramujos adultos expostos	Nº de caramujos adultos mortos	Fecundidade (Nº de embriões gerados)	% de fecundidade em relação ao grupo controle	Fertilidade (Nº de embriões viáveis)	% de embriões viáveis em relação ao grupo controle
0	30	1	6933	100	6818	98,4
125	30	1	6320	91,1	6236	89,9
250	30	2	6190	89,2	5824	84,0
500	30	2	3739	53,94	3442	49,6
750	30	3	3692	53,25	3335	48,1
1000	30	3	3434	49,53	3290	47,4

Tabela 2: Análise da mortalidade, fecundidade, fertilidade dos caramujos adultos de *B. glabrata* expostos por 96 horas ao extrato hidroalcoólico da *I. suffruticosa* e percentual de embriões viáveis.

Concentrações do extrato hidroalcoólico (ppm)	Nº de caramujos adultos expostos	Nº de caramujos adultos mortos	Fecundidade (Nº de embriões gerados)	% de fecundidade em relação ao grupo controle	Fertilidade (Nº de embriões viáveis)	% de embriões viáveis em relação ao grupo controle
0	30	1	7014	100	6921	98,6
125	30	1	6150	87,6	6054	86,3
250	30	1	6082	86,7	5589	79,6
500	30	3	3139	44,7	2837	40,4
750	30	3	3240	46,1	2609	37,1
1000	30	3	2726	38,8	2574	36,6

Tabela 3: Análise da Inviabilidade e Viabilidade de embriões de *B. glabrata* no estágio de blástula exposto por 96 horas ao extrato aquoso da *I. suffruticosa* e percentual de inviabilidade.

Concentrações do extrato aquoso (ppm)	Nº de embriões expostos	Inviabilidade (Nº de embriões mortos e malformados)	Viabilidade (Nº de embriões eclodidos)	% de embriões Inviáveis	% de embriões Viáveis
0	605	9	596	1,6	98,0
125	602	84	518	13,9	86,1
250	603	157	446	26,0	74,0
500	607	298	309	49,0	51,0
750	603	560	43	93,0	7,0
1000	607	607	0	100,0	0,0

Tabela 4: Análise da Inviabilidade e viabilidade de embriões de *B. glabrata* no estágio de blástula exposto por 96 horas ao extrato hidroalcoólico da *I. suffruticosa* e percentual de inviabilidade.

Concentrações do extrato hidroalcoólico (ppm)	Nº de embriões expostos	Nº de embriões inviáveis (mortos e malformados)	Viabilidade (Nº de embriões eclodidos)	% de embriões Inviáveis	% de embriões Viáveis
0	607	10	597	1,8	98,2
125	608	128	480	21,0	79,0
250	603	320	283	53,0	47,0
500	604	555	49	92,0	8,0
750	602	602	0	100,0	0,0
1000	605	605	0	100,0	0,0

Tabela 5: Análise da toxicidade dos extratos aquosos das folhas da *I. suffruticosa* sobre larvas (náuplios) de *A. salina* exposta por 24 horas.

Concentrações do extrato aquoso	Nº de larvas expostas	Nº de larvas mortas	% de larvas mortas
0	155	3	3,8
125	154	38	24,7
250	154	56	36,3
500	157	86	55,0
750	155	117	76,0
1000	153	153	100,0

Tabela 6: Análise da toxicidade dos extratos hidroalcoolicos das folhas da *I. suffruticosa* sobre larvas (náuplios) de *A. salina* exposta por 24 horas.

Concentrações do extrato hidroalcoólico	Nº de larvas expostas	Nº de larvas mortas	% de larvas mortas
0	153	3	3,9
125	155	58	38,0
250	156	100	64,0
500	155	122	78,7
750	150	127	85,0
1000	157	157	100,0