

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**  
**INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**

**CIRLANE SILVA FERREIRA**

**Análise bioquímica e equilíbrio ácido-base em *Biomphalaria glabrata*  
(Say, 1818), hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*  
(Sambon, 1907), sob a exposição ao *Stryphnodendron polyphyllum*  
(Martius, 1837), planta moluscicida do Cerrado brasileiro.**

Orientador:

Prof. Dr. José Clecildo Barreto Bezerra.

Dissertação de Mestrado

**Goiânia-Goiás, 2006.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**  
**INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**

**CIRLANE SILVA FERREIRA**

**Análise bioquímica e equilíbrio ácido-base em *Biomphalaria glabrata***  
**(Say, 1818), hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni***  
**(Sambon, 1907), sob a exposição ao *Stryphnodendron polyphyllum***  
**(Martius, 1837), planta moluscicida do Cerrado brasileiro.**

Orientador:

Prof. Dr. José Clecildo Barreto Bezerra.

Dissertação de Mestrado submetida ao PPGMT/IPTSP/UFG como  
requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre na área de Concentração  
de Parasitologia.

**Goiânia-Goiás, 2006.**

**DEDICATÓRIA**

Ao meu querido marido, Carlos Roberto Ferreira, pela  
dedicação, incentivo e pelo apoio nos momentos difíceis durante a realização  
deste trabalho.

Ao meu filho Renato Silva Ferreira, razão de minha existência,  
dedico este trabalho.

---

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me proporcionar inteligência e sabedoria nesta longa caminhada de aprendizado e vitórias.

Ao Professor Dr. José Clecildo Barreto Bezerra, professor adjunto do departamento de parasitologia, IPTSP/UFG, minha gratidão pela oportunidade, confiança, incentivo e orientação deste trabalho.

Ao meu marido, Carlos Roberto Ferreira, pelo companheirismo, pela atenção, compreensão e principalmente pelo amor demonstrado durante toda esta trajetória.

Ao meu filho, Renato Silva Ferreira, pelas demonstrações de carinho nas horas difíceis.

Aos meus pais, Gaspar Silva e Aida Maria da Silva pela oportunidade de estudo e apoio dispensado neste sentido.

Ao meu sogro Oscar Cardoso Ferreira e minha sogra Dolores Moreira Ferreira, pela disposição em ajudar sempre.

Aos queridos amigos Francisco Gilson Montenegro, Laís Rocha Montenegro, Ricardo Wagner de Oliveira e Rosana Evangelista Pinto de Oliveira, a minha eterna gratidão por ajudar-me a dar os primeiros passos nesta caminhada.

À Darcy Arruda Villela, chefe do setor de Análises Clínicas do Hospital de Urgências de Goiânia, pela contribuição inestimável e por tanta compreensão durante a realização desta titulação.

Às amigas Marina Clare Vinaud e Josireny Mariano Mendes que contribuíram para o fortalecimento e engrandecimento deste trabalho.

Aos amigos, colegas do mestrado, técnicos e funcionários do IPTSP/UFG pela colaboração na realização deste trabalho.

E a todos que mesmo não citados aqui contribuíram, diretamente ou indiretamente, possibilitando a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

---

**SUMÁRIO**

RESUMO .....	- vii-
ABSTRACT .....	- ix-
LISTA DE FIGURAS .....	- xi -
LISTA DE TABELAS .....	- xiii -
LISTA DE ABREVIATURAS .....	- xiv -
INTRODUÇÃO .....	-1-
1. A Esquistossomose e o molusco <i>Biomphalaria glabrata</i> .....	-1-
2. Controle da esquistossomose .....	-7-
3. Controle com produtos naturais. ....	-11-
4. Metabolismo de <i>B. glabrata</i> .....	-14-
4.1) Equilíbrio ácido-básico e do pH.....	-16-
4.2) Metabolismo da Glicose.....	-18-
4.3) Metabolismo de Aminoácidos.....	-20-
4.4) Metabolismo do Cálcio.....	-22-
JUSTIFICATIVA .....	-24-
OBJETIVOS.....	-26-
ARTIGO 1. Análise do Equilíbrio Ácido-Base em <i>Biomphalaria glabrata</i> (Say, 1818), sob exposição a <i>Stryphnodendron polyphyllum</i> (Martius, 1837), planta moluscicida do Cerrado brasileiro.....	-27-
ARTIGO 2 - Análise do metabolismo de proteínas, da via glicolítica e da fosforilação oxidativa de <i>Biomphalaria glabrata</i> (Say, 1818) sob ação do extrato da planta do Cerrado brasileiro	

---

<i>Stryphnodendron polyphyllum</i> (Martius, 1837).....	-43-
CONCLUSÕES FINAIS .....	-68-
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	-70-
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	-72-
ANEXOS .....	-87-

**RESUMO**

O Estado de Goiás representa uma área de alto risco ao estabelecimento da esquistossomose. A presença do hospedeiro intermediário, *Biomphalaria sp*, somada à elevada migração de pessoas oriundas de regiões endêmicas do país são fatores que favorecem a instalação do ciclo desta doença. Há, no Estado de Goiás, relatos de casos com alta intensidade parasitária, e até mesmo um caso com paraplegia associada a esquistossomose. O *Stryphnodendron polyphyllum* (Martius, 1837) conhecido como “Barbatimão de Folha Pequena” é relatado como planta moluscicida. Neste trabalho, avaliou-se a atividade de extratos brutos da casca do caule de *S. polyphyllum* sobre o metabolismo e o equilíbrio ácido-base do *B. glabrata*. Os moluscos foram expostos ao extrato por 24 horas, nas concentrações de 25 e 50 mg/L, e comparados com um grupo controle. Foram avaliadas as concentrações de glicose, cálcio, uréia, proteínas e atividade das enzimas lactato desidrogenase e aminotransferases pelo método de espectrofotometria. Os ácidos orgânicos citrato, propionato,  $\alpha$ -cetogluturato, succinato, acetato, malato, fumarato, piruvato e lactato foram dosados pelo método da cromatografia líquida. Dos ácidos orgânicos encontrados na hemolinfa apenas o citrato e o propionato tiveram uma alteração significativa. O equilíbrio ácido-base foi verificado pela medida das concentrações de pH, oxigênio, gás carbônico, íons carbonatos e saturação de oxigênio através de equipamento Radiometer.



O extrato de *S. polyphyllum* testado demonstrou ação efetiva, observada pelo estabelecimento de toxicidade celular sobre *B. glabrata*. (Say, 1818). As alterações apresentadas nas dosagens bioquímicas refletem os distúrbios metabólicos ocorridos na hemolinfa deste molusco. A interferência deste extrato fez com que os níveis de glicose, uréia, cálcio, aspartato, alanina aminotransferases e pressão de gás carbônico se elevassem, enquanto que os níveis de lactato desidrogenase, pH, pressão de oxigênio, íons carbonato e saturação de oxigênio diminuíram.

Este trabalho confirma a bioatividade do extrato aquoso de *S. polyphyllum* sobre o *B. glabrata*. Uma das principais contribuições desse estudo desenvolvido é a observação pós-contato direto com o extrato que demonstrou uma bioatividade sobre o metabolismo do molusco. A análise de extrato aquoso obtido do caule do barbatimão pode subsidiar nova alternativa de menor toxicidade e menor custo financeiro no controle da esquistossomose no Brasil, onde o Cerrado é vasto e a carência de recursos é freqüente no setor da saúde.

**Palavras Chaves:** *Biomphalaria glabrata*, Cerrado, CLAE, controle, equilíbrio ácido-base, metabolismo, *Schistosoma mansoni*, *Stryphnodendron polyphyllum*.

**ABSTRACT**

The state of Goiás represents a high risk to schistosomiasis establishment area. The presence of the intermediate host, *Biomphalaria sp*, added to high migration levels of people from endemic regions of the country; are evidences that favour the installation of this disease life cycle. In this state of Goiás, there are reports of high parasitary intensity and even cases of paraplegia associated with schistosomiasis. The *Stryphnodendron polyphyllum* (Martius, 1837) known locally as “Barbatimão de folha pequena”, is reported as a molluscicide plant. This paper assesses the activity of gross bark extracts from *S. polyphyllum* on the metabolism and on the acid-alkaline balance of *B. glabrata*. The mollusks were exposed to the extract at 25 and 50 mg/L concentrations for 24 hours and compared to a control group. The concentrations of glucose, calcium, urea, proteins and the activity of the following enzymes: dehydrogenases lactate and aminotransferases were estimated using the spectrophotometry method. The organic acids citrate, propionate,  $\alpha$ -cetoglutarate, succinate, acetate, malate, fumarate, pyruvate and lactate were detected and quantified using the liquid chromatography method. Of all the organic acids found in the hemolymph, only citrate and propionate presented a significant alteration. The acid-alkaline balance was verified by measuring the concentrations found in the pH, oxygen, carbonic gas, carbonate ions and oxygen saturation using Radiometer equipment.

The *S. polyphyllum* extract tested proved effective due to celular toxicity on *B. glabrata*.(Say 1818). Alterations verified in the biochemical dosages reflect the metabolic disturbances in the hemolymph of the mollusk. The

extract interference caused an increase in the levels of glucose, urea, calcium, aspartate, alanine aminotransferases and carbonic gas pressure, simultaneously causing a decrease in the levels of lactate dehydrogenase, pH, oxygen pressure, carbonate ions and oxygen saturation.

This study confirms the bioactivity of the *S. polyphyllum* aqueous extract on *B.glabrata*. One of the main contributions of the methodology used is that it enabled observation after direct contact with the extract that proved bioactivity on the metabolism of the mollusk. The analysis of the aqueous extract taken from the bark of the “barbatimão” may be the basis for new and less toxic, as well as less costly alternative for the control of schistosomiasis in Brazil, where the savannah is vast and financial resources are often scarce in the health sector.

**Key words:** acid-alkaline balance, *Biomphalaria glabrata*, control, HPLC, metabolism, savannah, *Schistosoma mansoni*, *Stryphnodendron polyphyllum*.

---

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - Figura 1. Ciclo biológico de <i>Schistosoma mansoni</i> .....	- 5 -
Figura 2 - Metabolismo da via glicolítica e dos aminoácidos .....	-22-
Figura 3 – a)Taxas de pH, b) concentrações de íons carbonatos, c) pressão parcial de gás oxigênio e gás carbônico,d) saturação de oxigênio na hemolinfa de <i>Biomphalaria glabrata</i> expostos ao extrato de caule de <i>Stryphnodendron polyphyllum</i> , nas concentrações de 25 e 50 mg/L.....	- 37 -
Figura 4 – Efeitos do extrato de <i>Stryphnodendron polyphyllum</i> no equilíbrio ácido-base do <i>Biomphalaria glabrata</i> .....	- 38 -
Figura 5 – Representa o dióxido de carbono produzido pelo metabolismo, a sua pequena dissociação em íons e o equilíbrio sob a forma de CO <sub>2</sub> dissolvido e água.....	- 39 -
Figura 6 - Representa o pH na acidose e na alcalose. Demonstra também os limites de tolerância do organismo aos desvios de pH.	- 41 -
Figura 7 – Taxas de glicose e cálcio na hemolinfa de <i>Biomphalaria glabrata</i> exposto ao extrato do caule de <i>Stryphnodendron polyphyllum</i> , nas concentrações de 25 e 50 mg/L.....	- 54 -
Figura 8- Taxas de uréia e proteínas na hemolinfa de <i>Biomphalaria glabrata</i> exposto ao extrato do caule de <i>Stryphnodendron polyphyllum</i> , nas concentrações de 25 e 50	

---

mg/L..... - 55 -

Figura 9 – Taxas da atividade enzimática na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* exposto ao extrato do caule de *Stryphnodendron polyphyllum*, nas concentrações de 25 e 50

mg/L..... - 57-

Figura 10. Esquema resumido da produção de ácidos orgânicos - 65 -

.

---

**LISTA DE TABELAS**

- Tabela 1. Análise do equilíbrio ácido-base na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* expostos ao extrato do caule de *Stryphnodendron polyphyllum*, nas concentrações de 25 e 50mg/L valor em média±desvio padrão ou mediana (mínimo - máximo)..... - 36 -
- Tabela 2. Análise bioquímica da hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* expostos ao extrato do caule de *Stryphnodendron polyphyllum*, nas concentrações de 25 e 50mg/L valor em média±desvio padrão ou mediana (mínimo - máximo)..... - 53 -
- Tabela 3. Média e Mediana da concentração (mmol/L) de ácidos orgânicos presentes na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata*, grupo controle e o grupo teste exposto a 25 e 50 mg/L do extrato de *Stryphnodendron polyphyllum* ..... - 59 -

---

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ADP – Adenosina di-fosfato

ALT – Alanina aminotransferase

AST – Aspartato aminotransferase

ATP – Adenosina tri-fosfato

BH – Belo Horizonte

cAMP – Adenosina-5`-monofosfato cíclico

CFX – Clesosulfonamida

CLAE – Cromatografia líquida de alta performance

IFCC – Federação Internacional de Química Clínica

IPTSP – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública

LDH – Lactato desidrogenase

mmol/L – milimol por litro

NAD – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

PFK – Fosfofrutoquinase

pH – Potencial hidrogeniônico

mg/L – Partes por milhão

SUCAM - Superintendência de Campanhas de Saúde Pública

SFBC – Sociedade Francesa de Biologia Clínica

UFG – Universidade Federal de Goiás

U/L – Unidades internacionais por litro

UVAA – Ultravioleta para analisador automático





---

## INTRODUÇÃO

### 1) A Esquistossomose e o molusco *Biomphalaria glabrata*

Exames em múmias do antigo Egito revelaram lesões produzidas pela doença esquistossomose conhecida desde a antiguidade. Em 1852, o médico alemão, Theodor Bilharz descobriu o verme causador desta doença, o trematódeo do gênero *Schistosoma*. Atualmente registra-se a existência de cinco espécies dentro deste gênero, que causam a doença ao homem: *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* e *S. mekongi*. No Brasil, a transmissão da doença teve início com a chegada dos escravos africanos. Em 1951, Pirajá da Silva relata os primeiros casos. (SUCEN 2001).

O agente causador da esquistossomose, no Brasil, é o trematódeo digenético *S. mansoni*. Os vermes adultos vivem dentro de pequenas veias do intestino posterior e do fígado do homem doente; alcançam até 12 mm de comprimento por 0,44 mm de diâmetro. A manutenção do ciclo de vida deste parasito é pela presença de espécies do molusco aquático do gênero *Biomphalaria*, hospedeiro intermediário. Das várias espécies de moluscos existentes no Brasil, três mostraram-se capazes de infectar-se com o *S. mansoni*, *Biomphalaria tenagophila*, *B. glabrata* e *B. straminea* (Rey 1991).

Em vista da prevalência, morbidade e mortalidade, essa doença é um sério problema de saúde pública no Brasil, ocorrendo do norte ao centro sul do país (Mendes et al. 1999; Katz, Peixoto 2000).

O Estado de Goiás representa uma área de alto risco ao estabelecimento da esquistossomose. A presença do hospedeiro

---

intermediário, *Biomphalaria sp*, somada à elevada imigração de pessoas oriundas de regiões endêmicas do país são fatores que favorecem a instalação do ciclo desta doença. A transmissão da esquistossomose é limitada ao município de Padre Bernardo. A prevalência em 2002 foi de 1,86%. A média anual de internação por esquistossomose, no período de 1999 a 2003, foi de sete e taxa de 0,19/10 mil internações. O número médio de óbitos, no período de 1998 a 2002 foi de três com taxa de mortalidade de 0,06/100 mil habitantes. As internações e óbitos são de pacientes de outros estados (Ministério da Saúde 2005). Há, no Estado, relatos de casos com alta intensidade parasitária, e até mesmo um caso com paraplegia associada a esquistossomose. (Bezerra et al. 1996).

Vale ressaltar que é indispensável o tratamento dos pacientes com infecção. Na atualidade conta-se com dois medicamentos, apenas, para o tratamento corrente da esquistossomose mansônica: oxamniquine e praziquantel. Os medicamentos são geralmente inativos contra as formas larvárias (esquistossômulos), de modo que, em pacientes reinfetados pouco antes do tratamento existe a possibilidade de tais formas juvenis escaparem ao efeito terapêutico e transformarem-se, depois, em vermes adultos, reiniciando a eliminação de ovos nas fezes (Rey 1991).

No entanto, no período de tratamento, o ciclo infeccioso não se interrompe totalmente e, conseqüentemente, a resistência do parasito aos agentes quimioterápicos pode agravar o problema. O tratamento pela oxamniquine pode selecionar linhagens de *S. mansoni* resistentes a essa droga. A resistência dos helmintos comporta-se como um caráter mendeliano recessivo e parece depender da falta de produção de uma enzima que

---

converta a oxamniquine em um metabólito ativo. Assim, em pacientes que tendo recebido a medicação correta não se curaram, é conveniente refazer o tratamento com outra droga (Rey 1991). Desse modo, são necessárias ações que possam contribuir para interromper o ciclo de vida de *S. mansoni* e, assim, controlar a esquistossomose.

Além do tratamento das pessoas infectadas, uma das maneiras mais eficientes e rápidas de redução da transmissão da esquistossomose é a interrupção do ciclo de vida do parasito por meio do combate aos moluscos com o uso de moluscidas, prevenindo dessa maneira a infecção humana (Souza et al. 1997).

O *S. mansoni* desenvolve sua fase adulta como parasito na luz dos vasos sanguíneos do homem e de outros mamíferos, habitando preferencialmente as vênulas do plexo hemorroidárias superior e as ramificações mais finas das veias mesentéricas, particularmente da mesentérica inferior, onde põe seus ovos. Depois de atravessarem a parede intestinal, os ovos, que apresentam um espinho lateral, são eliminados com as fezes. Quando chegam às águas superficiais, liberam seus miracídios, que nadam durante horas até encontrarem os moluscos do gênero *Biomphalaria*. Penetrando nos tecidos do molusco, os miracídios transformam-se em esporocistos que, por poliembrionia, geram esporocistos filhos e depois cercárias. Várias gerações de esporocistos podem suceder-se, todas, produzindo, por algum tempo, cercárias. Estas abandonam o hospedeiro intermediário e nadam ativamente, quase sempre em direção à superfície, até encontrarem o hospedeiro definitivo, o homem ou outro mamífero susceptível. Penetram na sua pele, onde logo se transformam em

esquistossômulos. Os parasitos que não são destruídos na pele ganham a circulação sanguínea e chegam no coração, depois nos pulmões (onde também podem ser retidos e destruídos) e, em seguida, no fígado. Quando chegam no sistema porta hepático, os esquistossômulos desenvolvem-se e alcançam a fase adulta (Fig.1). Os vermes adultos acasalam-se e migram para as vênulas da parede intestinal, migrando contra a corrente sanguínea pela veia porta e veias mesentéricas (Rey 1991).

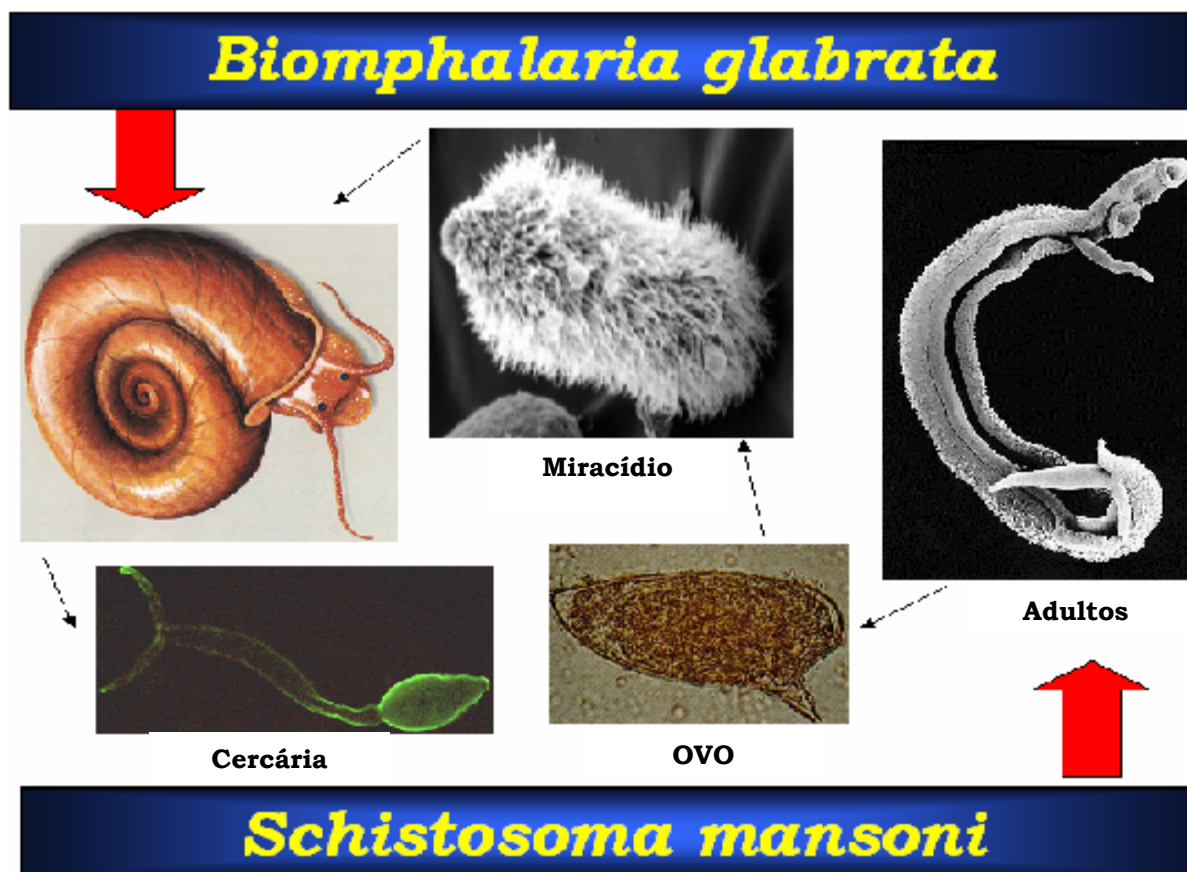


Figura 1. Ciclo biológico de *Schistosoma mansoni* (Bezerra et al 1997).

Na maioria das vezes, a infecção humana por *S. mansoni* costuma ser assintomática ou oligossintomática; mas ela pode produzir alterações anatomotológicas cujo caráter e gravidade cobre extensa gama de situações, o que imprime a essa doença grande polimorfismo e, em muitos casos, prognóstico incerto (Rey 1991). Aquelas com sintomas podem apresentar uma fase aguda e outra crônica.

A fase aguda geralmente só é percebida em pessoas de área não endêmica e depende do número de cercárias infectantes. Inicialmente, surge uma coceira e vermelhidão no local de penetração da cercária, a dermatite cecariana. Pode aparecer febre, suores frios, dor de cabeça, dores musculares, cansaço, perda de apetite, emagrecimento, tosse, dores

---

abdominais. Algumas pessoas relatam enjoos e vômitos. O fígado fica um pouco aumentado e doloroso à palpação.

A fase crônica pode se manifestar de três formas: intestinal, hepato-intestinal e hepato-esplênica. Na primeira forma, a diarreia é o sintoma mais comum. Pode acontecer perda de apetite, cansaço e abdome doloroso à palpação. Na forma hepato-intestinal os sintomas são os mesmos, porém, mais acentuados, hepatoesplenomegalia. A forma hepato-esplênica tem este nome devido a lesões no fígado e baço na qual o indivíduo queixa-se de tumor no abdome, já que o fígado e baço estão muito aumentados de volume. A lesão no fígado leva ao aparecimento de varizes no esôfago, e como sintomas vômitos e sangue nas fezes. Pode ocorrer aumento do tamanho do abdome, com presença de líquido (ascite). Esta forma aparece nas áreas de maior incidência como Nordeste e Minas Gerais (SUCEN 2001).

O *B. glabrata*, está comumente associado à vasta distribuição e à alta morbidade da esquistossomose mansônica no Brasil, advindo, desse fato, sua grande importância em saúde pública (Rey 1993). O molusco, hospedeiro intermediário, tem papel crucial no desenvolvimento desta parasitose, pois é um elemento obrigatório no ciclo. Ou seja, podemos dizer que se num local encontramos exemplares do molusco e a presença de somente um paciente liberando ovos viáveis, associados às condições inadequadas de saneamento básico, ali poderá se estabelecer um novo foco de doença, tal é sua importância (Moyou-Somo et al. 2003).

O homem parece constituir, em geral, o único reservatório importante do *S. mansoni*. Nesse particular difere do *S. japonicum* que admite grande número de mamíferos como hospedeiros vertebrados ou que, na variedade

---

existente em Taiwan (China), só se desenvolve em hospedeiros não humanos, principalmente o cão (Rey 1991).

O *S. mansoni* tem comportamento intermediário entre os de *S. haematobium* e de *S. japonicum*. Em condições naturais infecta marsupiais, desdentados, roedores, artiodátilos, canídeos, primatas e bovinos. Dos roedores, destaca-se pelas taxas elevadas de infecção o rato-lava-pés (*Nectomys squamipes*), o rato-de-cana (*Holochilus sciureus*) e o rato-porco (*Oxymycterus angulares*), que apresentam ampla distribuição geográfica no Brasil, e vivem próximo das coleções líquidas, nos vales, canaviais e capinzais(Rey 1991)

## **2) Controle da esquistossomose**

O *S. mansoni* tem no homem seu principal hospedeiro definitivo e as modificações ambientais produzidas pela atividade humana favorecem a proliferação dos caramujos transmissores. O Programa de Controle de Esquistossomose Mansônica, no Ministério da Saúde, tem como linhas mestras o diagnóstico e o tratamento quimioterápico com busca de novos casos. A vigilância epidemiológica é fundamentada na busca passiva de casos por meio de sensos coproscópicos direcionados à população de risco. É uma doença tipicamente condicionada pelo padrão sócio-econômico precário que atinge a maioria da população brasileira. É importante salientar que cada foco de transmissão tem suas peculiaridades e que a estratégia de controle deve levar em consideração estas características. Assim, em pequenos focos, restritos às vezes a uma única coleção aquática, o aterramento ou canalização deste criadouro pode resultar na extinção do foco (Amaral, Porto 1994).

Além disso, devem ser tomadas medidas profiláticas para que novos casos não apareçam na região. Entre elas podemos citar: tratamento dos doentes, saneamento básico, combate dos caramujos transmissores e educação sanitária da população (Amaral, Porto 1994).

Tem sido feito um grande esforço para evitar o contato do homem com águas contaminadas, porém este é feito, por motivos de necessidades trabalhistas, envolvendo lavadeiras, pescadores, trabalhadores em plantações de arroz, e de lazer como crianças que se banham em lagos e rios contaminados. Em tais situações deve-se fazer um trabalho de educação da população, conscientizando-a do problema, além de melhorar as condições sanitárias locais, afastando os indivíduos das águas que contém caramujos. A construção de banheiros adequados nas habitações, tanques públicos para a lavagem das roupas, piscinas públicas destinadas ao lazer das crianças, rede de abastecimento de água e esgoto são algumas das medidas indicadas (Schall 1995, Moza et al. 1998).

Para o controle da esquistossomose, devem ser considerados fatores epidemiológicos, tratamento de casos positivos, combate ao hospedeiro intermediário, educação sanitária e saneamento básico. Para obter-se um moluscicida ideal, esse deve ser letal para qualquer estágio de vida do molusco, ser de fácil estocagem, apresentar baixo custo, ser seguro para o aplicador, ser efetivo em baixas concentrações. Poucos produtos sintéticos usados atualmente apresentam estes requisitos, e o mais recomendado para aplicação em grande escala, pela Organização Mundial de Saúde no controle da esquistossomose é a niclosamida (Bayluscide®) (Who 1993, Souza et al. 1997). Esta droga destaca-se por sua alta toxicidade para os moluscos, tem



---

atividade letal de 100% na concentração 1 mg/litro. Os inconvenientes da droga são seu custo elevado e toxicidade para peixes e pequenos animais. Nas últimas décadas tem-se constatado o envolvimento de muitos pesquisadores na busca de novos compostos de plantas que possuam estas propriedades (Mendes et al. 1999).

Recomenda-se que o controle dessa endemia seja baseado em medidas integradas entre o progresso tecnológico e a agricultura moderna. O combate aos hospedeiros intermediários é considerado imprescindível, destacando-se, para esse fim, o uso de medidas ambientais, tais como abastecimento de água tratada, as instalações sanitárias e o tratamento dos esgotos sanitários, ou seu destino adequado, sendo estas as mais importantes em saúde pública (WHO 1998). Entretanto, a eficácia do controle depende dos conhecimentos sobre a ecologia desses moluscos, a composição do habitat, condições gerais e sobre seu papel na situação epidemiológica local (Madsen 1992).

Dentre as atividades de controle de esquistossomose, destaca-se a quimioterapia com oxamniquina, em pacientes com a doença, administrado por via oral, é absorvido prontamente e age sobre as formas adultas do parasito, realizada pelas Unidades de Saúde e eventualmente pela SUCAM. A aplicação de moluscidas em coleções hídrica com planorbídeos infectados mata os moluscos adultos e destroem as desovas e as formas larvais do *Schistosoma*. As ações educativas têm assumido papel complementar no programa (SUCEN 1989). As drogas administradas aos pacientes até o presente momento reduzem a morbidade, mas não controlam a transmissão

da doença, pois não imunizam o paciente, além de provocarem na maioria das vezes, reações colaterais desagradáveis (Mendonça 2003).

Em busca de novas drogas no controle dos moluscos hospedeiros intermediários da esquistossomose, as plantas são sempre lembradas como fontes alternativas. Apesar do aumento de estudo nessa área, os dados disponíveis revelam que apenas 15 a 17% das plantas brasileiras foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (Soeyarto 1996).

O controle da população dos moluscos hospedeiros intermediários *B. glabrata* tem sido feito com moluscidas sintéticos que trazem danos ao ecossistema por não terem especificidade de seu alvo, atingindo não só o molusco, mas também o plâncton, e animais que dependem, dele, criando, muitas vezes, desequilíbrio na cadeia trófica (Mendonça 2003).

Nos últimos anos tem-se verificado um grande avanço científico, envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas (Filho, Yunes 1998) e embora as drogas sintéticas constituam maioria nas farmácias caseiras, os medicamentos à base de plantas, vêm ganhando um espaço cada vez maior no combate e tratamento de diversas doenças, entre elas a esquistossomose (Wink 1990). Planta de uso medicinal de família *Euphorbiaceae*, a *Euphorbia milii*, foi amplamente testada contra miracídios e cecárias de *S. mansoni* apresentando atividade na concentração de 100 mg/L (Carvalho et al. 1998).

### **3) Controle com produtos naturais**

Moluscicidas extraídos de plantas vêm sendo pesquisados no combate aos moluscos dos gêneros *Biomphalaria*, *Bulinus* e *Oncomelania*, diretamente implicados na transmissão do *S. mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum*, respectivamente (Marston, Hostettmann 1985, Whitfield 1996).

Fatores econômicos e ecológicos estimulam a descoberta de moluscicidas vegetais com ação seletiva, biodegradável, de baixo custo e de fácil aplicação nos criadouros naturais (Who 1983). Moluscicidas sintéticos são onerosos e ainda podem levar a problemas de toxicidade para organismos não-alvos. A niclosamida (Bayluscide®) tem sido por quatro décadas, o moluscicida sintético recomendado pela Organização Mundial de Saúde, para a aplicação em grande escala no controle desta parasitose, porém não apresenta os requisitos desejados, entre eles baixo custo, baixa toxicidade para peixes e pequenos animais, ser seguro para o aplicador, entre outros, como os citados para aqueles provenientes de produtos naturais (WHO 1993).

Extratos brutos obtidos de diversas partes de plantas de espécies da família Clusiaceae, como *Calophyllum verticillatum*, *C. inophyllum* e *C. recedens* apresentam atividade moluscicida com 20% de mortalidade dos moluscos *B. glabrata* na concentração de 100 mg/L para a primeira espécie e 10 mg/L para as outras duas (Ravelonjato et al. 1987).

Plantas do gênero *Kielmeyera*, conhecidas como rosa do campo, pertencentes à família das Clusiaceae e encontrada no cerrado brasileiro, têm sido usadas pela população para o tratamento de diversas doenças, como esquistossomose, leishmaniose, malária, infecção por bactérias e fungos, entre outras (Alves et al.2000). A osajaxantona isolada da espécie

---

*Kielmeyera coriacea* exhibe proteção contra a infecção das cercárias do *S. mansoni*, quando aplicada na pele de animais (Lopes et al. 1976).

A utilização de substâncias moluscidas é um fator crucial para o controle da esquistossomose. Em países do Terceiro Mundo o uso de moluscidas sintéticos tem causado problemas de toxicidade, contaminação do meio ambiente e a resistência dos caramujos (*B. glabrata*) transmissores da esquistossomose. Em contraste, o uso de plantas com atividade moluscida pode representar uma alternativa barata (Marston, Hostettmann 1985).

O mecanismo de ação dos moluscidas contendo polifenóis vegetais, ainda é pouco conhecido. O que se tem estabelecido, geralmente, é a bioatividade e o índice de mortalidade que estes produtos podem determinar, existindo dessa forma uma escassez de informações com respeito aos princípios ativos e mecanismos de ação dos moluscidas naturais. Apesar dos taninos serem a classe individual de fenóis vegetais mais estudadas em ecologia química, o esclarecimento do modo de ação sobre os moluscos, hospedeiro intermediário de *S. mansoni* ainda é objetivo de estudos (Alcanfor 2001).

O reconhecimento da bioatividade de extratos de plantas que preencham estes requisitos necessários à ação moluscida poderá tornar o seu uso uma alternativa aos compostos sintéticos usados no controle de moluscos. Muitas são as espécies de plantas relatadas na literatura buscando-se este propósito. Plantas existentes no Brasil têm demonstrado grande eficiência, como por exemplo, *Euphorbia* (“Coroa-de-Cristo”) em que frações fitoquímicas são 100 vezes mais ativas contra *B. glabrata* que o

---

produto sintético Niclosamida ( Baptista et al. 1992, Coelho et al. 1999). Vários pesquisadores, trabalhando com diferentes espécies vegetais, confirmaram a eficiência dos extratos como moluscicidas (Kuo 1987, Jurberg et al. 1989, Batista et al. 1992).

O Cerrado brasileiro é dotado de grande biodiversidade de plantas, por isso nos últimos anos tem se avaliado o potencial medicinal e aplicativo de suas espécies o que deverá contribuir também para a preservação e utilização consciente deste importante ecossistema.

O *Stryphnodendron polyphyllum* (Martius,1837) conhecido como Barbatimão de Folha Pequena é pouco relatada, mas tem revelado diversas ações de bioatividade em estudos preliminares em vários organismos (Audi et al. 1999, Alves et al. 2000).

O *S. polyphyllum* é uma planta considerada tanífera por apresentar altos teores de taninos em suas estruturas (Schaufelberger Hostettmann 1983). Essa substância contribui na defesa das plantas contra consumo de herbívoros, além de limitar o crescimento de microorganismos patogênicos. O ácido tânico, presente no extrato da casca é considerado o princípio ativo de moluscicidas sintetizados a partir de plantas taníferas (Alcanfor et al. 2001, Santos et al. 2002).

O barbatimão é uma Mimosoideae arbórea bastante comum nas regiões do Cerrado (Ferri 1980), cuja casca contém substâncias tânicas. Os taninos são produtos do metabolismo secundário dos vegetais e estão presentes em diversos grupos destes, constituindo-se em compostos altamente polimerizados e hidroxilados, com peso molecular variável, podendo ultrapassar 3.000 Da (Bravo 1998). Tais características permitem

---

que esses compostos formem complexos insolúveis com carboidratos e proteínas. O conhecimento da absorção de compostos polifenólicos no trato digestivo animal ainda é escasso e muitas vezes controverso. Resultados de estudos *in vivo* e *in vitro*, utilizando compostos polifenólicos de estruturas químicas diferentes, têm demonstrado sua variável susceptibilidade à digestão e à absorção, sendo, o peso molecular e características que apresentam quanto à extração por diferentes solventes, fatores determinantes (Bravo 1998).

As atividades moluscidas dos extratos aquosos metanólicos de uma série de plantas têm sido relacionadas, principalmente, à presença de taninos. Por exemplo, os efeitos moluscidas da planta *Acácia nilótica* têm sido atribuídos à sua constituição rica em taninos. Um spray seco desenvolvido a partir delas, contendo 56% de taninos condensados e hidrolisáveis foi efetivo contra moluscos *B. pfeifferi*, na concentração de 55 mg/L. Porém, os constituintes ativos ainda não foram bem identificados e pouco se sabe sobre a forma de atuação de moluscidas a base de taninos puros, apesar de o ácido tânico comercial a 50 mg/L ser ativo contra *B. glabrata*. Fontes típicas de taninos tais como *Krameria triandra*, *Hammamelis virginiana* e *Quercus sp*, produzem extratos que são ativos a 50, 100 e 200 mg/L respectivamente (Marston, Hostettmann 1985).

#### **4) Metabolismo de *B. glabrata***

No caso de *B. glabrata*, estudos do metabolismo têm sido direcionados com o objetivo de avaliar as regras metabólicas sob algumas condições fisiológicas distintas (Patience et al. 1983, Bezerra et al 1999). Invertebrados

que apresentam metabolismo aeróbio, entre estes *B. glabrata*, podem acionar ou redirecionar seu fluxo metabólico em sentido anaeróbio sob determinadas condições ecofisiológicas em que se encontrem. A alteração mais notável na passagem aeróbia para anaeróbia é a inversão no sentido do ciclo de Krebs (Bezerra 1994). Caminhos anaeróbios dão continuidade à produção de energia e apresentam como produto final substâncias facilmente excretadas sem causar, inicialmente, grandes danos à célula (Schöttler 1986).

O metabolismo do molusco pode-se modificar quando este está sob influência causadas através de limitações ou modificações dos fatores ecológicos como o clima, alimentação (jejum e estivação) ou infecção (Wolmarans 1987, Bezerra et al 1999). Os estudos do metabolismo do molusco *B. glabrata* são importantes na compreensão de sua fisiologia, além de gerar subsídios para a elucidação de suas vias metabólicas.

Diferenças no metabolismo, como as reações metabólicas ou mecanismos de regulação vital para a sobrevivência de *B. glabrata*, sob condições fisiológicas adversas, podem contribuir muito para o conhecimento da relação hospedeiro-parasito, podendo ser de grande importância para o controle de parasitoses específicas, servindo de base para o entendimento e o desenvolvimento do parasito em seu hospedeiro. Sob esta avaliação, pode-se afirmar que muitos invertebrados (parasitos e vetores) apresentam metabolismo diferenciado dos vertebrados, seus hospedeiros definitivos. Já foram descritos para diversos parasitos e seus hospedeiros vias metabólicas distintas, que serviram como ponto de controle específico, inclusive com aplicação de novas drogas naturais com especificidade a determinada via metabólica essencial aos moluscos e parasitos, que podem

---

ser utilizadas no controle de parasitoses. As enzimas vitais no metabolismo energético têm sido alvo lógico na ação de quimioterápicos. Diferenças metabólicas abrem novas possibilidades ao desenvolvimento de quimioterápicos mais específicos (Metzger 1970, Saz 1990, Kita 1992, Nabih e El-Ansary 1992, Bryant 1993, Tielens 1994).

#### **4.1) Equilíbrio ácido-básico e do pH**

O termo pH provém da expressão francesa “puissance” do hidrogênio, que se refere à força ou poder do hidrogênio. O pH é definido como o logaritmo negativo da concentração de íons hidrogênio. Na escala de pH uma mudança de 1,0 unidade de pH significa uma modificação de 10 vezes na concentração de íons hidrogênio. O teor de íons hidrogênio é regulado por uma série de tampões, destacando-se as hemoglobinas, as proteínas, os fosfatos e o sistema de bicarbonato. Este sistema é o tampão mais importante, pois se encontra presente em grandes quantidades (Marzzoco, Torres 1999).

O dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), em soluções aquosas, existe em equilíbrio potencial com o ácido carbônico ( $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ ). A enzima anidrase carbônica catalisa esta reação em direção a um ponto de equilíbrio: o  $\text{CO}_2$  é produzido através do metabolismo celular e liberado na hemolinfa; o ácido carbônico produzido dissocia-se rapidamente em íons hidrogênio ( $\text{H}^+$ ) e íons bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ). Esta situação pode ser mais bem visualizada por meio da equação de Henderson-Hasselbach. Esta equação especifica que:





---

$$\text{pH} = \text{pK} + \log \frac{\text{base}}{\text{ácido} \longrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3}$$

onde pK é a constante de dissociação (capacidade de liberar íons hidrogênio) do ácido H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Se houver aumento de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> sem qualquer elevação correspondente do H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, a relação está aumentada, e o pH sofrerá uma elevação. Por outro lado, se algum fator produzir aumento do H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, o denominador irá aumentar, a relação estará diminuída, o pH sofrerá uma queda (Marzzoco, Torres 1999).

A pO<sub>2</sub> representa o conteúdo de oxigênio dissolvido na hemolinfa. A saturação de oxigênio representa a quantidade de oxigênio ligada à hemoglobina. Quando a pressão parcial do oxigênio é diferente em duas partes de um sistema, estabelece-se um gradiente de difusão, ou seja, o gás se difunde do local em que a pressão parcial é maior para aquele em que ela é menor. Caso o sistema permaneça sem perturbações, a pressão parcial de um gás se torna a mesma em todas as suas partes. A ligação do complexo "heme" da hemoglobina com o oxigênio é fraca e instável, dependendo de uma série de fatores, como pH, temperatura e da pressão parcial dos gases dissolvidos no sangue. Portanto, o equilíbrio ácido-base é um dos fatores fundamentais para que o processo de transporte do oxigênio seja efetuado de maneira satisfatória (Marzzoco, Torres, 1999).

O dióxido de carbono produzido nos tecidos se difunde através das membranas celulares e dissolve-se na hemolinfa de *B. glabrata*. A pCO<sub>2</sub> refere-se à pressão parcial do gás CO<sub>2</sub> na hemolinfa expressa em mmHg. Os ácidos gerados durante o metabolismo e o íon hidrogênio gerado pela fixação do CO<sub>2</sub> são tamponados por tampões intracelulares, especialmente proteínas

---

e fosfatos. Contudo, o bicarbonato é o principal tampão que neutraliza os ácidos provenientes do metabolismo. O tampão bicarbonato minimiza as modificações na concentração de íons hidrogênio pela dissociação de um ácido ou associação de uma base no plasma. Quando o ácido é adicionado, o bicarbonato reage com o  $H^+$  e o  $H_2CO_3$  é liberado. O ácido carbônico é uma estrutura muito instável e logo se dissocia em dióxido de carbono e água. O excesso de  $CO_2$  é então eliminado pelo tegumento. É importante ressaltar que a solução tampão tem um determinado limite de ação. Ultrapassado esse limite, a variação de pH ocorre como se não existisse mais um sistema tampão (Marzzoco, Torres 1999). Nestes casos, ocorrem perdas de atividades vitais podendo levar o molusco à morte.

#### **4.2)Metabolismo da Glicose**

A glicose é o monossacarídeo mais abundante na hemolinfa de *B. glabrata*, organismo que apresenta uma organização citofisiológica de mitocôndrias, ciclo de Krebs funcional e metabolismo aeróbio (Cheng, Lee 1971). Esse caramujo apresenta como principal reserva energética o glicogênio. Acredita-se que a regulação da glicólise e dos estoques de glicogênio ocorram por intermédio de um controle cascata de glicogênio fosforilase. Em moluscos, este efeito cascata de proteínas para regular a formação ou quebra de glicogênio é, portanto, funcional e a fosfofrutoquinase (PFK), regulada conforme a taxa de ATP/ADP catalisa a primeira reação unidirecional no caminho da glicólise. (Becker, Lüth 1977).

Em caso de infecção por *S. mansoni*, a hipoglicemia em *B. glabrata* é um resultado comum, pois *S. mansoni* é capaz de utilizar a glicose do

---

caramujo diminuindo também os níveis de glicogênio (Christie et al. 1974 b, Rupprecht et al. 1989).

Os mecanismos envolvidos na regulação dos níveis de glicemia são complexos e, em muitos casos, apenas parcialmente esclarecidos. A formação da glicose a partir de precursores diferentes das hexoses é chamada de gliconeogênese (“formação de açúcar novo”). A gliconeogênese é uma via universal, encontrada em todos os animais, vegetais, fungos e microrganismos, e as reações que dela fazem parte são as mesmas em todos os casos. Os precursores importantes da glicose nos animais são o lactato, o piruvato, o glicerol e a maioria dos aminoácidos. Esta via aumenta a reserva de carboidratos disponível para elevar os níveis de glicemia. Embora as reações da gliconeogênese sejam as mesmas em todos os organismos vivos, o contexto metabólico e a regulação da via diferem de organismo para organismo e de tecido para tecido (Lehninger et al 1995).

Em condições de oxigenação tecidual adequada ou quase adequada, a glicose é metabolizada para a produção de energia através da via metabólica aeróbica, que converte os produtos metabólitos da glicólise em piruvato que, por sua vez, é metabolizado no ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs). Em condições de hipóxia tecidual grave, o metabolismo aeróbico é incapaz de funcionar adequadamente, de modo que os produtos metabólicos da glicólise na etapa de produção de piruvato são convertidos em lactato (ácido láctico) através do metabolismo anaeróbico (Marzzoco, Torres 1999). Por conseguinte, o aumento de lactato na hemolinfa, indica uma redução significativa da oxigenação tecidual (Fig. 2). O piruvato tem vários destinos possíveis: ser usado como precursor na síntese de carboidratos

---

(gliconeogênese), aminoácidos (transaminação) e ácidos graxos (via acetil-CoA) ou ser totalmente oxidado a dióxido de carbono CO<sub>2</sub> (via acetil CoA e ciclo de Krebs) (Fig.2.) (Marzzoco, Torres 1999).

#### **4.3) Metabolismo de Aminoácidos**

Os aminoácidos, derivados principalmente das proteínas da alimentação ou da degradação das proteínas intracelulares, são a última classe de biomoléculas, cuja oxidação faz uma contribuição significativa para a geração de energia metabólica. O valor da fração de energia metabólica derivada dos aminoácidos varia muito com o tipo de organismo considerado e com a situação metabólica em que ele se encontra. As vias de degradação dos aminoácidos são muito similares na maioria dos organismos. Os esqueletos carbônicos dos aminoácidos, em geral, encaminham-se para o ciclo do ácido cítrico e, de lá, são oxidados para produzirem energia química ou, então, encaminhados para a gliconeogênese (Lehninger et al 1995).

Sob condições ecofisiológicas adversas, muitos moluscos morrem apesar de existirem boas reservas de proteínas e lipídios (Gress, Cheng 1973, Michelson, Dubois 1975; Becker, Lüth 1977). A degradação de produtos nitrogenados, amônia e aminoácidos são geralmente transportados com a hemolinfa para lugares onde eles possam ser excretados ou futuramente processados (Little 1968).

A quantidade de produtos nitrogenados degradados é indicativa da atividade do metabolismo de proteínas e ácidos nucleicos de um animal, exposto a qualquer situação de estresse, onde deve aparecer uma produção

aumentando as concentrações de uréia, amônia e ácido úrico. Tal estresse pode ser causado por fases de uma intensa atividade reprodutiva ou por invasão de parasitas. Um aspecto deve ser considerado, especialmente no caso do *B. glabrata*, em estágio larval do *S. mansoni* que desenvolve dentro deste molusco e mostra uma rápida taxa de reprodução (Becker 1968).

A uréia é um produto de degradação contendo nitrogênio, proveniente do metabolismo das proteínas (Fig. 2). Estudos mostram que a função fisiológica do ciclo da uréia consiste na desintoxicação da amônia, ocorrendo um aumento na excreção e um acúmulo de uréia quando *B. glabrata* está sob situações ecofisiológicas adversas, como estivação ou a exposição ao extrato de *S. polyphyllum* (Cheng, Lee 1971, Schmale, Becker 1977).

Existem poucos dados na literatura sobre a concentração de uréia na hemolinfa e valores de aproximadamente 0,26 mmol/L normalmente são encontrados em *B. glabrata* (Becker, Schmale 1975).

Em *B. glabrata*, a ativação enzimática do ciclo da uréia pode surgir pelo aumento de nova síntese ou por degradação das enzimas envolvidas, sendo que este mecanismo provavelmente está sujeito à influência de substratos ou outros ativadores e inibidores (Becker, Schmale 1975).

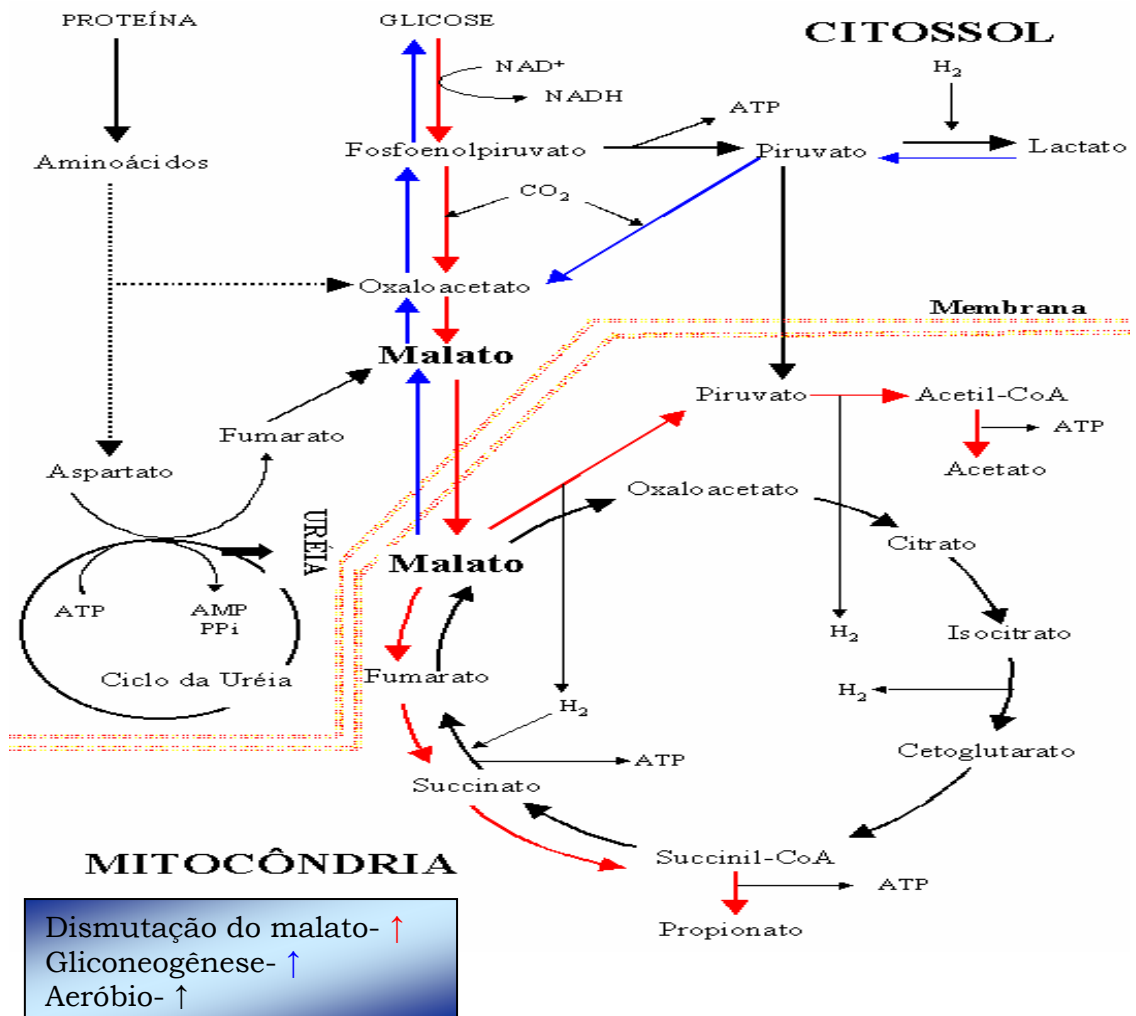


Figura 2. Metabolismo da via glicolítica e dos aminoácidos (Bezerra et al 1997. Mem.Inst.Osvaldo).

#### 4.4) Metabolismo de Cálcio

Com referência à avaliação do metabolismo do cálcio, as alterações em moluscos podem ser provocadas descalcificando a concha. Em situações adversas e que causam alteração de pH na hemolinfa do molusco, como a produção e acúmulo de succinato ou lactato, o carbonato de cálcio proveniente da concha é excretado para a hemolinfa para neutralizar ou tamponar estes ácidos, acumulados, se o molusco estiver sob anoxia (Wolmarans 1987, Bielefeld *et al.* 1992, Marxen, Becker 2000).

O cálcio sérico total é constituído de cerca de 50% (faixa de 35-55%) de cálcio ligado e de cerca de 50% (faixa de 35-65%) de cálcio não ligado. Tradicionalmente, o cálcio não-ligado foi denominado cálcio “ionizado”, sendo também conhecido como cálcio “livre ou dialisável”. O cálcio ligado é subdividido em cálcio ligado a proteínas e cálcio complexado com compostos não protéicos. Cerca de 45% do cálcio total (30-50%) estão ligados às proteínas. A parte restante do cálcio total, que corresponde a 5% (5-15%), é complexada como citrato, fosfato, sulfato e bicarbonato, que não fazem parte das proteínas séricas (Marzzoco,Torres 1999).

Os íons  $\text{Ca}^{+2}$  liberados em resposta a um estímulo nervoso, além de desencadearem a contração muscular, estimulam a degradação de glicogênio e inibem a sua síntese. Estes íons ligam-se à subunidade da fosforilase quinase, idêntica a calmodulina. A fosforilase quinase torna-se ativa, desencadeando a glicogenólise, também induzida por adrenalina no músculo em repouso. Menos de 5% do glicogênio fosforilase são funcionais, mas, 0,7 segundos após o início da contração, o percentual da enzima ativa já atinge 50%. O resultado final consiste em um aumento da oferta de substrato para a glicólise e da produção de ATP para sustentar a contração muscular (Marzzoco,Torres 1999).

## **JUSTIFICATIVA**

O *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário de *S. mansoni*, possui um papel obrigatório e decisivo para a permanência da esquistossomose em uma determinada região. Enfatiza-se a busca de conhecimento a respeito de sua fisiologia e metabolismo frente a alterações realizadas, experimentalmente, em laboratório. Diante dos inúmeros extratos de plantas testados como moluscicidas, propõe-se o estudo da relação parasito-hospedeiro como potencial sítio de ação de produtos naturais no controle integrado da esquistossomose.

A adaptação do hospedeiro intermediário, *B. glabrata*, a períodos de estiagem mais longos, o aumento de construções de represas e introdução de esquemas de irrigação, vêm inadvertidamente propiciando criadouros ideais para o *B. glabrata*. Assim, torna-se imprescindível a melhoria das condições de vida, educação sanitária e a pesquisa de alternativas terapêuticas que possam auxiliar no combate a esquistossomose.

O Cerrado brasileiro é um importante bioma com grande potencial para esta aplicação. Esta bioatividade foi analisada em *S. polyphyllum*, conhecido como Barbatimão de Folha Pequena, a qual é pouco relatada na literatura, mas tem revelado bioatividade em estudos preliminares de vários organismos (Audi et al. 1999; Alves et al. 2000). A espécie *S. polyphyllum* da flora do Cerrado foi escolhida devido a sua ampla distribuição, já que o Cerrado forma o 2º bioma mais extenso do Brasil, cobrindo mais de dois milhões de Km<sup>2</sup>, o que representa cerca de 22% do território nacional. O



Cerrado é considerado atualmente como a savana de maior biodiversidade do mundo, tendo um potencial enorme ainda pouco explorado.

Sendo assim, o uso de extratos de plantas no controle de moluscos e da inibição do desenvolvimento larvar dentro deste (esporocistos e cercárias) vem de encontro a essa necessidade, buscando a bioatividade com eficiência em baixas doses, baixo impacto ambiental e baixo custo de produção. Como efeito, esta avaliação também contribuirá para o conhecimento das propriedades da flora do Cerrado, sua conservação e utilização racional.

Para tanto, é necessário estudar a bioquímica da relação parasito-hospedeiro com o intuito de se conseguir determinar os pontos de ação suscetíveis a novas drogas, avaliando as alterações metabólicas sofridas pelo hospedeiro intermediário.

Nosso grupo de pesquisa em bioquímica da relação parasita-hospedeiro vem estudando as plantas do Cerrado goiano, com ênfase ao *Stryphnodendron spp*, que se mostrou com grande potencial moluscicida. Esta planta merece maiores estudos de sua toxicidade sobre o metabolismo e o equilíbrio ácido-base do molusco *B. glabrata*.

## OBJETIVOS

a) Estabelecer estudo interdisciplinar da ação de extrato de *S. polyphyllum*, sobre *B. glabrata*, avaliando o efeito metabólico desta interação nas concentrações de 25 e 50 mg/L.

b) Estudar e avaliar as alterações no equilíbrio ácido-base de *B. glabrata*, em condições de estresse, provocadas pela presença do extrato de *S. polyphyllum*.

c) Verificar a eficiência do sistema tampão do molusco diante de uma situação de estresse provocada pela presença do extrato de *S. polyphyllum*.

d) Analisar o metabolismo de proteínas, a via glicolítica e a fosforilação oxidativa de *B. glabrata* sob ação do extrato da planta do Cerrado *S. polyphyllum*.

e) Avaliar a atividade das enzimas aminotransferases e lactato desidrogenase após a exposição ao extrato de *S. polyphyllum*, observando as mudanças assimiladas para a sobrevivência do molusco.

f) Avaliar, por meio do método de cromatografia líquida, as concentrações dos ácidos orgânicos após a exposição de *B. glabrata* ao extrato de *S. polyphyllum*.

**1º Artigo**

**Análise do Equilíbrio Ácido-Base em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), sob exposição a *Stryphnodendron polyphyllum* (Martius, 1837), planta moluscicida do Cerrado brasileiro.**

## RESUMO

Os moluscos do gênero *Biomphalaria* possuem sistema circulatório aberto onde circula a hemolinfa. Esta distribui, entre os órgãos, os metabólitos necessários; além disso, irá refletir distúrbios celulares, cujos produtos serão excretados através da hemolinfa. Estes produtos podem ser ainda eliminados ao meio exterior ou armazenados e, posteriormente reabsorvidos da hemolinfa pela célula. O objetivo deste trabalho foi estudar e avaliar as alterações no equilíbrio ácido-base de *B. glabrata* em condições não adequadas provocadas pela presença do extrato de *Stryphnodendron polyphyllum*, planta tanífera de comprovada ação moluscicida.

Os moluscos *B. glabrata*, cepa BH, foram mantidos no biotério do IPTSP/UFG, tratados por 24 horas com os extratos de caule de *S. polyphyllum* nas concentrações de 25 e 50mg/L (solução aquosa). No grupo controle os moluscos foram mantidos em água desclorada. A análise do equilíbrio ácido-base das amostras foi realizada com pool de hemolinfa de 3 moluscos e a leitura das concentrações feitas no gasômetro Radiometer modelo ABL-5.

A grande maioria dos processos bioquímicos é extremamente sensível à variação do pH. A manutenção do pH é conseguida pelos seres vivos graças à existência dos sistemas-tampão, porém o extrato de *S. polyphyllum* impediu que este sistema funcionasse de forma efetiva. Nesse sentido as plantas moluscicidas são de grande importância no controle dos focos da infecção, complementando outras medidas de prevenção da esquistossomose.

**Palavras chaves:** *Biomphalaria glabrata*, equilíbrio ácido-base, *Schistosoma mansoni*, *Stryphnodendron polyphyllum*.

**ABSTRACT**

*Biomphalaria* mollusks have an open circulation system where the hemolymph circulates distributing the necessary metabolites to the organs, as well as reflecting cellular disturbances and transporting excreted material, which may be eliminated into the environment or stored and later reabsorbed from the hemolymph into the cell. The aim of this work was to study and estimate the alterations in the acid-alkaline balance of *B. glabrata* under inadequate conditions caused by the presence of the extract of *S. polyphyllum*, a tanniferous plant with recognized molluscicide effect.

The *B. glabrata* mollusks, BH strain, were kept in the IPTSP/UFG vivarium and treated for 24 hours with bark extracts from *Stryphnodendron polyphyllum* at 25 and 50 mg/L concentrations (aqueous solution). The control group was performed with mollusks in dechlorinated water. The analysis of the acid-alkaline balance of the samples was performed by pooling the hemolymph from 3 mollusks and the concentrations read on the Radiometer gasometer, model ABL-5.

Most biochemical processes are extremely sensitive to any variation in pH. The pH is maintained in living beings due to acid-alkaline balance but the *S. polyphyllum* extract did not allow this system to function effectively. It is in this sense that molluscicide plants are important in the control of infection foci, complementing other schistosomiasis prevention measures.

**Key words:** acid-alkaline balance, *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni*, *Stryphnodendron polyphyllum*.

## INTRODUÇÃO

No Brasil existem, segundo dados do 8º Simpósio Internacional de Esquistossomose, cerca de 8 a 10 milhões de pessoas infectadas, de 25 a 30 milhões de pessoas expostas ao risco de infecção (Coutinho 2002). O ciclo de vida do *S. mansoni* já foi extensamente estudado e seu mapa genético foi recentemente concluído, além de várias pesquisas direcionadas ao desenvolvimento de vacinas contra o *S. mansoni* (Colley 2000).

O hospedeiro intermediário desta doença é um molusco de água doce, conhecido popularmente por caramujo. Esse molusco tem uma concha em espiral, com as voltas ou giros no mesmo plano, recebendo por isso a denominação de planorbídeo. Os caramujos, ou planorbídeos criam-se e vivem na água doce de córregos, riachos, valas, alagados, brejos, açudes, represas ou outros locais onde haja pouca correnteza. Os caramujos jovens alimentam-se de vegetais em decomposição e folhas verdes. Os caramujos põem ovos, dos quais, depois de alguns dias, nascem novos caramujos que crescem e tornam-se adultos (SUCEN 2001).

O tratamento dessas coleções de água através de moluscidas naturais obtidos de partes de plantas renováveis poderá constituir em forma mais econômica e de baixa toxicidade ao meio ambiente, para o combate ao molusco transmissor (Branco 1986, Perret, Whitfield 1996, Juberg et al. 1997, Alves et al. 2000). Com esta finalidade, plantas da flora do Cerrado brasileiro têm tido sua bioatividade estudada, avaliando-se alterações histopatológicas, promovidas pela incubação de *Biomphalaria glabrata* em diferentes extratos. Atribuem-se, inicialmente, estas alterações à

---

bioatividade dos taninos, que constitui uma classe de fenóis, presentes nestas espécies vegetais, existindo, porém, pouco conhecimento de seu modo de ação, principalmente em moluscos (Marston, Hostettmann 1985, Ozawa et al. 1987, Haslam 1996).

Os moluscos do gênero *Biomphalaria* possuem sistema circulatório aberto onde circula a hemolinfa, que veicula moléculas de baixo peso molecular como íons, aminoácidos, carboidratos, vitaminas, uréia, dentre outras e uma alta concentração de proteínas (Arndt, Santoro 2001). A hemolinfa distribui entre os órgãos os metabólitos necessários; além disso, irá refletir distúrbios celulares, cujos produtos serão excretados através desta. Estes produtos podem ser ainda eliminados ao meio exterior ou armazenados na hemolinfa e, posteriormente reabsorvidos da hemolinfa pela célula (Wijsman et al. 1985). O objetivo deste trabalho foi estudar e avaliar as alterações no equilíbrio ácido-base de *B. glabrata*, na presença do extrato de *Stryphnodendron polyphyllum* nas concentrações de 25 e 50 mg/L.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Os moluscos *B. glabrata*, cepa BH, foram mantidos no biotério do IPTSP/UFG em aquários com água desclorada e aerada, na temperatura de 25-28° C. A lavagem das caixas foi realizada semanalmente. Os moluscos foram alimentados com *Lactuca sativa* L. (alface) e ração apropriada “*ad libitum*” (Vinaud et al. 2001).

As cascas do *S. polyphyllum* usadas no trabalho foram colhidas, lavadas, secadas em estufas a 40 °C com ventilação forçada e posteriormente moídas. A farinha obtida com a trituração é denominada de



extrato bruto. O extrato bruto foi diluído em água isenta de cloro formando soluções nas concentrações de 25 e 50 mg/L.

A coleta e obtenção de extratos brutos do caule de *S. polyphyllum* foram realizadas pelo departamento de Botânica, de acordo com Santos et al. (2002) pelo Instituto de Química da UFG.

Os moluscos, com diâmetro de concha de 14 +/- 2 mm e idade aproximada de três meses, foram divididos em 20 grupos com 3 (três) moluscos/ aquário e tratados, por 24 horas, em contato permanente com a solução aquosa do extrato. As soluções aquosas do extrato bruto da casca do caule de *S. polyphyllum* usado nos bioensaios, nas concentrações de 25 e 50 mg/L (dose sub-letal), foram preparadas a partir de 12,5 e 25 mg do extrato e 500 ml de água de torneira desclorada. Durante o período de exposição os moluscos não foram alimentados. No grupo controle, 10 grupos de 3 moluscos, foram mantidos em água desclorada, garantindo assim as condições normais de sobrevivência.

Para a extração da hemolinfa os moluscos tiveram primeiro suas conchas limpas com álcool 70% e depois com água destilada e, posteriormente, seca com papel absorvente. Sob microscópio estereoscópio, usando bisturi cirúrgico, foi feito um orifício na região pericárdica de onde fluiu a hemolinfa, preenchendo a abertura central da concha, seguido de aumento de fluxo de hemolinfa à medida que o molusco se retraía na concha. A hemolinfa foi imediatamente pipetada e colocada num “ependorff” conservado em gelo (Bezerra et al. 1997). Todos os moluscos foram utilizados, pois não houve mortalidade. Em seguida a hemolinfa foi aspirada

---

com uma seringa, e retiradas todas as bolhas de ar, conservadas em banho de gelo até a leitura das amostras.

A análise do equilíbrio ácido-base das amostras foi realizada com pool de hemolinfa de 3 moluscos e a leitura das concentrações feita no gasômetro Radiometer modelo ABL-5.

Os resultados dos testes foram analisados em média e mediana de acordo com o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Na análise estatística, utilizou-se o teste de  $\chi^2$  para a relação do molusco em condição padrão comparando aos grupos expostos ao extrato da planta em estudo, e o teste one way ANOVA e Tukey para comparação entre as diferentes condições que os moluscos foram submetidos. Considerou-se estatisticamente significativo o valor de  $p < 0,05$ .

A tabela 1 refere-se aos resultados oriundos da análise do equilíbrio ácido-base realizado no gasômetro Radiometer modelo ABL-5.

## **RESULTADOS**

O pH da hemolinfa de *B. glabrata* reflete a atividade iônica de numerosas substâncias e é ligeiramente maior que o pH da água. O pH da hemolinfa dos caramujos mantidos sob condições padrão foi  $7,64 \pm 0,07$ , sendo, portanto levemente alcalino em relação ao pH da água de condicionamento ( água desclorada). Quando se adiciona o extrato de *S. polyphyllum* na água, mesmo em pequenas concentrações, o pH da hemolinfa sofreu uma acidose, variando de  $7,59 \pm 0,16$  para os moluscos submetidos à exposição de 25 mg/L e  $6,87 \pm 0,20$  para os moluscos expostos a 50 mg/L do extrato (Fig.3, tabela 1). A análise estatística dos valores

---

obtidos mostrou que houve distribuições normais, ocorrendo assim uma diferença estatística entre o grupo controle e de 50 mg/L e entre os testes de 25 e 50 mg/L. Não houve diferença entre o controle e o teste de 25 mg/L ( $p < 0,001$ ).

A pressão parcial de gás carbônico na hemolinfa de *B. glabrata* no grupo controle apresentou mediana de 13,50 mmHg, com valores referentes a 25% igual a 11,00 mmHg e referentes a 75% igual a 17,00 mmHg. Quando estes moluscos foram submetidos ao extrato na concentração de 25 mg/L a mediana foi 14,00 mmHg (12 a 15mmHg), não sendo estatisticamente diferente do grupo controle. Quando a concentração elevou-se para 50mg/L ocorreu um aumento significativo na pressão parcial de gás carbônico, a mediana elevou-se para 38,00 mmHg (37 a 44mmHg ) ao ser comparada com o grupo controle ( $p < 0,001$ ), (Fig.3, tabela 1).

A pressão parcial de gás oxigênio na hemolinfa dos caramujos do grupo controle foi de  $134,50 \pm 19,50$  mmHg e quando estes moluscos foram submetidos a exposição de 25mg/L do extrato da planta esta concentração passou a ser  $133,90 \pm 55,82$  mmHg, não mostrando assim uma diferença significativa. Porém quando estes foram submetidos à concentração de 50 mg/L a concentração parcial do gás oxigênio diminuiu para  $66,70 \pm 29,62$  mmHg, permitindo concluir que houve uma diferença significativa entre o controle e o teste de 50 mg/L ( $p < 0,001$ ) (Fig.3, tabela 1).

A dosagem dos íons bicarbonatos presentes na hemolinfa do grupo controle apresentaram valores de  $15,00 \pm 1,41$  mmol/L, não tendo diferença estatística com o grupo exposto a 25mg/L do extrato que apresentou média de  $13,50 \pm 2,70$  mmol/L. Quando estes moluscos foram submetidos à

concentração de 50 mg/L os íons bicarbonatos diminuíram sua média para  $7,50 \pm 4,00$  mmol/L (Fig.3, tabela 1). Isso permite concluir que houve uma diferença significativa entre o grupo controle e o teste de 50 mg/L ( $p < 0,001$ ).

A saturação de oxigênio do grupo controle e do grupo exposto a 25 mg/L não sofreu variação significativa. A mediana destes dois grupos foi 99%. Já quando a concentração do extrato passou para 50 mg/L a saturação de oxigênio caiu significativamente para 80% (75 a 90%), ( $p < 0,001$ ), (Fig.3, tabela 1).

Tabela 1. Análise do equilíbrio ácido-base na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* expostos ao extrato do caule de *Stryphnodendron polyphyllum*, nas concentrações de 25 e 50mg/L valor em média±desvio padrão ou mediana (mínimo - máximo).

	<b>Controle</b>	<b>S. polyphyllum 25mg/L</b>	<b>S. polyphyllum 50mg/L</b>
<b>pH</b>	7,64±0,07	7,59±0,16	6,87±0,20
<b>pCO<sub>2</sub> (mmHg)</b>	13,50 (11,00 – 17,00)	14,00 (12,00 -15,00)	38,00 (37,00 – 44,00)
<b>pO<sub>2</sub> (mmHg)</b>	134,50±19,50	133,90±55,82	66,70±29,62
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (mmol/L)</b>	15,00±1,41	13,50±2,70	7,50±4,00
<b>s O<sub>2</sub> %</b>	99,00 (99,00 – 99,00)	99,00 (99,00 – 99,00)	80,00 (75,00 – 90,00)

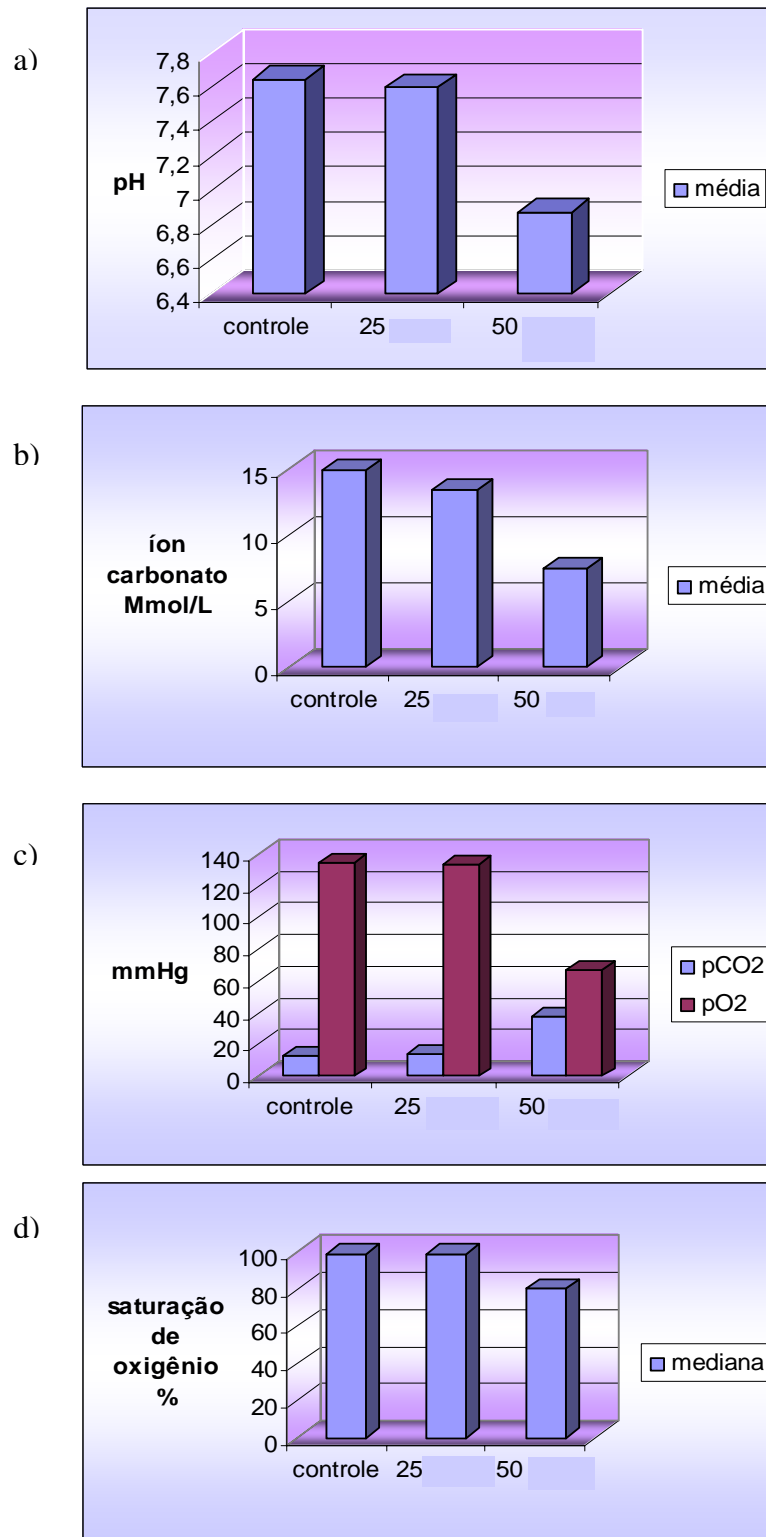


Figura 3 – a) Taxas de pH, b) concentrações de íons carbonatos, c) pressão parcial de gás oxigênio e gás carbônico, d) saturação de oxigênio na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* expostos ao extrato de caule de *Stryphnodendron polyphyllum*, nas concentrações de 25 e 50 mg/L.

## DISCUSSÃO

Invertebrados que apresentam metabolismo aeróbio, entre estes *B. glabrata*, podem acionar ou redirecionar seu fluxo metabólico em sentido anaeróbio sob determinadas condições ecofisiológicas em que se encontrem. A possibilidade de um metabolismo anaeróbio facultativo, em invertebrados, como os moluscos, permite sua sobrevivência ou adaptação às adversidades. Estes caminhos anaeróbios dão continuidade à produção de energia e apresentam como produto final substâncias facilmente excretadas sem causar inicialmente grandes danos à célula (Schöttler 1986).

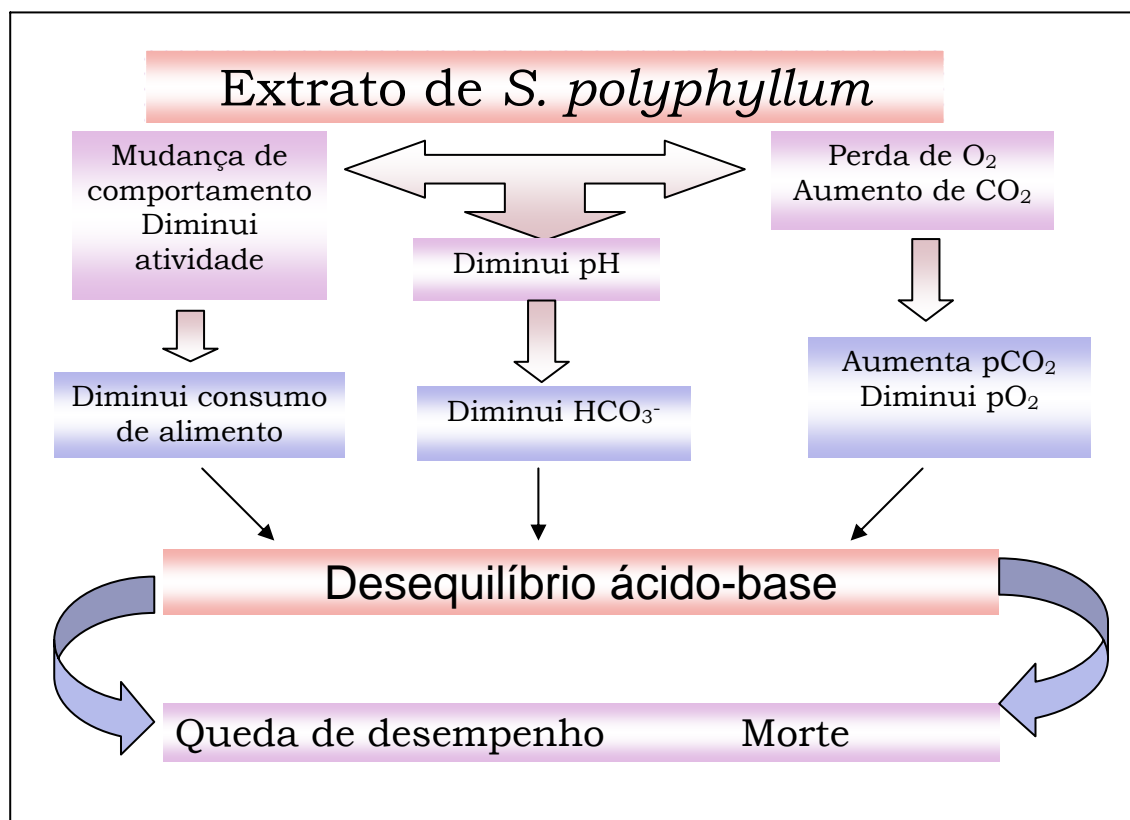


Figura 4 – Efeitos do extrato de *Stryphnodendron polyphyllum* no equilíbrio ácido-base em *Biomphalaria glabrata*.

O *B glabrata*, sob condições padrão apresenta metabolismo aeróbico como mostra o resultado da saturação de oxigênio no grupo controle de 99,00% e uma pressão parcial do gás oxigênio de 134,50 mmHg. Possibilitando uma completa oxidação de carboidratos em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O. Entretanto, quando estão sob condições desfavoráveis, impostas pela presença do extrato de *S. polyphyllum* a 50 mg/L, a saturação de oxigênio saiu de 99% para até 75 % e a pressão parcial do gás oxigênio abaixou de 134,5 para 66,70 mmHg (Fig. 3) , obrigando o molusco a redirecionar suas vias metabólicas, buscando meios para sobreviver de acordo com idéias já propostas por Bacila (1970), Becker (1980), Patience et al. (1983), Wolmarans (1987) e Shaw, Erasmus (1987).

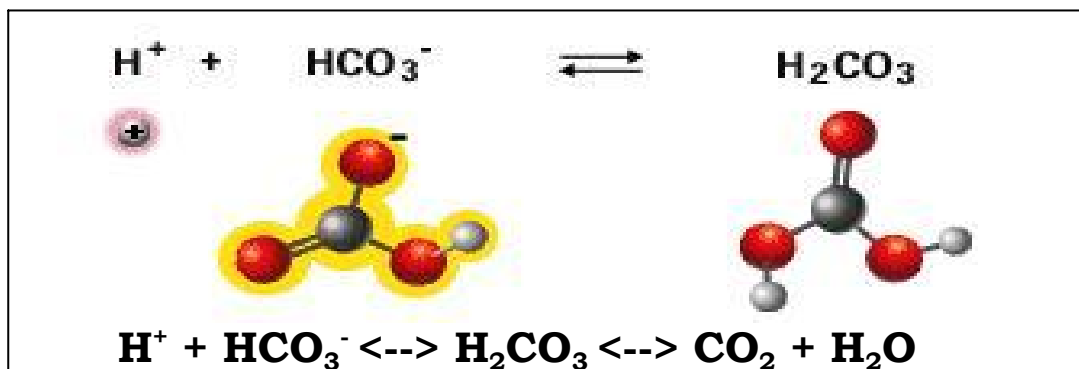


Figura 5. Representa o dióxido de carbono produzido pelo metabolismo, a sua pequena dissociação em íons e o equilíbrio sob a forma de CO<sub>2</sub> dissolvido e água.

Em situações adversas e que causam alteração de pH na hemolinfa de moluscos, como a produção e acúmulo de succinato ou lactato, o carbonato

de cálcio proveniente da concha é excretado para a hemolinfa, com a finalidade de neutralizar ou tamponar estes ácidos, acumulados se o molusco estiver sob anoxia (Wolmarans 1987, Bielefeld et al. 1992, Zelck et al. 1995, Marxen, Becker 2000). A concentração do bicarbonato, a  $pCO_2$  e o pH da hemolinfa são interdependentes. Portanto, a alteração de um dos parâmetros leva ao movimento compensatório dos demais, na busca do equilíbrio (Fig. 5). A hemolinfa destes moluscos apresentou o pH igual a 7,64 para o grupo controle e este pH tornou-se após a exposição ao extrato na concentração de 50 mg/L atingindo o valor de 6,87. Na tentativa de neutralizar o pH ácido, os íons carbonato foram consumidos, passando de 15,00 mmol/L no grupo controle para 7,50 mmol/L quando expostos a 50 mg/L do extrato de *S. polyphyllum*. A pressão parcial de gás carbônico ( $pCO_2$ ) acompanhou também a alteração do pH, inicialmente a  $pCO_2$  foi de 13,50 mmHg no grupo controle e 38,00 mmHg na hemolinfa dos moluscos expostos a 50 mg/L do extrato da planta. Com isso percebemos que o extrato realmente interfere no equilíbrio ácido-base do molusco (Fig. 6).



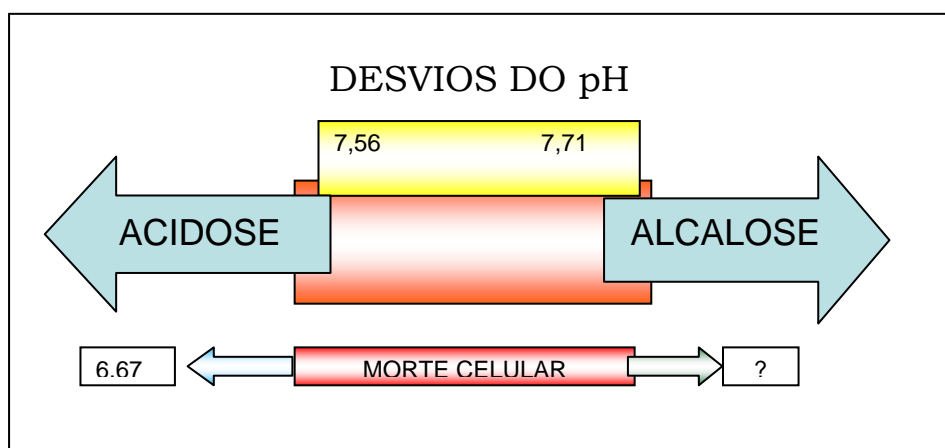


Figura 6. Representa o pH na acidose e na alcalose. Demonstra também os limites de tolerância do organismo aos desvios do pH.

Patience et al. (1983), Wolmarans (1987), Bezerra et al. (1999) e Silva (2002) também mostraram que os moluscos em condições não padrões à sua sobrevivência acionam seu metabolismo anaeróbio.

No estudo do equilíbrio ácido-base verificou-se na hemolinfa uma diminuição significativa no pH, na pressão de gás oxigênio, íons carbonatos e na saturação de gás oxigênio. Por outro lado, houve um aumento na pressão de gás carbônico, quando estes foram submetidos ao extrato na concentração de 50 mg/L.

A grande maioria dos processos bioquímicos é extremamente sensível à variação do pH. A manutenção do pH é conseguida pelos seres vivos graças à existência dos sistemas-tampão. O teor de íons hidrogênio é regulado por uma série de tampões, e dentre as substâncias que atuam como tampões, destacam-se as hemoglobinas, as proteínas, os fosfatos e o sistema de bicarbonato, sendo este o mais importante, pois se encontra presente em

grandes quantidades, porém o extrato de *S. polyphyllum* parece que impediu que este sistema funcionasse de forma efetiva.

O ajuste do metabolismo às diferentes condições fisiológicas é obtido graças a processos que, em conjunto são chamados de regulação metabólica. Os eventos de regulação não são isolados; cada um deles atua como um gerador primário de sinais, captados por geradores secundários, capazes de retransmiti-los até atingir toda a rede metabólica e repercutir a distância, em todo o organismo. A complexidade dos processos é enorme, mas justifica-se por permitir um ajuste sensibilíssimo do metabolismo a diferentes situações, propiciando uma resposta pronta e logicamente organizada (Marzzoco, Torres 1999).

**Artigo 2**

**Análise do metabolismo de proteínas, da via glicolítica e da fosforilação oxidativa de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) sob ação do extrato da planta do Cerrado brasileiro *Stryphnodendron polyphyllum* (Martius, 1837).**

## RESUMO

A esquistossomose permanece como uma das infecções parasitárias mais prevalentes, constituindo-se na segunda parasitose mais importante, depois da malária, em termos de índice de mortalidade global, apresentando conseqüências econômicas e de saúde pública muito significativas. No presente trabalho, o potencial de *Stryphnodendron polyphyllum*, uma planta do cerrado brasileiro, foi testado como fonte alternativa de produtos naturais com atividade moluscicida. Os moluscos foram submetidos a bioensaios, com extrato de *S. polyphyllum* nas concentrações de 25 e 50 mg/L, por 24 horas, e comparados com um grupo controle mantido sob condições padrão. O extrato interferiu no metabolismo destes moluscos de forma mais efetiva na concentração de 50 mg/L. Aparentemente o molusco fez um ajuste do metabolismo, frente às diferentes condições ecofisiológicas impostas pelo extrato, através de uma regulação de toda a rede metabólica, que foi adaptada a esta situação, repercutindo em todo o organismo do molusco. O extrato aquoso obtido do caule do barbatimão pode, após análise mais profunda, constituir uma alternativa de menor toxicidade e menor custo financeiro no controle da esquistossomose no Brasil.

**Palavras chaves:** *Biomphalaria glabrata*, controle, esquistossomose, metabolismo, molusco, *Stryphnodendron polyphyllum*.

**ABSTRACT**

Schistosomiasis remains one of the most prevailing parasite infections, second only to malaria in terms of global mortality index, causing highly significant economic and public health consequences.

This study tested the potential of *Stryphnodendron polyphyllum*, a plant from the Brazilian savannah as an alternative source of natural molluscicide products. The mollusks were submitted to biotests at 25 and 50 mg/L concentrations for 24 hours and compared with a control group kept under standard conditions. The extract affected more strongly the metabolism of the mollusks in the 50 mg/L concentration. As a result, the mollusk made a metabolic adjustment to the different eco-physiological conditions determined by the extract, by means of a metabolic regulation. These regulatory events did not occur alone, all the metabolic network was adapted to the new situation which reflected on the mollusk organism as a whole.

The aqueous extract taken from the bark of the “barbatimão” may, after further analysis, constitute a less toxic as well as less costly alternative for the schistosomiasis control in Brazil.

**Key words:** *Biomphalaria glabrata*, control, metabolism, mollusk, schistosomiasis , *Stryphnodendron polyphyllum*.

## INTRODUÇÃO

A esquistossomose permanece como uma das doenças tropicais mais prevalentes, constituindo-se na segunda parasitose mais importante, depois da malária, em termos de índice de mortalidade global (Rug, Ruppel 2000), apresentando conseqüências econômicas e de saúde pública muito significativas. Embora a distribuição da esquistossomose tenha sido alterada nos últimos 50 anos, através da implantação de programas de controle, o número de pessoas infectadas ou com risco de infecção, não tem sido reduzido (Mendes et al. 1999, Chitsulo et al. 2000). O controle desta doença depende de um conjunto de “multifacetadas desejáveis” (Whitfield 1996, Ed Khoby et al. 1998), incluindo o controle do molusco hospedeiro intermediário.

As atividades moluscidas dos extratos aquosos e metanólicos de uma série de plantas têm sido relatada, principalmente devido à presença de taninos na sua constituição. Por exemplo, os efeitos moluscidas da planta *Acácia nilótica* têm sido atribuídos à sua constituição rica em taninos (Marton, Hostettmann 1985)

Os moluscidas vegetais com ações seletivas, biodegradáveis, de baixo custo, localmente viáveis e de fácil aplicação nos criadouros naturais visam atender às exigências econômicas e ecológicas (WHO 1983), pois os moluscidas sintéticos são onerosos e ainda podem acarretar problemas de toxicidade para organismos não-alvos.

Convém assinalar que a niclosamida tem sido por quatro décadas, o moluscida sintético mais usado. Atualmente, a niclosamida ainda é

recomendada pela Organização Mundial de Saúde para aplicação em larga escala (WHO 1993). Porém, esse produto provoca alta mortalidade de peixes e possui um custo elevado (Perrett, Whitfield 1996), e áreas endêmicas para esquistossomose, geralmente não possuem recursos econômicos, e assim, mecanismos alternativos para controle dessa doença precisam ser buscado.

Nos últimos anos, o metabolismo de *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário de *Schistosoma mansoni*, vem sendo amplamente estudado por meio da análise da concentração de glicose, uréia, proteínas, cálcio e ácidos orgânicos em sua hemolinfa (Wolmarans 1987, Rupprecht et al. 1989).

Extratos de plantas estão sendo pesquisados no combate aos moluscos do gênero *Biomphalaria*, que estão diretamente implicados na transmissão de *S. mansoni* (Whitfield 1996), Uma vez que o uso de plantas com propriedades moluscidas pode ser uma medida econômica para se promover o combate ao molusco transmissor da esquistossomose.

Nesse sentido, pesquisadores não têm dispensado esforços para encontrar plantas que sejam ao mesmo tempo, altamente ativas, baratas, seguras, de fácil aplicação e localmente viáveis (Mott 1987). Também foram estudados vários mecanismos de interrupção do ciclo biológico utilizando-se moluscidas no controle do hospedeiro intermediário ou larvicidas para combater as formas infectantes – cercárias e miracídios (Carvalho et al. 1998, Bezerra et al. 2002). Mas as plantas têm inúmeros compostos químicos, só que como produtos naturais à degradação é mais rápida. O objetivo deste trabalho foi delinear o perfil bioquímico da hemolinfa de *B. glabrata* exposto a extratos do caule da planta do cerrado *Stryphnodendron polyphyllum*.

---

## MATERIAL E MÉTODOS

Os moluscos *B. glabrata*, cepa BH, foram mantidos no biotério do IPTSP/UFG em aquários com água desclorada e aerada, na temperatura de 25-28° C. A lavagem das caixas foi realizada semanalmente. Os moluscos foram alimentados com *Lactuca sativa* L. (alface) e ração apropriada “*ad libitum*” (Vinaud et al. 2001).

As cascas do *S. polyphyllum* usadas no trabalho foram colhidas, lavadas, secadas em estufas a 40 °C com ventilação forçada e posteriormente moídas. A farinha obtida com a trituração é denominada de extrato bruto. O extrato bruto foi diluído em água isenta de cloro formando soluções nas concentrações de 25 e 50 mg/L.

A coleta e obtenção de extratos brutos do caule de *S. polyphyllum* foram realizadas pelo departamento de Botânica, de acordo com Santos et al. (2002) pelo Instituto de Química da UFG.

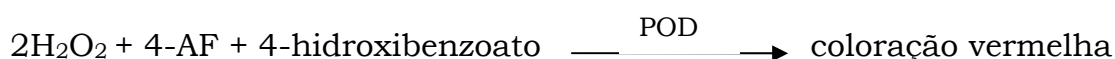
Os moluscos, com diâmetro de concha de 14 +/- 2 mm e idade aproximada de três meses, foram divididos em 20 grupos com 3 (três) moluscos/ aquário e tratados, por 24 horas, em contato permanente com a solução aquosa do extrato. As soluções aquosas do extrato bruto da casca do caule de *S. polyphyllum* usado nos bioensaios, nas concentrações de 25 e 50 mg/L (dose sub-letal), foram preparadas a partir de 12,5 e 25 mg do extrato e 500 ml de água de torneira desclorada. Durante o período de exposição os moluscos não foram alimentados. No grupo controle, 10 grupos de 3 moluscos foram mantidos em água desclorada, garantindo assim as condições normais de sobrevivência.



Para a extração da hemolinfa os moluscos tiveram primeiro suas conchas limpas com álcool 70% e depois com água destilada e, posteriormente, seca com papel absorvente. Sob microscópio estereoscópio, usando bisturi cirúrgico, foi feito um orifício na região pericárdica de onde fluiu a hemolinfa, preenchendo a abertura central da concha, seguido de aumento de fluxo de hemolinfa à medida que o molusco se retraía na concha. A hemolinfa foi imediatamente pipetada e colocada num “ependorff” conservado em gelo (Bezerra et al. 1997), posteriormente a hemolinfa foi centrifugada ficando assim livre de células. Todos os moluscos foram utilizados, pois não houve mortalidade.

A análise espectrofotométrica das amostras foi realizada com a utilização dos seguintes kits comerciais marca Wiener®. A metodologia empregada em cada análise foi a seguinte:

a. Glicose – Método enzimático para a determinação de glicose no sangue e outros líquidos biológicos (Trinder 1969)

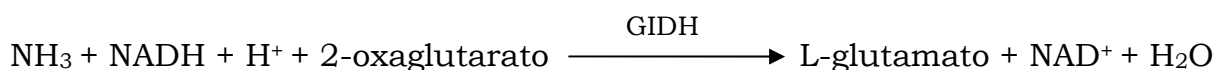
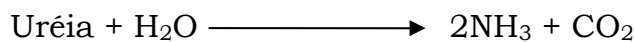


b. Proteínas – Método do Biureto, método colorimétrico para a determinação de proteínas totais ( Giese, Annino 1978).

As ligações de peptídeos das proteínas totais reagem com o íon cúprico, em meio alcalino, para se obter um complexo de cor lilás com máximo de absorbância a 540 nm, cuja intensidade é proporcional à concentração de proteínas totais na amostra.

c. Uréia – Método cinético UV linear para a determinação de uréia ( Talke, Schubert 1965).

urease



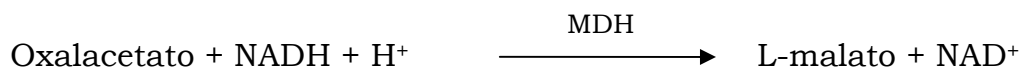
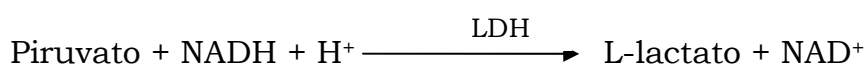
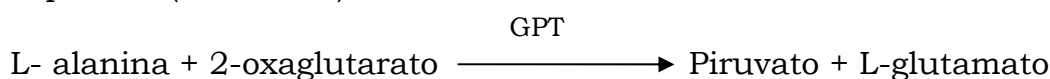
d. Cálcio – Método CFX Arsenazo, método colorimétrico direto para a determinação de cálcio (Martinek 1971).

O cálcio reage com arsenazão III produzindo um complexo de cor azul que se mede em fotolorímetro a 650 nm.

e. Lactato Desidrogenase – Método UV otimizado para a determinação de lactato desidrogenase (SFBC 1982).



f. Aminotransferase – Método UV otimizado para a determinação de alanina e aspartato (IFCC1980).



Os testes foram realizados em analisador automático para Química Clínica BT T.A.R.G.A. 3000 PLUS, produzido pela Biotécnica Instruments S.p.A Roma, Itália, com pool de hemolinfa de 3 moluscos, as amostras foram analisadas através de dosagens espectrofotométricas.

Os ácidos orgânicos citrato, propionato,  $\alpha$ -cetoglutarato, succinato, acetato, malato, fumarato, piruvato e lactato presentes na hemolinfa centrifugada foram extraídos a partir de colunas de Bond-Elut® (SAX-anion Exchange-quartenary amine, Analytichem Internacional, Habor City, USA) como descrito por Bezerra et al. (1997, 1999).

Foram obtidas 14 colunas, sendo 6 no grupo controle, 4 a 25 mg/L e 4 a 50 mg/L, estas foram ativadas em uma caixa de vácuo, consecutivamente com 1,0 ml de ácido clorídrico 0,5 mol/L; 1,0 ml de metanol e 2,0 ml de água ultra filtrada (tipo miliq). Neste ponto, com a coluna já ativada e ainda sob vácuo, adicionaram-se 200µL de hemolinfa seguidos de 2,0 ml de água ultra filtrada. As colunas foram retiradas do vácuo, e com a finalidade de eluir os ácidos orgânicos retidos na coluna, aplicaram-se em cada uma 250µL de ácido sulfúrico 0,5 mol/L, em seguida centrifugou-se as amostras, ainda dentro das colunas de extração, a 500 g por 5 min e a 2 °C.

A mistura resultante da centrifugação foi submetida a uma cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE–Varian ProSTAR) com uma coluna de exclusão molecular BIORAD-Aminex HPX – 87H ( 300 X 7,8 mm), protegida por uma coluna de proteção BIORAD-Aminex HPX – 85 acoplado a um detector UV em comprimento de onda de 210 nm. Cada amostra injetada correspondia a um volume de 80 µL. O eluente utilizado na fase móvel foi o ácido sulfúrico (8 mmol/L) à temperatura de 30 °C, com vazão de 0,8 mL/min

Todos os resultados encontrados no grupo controle e nos grupos submetidos à exposição do extrato de *S. polyphyllum* a 25 e 50 mg/L durante os experimentos foram agrupados em duas tabelas para facilitar a compreensão e análise dos dados obtidos. A tabela 1 refere-se às análises bioquímicas e a tabela 2 dispõe os resultados encontrados pela técnica da Cromatografia Líquida.

Os resultados foram analisados em média ou mediana de acordo com o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Na análise estatística,

utilizou-se o teste de  $\chi^2$  para a relação do molusco em condição padrão com aqueles frente ao extrato da planta em estudo, e o teste one way ANOVA e Tukey para comparação entre as diferentes condições que os moluscos foram submetidos. Considerou-se estatisticamente significativo o valor de  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

Foram observadas, durante os experimentos, algumas mudanças fisiológicas conforme os resultados obtidos na dosagem espectrofotométrica e cromatografia líquida, nos moluscos sob a exposição ao extrato de *S. polyphyllum* a 25 e 50 mg/L.

### Dosagens espectrofotométricas:

Tabela 2. Análise bioquímica da hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* expostos ao extrato do caule de *Stryphnodendron polyphyllum*, nas concentrações de 25 e 50mg/L. Valores em média±desvios padrão ou mediana (mínimo - máximo).

	<b>Controle</b>	<b><i>S. polyphyllum</i> 25mg/L</b>	<b><i>S. polyphyllum</i> 50mg/L</b>
<b>Glicose (mmol/L)</b>	2,86±0,77	4,05±0,90	8,22±1,88
<b>Uréia (mmol/L)</b>	2,40±1,06	1,98±0,56	3,48±1,54
<b>Proteína (g/dL)</b>	4,11±0,48	4,33±0,61	3,94±0,51
<b>Cálcio (mmol/L)</b>	4,12±0,54	6,10±0,80	13,25±1,25
<b>DHL (U/L)</b>	197,00 (137,00- 282,00)	28 (21,75 – 35,75)	30 (12,00 – 58,00)
<b>ALT (U/L)</b>	198,50 (163,00- 268,00)	225 (208,50 – 283,75)	1290,00 (687,00 – 1539,00)
<b>AST (U/L)</b>	330,00(277,00- 423,00)	338,00 (362,25- 459,75)	2072,00 (1545,75- 2978,25)

DHL-Lactato Desidrogenase, ALT – Alanina Aminotransferase, AST – Aspartato Aminotransferase.

### Glicose e Cálcio

A concentração de glicose encontrada na hemolinfa de *B. glabrata* para o grupo controle foi de 2,86±0,768 mmol/L . Nos moluscos expostos a 25 e 50 mg/L do extrato as concentrações foram de: 4,04±0,898mmol/L, e de 8,22±1,878 mmol/L, respectivamente.

A análise estatística permite verificar uma alteração significativa entre a concentração de glicose do grupo mantido sob condições padrão e os grupos expostos a 25 e 50 mg/L do extrato ( $p < 0,001$ ), (Fig.7, tabela 2).

A concentração de cálcio na hemolinfa dos moluscos do grupo controle foi de  $4,12 \pm 0,54$  mmol/L. Já as dosagens de cálcio na hemolinfa do grupo exposto a 25 mg/L foi de  $6,101 \pm 0,803$  mmol/L, mostrando uma diferença significativa com relação ao grupo controle e o grupo exposto a 50 mg/L que apresentou uma concentração de  $13,250 \pm 1,250$  mmol/L ( $p < 0,001$ ), (Fig.7, tabela 2); ocorrendo assim uma variação significativa entre todos os grupos estudados.

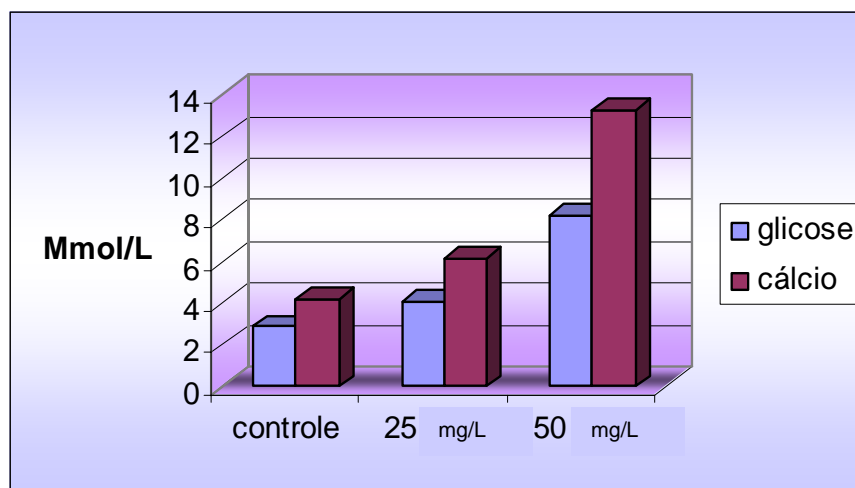


Figura 7 – Taxas de concentração de glicose e cálcio na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* exposto ao extrato do caule de *Stryphnodendron polyphyllum*, nas concentrações de 25 e 50 mg/L.

### **Uréia e proteínas**

O molusco sob condição padrão apresentou a seguinte concentração de uréia:  $2,397 \pm 1,056$  mmol/L. A taxa de uréia do grupo exposto a 25 mg/L foi de  $1,981 \pm 0,557$  mmol/L, enquanto que o grupo exposto a 50 mg/L apresentou a taxa de  $3,480 \pm 1,536$  mmol/L. A análise

estatística mostra que não há diferença entre o grupo controle e o exposto a 25 mg/L ( $p>0,05$ ) e somente a concentração de uréia na hemolinfa do grupo exposto a 50mg/L foi estatisticamente diferente da concentração de uréia na hemolinfa do grupo a 25mg/L ( $p=0,017$ ), (Fig.8, tabela 2).

Os achados dos experimentos não mostram diferenças ( $p>0,05$ ) entre os níveis de proteínas no grupo controle e nos grupos submetidos à exposição ao extrato do *S. polyphyllum*. A média do grupo controle foi de  $4,11 \pm 0,48$  g/dL, nos teste expostos a 25 e 50mg/L as médias foram de  $4,33 \pm 0,61$  g/dL e  $3,94 \pm 0,51$  g/dL, respectivamente ( fig.8, tabela 2), não ocorrendo assim diferença significativa entre os grupos de estudos.

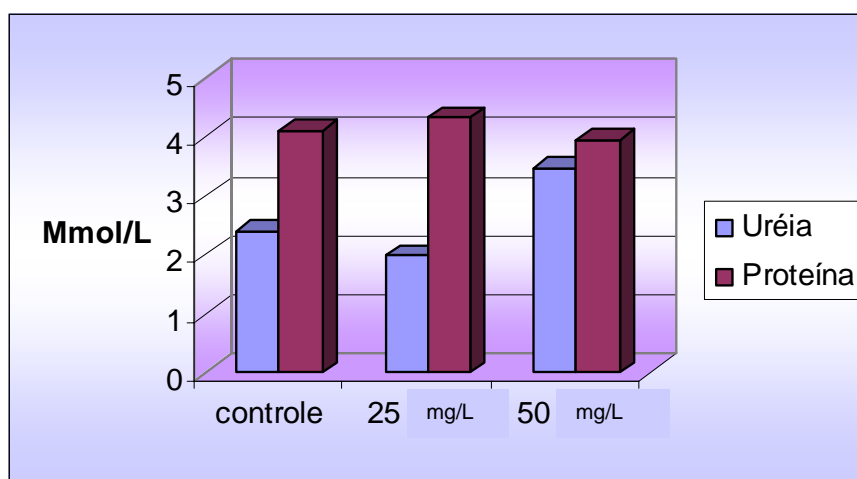


Figura 8 – Taxas de concentração de uréia e proteínas na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* exposto ao extrato do caule de *Stryphnodendron polyphyllum*, nas concentrações de 25 e 50 mg/L.

### **Atividade Enzimática em *B.glabrata***

O resultado da atividade da enzima Lactato Desidrogenase no grupo controle apresentou a mediana de 197,5 U/L, com o valor mínimo de 137

---

U/L e valor máximo de 282 U/L. Os moluscos expostos a 25 mg/L apresentaram mediana de 28 U/L, com valores variando entre 21,75 e 35,75 U/L. Enquanto os moluscos expostos a 50 mg/L apresentaram mediana de 30 U/L, com valores variando entre 12 e 58 U/L. Verifica-se através da análise estatística, uma distribuição não normal, com diferença significativa entre o controle e os testes a 25 e 50 mg/L, embora não haja diferença entre os testes nas concentrações de 25 e 50 mg/L ( $p < 0,001$ ), (Fig.9, tabela 2).

As transaminases são enzimas que catalisam a transferência de grupamento amina de alfa-aminoácidos para alfa-acetoácidos. Os resultados, em mediana, da atividade enzimática da ALT no grupo controle foi de 198,5 U/L (163 a 268 U/L), não apresentando diferença significativa com o grupo exposto a 25 mg/L que apresentou mediana 225 U/L (208,5 a 283,75 U/L). No grupo submetido a 50mg/L verificou-se a mediana com o valor de 1290 U/L (687 a 1539 U/L), mostrando assim uma variação estatística significativa ( $p < 0,001$ ).

Os resultados, em mediana, da atividade enzimática da AST do grupo controle foi de 330 U/L (277 a 423 U/L), para o grupo exposto a 25 mg/L o resultado foi de 388 U/L (362,25 a 459,75 U/L) e para o grupo exposto a 50 mg/L a atividade enzimática foi de 2072 U/L (1545,75 a 2978,25 U/L) (Fig.9, tabela 2).

Com isso, verifica-se que apenas o grupo exposto ao extrato na concentração de 50 mg/L apresentou uma diferença estatística importante com relação aos demais grupos ( $p < 0,001$ ).



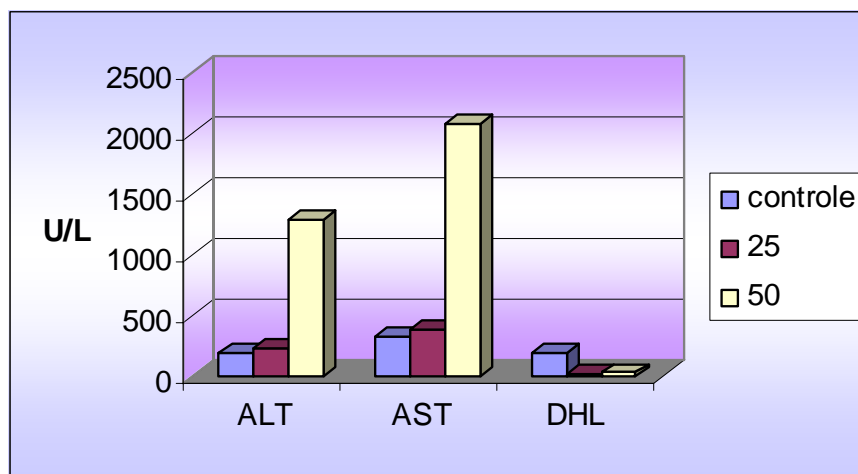


Figura 9 – Taxas da atividade enzimática na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* exposto ao extrato do caule de *Stryphnodendron polyphyllum*, nas concentrações de 25 e 50 mg/L.

### Dosagens pela Cromatografia Líquida

Os valores obtidos dos ácidos orgânicos: citrato, propionato,  $\alpha$ -cetoglutarato, succinato, acetato, malato, fumarato, piruvato e lactato a partir da hemolinfa de *B. glabrata* em condição padrão referem-se ao grupo controle. A exposição dos moluscos às concentrações de 25 e 50 mg/L do extrato de *S. polyphyllum*. A comparação entre estes valores permitiu sugerir algumas modificações sobre o metabolismo dos moluscos.

A exposição do molusco ao extrato da planta originou resultados de distribuição não normal na maioria dos testes analisados na hemolinfa de *B. glabrata*. Apenas o citrato e o propionato apresentaram diferenças estatísticas significantes ( $p < 0,001$ ). Para o grupo controle o citrato apresentou a concentração mediana de 0,46 mmol/L, com valores

variando de 0,25 a 0,62 mmol/L, porém este não foi detectado na hemolinfa dos moluscos expostos a 25 e 50 mg/L do extrato em estudo. O propionato foi detectado nos três grupos e, para os dados obtidos, estes resultados foram estatisticamente diferentes com relação ao grupo controle e os testes expostos a 25 e 50 mg/L ( $p \leq 0,007$ ). No grupo controle, a concentração de propionato foi de 8,12 mmol/L (7,10 a 11,53); a 25 mg/L o valor encontrado foi de 9,58 mmol/L (4,28 a 189,28) e a 50 mg/L sua concentração se elevou para 488,24 mmol/L (94,34 a 906,61). O propionato apresentou uma diferença significativa quando o grupo controle foi comparado com o teste exposto a 50 mg/L ( $p \leq 0,026$ ), (tabela 3).

Os outros ácidos orgânicos como  $\alpha$ -cetogluturato, succinato, acetato, malato fumarato, piruvato e lactato também foram detectados, porém não apresentaram diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ), conforme tabela 3.

Tabela 3. Média e Mediana da concentração (mmol/L) de ácidos orgânicos presentes na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata*, grupo controle o grupo teste exposto a 25 e 50 mg/L do extrato de *Stryphnodendron polyphyllum*.

<b>Ácidos Orgânicos</b>	<b>Controle</b>	<b>25mg/L</b>	<b>50mg/L</b>
<b>Citrato*</b>	0,46 (0,25-0,62)	n.d.	n.d.
<b>Propionato*</b>	8,12 (7,10-11,53)	9,58 (4,28-189,28)	488,24 (94,34-906,61)
<b>cetogluturato</b>	n.d.	3,90 (0,0-9,04)	9,67 (4,10-13,08)
<b>Succinato</b>	3,13 (1,82-4,99)	4,05 (2,66-7,80)	45,84 (18,64-78,78)
<b>Acetato</b>	3,70 (0,74-5,39)	58,72 (4,03-119,12)	118,43 (40,17-166,87)
<b>Malato</b>	3,69 (2,09-7,25)	2,51 (0,73-6,55)	40,16 (19,74- 46,50)
<b>Fumarato</b>	0,12 (0,03-0,16)	0,12 (0,03-0,45)	0,13 (0,07-0,16)
<b>Piruvato</b>	0,19 (0,07-0,24)	0,13 (0,0-0,37)	n.d.
<b>Lactato</b>	0,55 ±0,28	0,22 ±0,19	0,61 ±0,21

• \*valores com diferença estatisticamente significativa.

n.d. não detectado

## DISCUSSÃO

O uso de plantas com propriedades moluscidas vem sendo considerado desde que se descobriu na Etiópia, que os frutos da *Phytolacca dodecandra*, possuíam a propriedade de interferir no metabolismo dos moluscos transmissores da esquistossomose. Esta doença, endêmica em várias regiões do Brasil, tem uma ampla distribuição geográfica dos moluscos hospedeiros intermediários do *S. mansoni* (Schaufelberger, Hostettmann 1983; Souza et al. 1992).

Em estudos preliminares realizados por nossa equipe, os extratos da casca e folha de *S. polyphyllum* foram utilizados em testes de mortalidade de

moluscos *B. glabrata*, expostos por 24 horas às soluções testes com resultados de 70% de eficácia moluscicida a 50 mg/L a partir do 3º dia de observação (Bezerra et al. 2002).

Uma maneira de se atingir o objetivo de compreensão metabólica pode ser através de bioensaios com produtos naturais, muitas vezes de uso medicinal, encontrados na flora do Cerrado. Muitas dessas plantas são consideradas taníferas, por apresentarem altos teores de taninos em suas estruturas (Alcanfor et al. 2001).

Os taninos possuem a capacidade de complexar com proteínas, polissacarídeos, alcalóides, íons metálicos como ferro, vanádio, cobre, alumínio, cálcio e outros, além de atividade antioxidante e seqüestradora de radicais livres. Testes *in vitro* demonstraram que fenóis e polifenóis inibem a peroxidação de lipídios e lipogenases, assim como possuem a habilidade de seqüestrarem radicais livres como: hidroxil, superperóxido e peroxil (Bezerra et al. 1997, 1999, Gomes et al 1998, Foster et al. 1989, Herzog- Soares et al. 1999, Lima et al. 1998).

A glicose é o monossacarídeo mais comum na hemolinfa de gastrópodes (Livingstone, de Zwaan 1983). Na classe Pulmonata de moluscos diferentes estratégias podem ser desenvolvidas para o uso da energia armazenada durante condições nutricionais adversas (Streit 1978).

No presente estudo, a concentração de glicose elevou-se de forma significativa quando os moluscos foram expostos ao extrato de *S. polyphyllum*, semelhante ao descrito por Wijsman et al. (1988), que relatam hiperglicemia devido à anoxia química (sulfato de cobre) e anestesia (Nembutal + MS 222) em *Lymnaea stagnalis*. Os autores concluíram que o

sulfato de cobre e anestesia induziam ao estresse (sem hiperlactatemia), mas que a anóxia induzia a hiperglicemia para contrabalançar o uso inefetivo anaeróbio de energia (hiperlactatemia drástica). Hiperglicemia, como uma “reação de emergência” para o estresse, geralmente achada no reino animal e no mecanismo intracelular (aumento de cAMP, análise do glicogênio) parece ser onipresente (Marks 1979). A ausência de um efeito significativo de hipoglicemia em situação fisiológica de jejum, apresentado aqui, coincide com os resultados de Liebsch e Becker (1990).

Com relação à avaliação do metabolismo do cálcio os resultados mostraram um aumento nas concentrações deste, na hemolinfa dos moluscos quando expostos por 24 horas ao extrato da casca de *S. polyphyllum*. Alterações de cálcio em moluscos podem ser provocadas por descalcificação da concha. O cálcio tem uma função muito importante na biologia dos moluscos. Em *B. glabrata* o cálcio pode estar relacionado com a produção e desenvolvimento de ovos e embriões (Shaw, Erasmus 1987). Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Alcanfor (2001), porém não estão de acordo com os resultados encontrados por Silva (2002) que fez esta mesma análise sob condição de jejum e não se observou uma alteração expressiva.

A biomineralização da concha de moluscos é um problema ainda não resolvido pela ciência. A concha dos moluscos é constituída por carbonato de cálcio e uma larga variedade de estruturas de cristais. É aceito pela maioria, que a parte orgânica da concha é envolvida por uma determinada quantidade de cristais modificados (Belcker et al. 1996). A matrix orgânica consiste de proteínas e carboidratos (Marxen, Becker 1997) e o fornecimento

de ácidos ligados por todos os lados é determinante para a acumulação de cálcio (Weiner, Addadi 1991).

Com referência ao metabolismo das proteínas, através da análise estatística, foi verificado que as concentrações na hemolinfa dos moluscos sob exposição ao extrato de *S. polyphyllum* e o grupo mantido sob condições padrão não revelaram diferenças. Então as condições ecofisiológicas adversas provocadas pelo extrato levam à morte dos moluscos, apesar de existirem boas reservas de proteínas e lipídeos (Gress, Cheng 1973, Michelson, DuBois 1975, Becker, Lüth 1977). Estes achados não estão de acordo com os dados de Alcanfor (2001), que também expôs os moluscos ao extrato de *S. polyphyllum* e Silva (2002) que encontrou uma redução nos níveis de proteínas totais, quando submeteu os moluscos ao jejum e a estivação.

Estudos mostram que a função fisiológica do ciclo da uréia consiste na desintoxicação da amônia, ocorrendo um aumento na excreção e um acúmulo de uréia quando *B. glabrata* está sob situações ecofisiológicas adversas (Cheng, Lee 1971, Schmale, Becker 1977). Becker (1975) encontrou valores de aproximadamente 0,26 mmol/L, neste trabalho o grupo controle teve a concentração média de 2,4 mmol/L e quando o molusco foi exposto a 50 mg/L do extrato ocorreu uma maior excreção da uréia elevando sua concentração para 3,48 mmol/L. Em *B. glabrata* a ativação enzimática do ciclo da uréia pode surgir pelo aumento de nova síntese ou por restrição da degradação das enzimas envolvidas, sendo que este mecanismo provavelmente está sujeito à influência de substratos ou outros ativadores e inibidores (Becker, Schmale 1975).

Observa-se que *B. glabrata* apresenta uma série de possibilidades metabólicas que lhe permitem sobreviver temporariamente em condições adversas. Obviamente, diferentes condições fisiológicas podem levar a alteração na atividade de diferentes enzimas. O estudo da atividade de algumas enzimas chave como um mecanismo de regulação fisiológica do molusco pode representar alvo de estudo. Então se dosou a concentração das enzimas transaminases-alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) - e a desidrogenase láctica (LDH).

Testes farmacológicos e biológicos realizados com extratos ricos em taninos têm identificado diversas atividades fisiológicas desta classe de substância, como ação bactericida e fungicida, antiviral, moluscicida, inibição de enzimas como glucosiltransferases de *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus* (Carmona 1994, Haslan 1998).

As aminotransferases representam uma ligação importante entre as vias metabólicas de carboidratos e aminoácidos. Considerando as alterações na concentração de carboidratos (Wright 1966) e aminoácidos (Gilbertson et al. 1967, Feng et al. 1970) em moluscos infectados, onde é comum encontrar uma redução nos níveis de glicose e proteínas. Neste trabalho a atividade das aminotransferases aumentaram de forma significativa após a exposição ao extrato de *S. polyphyllum* na concentração de 50mg/L. Manohar et al (1972) encontraram as mesmas mudanças nas aminotransferases em *Lymnaea luteola* infectada com *Prosthogonimus sp.*

Douglas e Haskim (1972) encontraram um aumento de aspartato aminotransferase na hemolinfa de ostras (*Crassostrea virginica*) expostas a

---

*Minchinia nelsoni* (pequenos endoparasitas de invertebrados marinhos, filo dos protozoários no ramo alvelado).

Christie et al (1974a) analisaram estas aminotransferases em *B. glabrata*, infectado com *S. mansoni*, e verificaram que existe uma significativa diminuição na concentração de AST e ALT, que pode ser causada pelo declínio na concentração de proteínas. Pode haver também uma diminuição na atividade específica de ALT no tecido do molusco com progresso da infecção. As atividades específicas de transaminases no tecido do molusco são mais baixas que o normal durante a infecção.

Esta oxidação de aminoácidos pode ocasionar acidose metabólica (Patience 1983), conforme visto na dosagem de pH no artigo anterior.

Goldberg e Cather (1963 a, b) descreveram múltiplas formas de lactato desidrogenase em um molusco e malato desidrogenase em duas espécies de moluscos, o que leva a crer que múltiplas formas de desidrogenases são provavelmente comuns em moluscos. Neste trabalho a enzima, DHL, sofreu uma redução significativa quando o *B. glabrata* foi exposto ao extrato de *S. polyphyllum*. Mas Coles (1969) relatou que estas enzimas podem ser restritas a uma população local de moluscos e em outras populações da mesma espécie os resultados podem ser diferentes.

As análises realizadas pela técnica de cromatografia líquida tinham como propósito o estudo da bioatividade da planta *S. polyphyllum* sobre a hemolinfa de *B. glabrata*. Ácidos orgânicos são importantes componentes do metabolismo intermediário e participam em ambas as vias: catabólica (ex. glicólise) e anabólica (ex. gliconeogênese). O Piruvato é indicador de processos glicolíticos sob condições aeróbias, o lactato é indicador de



processos sob condições anaeróbias, enquanto fumarato, succinato e malato são indicadores do ciclo de Krebs ou produtos de metabolismo anaeróbio em invertebrados (Bezerra, Becker 1993). A presença de corpos cetônicos, tal como  $\beta$ -hidroxibutirato e acetoacetato, assim como ácidos graxos, tal como acetato e propionato, são indicativos para metabolismo de lipídios (Meyer et al 1986, Bezerra, Becker 1993) (fig.10).

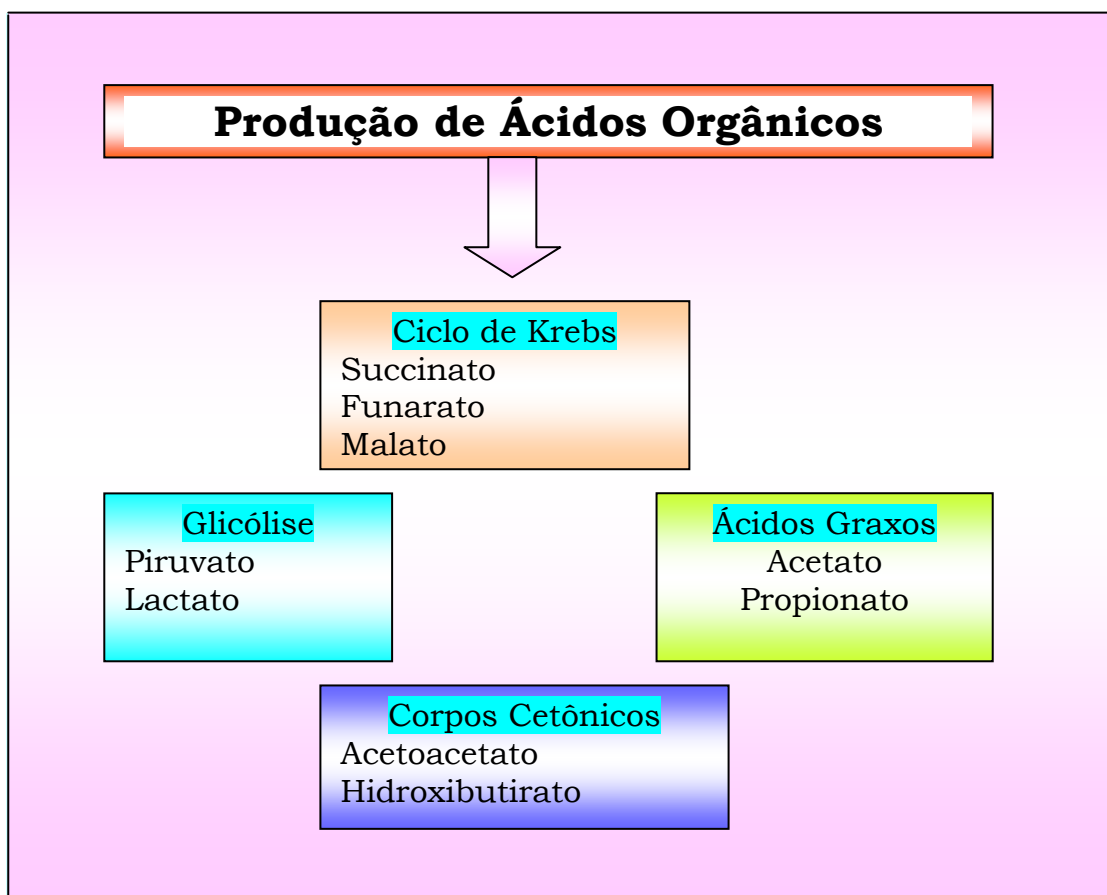


Figura 10 – Esquema resumido da produção de ácidos orgânicos (Bezerra et al 1997. Mem.Inst.Oswaldo).

Os resultados obtidos por Bezerra (1994) em *B. glabrata* com estudos da concentração dos ácidos orgânicos succinato, malato e fumarato, sob condições hipóxicas, evidenciou uma indicação para inversão parcial no ciclo

de Krebs como adaptação à nova circunstância metabólica, promovendo desta forma a sobrevivência do mesmo. Esta adaptação estará originando produtos finais do metabolismo anaeróbio em moluscos (Patiennce et al 1983). No presente trabalho não se evidenciou esta inversão do ciclo de Krebs. Bezerra et al (1999) analisaram a hemolinfa de *B.glabrata* após 7 e 14 dias de estivação e verificaram que a concentração de acetato e piruvato aumentou significativamente. Neste trabalho a situação de estresse foi induzida pela presença do extrato de *S. polyphyllum* e as concentrações dos ácidos orgânicos foram influenciadas de forma significativa para o citrato e o propionato.

O trabalho desenvolvido enfatiza vários problemas críticos associados com a investigação dos ácidos orgânicos de moluscos, porque existe uma grande variação inerente na concentração destes ácidos na hemolinfa destes moluscos, um grande número de amostras é necessário para se obter diferenças estatísticas.

Seres vivos dependem de uma série de condições mínimas para que suas funções sejam equilibradas e distribuídas propriamente pelo corpo, afim de que os metabolismos possam ser exercidos de acordo com as necessidades de vida do organismo. No meio aquático, a dependência de vários fatores físicos, químicos e biológicos encontrados na água é de importância vital aos que nela habitam. Esses fatores são naturalmente mudados ou substituídos de forma constante, agindo de maneira altamente influente nos organismos, necessitando de alguns ajustes para que tais mudanças sejam assimiladas e corretamente direcionadas ao destino de suas funções.

Obviamente, alterações fisiológicas podem levar a patologias. O desenvolvimento de medicamentos ou de uma quimioterapia só será possível se conhecermos características fisiológicas deste organismo e sua relação, por isso, faz-se necessário que conheçamos a concentração de substâncias intermediárias ou finais do metabolismo.

O estudo do metabolismo bioquímico do molusco, pode deduzir algumas vias metabólicas alteradas, que irão proporcionar sua manutenção por longos períodos e com isto interpretar e sugerir alternativas integradas contra o molusco, evitando as estratégias metabólicas que permitam sua sobrevivência (Bezerra e Becker 1993).

## CONCLUSÕES FINAIS

1. A interação dos estudos em *B. glabrata* sob condições ecofisiológicas adversas provocadas pela ação do extrato de *S. polyphyllum*, produto natural extraído do caule da planta do Cerrado, permite verificar uma influência na obtenção dos resultados analisados na hemolinfa do molusco.

2. O extrato de *S. polyphyllum*, na concentração de 50 mg/L, causou uma hiperglicemia na hemolinfa do molusco. As concentrações de proteínas totais em *B. glabrata* após a exposição ao extrato da casca do caule de *S. polyphyllum* não sofreram alterações. Ocorreu um aumento na excreção da uréia. O extrato testado interferiu no metabolismo de cálcio, aumentando sua concentração.

3. A atividade enzimática também sofreu influência do extrato estudado, as concentrações das enzimas alanina e aspartato aminotransferases elevaram-se de forma significativa e a concentração de lactato desidrogenase sofreu uma redução importante na concentração de 50 mg/L apenas.

4. A avaliação das concentrações dos ácidos orgânicos sob a ação do extrato de *S. polyphyllum* permitiu verificar a presença dos ácidos citrato, propionato, cetogluturato, succinato, acetato, malato, fumarato, piruvato e lactato com uma alteração significativa sobre o citrato e o propionato, indicando assim que os testes expostos à dose sub letal de

50 mg/L influenciaram no metabolismo do ciclo de Krebs e ácidos graxos.

5. No estudo do equilíbrio ácido-base verificou-se na hemolinfa uma diminuição significativa no pH, na pressão de gás oxigênio, íons carbonatos e na saturação de gás oxigênio. Por outro lado, houve um aumento na pressão de gás carbônico, quando estes foram submetidos ao extrato na concentração de 50 mg/L.

6. A grande maioria dos processos bioquímicos é extremamente sensível à variação do pH. A manutenção do pH é conseguida pelos seres vivos graças à existência dos sistemas-tampão. O teor de íons hidrogênio é regulado por uma série de tampões, e dentre as substâncias que atuam como tampões, destacam-se as hemoglobinas, as proteínas, os fosfatos e o sistema de bicarbonato, sendo este o mais importante, pois se encontra presente em grandes quantidades, porém o extrato de *S. polyphyllum* parece que impediu que este sistema funcionasse de forma efetiva.

7. Os resultados encontrados mostram perspectivas promissoras para o controle da esquistossomose, visam não só ao combate do hospedeiro intermediário, mas também a preservação deste rico bioma, como potencial fonte de alternativas de produtos naturais para usos diversos, que está sofrendo acelerado processo de destruição.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta investigação confirma a bioatividade do extrato aquoso de *S. polyphyllum* sobre o *B.glabrata*, hospedeiro intermediário do *S. mansoni*. Uma das principais contribuições da presente metodologia empregada é a observação pós-contato direto com o extrato, que demonstrou uma bioatividade sobre o metabolismo do molusco.

A análise de extrato aquoso obtido do caule do barbatimão pode subsidiar novas alternativas de menor custo financeiro no controle da esquistossomose no Brasil, onde o Cerrado é vasto e a carência de recursos é freqüente no setor da saúde.

O estudo do metabolismo bioquímico do molusco nos permite deduzir algumas vias metabólicas alteradas, que irão proporcionar sua manutenção por longos períodos, além de interpretar e sugerir alternativas integradas contra o molusco, evitando as estratégias metabólicas que permitam a sua sobrevivência (Bezerra, Becker 1993).

Os mecanismos de ação dos taninos ainda não foram bem esclarecidos. Entretanto, se for constatado que os taninos são menos tóxicos para organismos não alvos do que outros compostos com ação moluscicida, eles constituirão uma classe poderosa de produtos naturais (Marston, Hostetmann 1985).

Um programa integrado envolvendo melhoria nas condições sanitárias, juntamente com a quimioterapia de pacientes e a aplicação de moluscicidas adequados, educação e saúde em zonas endêmicas da esquistossomose, poderá reduzir a ocorrência da doença em grandes áreas endêmicas. Nesse

sentido as plantas moluscicidas são de grande importância no controle dos focos da infecção, complementando outras medidas de prevenção da esquistossomose.

O Brasil é um país de contrastes, onde as desigualdades sócio-econômicas perduram em pleno ano 2006. A ausência de programas sólidos em saúde pública e na educação é uma das grandes causas das diferenças nas camadas sociais. Poucos são aqueles que possuem acesso às melhorias de vida, obtidas ao longo da evolução lenta de nossos governantes. Enfrentamos em nosso cotidiano, ao longo do ano, o surgimento de doenças outrora já controladas pela simples falta de educação e saneamento básico, ou continuidade de investimentos.

Além das notórias deficiências dos serviços de saúde, principalmente nas áreas periféricas da maioria dos países em desenvolvimento, constata-se grande falta de pessoal qualificado, em todos os níveis, reduzida circulação das informações científicas, nesses meios. Essa situação se agrava na medida em que nos afastamos dos centros culturais e onde velhos preconceitos prevalecem, ou subsiste uma cultura folclórica com noções e práticas atrasadas de séculos ou milênios.

Afinal, tudo se passa como se não existissem, já, os conhecimentos para solucionar os problemas e para implantar as medidas de controle da esquistossomose se fazem necessárias.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCANFOR JDX, FERRI PH, SANTOS SC, BEZERRA JCB 2001. Plantas moluscicidas no controle de caramujos transmissores da esquistossomose, com ênfase na ação de taninos. Rev Pat Trop V 30 (2): 167-175.
- ALCANFOR JDX 2001. Ação de extratos de plantas do cerrado sobre *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni* Sambon,1907. Dissertação (Mestrado em parasitologia)-Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, UFG.
- ALVES TMA, Silva AF, BRANDÃO M, GRANDI TSM, SMÂNIA EFA, JUNIOR AS, ZANI CL 2000. Biological screening of brazilian medicinal plants. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 95(3): 367-373.
- AMARAL RS & PORTO MAS 1994. Evolução e Situação Atual do Controle da Esquistossomose no Brasil. Rev Soc Bras Med Trop, 27 (Supl III): 73 – 90.
- ARNDT MHL, SANTORO MM 2001. Globinas em *Biomphalaria*. Minas Gerais, 2001. Disponível em: <<http://www.icb.ufmg.br/prodap/projetos/globinas/descobertas1.htm>>Acesso em: 06/abr.2001.
- AUDI EA, TOLEDO DP, PERES PG, KIMURA E, PEREIRA WKV, DE MELLO JCP, NAKAMURA C, ALVES-DO-PRADO W, CUMAN RKN, BERSANI-AMADO C 1999. Gastric antiulcerogenic effects of *Stryphnodendron adstringens* in rats. Phytother Res 13: 264-266.
- BACILA M 1970. Anaplerotic mechanisms and metabolic regulation in *Biomphalaria glabrata*. An Acad Bras Cienc 42: 161-169.



- BAPTISTA DF, VASCONCELOS MC, LOPES EF, SILVA IP & SCHALL VT 1992. Evaluation of the moluscicidal property of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (N.E.B) (EUPHORBIACEAE) investigation in lotic habitat. Mem Inst Oswaldo Cruz, 87 (4): 549-533.
- BECKER W 1968. Untersuchungen über die aus der Muttersporocyste auswandernden Tochtorsporocysten von *Schistosoma mansoni* – I. Beiträge zum Kohlen-hydratstoffwechsel dieser Stadien. Z Parasit 30: 233-251.
- BECKER W, LÜTH W 1977. Der Einfluß von Hunger und infection mit *Schistosoma mansoni* auf den Ketonkörpergehalt der Hämolymphe von *Biomphalaria glabrata*. Z Parasit 53: 109-113.
- BECKER W, SCHMALE H 1975. The nitrogenous products of degradation ammonia, urea and uric acid: In the hemolymph of the snail *Biomphalaria glabrata*. Comp Biochem Physiol 51A: 407-411.
- BECKER W 1980. Metabolic interrelationships of parasitic trematodes and molluscs, especially *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. Z Parasit 63: 101-111.
- BELCKER AM, WU XH, CHRISTENSEN RJ, HANSMA PK, STUCKY GD, MORSE DE 1996. Control of crystal phase switching and orientation by soluble mollusc-shell proteins. Nature 381: 56-58.
- BEZERRA JCB, BECKER W 1993. Konzentration organischer Säuren in der Hämolymphe von *Biomphalaria glabrata* unter verschiedenen physiologischen Zuständen. Verh Dtsch Zool Ges 86:81.
- BEZERRA JCB 1994. Die organischen Säuren in *Biomphalaria glabrata*, Zwischenwirt des Trematoden *Schistosoma mansoni*. PhD Thesis,

Zoologisches Institut und Museum da Universidade Hamburgo, Alemanha.

BEZERRA JCB, HANNOUCHE RZ, VIEIRA EL, PIMENTEL LA, LEITE MSB 1996. Ocorrência de paraplegia associada à infecção com *Schistosoma mansoni* não autóctone no estado de Goiás. Rev Pat Trop v 25 (1): 73-79.

BEZERRA JCB, BECKER W, ZELCK UE 1997. A comparative study of the organic acid content of the hemolymph of *Schistosoma mansoni*-resistant and susceptible strains of *Biomphalaria glabrata*. Mem Inst Oswaldo Cruz 92 (3): 421-425.

BEZERRA JCB, KEMPER A, BECKER W 1999. Profile of organic acid concentrations in the digestive gland and hemolymph of *Biomphalaria glabrata* under estivation. Mem Inst Oswaldo Cruz 94 (6): 779-84.

BEZERRA JCB, SILVA IA, FERREIRA HD, FERRI PH, SANTOS SC 2002. Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian Cerrado Medicinal Plants. Fitoterapia 73 (5): 428-30.

BIELEFELD U, ZIEROLD KA, BECKER W 1992. Calcium localization in the Shell-forming tissue of the freshwater snail, *Biomphalaria glabrata* a comparative study of various methods for localizing calcium. Histochemical Journal 24: 927-938.

BRANCO SM 1986. Hidrobiologia aplicada à engenharia sanitária, 3 ed., São Paulo, ASCETESB 40.

BRAVO L 1998. Polyphenols: Chemistry, dietary source, metabolism, and nutritional significance. Nutrition Review 56 (11): 317-333.

BRYANT C 1993. Organic acid excretion by helminthes. Parasitol Today 9: 58-60.

- CARMONA A 1994. Tannins; Thermostable pigments which complex dietary proteins and inhibit digestive enzymes. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion* 44 (4-S): 31-S-35-S.
- CARVALHO RR, MALDONADO Jr A, OLIVEIRA-Filho EC, RIBEIRO AC, PAUMGARTTEN FJR, REY L 1998. Effects of *Euphorbia milii* látex on *Schistosoma mansoni* eggs, miracidia and cercariae. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93 (Suppl I): 235-237.
- CHENG TC, LEE FO 1971. Glucose levels in the mollusc *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*. *J Invertebr Pathol* 18: 395-399.
- CHITSULO L, ENGELS D, MONTRESOR A, SAVIOLI L 2000. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Tropica* 77: 41-51.
- CHRISTIE JD, FOSTER WB, STAUBER LA 1974a. The effect of parasitism and starvation on carbohydrate reserves of *Biomphalaria glabrata*. *J Invert Path* 23: 55-62.
- CHRISTIE JD, FOSTER WB, STAUBER LA 1974b. Uptake by *Schistosoma mansoni* from *Biomphalaria glabrata*, exposed to C-glucose. *J Invert Path* 23 (3): 297-302.
- COELHO APP, ROSA MSV, PEREIRA PAC, ARAÚJO RML, ABREU NLL, PENA MS 1999. Obtenção de DL<sub>50</sub>. do látex de *Euphorbia splendenes* Joly, 1979 usado como moluscicida para *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 em testes laboratoriais. XIII Jornada de Biologia.
- COLES GC 1969. Isoenzymes of snail livers- I. Hydrolysing enzymes and peroxidase. *Comp Biochem Physiol* 29: 403-411.

- COLLEY DG 2000. Parasitic diseases: opportunities and challenges in the 2<sup>a</sup> Century. Mem Inst Oswaldo Cruz 95 (Supl. I): 79-87.
- COUTINHO EM 2002. Opening address. Mem Inst Oswaldo Cruz 97 (Supl. I): 3-4.
- DOUGLAS WR, HASKIN HH 1972. Hemolymph enzymes in *Crassostrea virginica* and their possible role in disease resistance. In Disease Resistant Oyster Program. Report to the National Marine Fisheries Service on Project NJ-3-3R under PL 88-309; 101-121. New Brunswic.
- EL KHOBY T, GABAL N, FENWICK A 1998. The USAID government og Egypt's schistosomiasis research project (SRP). Parasitol Today IV 14: 92-96.
- FENG SY, KAIRALLAH EA, CANZONIER WJ 1970. Hemolymph-free amino acids and related nitrogenous compounds of *Crassostrea virginica* infected with *Bucephalus sp.* and *Minchinia nelsoni*. Comp Biochem Physiol 34: 547-556.
- FERRI MG 1980. Vegetação brasileira. São Paulo: EDUSP, 157p.
- FILHO CV, YUNES R 1998. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. Química Nova 21(1): 99-105.
- FOSTER LA, CHEN GZ, VANDEWAA EA, PAX RA, BENNETT JL 1989. Glutamine vs glucose-supported motor activity in *Schistosoma mansoni*: physiological relevance of aerobic metabolism. Exp Parasitol 69 (1): 44-53.

- GIESE RW, ANNINO JS 1978. Química Clínica. Princípios e métodos , 191-195.
- GILBERTSON DE, ETGES FJ, OGLE JD 1967. Free amino acids of *Australobis glabratus* hemolymph: comparison of four geographic strains and effect of infection by *Schistosoma mansoni*. J Parasitol 53: 565-568.
- GOLDBERG E, CATHER JN 1963 a. The occurrence and distribution of malate dehydrogenase enzymes in molluscan development. Am Zool 3: 486-489.
- GOLDBERG E, CATHER JN 1963 b. Molecular heterogeneity of lactic dehydrogenase during development of the snail *Argobuccinum oregonense* Redfield. F. Cell Comp Physiol 61: 31-37.
- GOMES AG, SILVA LA, BEZERRA JCB 1998. Tratamento da esquistossomose mansônica com disofenol (2,6-Diiodo-4-dinitrofenol), em camundongos infectados experimentalmente. Rev Soc Bras Med Trop 31(I): 187-188.
- GRESS FM, CHENG T C 1973. Alterations in Total Serum Proteins and Protein Fractions in *Biomphalaria glabrata* parasitized by *Schistosoma mansoni*. J Invert Pathology 22: 382-390.
- HASLAM E 1996. Natural Polyphenols (vegetable Tannins) as Drugs and Medicines: Possible Modes of Action. J Nat Prod 59: 205.
- HASLAM E 1998. Practical polyphenolics: From structure molecular recognition and physiological action. Medicines; Cambridge University Press. : 422.
- HERZOG-SOARES JDA, ALVES RA, BEZERRA JCB 1999. Análise da proliferação da *Entamoeba moshkovskii* exposta à diferentes

- concentrações do extrato da casca de *Stryphnodendron adstringens*. XVI Anais do Congresso Brasileiro de Parasitologia. 2 a 5 de novembro, Poços de Caldas, MG.
- IFCC 1980. Federação Internacional de Química Clínica. Clin Chim Acta 105: 147.
- JURBERG P, VASCONCELOS MC, MENDES NM 1989. Plantas empregadas como moluscicidas: uma visão crítica. Mem Inst Oswaldo Cruz 84 (Supl. I): 76-83.
- JURBERG P, CUNHA RA, RODRIGUES ML 1997. Behavior of *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Gastropoda: Planorbidae) – I morphophysiology of the mantle cavity. Mem Inst Oswaldo Cruz, 92 (2): 287-292.
- KATZ N, PEIXOTO SV 2000. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni. Rev Soc Bras Med Trop 33: 303-308.
- KITA K 1992. Eletron-transfer complexes of mitocôndria in *Ascaris suum*. Parasitol Today 8:155-159.
- KUO YH 1987. Plant molluscicide studies in the people in Republic of China. In: Mott ke, ed. Plant Molluscicide. New York. UNDP/World Bank/WHO 220-98.
- LEHNINGER AL, NELSON DL, COX MM 1995. Princípios de Bioquímica, 2<sup>a</sup> ed., Editora Sarvier:375, 444-445.
- LIEBSCH M, BECKER W 1990. Comparative glucose tolerance studies in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*: influence of starvation and infeccion with the trematode *Schistosoma mansoni* . Comp Physiol B 166: 41-50.

- LIMA SF, SOUZA CTM, VIEIRA LQ, COELHO PMZ 1998. Protein deficiency impairs schistosomicidal action of Praziquantel. Mem Inst Oswaldo Cruz 93 (Supl. 1): 271- 272.
- LITTLE C 1968. Aestivation and ionic regulation in two species of Pomacea (Gastropoda; Prosobranchia). J Exp Biol 48: 569-585.
- LIVINGSTONE DR, ZWAAN A de 1983. Carbohydrate metabolism of gastropods. In: Wilbur KM (ed) The Mollusca. Vol 1, Academic Press, New York: 177-242.
- LOPES JL, LOPES JNC, GILBERT B, BONINI SEO 1976. Phytochemistry 16: 1101.
- MANOHAR L, RAO PV, SWAMI KS 1972. Variations in amino-transferase activity and total free amino acid level in the body fluid of the snail *Lymnaea luteola* during different larval trematode infections. J Invert Path 19: 36-41.
- MARKS F 1979. Molekulare Biologie der Hormone. Fischer, Stuttgart New York.
- MARSTON A, HOSTETTMANN K 1985. Plant molluscicides. Phytochemistry, 24 (4): 639-652.
- MARTINEK R G 1971. J Am Méd Techn 33: 416.
- MARZZOCO A, TORRES BB 1999. Bioquímica Básica, 2<sup>a</sup> ed, Ed.Guanabara Koogan: 110-120.
- MARXEN JC, BECKER W 1997. The organic shell matrix of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*. Comp Biochem Physiol 118 B (1): 23-33.

- MARXEN JC, BECKER W 2000. Calcium binding constituents of the organic Shell matrix from the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*. Comp Biochem Physiol 127b: 235-242.
- MADSEN H 1992. Ecological studies on the intermediate host snails and the relevance to schistosomiasis control. Mem Inst Oswaldo Cruz 87: 249-53.
- MENDES NV, QUEIROZ RO, GRANDI TSM, ANJOS AMG, OLIVEIRA AB, ZANI CL 1999. Screening of Asteraceae (compositae) Plant extracts for Molluscicidal Activity. Mem do Inst Oswaldo Cruz, 94 (3): 411-412.
- MENDONÇA RPC 2003. Avaliação da atividade moluscicida e nematicida de *Pithecolobium* *avaremotemo*, [www.s bq.org.br/antiores/23/resumos/0597-2/](http://www.s bq.org.br/antiores/23/resumos/0597-2/).
- METZGER H 1970. Biochemie einiger parasitisch lebender Würmer und Protozoen, und die Wirkungsweise chemotherapeutisch wichtiger Stoffe. Z Parasit 34:271-295.
- MEYER R, BECKER W, KLIMKEWITZ M 1986. Investigations on the ketone body metabolism in *Biomphalaria glabrata*: Influence of starvation and of infection with *Schistosoma mansoni*. J Comp Physiol B 156: 563-571.
- MICHELSON EH, DuBOIS L 1975. Intraspecific variations in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata* a snail host of *Schistosoma mansoni*. Malacologia 15 (1): 105-111.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde 2005. <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/go1.pdf>/acessado 26/01/2006.
- MOYOU-SOMO R, KOUEMENI LE, NDJAMEN B, NGOGANG J, DONGLA R, LONGANG-TCHATCHOUANG V, HASSIMI M 2003. A new focus of



- Schistosoma mansoni* in Yoro village, Mbam and Inoubou Division, Cameroon. Am J Trop Med Hyg 69 (1): 74-77.
- MOTT K 1987. Plant moluscicides. UNDP/World Bank/WHO/TDR. John Wiley and Sons Ltda; 326.
- MOZA PG, PIERI OS, BARBOSA CS, REY L 1998. Sociodemographic and behavioral factors related to schistosomiasis in a rural village of the sugar cane belt in Pernambuco State, Brazil. Cad Saude Publica 14(1):107-115.
- NABIH I, EL-ANSARY A 1992. Metabolic end-products in parasitic helminthes and their intermediate hosts. Comp Biochem Physiol 101B (4): 499-508.
- OZAWA T, LILLEY TH, HASLAM E 1987. Polyphenol interactions adstringency and loss of astringency in ripening fruit. Phytochemistry 26 (11): 2937-2942.
- PATIENCE RL, THOMAS JD, STERRY PR 1983. Production and release of carboxylic acids during oxic and anoxic metabolism by the pulmonate snail *Biomphalaria glabrata* (Say). Comp Biochem Physiol. 76B : 253-262.
- PERRETT S, WHITFIELD P 1996. Currently available molluscicides. Parasitol Today 12 (4): 156-159.
- RAVELONJATO B, KUNESCH N, POISSON JE 1987. Phytochemistry 26: 2973.
- REY L 1991. Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nas Américas e na África, 2ed. Ed.Guanabara :351- 362, 389-409.
- REY L 1993. Non-human vertebrate hosts of *Schistosoma mansoni* and schistosomiasis transmission in Brazil. Rev Parasitol 52: 13-25.

- RUG M, RUPPEL A 2000. Toxic activities of the plant *Jatropha curcas* against intermediate snail hosts and larvae of schistosomes. Trop Med and International Health 5 (6): 423-430.
- RUPPRECHT H, BECKER W, SCHAWANBEK A 1989. Alterations in hemolymph components in *Biomphalaria glabrata* during long-term infection with *Schistosoma mansoni*. Parasitol Research 75: 233-237.
- SANTOS SC, COSTA WF, RIBEIRO JP, GUIMARÃES DO, FERRI PH, FERREIRA HD, SERAPHIN JC 2002. Tannin composition of barbatimão species. Fitoterapia 73: 292-299.
- SAZ HJ 1990. Helminths: Primary models for comparative biochemistry. Parasitol Today 6: 92-93.
- SCHALL VT 1995. Health education, public information, and communication in schistosomiasis control in Brazil: a brief retrospective and perspective. Mem Inst Oswaldo Cruz 90 (2): 229-234.
- SCHAUFELBERGER D, HOSTETTMANN K 1983. On the Molluscicidal Activity of Tannin Containing Plants. J Med P Research 48: 105-107.
- SCHMALE H, BECKER W 1977. Studies on the urea cycle of *Biomphalaria glabrata* during normal feeding activity, in starvation and with infection of *Schistosoma mansoni*. Comp Bioche Physiol 5kb: 321-330.
- SCHÖTTLER U 1986. Weitere Untersuchungen zum anaeroben Energiestoffwechsel des Polychaeten *Arenicola marina* L. Zool Beitr NF 30: 141-152.
- SHAW MK, ERASMUS DA 1987. *Biomphalaria glabrata*: changes in calcium reserves following parasitism by larval *Schistosoma mansoni*. Parasitology 95: 267-276.

- SILVA RC 2002. A influência das situações ecofisiológicas e do extrato de *Stryphnodendron polyphyllum* no metabolismo de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907. Dissertação (Mestrado em parasitologia)-Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- SFBC 1982. Societé Français de Biologie Clinique. Ann Biol Clin 40: 160.
- SOEYARTO DD 1996. Biodiversity propecting and benefi sharing: perpectives from the fiel. J Ethnopharmacol 51: 15.
- SOUZA CP, MENDES NM, JANNOTTI-PASSOS LK, PERREIRA JP 1992. O uso da casca da castanha-do-caju *Anacardium occidentale*, como moluscicida alternativo. Rev Inst Méd Trop São Paulo 34 (5): 459-466.
- SOUZA CAM, CARVALHO RR, KURIYAMA SN et. al.1997. Study of embryofeto-toxicity of Crown-of-Thorns (*Euphorbia millii*) látex, a natural molluscicide. Bras J Med Biol Research 30 (11): 1325-1332.
- STREIT B 1978. Changes in protein, lipid and carbohydrate content during starvation in the freshwater limpet *Acylus fluviatilis* ( Basomatophora). J Comp Physiol 123: 149-153.
- SUCEN-Superintendência de Controle de Endemias 1989. Programa de Controle de Esquistossomose. Sao Paulo, Secretaria de Estado da Saúde: 8.
- SUCEN-Superintendência de Controle de Endemias 2001. Controle de vetores e hospedeiros intermediários: esquistossomose mansônica. [http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/esquisto/texto\\_esquistossomose.htm/](http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/esquisto/texto_esquistossomose.htm/) acessado 04/11/2005.
- TALKE H, SCHUBERT GE 1965. Klini Wochschr 43: 1754.

- TIELENS AGM 1994. Energy generation in parasitic helminths. *Parasitol Today* 10: 346-352.
- TRINDER P 1969. *Ann Clin Biochem* 6-24.
- VINAUD MC, MENDES JM, BEZERRA JCB 2001. Eficiência de ração nas taxas de crescimento, oviposição e mortalidade para *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário de *Schistosoma mansoni*. *J Bras Patologia* 37 (4): 182.
- WEINER S, ADDADI L 1991. Acidic macromolecules of mineralized tissues: the controllers of crystal formation. *TIBS* 16: 252-256.
- WHITFIELD PJ 1996. Medicinal plants and the control of parasites: Novel anthelmintic compounds and molluscicides from medicinal plants. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 90: 596-600.
- WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION 1983. Report of the Scientific working Group on Plant Molluscicide e Guidelines for evaluation of plant molluscicides. Geneva . (TDR/SCH-SWE(4)/83.3).
- WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION 1993. The control of schistosomiasis second report of the WHO expert committee, WHO Technical Report Series, 830, World Health Organization, Geneva.
- WHO- WORLD HEALTH ORGANIZATION 1998. *Report of the WHO informal consultation on schistosomiasis control*. Geneva (WHO/CDS/CPC/SIP/99.2).
- WIJSMAN TCM, VAN DER LUGT HC, HOOGLAND HP 1985. Anaerobic metabolism in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*: Haemolymph as reservoir of D-lactate and succinate. *Comp Biochem Physiol* 81b (4): 889-895.

- WIJSMAN TCM, MAASKANT JJ, BALM P, KLIJNSTRA J 1988. Hyperglycaemia in relation to anoxia and stress in the freshwater snail *Limnaea stagnalis*. *Comp Biochem Physiol* 89B: 55-63.
- WINK M 1990. Physiology of Secondary Product Formation in Plants. In: *Secondary Products from Plant Tissue Culture*, ed. Charlwood, B. V. Rhodes, M. J. C.: 23. Clarendon Press, Oxford.
- WOLMARANS CT 1987. *Biomphalaria glabrata*: respiration, calcium and end products of carbohydrate metabolism *Comp Biochem Physiol* 87A (3): 785-790.
- WRIGHT CA 1966. The pathogenesis of helminthes in the mollusca. *Helminthol Abstr* 35: 207-224.
- ZELCK UE, BECKER W, BAYNE C 1995. The plasma proteins of *Biomphalaria glabrata* in the presence and absence of *Schistosoma mansoni*. *Developmental and comparative immunology* 19 (3): 181-194.

**ANEXOS**

## ANEXOS

**Anexo 1** Tabela das dosagens bioquímicas e dosagens do equilíbrio ácido-base do grupo controle.

Controle										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
glicose	2,44	3,05	2,05	1,94	2,11	4,00	2,88	3,05	2,94	4,16
ureia	1,83	2,33	2,50	3,00	2,66	2,66	1,83	4,66	0,50	2,00
proteína	4,20	4,80	3,40	3,30	4,40	4,60	4,10	3,90	4,40	4,00
calcio	4,35	4,42	3,52	3,60	4,82	4,35	4,55	3,52	4,62	3,42
DHL	210,00	130,00	210,00	168,00	185,00	289,00	66,00	282,00	137,00	284,00
ALT	163	186	69	188	102	251	298	278	209	268
AST	277	284	151	324	232	553	423	336	420	567
pH	7,75	7,74	7,68	7,62	7,66	7,59	7,54	7,65	7,64	7,55
pCO <sub>2</sub>	11,00	11,00	11,00	17,00	13,00	14,00	17,00	14,00	12,00	17,00
pO <sub>2</sub>	145,00	123,00	110,00	136,00	139,00	125,00	156,00	168,00	105,00	138,00
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	16,00	16,00	14,00	18,00	15,00	14,00	14,00	15,00	13,00	15,00
SO <sub>2</sub>	99,00	99,00	99,00	99,00	99,00	99,00	99,00	100,00	99,00	99,00

Tabela das dosagens bioquímicas e dosagens do equilíbrio ácido-base do grupo exposto a 25 mg/L/24h.

25mg/L										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
glicose	3,11	4,94	3,00	3,66	3,50	4,05	3,83	3,55	5,39	5,44
ureia	2,66	1,33	1,33	2,00	1,50	1,50	2,50	1,83	2,50	2,66
proteína	3,10	5,10	4,70	4,20	3,60	4,70	4,10	4,30	4,80	4,70
calcio	7,20	5,35	5,35	7,00	6,45	7,02	5,07	5,82	6,35	5,40
DHL	28,00	15,00	43,00	41,00		34,00	32,00	7,00	24,00	
ALT	423		225	269	189	209	207	209	328	227
AST	751		338	458	367	396	388	368	465	348
pH	7,20	7,70	7,76	7,57	7,74	7,61	7,62	7,58	7,55	7,60
pCO <sub>2</sub>	18,00	12,00	11,00	14,00	12,00	15,00	13,00	14,00	17,00	15,00
pO <sub>2</sub>	97,00	14,00	173,00	139,00	146,00	154,00	150,00	86,00	216,00	164,00
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	7,00	15,00	16,00	12,00	16,00	15,00	14,00	13,00	15,00	15,00
SO <sub>2</sub>	96,00	99,00	100,00	99,00	99,00	99,00	99,00	98,00	100,00	99,00

Tabela das dosagens bioquímicas e dosagens do equilíbrio ácido-base do grupo exposto a 50mg/L/24h.

50 mg/L	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
glicose	5,50	10,33	8,55	8,83	7,94	8,72	5,28	11,16	7,05	8,88
ureia	6,00	3,50	5,66	2,50	2,33	1,50	2,66	3,83	4,66	2,16
proteína	3,30	4,40	3,50	3,50	4,50	3,80	3,60	4,70	3,70	4,40
calcio	11,85	13,85	11,87	14,17	14,07	13,55	14,65	12,07	11,65	14,77
DHL	47,00	12,00	8,00	21,00		39,00	58,00	19,00	10,00	
ALT	1875,00	1175,00	1405,00	672,00	687,00	1539,00	487,00	1618,00	1490,00	944,00
AST	3528	2040	2795		1284	2072	997	2313	3627	1633
pH	6,68	6,84	6,48	7,03	6,90	6,93	7,12	6,83	6,76	7,13
pCO <sub>2</sub>	27,00	38,00	58,00	37,00	38,00	44,00	47,00	26,00	37,00	39,00
pO <sub>2</sub>	19,00	84,00	41,00	70,00	91,00	123,00	44,00	66,00	78,00	51,00
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	3,00	6,00	4,00	9,00	7,00	9,00	15,00	4,00	5,00	13,00
SO <sub>2</sub>	99,00	86,00	20,00	86,00	90,00	96,00	64,00	75,00	80,00	75,00

Tabela das dosagens dos ácidos orgânicos do grupo controle.

	oxalat o	citrat o	propionat o	succinat o	cetoglutar a to	acetato	malat o	fumarat o	pituvat o	Lactat o
control e 1	Nd	0,566 8	7,0987	Nd	Nd	0,7394	7,252 5	0,1762	0,2783	Nd
control e 2	Nd	0,616 1	7,5771	Nd	Nd	10,3177	2,175 8	0,1161	0,1637	Nd
control e 3	Nd	0,348 2	21,6616	Nd	Nd	2,0831	2,088 5	0,1208	0,2378	Nd
control e 4	2,91	0,245 5	6,802	Nd	Nd	5,3864	7,441	0,0263	0,0704	Nd
control e 5	Nd	0,658 1	11,5255	0,945	Nd	Nd	5,211 9	0,1639	0,214	0,082 5
control	Nd	0,235	8,6573	Nd	Nd	5,3186	1,002	0,0168	0,0255	Nd



---

e 6

9

1

---

Tabela das dosagens dos ácidos orgânicos do grupo exposto a 25 mg/L

	oxalat o	citrat o	propionat o	succinat o	cetoglutarat o	acetato	malat o	fumarat o	piruvat o	lactat o
spc 25 1	Nd	Nd	8,5629	3,5961	10,2659	109,371 1	0,859 3	0,1789	Nd	Nd
spc 25 2	Nd	Nd	10,5988	11,0952	Nd	Nd	8,942 1	0,7226	0,2611	Nd
spc 25 3	Nd	Nd	367,9618	4,5101	Nd	128,871 3	4,158 2	Nd	0,482	Nd
spc 25 4	Nd	Nd	Nd	1,7297	7,8056	8,0705	0,598 8	0,0664	Nd	Nd

Tabela das dosagens dos ácidos orgânicos do grupo exposto a 50 mg/L

	oxalat o	citrat o	propionat o	succinat o	cetoglutarat o	acetato	malato	fumarat o	piruvat o	lactat o
spc 50 1	Nd	Nd	Nd	Nd	15,0231	80,3498	39,473 7	Nd	Nd	0,508 8
spc 50 2	Nd	Nd	30,7454	Nd	11,1455	Nd	Nd	0,1837	Nd	Nd
spc 50 3	Nd	Nd	818,545	Nd	Nd	177,230 2	52,154 4	0,1321	Nd	Nd
spc 50 4	Nd	Nd	157,9257	37,28	8,2048	156,519 8	40,850 9	0,1346	Nd	0,686 6