

Universidade Federal de Juiz de Fora
Pós-Graduação em Ciências Biológicas
Mestrado em Comportamento e Biologia Animal

Bruna Aparecida de Souza

**EFEITOS DOS EXTRATOS AQUOSOS DE *Bidens pilosa* LINNÉ E *Mikania glomerata*
SPRENGEL (ASTERACEAE) SOBRE ASPECTOS BIOLÓGICOS E
COMPORTAMENTAIS DE *Subulina octona* (BRUGUIÈRE,1789) (MOLLUSCA,
SUBULINIDAE)**

Juiz de Fora

2012

Bruna Aparecida de Souza

**Efeitos dos extratos aquosos de *Bidens pilosa* Linné e *Mikania glomerata* Sprengel
(Asteraceae) sobre aspectos biológicos e comportamentais de *Subulina octona*
(Bruguière,1789) (Mollusca, Subulinidae)**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Comportamento e Biologia Animal).

Orientadora: Profa. Dra. Elisabeth Cristina de Almeida Bessa
Co-orientadora: Profa. Ma. Lidiane Cristina da Silva

Juiz de Fora
2012

Souza, Bruna Aparecida de.

Efeitos dos extratos aquosos de *Bidens pilosa* Linné e *Mikania glomerata* Sprengel (Asteraceae) sobre aspectos biológicos e comportamentais de *Subulina octona* (Bruguière, 1789) (Mollusca, Subulinidae) / Bruna Aparecida de Souza. – 2012.
.145 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Comportamento e Biologia Animal)—
Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2012.

1. Comportamento animal. I. Título.

CDU 591.51

Efeitos dos extratos aquosos de *Bidens pilosa* Linné e *Mikania glomerata* Sprengel
(Asteraceae) sobre aspectos biológicos e comportamentais de *Subulina octona*
(Bruguière, 1789) (Mollusca, Subulinidae)

Bruna Aparecida de Souza

Orientadora: Profa. Dra. Elisabeth Cristina de Almeida Bessa
Co-orientadora: Profa. Ma. Lidiane Cristina da Silva

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências
Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de
Fora, como parte dos requisitos para obtenção
do Título de mestre em Ciências Biológicas
(Área de Concentração em Comportamento e
Biologia Animal).

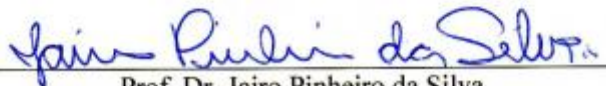
Aprovada em 24 de fevereiro de 2012.



Profa. Dra. Elisabeth Cristina de Almeida Bessa-Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora



Profa. Dra. Stefane D'ávila de Oliveira e Paula
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Jairo Pinheiro da Silva
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo seu infinito Amor e por sempre iluminar os meus caminhos. Por ter me dado força e sabedoria para vencer todos os obstáculos e dificuldades.

À professora Elisabeth Cristina de Almeida Bessa, Departamento de Zoologia, ICB da UFJF, pela confiança na minha capacidade de realizar esse projeto. Pela orientação, respeito e amizade. Por isso e por muito mais, muito obrigada.

À Lidiane Cristina da Silva, Ma., discente de doutorado do CPGCV, UFRRJ, pela amizade e pela Grandiosa ajuda na elaboração desse trabalho, por sempre ter me socorrido com toda atenção e dedicação.

À Maria Alice Allemand Carvalho, vice-coordenadora do Museu de Malacologia professor Maury pinto de Oliveira da UFJF, pela amizade, confiança e respeito. Pelo incentivo desde o início, antes mesmo de fazer a prova de seleção. Sempre muito carinhosa e atenciosa para ouvir meus desabafos. Muito Obrigada pela sua torcida!

À professora Dra. Sthefane D'ávila de Oliveira e Paula, departamento de Zoologia, ICB da UFJF, pela inestimável contribuição para a melhoria desse trabalho e pelo apoio ao XXII Congresso Brasileiro de Malacologia.

Ao prof. Dr. Jairo Pinheiro da Silva, Área de Biofísica, DCF, IB, UFRRJ, Pela disponibilização de alguns reagentes para a análise fitoquímica.

À profa. Dra. Flávia Oliveira Junqueira, Centro Universitário do Leste de Minas Gerais – UnilesteMG, por acreditar no meu trabalho e pelo carinho.

Ao prof. Dr. Roberto da Gama Alves, departamento de Zoologia, ICB da UFJF, pela confiança depositada em mim e pelo carinho.

À profa. Dra. Juliane Floriano Lopes dos Santos, departamento de Zoologia, ICB da UFJF, pelo carinho e pelas sugestões que contribuíram muito para a melhoria do meu trabalho.

À Senhora Maria Helena de Oliveira Torquato, pela disponibilização das amostras vegetais de *Mikania glomerata*.

À amiga Tércia, desde os tempos de cursinho, pela amizade, sugestões, críticas e ajuda na realização desse e de outros trabalhos.

À amiga Daisy, amiga que quero levar para o resto da vida. Desde o início, estudamos juntas para a seleção de mestrado, dividimos os mesmos medos e angústias. Obrigada pela força e palavras de estímulo.

Aos secretários do PPGCB Ritinha e Osmar por sempre me atenderem com muita dedicação e paciência. Sem vocês teria sido bem mais difícil!

À profa. MSc. Paula Ferreira dos Santos, pelo apoio ao uso de alguns equipamentos.

À Liliane, pelo apoio desde o início da seleção. Pelas sugestões que contribuíram para a melhoria desse trabalho, pelo carinho e torcida.

À Cidinha, pela amizade. Sempre atenciosa e carinhosa comigo. Pelas conversas agradáveis na Malacologia.

À Lorraine, pela ajuda na manutenção das matrizes, sempre muito dedicada e disposta a me ajudar. Pela sua amizade e torcida!

À Evelyn, pela amizade e pela sua torcida! Pela disponibilidade de me ajudar no que fosse preciso.

Aos meus amigos “químicos” Lucas, Thiago, Sandro, Tatiana, Carol, Mariana, Rita, Leonardo e Cláudia pelo apoio e torcida.

À minha mãe Sandra, pelo amor, paciência, compreensão e dedicação a mim nesses dois anos de estudo.

À minha avó querida, Arlete, pela sua dedicação a mim, pela torcida. Sempre me ajudando com conselhos e palavras de estímulo.

Aos meus irmãos Diogo e Alessandra e cunhado Eduardo pelo carinho.

Ao meu irmão Ailton, pelo carinho, confiança e por acreditar que eu estava no caminho certo.

À minha amiga Jussara, pela amizade desde a época de cursinho, sonhamos juntas, compartilhamos as mesmas dúvidas, medos e esperanças. Sonhamos e conquistamos com a Graça de Deus. Pela sua torcida sempre acompanhada de orações que tornaram meus dias mais fáceis e alegres.

À minha amiga Selmara, sempre me estimulando e dando conselhos. Sua alegria é contagiante e sempre me motivava. Obrigada pelas suas orações e torcida.

À Amiga Linéia, pela amizade de longa data, pela torcida, pelo carinho. Pelas conversas agradáveis que me transmitiam tranquilidade e motivação.

Às amigas Lara, Lílian, Cláudia e Nilzimar pelo seu carinho e orações. Sempre torcendo por mim! Muito obrigada!

Ao Programa de Ciências Biológicas – Comportamento e Biologia Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora pela oportunidade de desenvolver esse projeto. Pelo auxílio financeiro para os congressos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa de estudo.

Vinde a mim, todos vós que estais aflitos e sobrecarregados, que eu vos aliviarei. Tomai sobre vós o meu jugo e aprendei comigo que sou brando e humilde de coração e achareis repouso para vossas almas, pois é suave o meu jugo e leve o meu fardo.

(S. MATEUS, 11: 28 - 30)

RESUMO

O molusco terrestre *Subulina octona* (Bruguière, 1789) atua como hospedeiro intermediário de helmintos parasitos de humanos e animais domésticos. Em alta densidade populacional também pode atuar como praga agrícola, o que levanta a necessidade de medidas de controle. A busca por moluscidas de origem vegetal tem se intensificado nos últimos anos devido às vantagens que as espécies vegetais apresentam. Os vegetais *Bidens pilosa* Linné e *Mikania glomerata* Sprengel apresentam ampla distribuição geográfica, são frequentemente utilizados na medicina popular e apresentam princípios ativos solúveis em água e com reconhecida atividade moluscida. Objetivou-se com esse trabalho comprovar a presença desses princípios ativos, calcular as concentrações de referência (CL₅₀ e CL₉₀) sobre adultos de *S. octona* e avaliar os efeitos das CL₅₀ obtidas sobre aspectos biológicos e comportamentais desse molusco em diferentes fases de desenvolvimento. Para a obtenção das CL₅₀ e CL₉₀ foram utilizadas cinco concentrações do extrato aquoso das espécies vegetais, no qual 30 moluscos (10moluscos/grupo) foram utilizados para cada concentração e para o controle. Os grupos tratados foram expostos à 5mL dos extratos por contato direto com a solução por 24 horas seguidas de 24 horas de recuperação e grupos controle foram expostos a água destilada pelo mesmo período. As concentrações de referência foram obtidas pela análise Probit utilizando o software BioStat 2008, versão 2.5. As CL₅₀ obtidas foram testadas sobre ovos, jovens recém-eclodidos e jovens de 30 dias e adultos que ficaram expostos aos tratamentos por 24 e 48 horas. Grupos controle ficaram expostos pelo mesmo período em água destilada. Para os adultos foram realizadas três aplicações das CL₅₀ em intervalos de 30 dias. As observações para a análise de repelência em adultos foram realizadas nos primeiros 10 minutos após a primeira aplicação. A eclosão, sobrevivência e reprodução foram avaliadas e os dados comparados pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) utilizando o software BioEstat versão 5.0. A análise fitoquímica comprovou a presença de flavonóides, taninos e saponinas nos extratos aquosos dos dois vegetais. As CL₅₀ e CL₉₀ obtida para *B. pilosa* foi de 51,4mg/mL e 74,1mg/mL respectivamente, e para *M. glomerata* foi de 44,6mg/mL para CL₅₀ e 71,9mg/mL para CL₉₀. A atividade repelente dos extratos foi verificada logo após a aplicação. A sobrevivência dos adultos foi significativamente reduzida após a segunda aplicação dos extratos. Da mesma forma, a fecundidade diminuiu para os grupos expostos por 24 horas. Não foi verificada diferença significativa na eclosão de moluscos da prole provenientes dos adultos expostos aos tratamentos. Todavia, a eclosão dos moluscos

provenientes de ovos expostos diretamente aos extratos aquosos das plantas testadas, foi, em média, significativamente reduzida. O tempo de exposição também influenciou, onde os grupos expostos pelo maior tempo tiveram sua eclosão reduzida. Os extratos também influenciaram na sobrevivência dos eclodidos proveniente dos ovos tratados e dos jovens-recém-eclodidos e dos de 30 dias. Alterações sobre o crescimento foi verificado para os tratamentos. Os resultados observados nesse estudo provavelmente foram provocados pela mistura complexa de princípios ativos que podem interagir de forma sinérgica, aditiva ou até facilitando a absorção de algum composto. A facilidade na obtenção, preparação e aplicação desses extratos tornam esses vegetais possíveis candidatos para programas de controle desse molusco.

Palavras chaves: Molusco terrestre, extrato vegetal, moluscicida, toxidez

ABSTRACT

The land snail *Subulina octona* (Bruguière, 1789) is an intermediate host of helminths that parasitizes humans and domestic animals. In high densities it can also be a crop pest making necessary the application of control measures. The search for plant molluscicide increased in last years due to its advantages. The plants *Bidens pilosa* Linné and *Mikania glomerata* Sprengel are widely distributed and are frequently used in folk medicine. They have active principles that are water soluble and with proven action against snails. The aim of this study was to confirm the presence of these active principles, to calculate the reference concentrations (LC₅₀ e LC₉₀) in adult *S. octona* and to evaluate the effects of the LC₅₀ obtained on biological and behavioral aspects of this snail in different development phases. To obtain the LC₅₀ e LC₉₀ five concentrations were utilized for each plant aqueous extract, and 30 snails (10snails/group) were utilized for each concentration and for control group. The groups were exposed to 5mL of the extracts by direct contact with the solution for 24 hours followed by 24 hours of recovery period and the control groups were exposed to distilled water for the same time period. The reference concentrations were obtained using the Probit analysis through (BioStat 2008 software, version 2.5). The LC₅₀ obtained were tested on eggs, newly hatched, 30 day old individuals and adults that were exposed to the treatments for 24 and 48 hours period. Control groups were exposed to distilled water. For the adults, were utilized three applications of the LC₅₀ every 30 days. The observations to analyse the repellency in adults were made at the realized at the 10 first minutes after the first application. The hatchability, survival and reproduction were evaluated and the data were compared by using the Kruskal-Wallis (p<0,05) (BioEstat software, version 5.0). The phytochemical analysis confirmed the presence of flavonoids, tannins and saponins in the aqueous extracts of both plants. The LC₅₀ and LC₉₀ obtained for *B. pilosa* was 51.4mg/mL and 74.1mg/mL respectively, and for *M. glomerata* was 44.6mg/mL for LC₅₀ and 71.9mg/mL for LC₉₀. The repellency of the extracts was verified after the application. The survival of adult snails was significantly diminished after the second application of the extracts. In the same way, the fecundity was reduced in groups exposed for 24 hours. It was not verified significantly difference in offspring hatchability from adult snails exposed to the treatment. However, the eggs exposed directly to the treatments had significantly reduction in hatchability means. The mean hatchability of the snail from eggs directly exposed to the treatments were significantly reduced. The extracts also influenced the survival of snails hatched from treated eggs, in

newly hatched and 30 day old individuals. Alterations on growth were verified in all treatments. The results obtained in this study were probably due to the complex combination of the active principles that can interact synergistically, additive or antagonist or even facilitating absorption of some compounds. The facility in the plant collection, extract preparation and application of these extracts turn these plants candidates in the control of this species.

Key-words: Land snail, vegetable extract, molluscicide, toxicity

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

2. Revisão Bibliográfica

Quadro 1:	Chalconas descritas para a espécie <i>Bidens pilosa</i> -----	34
Quadro 2:	Auronas descritas para a espécie <i>Bidens pilosa</i> -----	35
Fotografia 1:	Espécies vegetais e <i>Subulina octona</i> em diferentes estágios de desenvolvimento. (A) Adulta (B) ovos (C) recém-eclodidos (D) Jovens de 30 dias de idade; E) <i>Bidens pilosa</i> ; F) <i>Mikania glomerata</i> -----	37
Estrutura 1:	Núcleo fundamental dos flavonóides e sua numeração-----	38
Estrutura 2:	A) Tanino hidrolisável: Aceritanino; B) Tanino condensado: modelo de estrutura-----	40
Estrutura 3:	A) Estrutura básica de saponina esteroidal; B) Estrutura básica de saponina triterpência-----	41

3. Prospecção fitoquímica dos extratos aquosos de *Bidens pilosa* Linnée *Mikania glomerata* sprengel (Asteraceae) e bioensaio toxicológico em adultos de *Subulina octona* (Bruguère, 1789) (Mollusca, Subulinidae) em laboratório

Fotografia 2:	Moluscos <i>Subulina octona</i> . A - Indivíduos adultos; B – Matrizes-----	46
Esquema 1:	Representação esquemática do processo adotado para a realização dos testes piloto para a obtenção das concentrações limites dos extratos aquosos de <i>Bidens pilosa</i> e <i>Mikania glomerata</i> -----	48
Quadro 3:	Volume (mL) de solução extrativa, água destilada e da solução final para cada tubo de ensaio-----	53
Esquema 2:	Representação esquemática dos procedimentos adotados na análise fitoquímica-----	55
Fotografia 3:	Moluscos <i>Subulina octona</i> ao longo do procedimento experimental adotado para os testes de atividade moluscicida de extratos aquosos de <i>Bidens pilosa</i> e <i>Mikania glomerata</i> . A – Moluscos sendo expostos aos extratos aquosos; B – Etapa de recuperação após a exposição ao extrato aquoso-----	57
Esquema 3:	Representação esquemática das possíveis interações entre taninos e proteínas-----	60

- Fotografia 4: Testes fitoquímicos para identificação de possíveis compostos com atividade moluscicida sobre *Subulina octona* em extratos aquosos de *Bidens pilosa* e *Mikania glomerata*. A) extrato aquoso de *Bidens pilosa* evidenciando a coloração vermelha (a) após adição de hidróxido de sódio (NaOH), característica para presença de flavonóides (chalconas e/ou auronas); B) extrato aquoso de *Mikania glomerata* após adição de NaOH (b) evidenciando a presença de outros flavonóides; C) extrato aquoso de *Bidens pilosa* após adição de gelatina, apresentando turvação (c) e indicando a presença de taninos e/ou polifenóis; D) extrato aquoso de *Mikania glomerata* evidenciando ausência de turvação (d) após adição de solução de gelatina; E) extrato aquoso de *Bidens pilosa* (e) evidenciando reação negativa ao teste da cafeína para identificação de taninos----- 62
- Fotografia 5: Testes fitoquímicos para identificação de possíveis compostos com atividade moluscicida sobre *Subulina octona* em extratos aquosos de *Bidens pilosa* e *Mikania glomerata*. A) extrato aquoso de *Bidens pilosa* evidenciando a coloração verde (a) após adição de cloreto férrico ($FeCl_3$) característica para presença de taninos condensados; B) extrato aquoso de *Mikania glomerata* após adição de cloreto férrico ($FeCl_3$) (b) característica para presença de taninos condensados C) extrato aquoso de *Bidens pilosa* após agitação e repouso de 15 minutos, indicando a presença de saponinas devido a formação de espuma (D) tubo 10 com 1cm de espuma; E) extrato aquoso de *Mikania glomerata* após agitação e repouso de 15 minutos, indicando a presença de saponinas devido a formação de espuma (D) tubo 9 com 1cm de espuma----- 63
- Gráfico 1: Mortalidade média de adultos de *Subulina octona*, expostos aos extratos aquosos das partes aéreas de *Bidens pilosa* e *Mikania glomerata*, após as 24 horas de recuperação. ^{a,b}=Letras diferentes = médias diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)----- 66
- Gráfico 2: Correlação de Pearson entre concentração do extrato aquoso de *Bidens pilosa* e mortalidade de *Subulina octona*----- 67
- Gráfico 3: Correlação de Pearson entre concentração do extrato aquoso de *Mikania glomerata* e mortalidade de *Subulina octona*----- 67

Gráfico 4 : Relação concentração-resposta de *Subulina octona* exposta ao extrato aquoso das partes aéreas de *Bidens pilosa*. Resposta avaliada=letalidade, expressa em percentual de moluscos mortos----- 70

Gráfico 5: Relação concentração-resposta de *Subulina octona* exposta ao extrato aquoso das partes aéreas de *Mikania glomerata*. Resposta avaliada=letalidade, expressa em percentual de moluscos mortos----- 70

4. Efeitos de sucessivas aplicações da CL₅₀ de *Bidens pilosa* Linné e *Mikania glomerata* Sprengel (Asteraceae) sobre aspectos biológicos e comportamentais em adultos de *Subulina octona* (Bruguère, 1789) (Mollusca, Subulinidade), em laboratório

Gráfico 6: Percentual de sobrevivência de *Subulina octona*, exposta ao extrato aquoso de partes aéreas de *Bidens pilosa*, utilizando dois tempos de exposição, 24 e 48 horas, e sendo efetuadas observações por 90 dias. Ap= aplicação----- 82

Gráfico 7: Tamanho médio de moluscos *Subulina octona* expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de *Bidens pilosa* por 24 horas de exposição. Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias (p<0,05)----- 82

Gráfico 8: Tamanho médio de moluscos *Subulina octona* expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de *Bidens pilosa* por 48 horas de exposição. Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias (p<0,05)----- 82

Gráfico 9: Número médio de ovos postos por molusco *Subulina octona* expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de *Bidens pilosa* utilizando diferentes tempos de exposição, 24 e 48 horas. Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias (p<0,05)----- 84

Gráfico 10: Percentual de eclodibilidade de moluscos *Subulina octona* provenientes de ovos postos por moluscos expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de *Bidens pilosa* utilizando diferentes tempos de exposição, 24 e 48 horas. Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias (p<0,05)----- 85

Gráfico 11: Percentual de sobrevivência de moluscos *Subulina octona* ao longo de três exposições ao extrato aquoso de partes aéreas de *Mikania glomerata*, utilizando dois tempos de exposição, 24 e 48 horas, sendo

	observados por 90 dias. Ap= aplicação-----	88
Gráfico 12:	Tamanho médio de moluscos adultos de <i>Subulina octona</i> expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de <i>Mikania glomerata</i> por 24 horas de exposição. Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias ($p < 0,05$)-----	89
Gráfico 13:	Tamanho médio de moluscos adultos de <i>Subulina octona</i> expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de <i>Mikania glomerata</i> por 48 horas de exposição. Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias ($p < 0,05$)-----	89
Gráfico 14:	Número médio de ovos postos por molusco <i>Subulina octona</i> ao longo de três exposições ao extrato aquoso de partes aéreas de <i>Mikania glomerata</i> , utilizando dois intervalos de exposição, 24 e 48 horas. Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias ($p < 0,05$)-----	90
Gráfico 15:	Percentual de eclodibilidade de moluscos <i>Subulina octona</i> provenientes de ovos postos por moluscos expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de <i>Mikania glomerata</i> utilizando diferentes tempos de exposição, 24 e 48 horas. Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias ($p < 0,05$)-----	90
Fotografia 6:	A) Adultos de <i>Subulina octona</i> em fuga após adição do extrato aquoso das partes aéreas de <i>Bidens pilosa</i> (B) e (C) exibindo o deslocamento vertical; D) Adultos de <i>Subulina octona</i> em fuga para as laterais do terrário após adição do extrato aquoso das partes aéreas de <i>Mikania glomerata</i> ; E) Adultos de <i>Subulina octona</i> do grupo controle após aplicação de água destilada (F) permanecendo no centro de aplicação----	92

5. Efeitos da CL₅₀ dos extratos de *Bidens pilosa* Linné e *Mikania glomerata* Sprengel (Asteraceae) sobre diferentes fases do desenvolvimento de *Subulina octona* (Bruguière,1789) (Mollusca, Subulinidae), em laboratório

Gráfico 16:	Médias de eclosão do molusco <i>Subulina octona</i> , expostos ao extrato aquoso de partes aeras de <i>Bidens pilosa</i> , utilizando diferentes tempos de exposição, 24 e 48 horas. Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias pelo teste Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)-----	102
Gráfico 17:	Médias de eclosão do molusco <i>Subulina octona</i> , expostos ao extrato aquoso de partes aeras de <i>Mikania glomerata</i> , utilizando diferentes	

	tempos de exposição, 24 e 48 horas. Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias pelo teste Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)-----	103
Gráfico 18:	Sobrevivência da prole de <i>Subulina octona</i> proveniente de ovos expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de <i>Bidens pilosa</i> , utilizando dois tempos de exposição, 24 e 48 horas, em observações realizadas em 120 dias-----	107
Gráfico 19:	Relação entre percentual de sobrevivência e tempo após exposição de <i>Subulina octona</i> proveniente de ovos expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de <i>Bidens pilosa</i> , utilizando 48 horas de exposição, em observações realizadas durante 45 dias-----	108
Gráfico 20:	Temperaturas máximas e mínimas registradas durante 120 dias-----	109
Gráfico 21:	Umidade relativa do ar registradas durante 120 dias-----	109
Gráfico 22:	Sobrevivência de jovens de <i>Subulina octona</i> , expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de <i>Mikania glomerata</i> , utilizando dois tempos de exposição, 24 e 48 horas, em observações realizadas durante 120 dias----	110
Gráfico 23:	Sobrevivência de jovens recém eclodidos de <i>Subulina octona</i> expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de <i>Bidens pilosa</i> , utilizando dois intervalos de exposição, 24 e 48 horas, em observações realizadas durante 90 dias-----	112
Gráfico 24:	Sobrevivência de jovens recém eclodidos de <i>Subulina octona</i> , expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de <i>Bidens pilosa</i> , utilizando dois intervalos de exposição, 24 e 48 horas, observadas durante 90 dias, em observações realizadas durante 45 dias após a exposição-----	113
Gráfico 25:	Tamanho médio de moluscos <i>Subulina octona</i> expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de <i>Bidens pilosa</i> por 24 horas de exposição. Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)-----	114
Gráfico 26:	Tamanho médio de moluscos <i>Subulina octona</i> expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de <i>Bidens pilosa</i> por 48 horas de exposição. Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)-----	114
Fotografia 7:	Moluscos recém-eclodidos de <i>Subulina octona</i> expostos ao extrato aquoso de partes aéreas <i>Mikania glomerata</i> por 48 horas-----	116

- Gráfico 27: Sobrevivência de jovens recém eclodidos de *Subulina octona*, expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de *Mikania glomerata*, utilizando dois tempos de exposição, 24 e 48 horas, em observações realizadas durante 75 dias após a exposição----- 117
- Gráfico 28: Tamanho médio de moluscos *Subulina octona* expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de *Mikania glomerata* por 24 horas de exposição. Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)----- 118
- Gráfico 29: Tamanho médio de moluscos *Subulina octona* expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de *Mikania glomerata* por 48 horas de exposição. Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)----- 118
- Gráfico 30: Sobrevivência de jovens de *Subulina octona* com 30 dias de idade, expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de *Bidens pilosa*, utilizando dois tempos de exposição, 24 e 48 horas, em observações realizadas durante 90 dias após a exposição----- 119
- Gráfico 31: Sobrevivência de jovens de *Subulina octona*, com idade de 30 dias, expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de *Bidens pilosa*, expostos por 48 horas, com 45 dias de observação----- 121
- Gráfico 32: Tamanho médio de moluscos *Subulina octona* expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de *Bidens pilosa* por 24 horas de exposição. Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)----- 122
- Gráfico 33: Tamanho médio de moluscos *Subulina octona* expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de *Bidens pilosa* por 48 horas de exposição. Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)----- 122
- Gráfico 34: Sobrevivência de jovens de *Subulina octona* com 30 dias de idade, expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de *Mikania glomerata*, utilizando dois tempos de exposição, 24 e 48 horas, em observações realizadas durante 90 dias após a exposição. Pontos “X” e “Y” marcados para avaliar a eficiência, em tempo de ação, dos dois intervalos de exposição, 24 e 48 horas----- 124

Gráfico 35: Tamanho médio de moluscos *Subulina octona* expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de *Mikania glomerata* por 24 horas de exposição. Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)----- 125

Gráfico 36: Tamanho médio de moluscos *Subulina octona* expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de *Mikania glomerata* por 48 horas de exposição. Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)----- 125

LISTA DE TABELAS

3. Prospecção fitoquímica dos extratos aquosos de *Bidens pilosa* Linnée *Mikania glomerata* sprengel (Asteraceae) e bioensaio toxicológico em adultos de *Subulina octona* (Bruguière, 1789) (Mollusca, Subulinidae)

- Tabela 1: Conteúdo de tanino (expresso em g/100 g de planta seca) em extrato aquoso das partes aéreas de *Bidens pilosa* e *Mikania glomerata*, percentual de taninos no extrato e percentual de taninos na planta----- 60
- Tabela 2: Relação entre a concentração dos extratos aquosos de *Bidens pilosa* e *Mikania glomerata* e a mortalidade de *Subulina octona* expostas a estes extratos. Regressão linear, R^2 , CL_{50} e CL_{90} e erro padrão. R= Resposta; C= Concentração----- 71

4. Efeitos de sucessivas aplicações da CL_{50} de *Bidens pilosa* Linné e *Mikania glomerata* Sprengel (Asteraceae) sobre aspectos biológicos e comportamentais em adultos de *Subulina octona* (Bruguière, 1789) (Mollusca, Subulinidade) em laboratório

- Tabela 3: Número médio e percentual de moluscos *Subulina octona* sobreviventes após exposição ao extrato aquoso de partes aéreas de *Bidens pilosa* utilizando dois tempos de exposição, 24 e 48 horas, observados durante 30 dias. ----- 80
- Tabela 4: Percentual de sobrevivência de moluscos *Subulina octona* ao longo de três exposições ao extrato aquoso de partes aéreas de *Mikania glomerata*, utilizando dois tempos de exposição, 24 e 48 horas, sendo observados por 90 dias----- 87

5. Efeitos da CL_{50} dos extratos de *Bidens pilosa* Linné e *Mikania glomerata* Sprengel (Asteraceae) sobre diferentes fases do desenvolvimento de *Subulina octona* (Bruguière,1789) (Mollusca, Subulinidae), em laboratório

- Tabela 5: Eclodibilidade de moluscos *Subulina octona* provenientes de ovos expostos ao extrato aquoso de *Bidens pilosa* utilizando dois tempos de exposição, 24 e 48 horas, e 30 dias de observação----- 102
- Tabela 6: Eclodibilidade de *Subulina octona* tratados com *Mikania glomerata*, nos dois intervalos de exposição, observados durante 30 dias. (mínimo, máximo, média, desvio padrão e percentual de eclosão)----- 104

Tabela 7:	Sobrevivência de recém- eclodidos de <i>Subulina octona</i> expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de <i>Bidens pilosa</i> , utilizando dois intervalos de exposição, 24 e 48 horas, observadas durante 90 dias. (valor máximo, mínimo, média, desvio padrão e percentual)-----	112
Tabela 8:	Sobrevivência de recém- eclodidos de <i>Subulina octona</i> expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de <i>Mikania glomerata</i> , utilizando dois intervalos de exposição, 24 e 48 horas, observadas durante 90 dias. (Intervalo de variação, média, desvio padrão e percentual)-----	117
Tabela 9:	Sobrevivência de jovens de <i>Subulina octona</i> com 30 dias de idade, expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de <i>Bidens pilosa</i> , utilizando dois intervalos de exposição, 24 e 48 horas, observadas durante 90 dias. (Intervalo de variação, média, desvio padrão e percentual)-----	120
Tabela 10:	Sobrevivência de jovens de <i>Subulina octona</i> com 30 dias de idade, expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de <i>Mikania glomerata</i> , utilizando dois intervalos de exposição, 24 e 48 horas, observadas durante 90 dias. (valor máximo, mínimo, média, desvio padrão e percentual)-----	124

LISTA DE EQUAÇÕES

3. Prospecção fitoquímica dos extratos aquosos de *Bidens pilosa* Linnée *Mikania glomerata* sprengel (Asteraceae) e bioensaio toxicológico em adultos de *Subulina octona* (Bruguière, 1789) (Mollusca, Subulinidae) em laboratório

Equação 1:	Massa de resíduo gerado após extração-----	51
Equação 2:	Percentual de extrativos totais-----	51
Equação 3:	Percentual de taninos no extrato-----	52
Equação 4:	Percentual de taninos condensados no vegetal-----	52
Equação 5:	Índice de espuma -----	54

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

Apud:	Citado por
CL ₅₀ :	Concentração letal que causa a morte de 50% dos animais testados
CL ₉₀ :	Concentração letal que causa a morte de 90% dos animais testados
cm:	Centímetro
DL ₅₀ :	Dose letal que causa a morte de 50% dos animais testados
Kg:	Kilograma
mg:	Miligrama
mL:	Mililitros
mm:	Milímetro
μ L:	Microlitros
n:	Número de animais
ppm:	Partes por milhão
WHO:	World Health Organization

LISTA DE SÍMBOLOS

- $>$ Maior
- \geq Maior ou igual
- $<$ Menor
- \leq Menor ou igual

SUMÁRIO

1. Introdução-----	26
2. Revisão Bibliográfica-----	28
2.1. <i>Subulina octona</i> -----	28
2.2. Moluscidas vegetais -----	30
2.3. <i>Bidens pilosa</i> Linné -----	33
2.4. <i>Mikania glomerata</i> Sprengel -----	36
2.5. Metabólitos secundários com atividade moluscicida presentes em <i>Bidens pilosa</i> Linné e <i>Mikania glomerata</i> Sprengel (Asteraceae)-----	38
2.5.1. Flavonóides - Características gerais e efeito tóxico sobre moluscos-----	38
2.5.2. Taninos - Características gerais e efeito tóxico sobre moluscos -----	39
2.5.3. Saponinas - Características gerais e efeito tóxico sobre moluscos-----	41
3. Prospecção fitoquímica dos extratos aquosos de <i>Bidens pilosa</i> Linnée <i>Mikania glomerata</i> Sprengel (Asteraceae) e bioensaio toxicológico em adultos de <i>Subulina octona</i> (Bruguière, 1789) (Mollusca, Subulinidae)-----	44
3.1. MATERIAL E MÉTODOS-----	46
3.1.1. Local dos Experimentos e condições experimentais-----	46
3.1.2. Obtenção dos moluscos-----	46
3.1.3. Obtenção, identificação e processamento do material vegetal-----	47
3.1.4. Testes pilotos-----	47
3.1.5. Experimentos-----	49
3.1.5.1. Experimento I- Prospecção fitoquímica de <i>Bidens pilosa</i> e <i>Mikania glomerata</i> -----	49
3.1.5.2. Experimento II- Atividade moluscicida dos extratos aquosos de <i>Bidens pilosa</i> e <i>Mikania glomerata</i> sobre <i>Subulina octona</i> e cálculo das CL ₅₀ e CL ₉₀ -----	56
3.1.6. Análise estatística dos dados-----	58
3.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	59
3.2.1. Experimento I- Prospecção fitoquímica de <i>Bidens pilosa</i> e <i>Mikania glomerata</i> -----	59
3.2.2. Experimento II- Atividade moluscicida dos extratos aquosos de <i>Bidens pilosa</i> e <i>Mikania glomerata</i> sobre <i>Subulina octona</i> e CL ₅₀ e CL ₉₀ -----	64
3.3. CONCLUSÕES-----	74

4. Efeitos de sucessivas aplicações da CL₅₀ de <i>Bidens pilosa</i> Linné e <i>Mikania glomerata</i> Sprengel (Asteraceae) sobre aspectos biológicos e comportamentais em adultos de <i>Subulina octona</i> (Bruguière, 1789) (Mollusca, Subulinidade), em laboratório	75
4.1. MATERIAL E MÉTODOS	76
4.1.1. Local dos experimentos e condições experimentais	76
4.1.2. Obtenção e manutenção dos adultos de <i>Subulina octona</i>	76
4.1.3. Obtenção, identificação e processamento do material vegetal	76
4.1.4. Experimentos	77
4.1.4.1. Experimento I- Efeitos de sucessivas aplicações da CL ₅₀ do extrato aquoso de <i>Bidens pilosa</i> sobre a sobrevivência, crescimento e reprodução de adultos de <i>Subulina octona</i> , expostos por 24 e 48 horas aos tratamentos	77
4.1.4.2. Experimento II- Atividade repelente dos extratos de <i>Bidens pilosa</i> e <i>Mikania glomerata</i> sobre adultos de <i>Subulina octona</i>	78
4.1.5. Análise estatística dos dados	78
4.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
4.2.1. Experimento I- Efeitos de sucessivas aplicações da CL ₅₀ do extrato aquoso de <i>Bidens pilosa</i> e <i>Mikania glomerata</i> sobre a sobrevivência, crescimento e reprodução de adultos de <i>Subulina octona</i> , expostos por 24 e 48 horas aos tratamentos	79
4.2.1.1. Efeitos de sucessivas aplicações da CL ₅₀ do extrato aquoso de <i>Bidens pilosa</i> sobre a sobrevivência, crescimento e reprodução de adultos de <i>Subulina octona</i> , expostos por 24 e 48 horas aos tratamentos	80
4.2.1.2. Efeitos de sucessivas aplicações da CL ₅₀ do extrato aquoso de <i>Mikania glomerata</i> sobre a sobrevivência, crescimento e reprodução de adultos de <i>Subulina octona</i> , expostos por 24 e 48 horas aos tratamentos	86
4.2.2. Experimento II- Atividade repelente dos extratos de <i>Bidens pilosa</i> e <i>Mikania glomerata</i> sobre adultos de <i>Subulina octona</i>	91
4.3. CONCLUSÕES	95
5. Efeitos da CL₅₀ dos extratos de <i>Bidens pilosa</i> Linné e <i>Mikania glomerata</i> Sprengel (Asteraceae) sobre diferentes fases do desenvolvimento de <i>Subulina octona</i> (Bruguière,1789) (Mollusca, Subulinidae), em laboratório	96
5.1. MATERIAL E MÉTODOS	97
5.1.1. Local dos experimentos e condições experimentais	97

5.1.2. Obtenção e manutenção dos ovos, jovens recém-eclodidos e de 30 dias-----	97
5.1.3. Obtenção, identificação e processamento do material vegetal-----	98
5.1.4. Experimentos-----	98
5.1.4.1. Experimento I- Efeitos das CL ₅₀ de <i>Bidens pilosa</i> e <i>Mikania glomerata</i> sobre a eclosão de <i>Subulina octona</i> , expostos por 24 e 48 horas-----	98
5.1.4.2. Experimento II- Sobrevivência da prole proveniente dos ovos expostos aos tratamentos-----	98
5.1.4.3. Experimento III- Efeitos da CL ₅₀ de <i>Bidens pilosa</i> e <i>Mikania glomerata</i> sobre a sobrevivência, crescimento e alcance da maturidade sexual de jovens recém-eclodidos, expostos por 24 e 48 horas-----	99
5.1.4.4. Experimento IV- Efeitos da CL ₅₀ de <i>Bidens pilosa</i> e <i>Mikania glomerata</i> sobre a sobrevivência, crescimento e alcance da maturidade sexual de jovens de 30 dias, expostos por 24 e 48 horas-----	100
5.1.5. Análise estatística dos dados-----	100
5.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	101
5.2.1. Experimento I- Efeitos das CL ₅₀ de <i>Bidens pilosa</i> e <i>Mikania glomerata</i> sobre a eclosão de <i>Subulina octona</i> , expostos por 24 e 48 horas-----	101
5.2.1.1. Efeitos das CL ₅₀ de <i>Bidens pilosa</i> sobre a eclosão de <i>Subulina octona</i> , expostos por 24 e 48 horas-----	101
5.2.1.2. Efeitos das CL ₅₀ de <i>Mikania glomerata</i> sobre a eclosão de <i>Subulina</i> <i>octona</i> expostos por 24 e 48 horas-----	103
5.2.2. Experimento II- Sobrevivência da prole proveniente dos ovos expostos aos tratamentos-----	106
5.2.2.1. Sobrevivência da prole proveniente dos ovos tratados com a CL ₅₀ de <i>Bidens pilosa</i> , expostos por 24 e 48 horas-----	106
5.2.2.2. Sobrevivência da prole proveniente dos ovos tratados com a CL ₅₀ de <i>Mikania glomerata</i> , expostos por 24 e 48 horas-----	110
5.2.3. Experimento III- Efeitos da CL ₅₀ sobre a sobrevivência, crescimento e reprodução de jovens recém eclodidos tratados com <i>Bidens pilosa</i> e <i>Mikania</i> <i>glomerata</i> expostos por 24 e 48 horas-----	111
5.2.3.1. Efeitos da CL ₅₀ sobre a sobrevivência, crescimento e reprodução de recém-eclodidos tratados com <i>Bidens pilosa</i> , expostos por 24 e 48 horas-----	111
5.2.3.2. Efeitos da CL ₅₀ sobre a sobrevivência, crescimento e reprodução de	

jovens recém eclodidos de <i>Subulina octona</i> tratados com <i>Mikania glomerata</i> , expostos por 24 e 48 horas-----	116
5.2.4. Experimento IV- Efeitos da CL ₅₀ sobre a sobrevivência, crescimento e reprodução de jovens de 30 dias de <i>Subulina octona</i> tratados com <i>Bidens pilosa</i> e <i>Mikania glomerata</i> , expostos por 24 e 48 horas-----	119
5.2.4.1. Efeitos da CL ₅₀ sobre a sobrevivência, crescimento e reprodução de jovens de 30 dias de <i>Subulina octona</i> tratados com <i>Bidens pilosa</i> , expostos por 24 e 48 horas-----	119
5.2.4.2. Efeitos da CL ₅₀ sobre a sobrevivência, crescimento e reprodução de jovens de 30 dias de <i>Subulina octona</i> tratados com <i>Mikania glomerata</i> , expostos por 24 e 48 horas-----	123
5.3. CONCLUSÕES-----	127
5.4. REFERÊNCIAS BIBLIGRÁFICAS-----	128
CONSIDERAÇÕES FINAIS-----	144
GLOSSÁRIO-----	145

INTRODUÇÃO

Estudos que visam o controle de moluscos tem se intensificado nos últimos anos devido à importância epidemiológica que esses apresentam. Em espécies terrestres, além da importância médico-veterinária apresentam ainda prejuízos na agricultura por atuar como praga de culturas. Dentre as espécies de moluscos terrestres que atuam como hospedeiro intermediário de vários parasitos encontra-se a espécie *Subulina octona* (Bruguière, 1789) (Subulinidae). Esses registros não ocorrem apenas com relação aos helmintos de animais, mas também com relação a alguns parasitos do homem (ALICATA, 1940; CALDEIRA et al., 2007; RIBEIRO, 2004). Essa espécie apresenta distribuída em todo território brasileiro sendo geralmente encontrada em locais úmidos e sombreados, como jardins e hortas (ARAÚJO & BESSA, 1993). Seu hábito alimentar herbívoro e sua elevada capacidade reprodutiva caracteriza-a como praga agrícola (BESSA & ARAÚJO, 1995a, 1995b). Além disso, essa espécie atua como um bom modelo biológico por ser uma espécie facilmente criada em laboratório facilitando estudos de várias naturezas, como biologia, ciclo de vida de helmintos e em testes com substâncias moluscidas (BESSA & ARAÚJO, 1995a, 1995b; BESSA et al., 2000, FERREIRA et al., 2009; NASCIMENTO, 2008; SOUZA, 2003) além de estudos comportamentais (D'ÁVILA et al., 2006).

Visando menores impactos ambientais a Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 1983) recomenda o uso de extratos vegetais como substituição aos moluscidas sintéticos. Entretanto, alguns moluscidas sintéticos ainda são utilizados e esses apresentam uma elevada toxidez ao ambiente (GASPAROTTO et. al., 2005), muitos são à base de metaldeído, substâncias medianamente tóxicas para outras espécies de animais. A niclosamida (2,5-dicloro-4-nitrosalicilanilida) é o único moluscida sintético recomendado pela OMS (WHO, 2002), todavia, o seu alto preço, alto custo operacional, danos ambientais (Ministério da Saude, 2008) e dificuldade de formulação (WHO, 1965) dificultam a sua utilização.

Desta forma, pesquisas sobre moluscidas de origem vegetal tem se intensificado nos últimos anos, porém, a escolha da espécie vegetal deve ocorrer de forma criteriosa, pois muitos apresentam considerável toxidez ao homem. Para que uma substância possa ser utilizada como moluscida, esta deve atender a determinadas características indispensáveis a qualquer praguicida, tais como, toxidez em todos os estágios de vida do molusco, ativo em baixas concentrações, inofensivo ao homem e aos animais, facilidade de preparação e aplicação além de apresentar baixo custo (MARSTON & HOSTETTMAN, 1985; Ministério

da Saude, 2008; MOTT, 1987). Todavia, são poucos os estudos realizados com a flora brasileira em moluscos terrestres sendo a maioria direcionada aos aquáticos, em especial ao gênero *Biomphalaria* (Preston, 1910).

Diversos estudos têm evidenciado a atividade moluscicida de várias espécies da família Asteraceae sobre espécies aquáticas (HMAMOUCIU et al., 2000; BARDÓN et al., 2007; MENDES et al., 1999). Esses resultados indicam o potencial de espécies dessa família para tal utilização.

As espécies *Bidens pilosa* Linné e *Mikania glomerata* Sprengel, ambas pertencentes a essa família, apresentam-se amplamente distribuída em todo território brasileiro, conhecidas popularmente como “picão preto” (ADEGAS et al.; 2003) e “guaco” (ROCHA et al., 2008), respectivamente. Os princípios ativos presentes nesses vegetais, flavonóides, taninos e saponinas, são conhecidos pela sua atividade biocida, inclusive moluscicida (CANTANHEDE et al., 2010; FILHO, 2010; SCHAUFEBBERGER & HOSTETTMANN, 1983; SIMÕES, et al., 2010) e apresentam como grande vantagem a solubilidade em água, fato que torna o processo de extração ecologicamente correto e menos dispendioso economicamente.

O presente estudo teve como objetivo identificar a presença desses princípios ativos nos extratos aquosos *B. pilosa* e *M. glomerata*, e avaliar a ação moluscicida sobre *S. octona*, calcular as concentrações de referência (CL₅₀ e CL₉₀) e avaliar os efeitos das CL₅₀ sobre a eclodibilidade, sobrevivência, crescimento e reprodução de *S. octona* nas diferentes fases de vida a partir de 24 e 48 horas de exposição aos tratamentos, bem como verificar a atividade repelente desses extratos sobre os adultos.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Subulina octona* (Brugüière, 1789) (Subulinidae)

Subulina octona (Brugüière, 1798) (Subuliniade) é um gastrópode pulmonado com ampla distribuição geográfica, sendo encontrado na América tropical (DUNDEE 1974), Caribe (DEISLER & ABBOTT, 1984), na América do Norte e na Europa (Grã-Bretanha, Irlanda, Dinamarca e Alemanha) (JUŘIČKOVÁ, 2006). Foi registrada pela primeira vez no Brasil nos estados da Bahia e Ceará (FISHER & CROSSE, 1878) (Fotografia 1). Devido ao comércio de vegetais, sua presença é comum em várias regiões do Brasil, foi relatada nos estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais, Pará, Amapá, Bahia, Amazonas, Rio Grande do Sul, São Paulo, Rondônia e Paraná (ARAÚJO & BESSA, 1993). Ocorre em florestas tropicais e subtropicais, e também em ambientes abertos (ALVAREZ & WILLIG, 1993), bem como em jardins e hortas (ARAÚJO & BESSA, 1993).

Sua presença é mais frequente em épocas quentes e chuvosas do ano. Habita o solo, sob pedras e fragmentos de madeira e alimenta-se preferencialmente de vegetais tenros ou fragmentáveis (ARAÚJO, 1982).

Tal espécie apresenta significativa importância médica e veterinária, participando como hospedeiro intermediário no ciclo de parasitos de humanos e animais domésticos, tais como *Platynossomun illiciens* (Braun, 1901) parasito do gato doméstico (MALDONADO, 1945), *Postharmostomum gallinum* (Witenberg, 1923) (Brachylaimidae) de aves domésticas (ALICATA, 1940), *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) de canídeos, *Aleurostrongylus abstrusus* (Railliet, 1898) do gato doméstico (Angiostrongylidae), *Paratanaisia bragai* (Santos, 1934) Freitas, 1959 (Digenea, Eucotylidae) de aves domésticos e *Davainea proglottina* (Davaine, 1860) (Davaineidae) de galináceos (ARAÚJO & BESSA, 1993).

O primeiro registro da participação de *S. octona* no ciclo de *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Angiostrongylidae), parasito de roedores e humanos, foi feito em Porto Rico (ANDERSEN et al., 1986). No Brasil Caldeira et al. (2007) apresentaram o primeiro registro da presença desse parasito em *S. octona*, coletada no estado do Espírito Santo. Carvalho et al. (2011) coletaram várias espécies de moluscos de regiões portuárias da costa brasileira para verificar a possível presença de *A. cantonensis*. Constataram a presença desse helminto em várias espécies entre elas, *S. octona*. Esses autores relataram ainda que a

presença desse helminto foi verificada em cerca de 36% dos portos, o que segundo eles indica uma ampla distribuição pela costa brasileira. Bessa *et al* (2000) verificaram a evolução larval de *A. vasorum* em *S. octona* e a infectividade de larvas de terceiro estágio provenientes de *S. octona*, para cães.

Platynosomum concinnum (Braun, 1901) (Trematoda, Dicrocoeliidae) é um trematódeo que habita os ductos biliares e a vesícula biliar de gatos e tem como hospedeiro intermediário a espécie *S. octona* (RIBEIRO, 2004).

O ciclo de vida do *Platynosomum fastosum* (Kossack, 1910) (Trematoda, Dicrocoeliidae), parasito do fígado mais importante de gatos domésticos, necessita de hospedeiros intermediários, sendo o primeiro a espécie *S. octona* (LIMA et al., 2008).

Bessa & Araújo (1995a) verificaram a ocorrência de autofecundação em indivíduos isolados de *S. octona* e maturidade sexual ocorrendo entre o 38° e 50° dia de vida. Verificaram também o período de eclosão dos filhotes, ocorrendo entre o 1° e o 15° dia, após a postura e uma viabilidade dos ovos de aproximadamente 95%. Em outro estudo, constataram a influência da temperatura sobre a fecundidade, sendo observado maior número de oviposições nos meses de fevereiro, março e abril, em contraste para os meses de maio, junho e julho (BESSA & ARAÚJO, 1995b). Os ovos são depositados no fundo da caixa, através de fendas abertas na terra pelo próprio molusco ao enterrar-se. Esses mesmos autores verificaram também que a espécie *S. octona* apresenta atividade noturna, o que também foi verificado por D'ávila (2003).

Durante o período de atividade reprodutiva, os ovos são vistos no útero devido a transparência da concha (ARAÚJO, 1982; BESSA & ARAÚJO, 1995b, D'ÁVILA, 2005a).

D'ávila & Bessa (2005b) verificaram um menor crescimento de *S. octona* quando criados em terra vegetal em comparação com os criados com areia e argila. Segundo essas autoras o consumo de substrato em detrimento ao consumo de ração pode ser a justificativa para tal ocorrido. Neste mesmo trabalho as autoras verificaram um declínio progressivo do aumento do crescimento após o alcance da maturidade sexual e observaram uma relação positiva entre o aumento do tamanho corporal com a produção de ovos.

Segundo D'ávila et al. (2011) essa espécie é ovovíparo devido a retenção dos ovos no oviduto e liberação no ambiente em estágio avançado de desenvolvimento embrionário.

D'ávila et al. (2006) descreveram o comportamento de *S. octona* como sendo agregativo, concluíram ainda que esse comportamento pode ser uma estratégia para a resistência a dessecação e para o encontro de parceiros sexuais em espécies que apresentam a capacidade de deslocamento limitada, como é o caso de moluscos terrestres. Segundo D'ávila

(2003) essa espécie apresenta baixa capacidade de deslocamento vertical movimentando-se de modo preferencial horizontalmente no substrato.

Dias et al. (2007) verificaram a influência da umidade do substrato sobre a resistência à dessecação desse molusco. Indivíduos foram distribuídos em grupos com substrato seco e grupos com substrato úmido, esses foram expostos a 35°C por 48 horas. Ao final do experimento foi constatada a mortalidade de todos os indivíduos dos grupos com substrato seco enquanto os dos potes úmidos sobreviveram.

Souza (2003) verificou a atividade moluscicida da cafeína e do timol sobre *S. octona* encontrando para as duas substâncias um efeito tóxico para ovos, jovens e adultos.

Trabalhos em laboratório tem sido realizados com o objetivo de encontrar substâncias com potencial moluscicida para o controle desse molusco (FERREIRA et al., 2009; FRANÇA et al., 2009; GOMES, 2008; NASCIMENTO, 2008; SOUZA, 2009).

2.2 . Moluscidas vegetais

A partir da década de 1930 começaram a surgir os primeiros trabalhos com moluscidas vegetais. Deste então já foram estudadas cerca de 1.100 espécies vegetais no mundo (Mott, 1987) só no Brasil foram aproximadamente 360 aproximadamente (JURBERG et al., 1989). As primeiras espécies vegetais estudadas no Brasil foram as *Serjania spp* e *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae) e a atividade moluscicida dos extratos aquosos sobre *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Planorbidae) foi associada à presença de saponinas.

Devido aos problemas causados pelos moluscidas sintéticos a OMS (WHO, 1983) recomenda o uso de moluscida de origem vegetal devido aos menores impactos ambientais. Porém existem muitos pré-requisitos para que uma determinada planta possa ser utilizada como moluscida. As espécies vegetais devem ser abundantes e apresentar desenvolvimento contínuo, os princípios ativos devem ser solúveis preferencialmente em água (SILVA et al. 2002). Além disso, os extratos devem ser de fácil preparação e aplicação não apresentar toxidez ao homem, a fauna e a flora e ser ativo em baixas concentrações em todas as fases de desenvolvimento do molusco (JURBERG et al., 1989; WHO, 1965),

Com o objetivo de adquirir produtos com ação moluscicida a partir de extratos vegetais, muitos autores se dedicaram à pesquisa com plantas regionais, principalmente espécies ornamentais e medicinais quanto à possível ação sobre moluscos.

Jurberg et al. (1989) fizeram um levantamento de plantas testadas no Brasil quanto ao efeito moluscicida para as espécies do gênero *Biomphalaria*, sendo 26 espécies em 19 diferentes famílias apresentaram mortalidade em concentrações inferiores a 100 ppm, com a família da Euphorbiaceae com duas espécies e Sapindaceae com uma espécie apresentando 100% de mortalidade nas concentrações inferiores a 100 ppm.

Afonso-Neto (2003) testou a atividade moluscicida do látex de três espécies de euphorbias, *E. cotinifolia* L., *E. milii* desMoul. var. *splendens* (Bojer ex Hook) Ursch & Leandri e *E. tirucalli* L. Sendo a espécie *E. splendens* atingindo elevada ação moluscicida sobre a espécie *Leptinaria unimellata* d'Orbigny, 1865 (Subulinidae) nas diluições do látex em água na proporção de 1:10 e 1:100.

Nascimento et. al. (2006) verificaram mortalidade de 80% de recém eclodidos para *Bradybaena similares* (Férussac, 1821) (Bradybaenidae) nas concentrações de 1:10 e 1:100 do extrato aquoso de *Alamanda cathartica* L. (Apocynaceae).

Silva et al. (2006) verificou que das sete espécies de *Solanum* coletadas no Nordeste do Brasil seis apresentaram atividade moluscicida contra *B. glabrata*.

Mello-Silva et al. (2006) utilizando uma dose subletal de 0,16 g de *Solanum malacoxylon* (Sendter) (Solanaceae) sobre *B. glabrata* e constataram alterações fisiológicas no metabolismo de carboidratos, o que levou a diminuição das reservas de glicogênio nos tecidos. Esses autores também verificaram o aumento da concentração de proteínas totais e ácido úrico na hemolinfa dos moluscos o que indica a degradação dessa como fonte de produção de energia devido a intoxicação dos animais.

Lustrino et al. (2008) verificou alterações das concentrações nos depósitos de carboidratos da espécie *B. similaris* expostos aos extratos aquosos de *A. cathartica* L. (Apocynaceae), verificaram ainda que, a exposição ao pó das sementes alterou severamente o metabolismo de carboidratos.

O látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii* reduziu a fecundidade de *B. glabrata* Mello-Silva et al. (2007). O látex dessa mesma espécie reduziu significativamente as reservas de glicogênio de *Achatina fulica* (Bowdich, 1822) (Achatinidae) (OLIVEIRA, 2007).

Souza et al. (2009) verificaram atividade repelente do extrato aquoso de *A. cathartica* sobre adultos de *S. octona* e *Dysopeas muibum* (MARCUS & MARCUS, 1968) (Subulinidae). Essa atividade sobre *S. octona* para diferentes vegetais também é compartilhada por outros autores (FRANÇA et al., 2009; NASCIMENTO, 2008) e observada para outras espécies terrestres (AFONSO-NETO, 2003; NASCIMENTO et al., 2006).

Nascimento (2008) testou extratos aquosos de *Furcraea foetida* (L.) (Agavaceae) sobre *S. octona* com a presença e ausência de substrato, os resultados mostraram uma maior ação moluscicida dos grupos em potes com a ausência de substrato. Neste mesmo trabalho a autora não verificou alteração sobre o crescimento e fecundidade desse molusco. Essa mesma espécie de molusco teve a eclodibilidade e sobrevivência dos jovens reduzida após aplicação da CL₅₀ do extrato aquoso de *Solanum paniculatum* (SILVA et al., 2011).

Souza et al. (2011) verificaram a redução no consumo de ração de *A. fulica* após sucessivas aplicações do extrato aquoso de *Solidago microglossa* D.C. (Asteraceae).

A baixa atividade ovicida de extratos vegetais tem sido relatada por alguns autores. Leyton et al. (2005) não verificaram atividade dos extratos aquosos e alcoólicos das folhas de *Lycopersicon esculentum*, Mill. (Solanaceae) sobre ovipostura de *B. glabrata* nas concentrações que foram letais para os adultos. Extratos hexânicos das folhas de *E. cotinifolia* foram ativos sobre ovipostura de *B. glabrata* em concentrações aproximadamente 20 vezes superiores às eficazes nos adultos (PEREIRA et al., 1978).

Espécies da família Asteraceae já foram estudadas quanto ao efeito moluscicida. Mendes et al. (1999) testaram a ação de 66 espécies dessa família sobre adultos da espécie *B. glabrata* e detectaram atividade moluscicida nos extratos etanólico de seis espécies, *Achyrocline satureoides* (Lam.) D.C., *Actinoseris angustifolia* (Gardn.) (Cabr.), *Alomia myriadenia* Baker; *Piptocarhpa rotundifolia* Baker e *Vanillosmopsis erythropappa* Sch. Bip., *Verbesina claussoni* Sch. Bip. Hmamouchiu et al., (2000) obtiveram resultados positivos com a espécie *Artemisia herba alba* Asso (Asteraceae) sobre *B. truncatus* no Marrocos. Para esse vegetal foi mencionada a presença de flavonóides e saponinas. Bardón et al. (2007) também verificaram a atividade moluscicida dos extratos de 14 espécies vegetais dessa família coletadas na Bolívia e Argentina sobre *B. peregrina*.

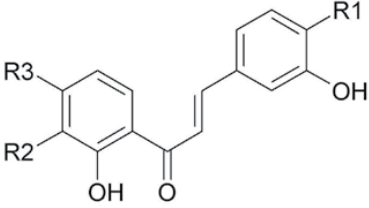
2.3. *Bidens pilosa* Linné (Asteraceae)

A espécie *Bidens pilosa* L. pertence à família Asteraceae, originária da América tropical largamente distribuída em várias regiões do mundo. Ocorre amplamente em regiões tropicais sendo classificada como planta invasora, crescendo espontaneamente em todos os solos agrícolas e em outras áreas exploradas pelo homem formando densas infestações (KISSMANN & GROTH, 1992; ADEGAS et al.; 2003) (Fotografia 2). No Brasil, é

geralmente conhecida como “picão-preto” (ADEGAS et al.; 2003) de ciclo anual e curto e com capacidade de produzir até três gerações por ano (LORENZI, 2000). É utilizada na medicina popular para tratamento de várias doenças entre elas, hepatite febre, angina, diabetes, infecções e inflamações (KUMARI, 2009; RAIN TREE NUTRITION).

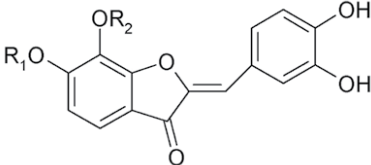
Análises fotoquímicas dessa espécie revelaram uma ampla constituição química, sendo poliacetilênicas e flavonóides as principais substâncias já isoladas dessa planta (BRANDÃO et al., 1997). Vários princípios ativos já foram identificados em extratos aquosos e etanólicos, entre eles, compostos fenólicos, taninos condensados, saponinas, açúcares redutores e pectinas (BORGES, 2009; GUTIÉRREZ et al., 1998; VALDÉS & REGO, 2001), flavonóides, especificamente as chalconas, (HOFFMANN & HOLZL, 1988), auronas e flavonas (HU et al., 1994), desses flavonóides algumas estruturas já foram isoladas e elucidadas (Quadros 1 e 2).

Quadro 1: Chalconas descritas para a espécie *Bidens pilosa* L.

			
R1	R2	R3	Nome
OH	OH	OH	Ocanina
OH	H	OH	Buteina
OH	OGlc	OH	Mareina
CH3	OGlc	OH	
OH	OH	(2'',4'',6''-triacetil)-glicose	
OH	OH	O-gentiobiose	
OH	OH	OGlc	
OH	OH	6''-acetil-glicose	
OH	OH	(4''-acetil-6''-p-cumaroil)-glicose	
OH	OH	(2'',4''-diacetil-6''-p-cumaroil)-glicose	
OH	OH	(3'',4''-diacetil-6''-p-cumaroil)-glicose	
OH	OH	(6''-p-cumaroil)-glicose	
OH	H	OGlc	Coreopsina

Fonte: Lucchetti et al. (2009)

Quadro 2: Auronas descritas para a espécie *Bidens pilosa* L.

		
R1	R2	Nome
H	b-D-glucopiranosil	(Z)-7-O-b-D-glucopiranosil-6,7,3',4'-tetraidroxiaurona
H	H	Maritimetina
6-O-p-cumaroil-b-Dglucopiranosil	H	(Z)-6-O-(6-O-p-cumaroil-b-D-glucopiranosil)-6,7,3',4'-tetraidroxiaurona
6-O-acetil-b-D-glucopiranosil	H	(Z)-6-O-(6-O-acetil-b-Dglucopiranosil)-6-7-3',4'-tetraidroxiaurona
b-D-glucopiranosil	H	(Z)-6-O-b-D-glucopiranosil-6,7,3',4'-tetraidroxiaurona
3'',4'',6''-triacetil-b-Dglucopiranosil	H	(Z)-6-O-(3'',4'',6''-triacetil-b-D-glucopiranosil)-6,7,3',4'-tetraidroxiaurona
2'',4'',6''-triacetil-b-Dglucopiranosil	H	(Z)-6-O-(2'',4'',6''-triacetil-b-D-glucopiranosil)-6,7,3',4'-tetraidroxiaurona

Fonte: Lucchetti et al. (2009)

Gutiérrez et al., (1998) obtiveram uma DL_{50} do extrato etanólico desse vegetal em ratos de 7494 mg/kg, que segundo eles classifica essa espécie com praticamente não tóxicas.

Haida et al., (2007) verificaram a atividade antimicrobiana dos extratos aquosos e etanólicos de *B. pilosa* à 50% devido a atividade sobre *Escherichia coli*.

A ação anti-diabética do extrato metanólico e de uma mistura de dois poliacetilenos foi constatada em modelos de ratos diabéticos, evidenciada pela diminuição da concentração de glicose no sangue desses (CHIEN et al., 2009). O extrato aquoso apresentou atividade anti-

hiperglicêmica onde foi observada uma diminuição de glicose no sangue de ratos na dose de 50mg/Kg e um aumento dos níveis séricos de insulina (HSU et al., 2008).

Bach & Silva (2010) verificaram que o extrato aquoso dessa planta na concentração de 10% não interfere na germinação plântulas de *Lactuca sativa* L. (Compositae).

2.4. *Mikania glomerata* Sprengel (Asteraceae)

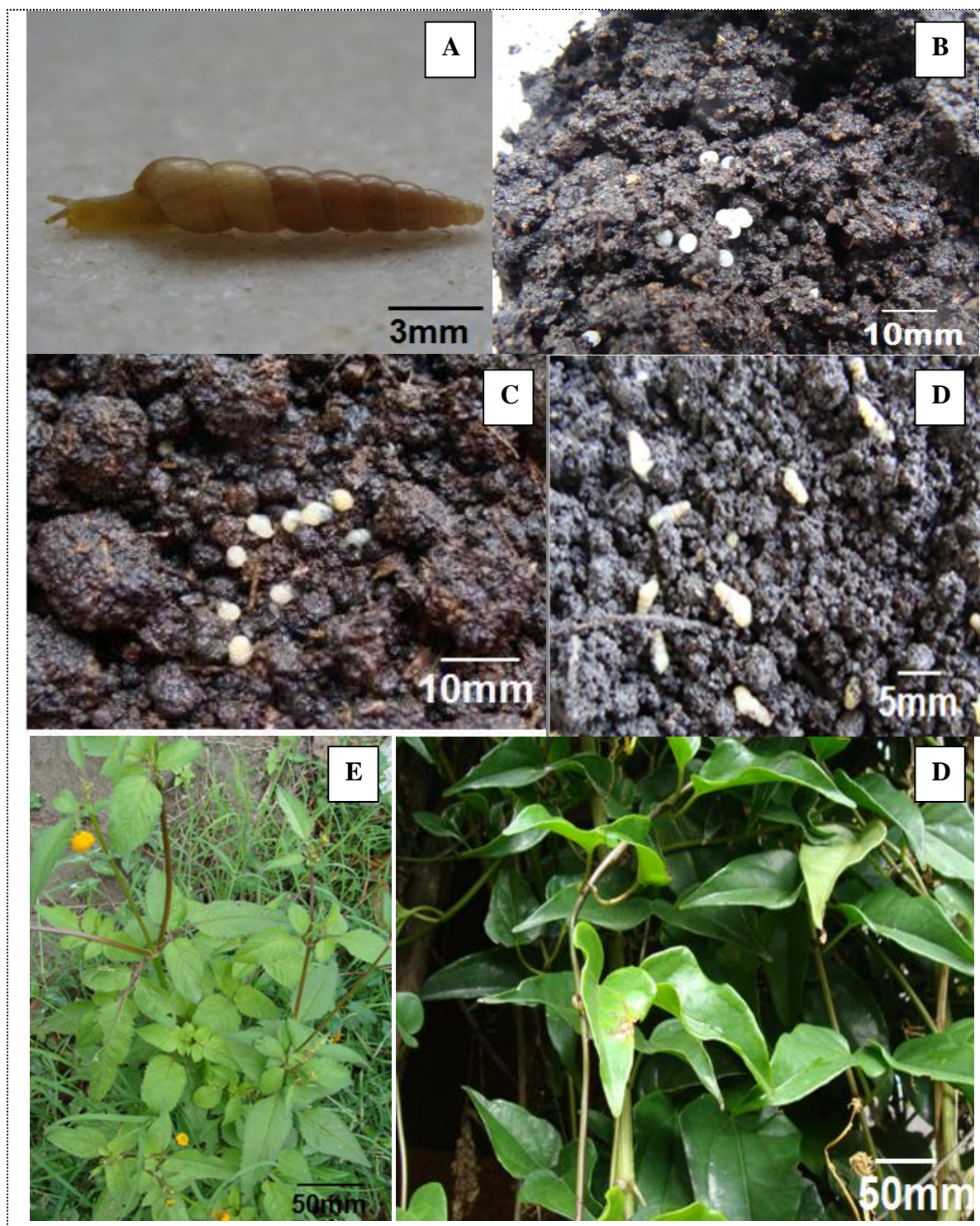
O gênero *Mikania*, pertencente à família Asteraceae apresenta cerca de 430 espécies distribuídas principalmente na América do Sul. No Brasil, são aproximadamente 171 espécies, sendo sua principal área de dispersão os estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo. (OLIVEIRA, 1972). *Mikania glomerata* Sprengel é conhecida popularmente como “guaco”, (ROCHA et al., 2008), “coração-de-jesus”, “guaco-liso”, “cipó-caatinga” e “erva-de-cobra” (BRANDÃO et al., 2006) Fotografia 3.

Ocorre no Brasil, Paraguai, Argentina e Uruguai como um vegetal subarborescente trepador, o caule quando seco, apresenta fratura fibrosa e aspecto estriado (NEVES & SÁ, 1991). É encontrada principalmente nas margens dos rios, onde cresce espontaneamente em matas primárias, capoeiras, capoeirões, orla de matas, terrenos de aluvião, várzeas sujeitas a inundações, possui também boa adaptação ao cultivo doméstico, reproduz-se por sementes ou pelo plantio de estacas do caule, de preferência em terrenos arenosos e úmidos.

Diversos trabalhos na literatura relatam as atividades bactericida, anti-ofídica, antialérgica e anti-inflamatória dessa espécie (FRIERRO et al., 1999; HOLETZ et al., 2002; SALGADO et al., 2005; SOARES et al., 2002).

Estudos fitoquímicos apontaram a presença de cumarinas, esteróides e triterpenóides no extrato etanólico e no extrato aquoso foi evidenciada a presença de taninos condensados e hidrolisados, glicosídeos saponínicos e ácidos voláteis (LIMA, 2003)

Em outras análises foram verificados lupeol, ácidos diterpênicos, grandiflórico, caurenol, friedelina, triterpenóides (OLIVEIRA et al., 1984; TALEB-CONTINI, 2006; VENEZIANI & OLIVEIRA, 1999) e flavonóides (BOUZADA et al. 2007). Todavia, Bolina et al. (2009) não verificaram a presença de saponinas, taninos e de polifenóis no extrato etanólico dessa espécie. A ausência de taninos nos extratos alcóolicos também é compartilhada por Bouzada et al. (2007).



Fotografia 1: Espécies vegetais e *Subulina octona* em diferentes estágios de desenvolvimento. (A) Adulta (B) ovos (C) recém-eclodidos (D) Jovens de 30 dias de idade; E) *Bidens pilosa*; F) *Mikania glomerata*. Fonte: Do autor

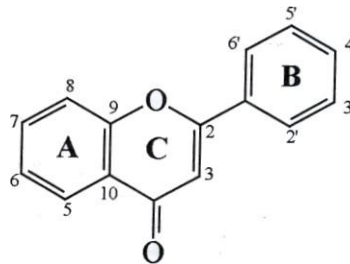
2.5. Metabólitos secundários com atividade moluscicida presentes em *Bidens pilosa* Linné e *Mikania glomerata* Sprengel (Asteraceae)

2.5.1. Flavonóides- Características gerais e efeito tóxico sobre moluscos

Os flavonóides representam uma importante classe de polifenóis, forma um grupo diversificado entre os produtos de origem natural, presente em relativa abundância entre os metabólitos secundários. São representados por 10 classes estruturais: antocianina, leucoantocianina, flavonol, flavona, glicoflavonóide, biflavonóide, chalcona, aurona, flavanona e isoflavona (HARBORNE, 1976; 1994). A maioria dos representantes dessa classe possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, e duas fenilas¹ ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas (Estrutura 1).

Os flavonóides de origem natural apresentam-se, frequentemente oxigenados, onde um grande número ocorre conjugado com açúcares, desta forma conjugada são conhecidos como heterosídeos. Os heterosídeos são geralmente solúveis em água e em alcoóis diluído (SIMÕES et al., 2010), as auronas, geralmente são encontradas nessa forma.

Diversas funções são atribuídas a essa classe entre elas, proteção dos vegetais contra insetos-praga, fungos e bactérias (SIMÕES et al., 2010).



Estrutura 1: Núcleo fundamental dos flavonóides e sua numeração
Fonte: Simões et al. (2010)

Os flavonóides de maneira geral são identificados por reação colorimétrica com substâncias básicas onde apresentam coloração amarela que pode variar com a intensidade

¹ Fenilas: Radical derivado do benzeno.

(MOUCO et al., 2003). Já as chalconas e auronas são identificadas devido a mudança da coloração amarela que passa à vermelha em meio alcalino. (SIMÕES et al., 2010).

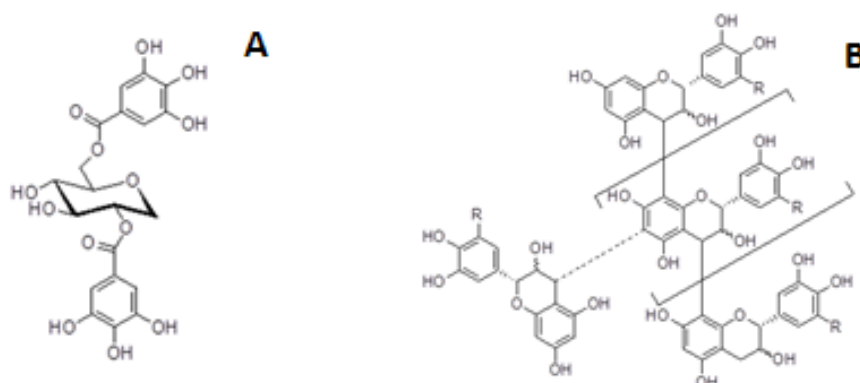
Lopes et al. (2011) verificaram a atividade moluscicida do extrato hidroalcoólico das folhas de *Caryocar brasiliense* Camb. em *B. glabrata* (Say, 1818) (Planorbidae). A análise fitoquímica desta planta constatou dentre outros princípios ativos, a presença de flavonóides, mais especificamente os grupos flavononas e flavononóis.

O extrato hidroalcoólico de *S. saponaria* foi avaliado quanto ao seu efeito moluscicida apresentando resultados positivos a 200ppm. Estudos fitoquímicos apontaram a presença de alto teor de flavonóides e saponinas (TSUZUKI, et al., 2004).

2.5.2. Tanino- Características gerais e efeito tóxico sobre moluscos

Os taninos são compostos químicos secundários de origem natural que caracterizam-se devido a presença de uma estrutura fenólica (polifenóis), sendo solúveis em água (SIMÕES et al., 2010). Esse termo é largamente utilizado para designar qualquer grande composto polifenólico contendo suficientes grupos hidroxila para formar complexos fortes com proteínas e outras macromoléculas, promovendo sua precipitação (NETO & CAETANO, 2005). São metabolizados pelas plantas e apresentam função de defesa encontrada em quase todas as famílias botânicas, podem ser divididos em dois grandes grupos: Os taninos condensados (pro-antocianidinas) e os hidrolisáveis.

Os taninos hidrossolúveis são poliésteres do ácido gálico ou dos derivados, são caracterizados por um poliol central cujas funções hidroxilas são esterificadas com o ácido gálico (Estrutura 2A), já os condensados são polímeros que produzem antocianidinas, sob hidrólise ácida, provenientes de flavonóides (Estrutura 2B) (SIMÕES et al., 2010).



Estrutura 2: Estruturas de moléculas de taninos. A - tanino hidrolisável: Aceritanino; B - tanino condensado - modelo de estrutura. Fonte: Sociedade Brasileira de Farmacognosia.

O efeito moluscicida de plantas taníferas foi comprovado por Schaufebberger & Hostettmann (1983), que retirando o componente químico, tanino, dos extratos, verificou que estes não mais apresentaram efeito moluscicida. Marston & Hostettmann (1985) demonstraram que plantas como *Krameria triandra* Ruiz & Pav., *Hammamelis virginiana* e *Quercus* sp. ricas em taninos, apresentaram efeito moluscicida. Os autores enfatizaram que os taninos poderão constituir uma classe promissora de produtos naturais com efeito tóxico.

A atividade moluscicida do extrato etanólico de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. (Mimosoideae) sobre *B. glabrata* foi atribuída a presença de taninos condensados (BEZERRA, 2002). Cantanhede et al. (2010) em estudo de revisão, apontou os taninos como uma das classes de compostos com reconhecida atividade moluscicida.

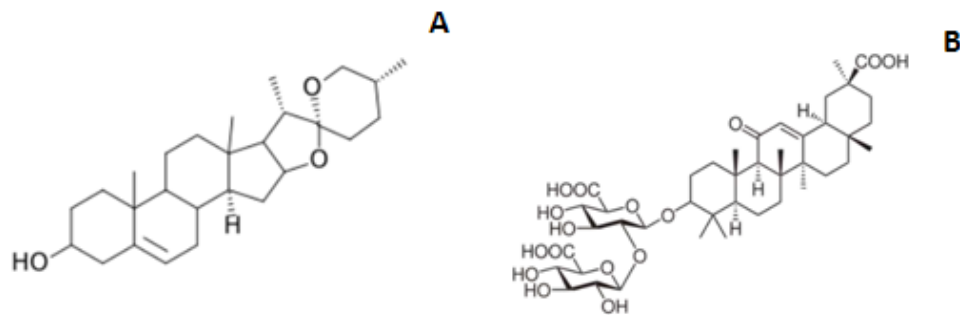
A complexação entre taninos e proteínas é considerada a base da sua atividade biológica para o controle de insetos-praga, fungos, bactérias e de suas propriedades farmacológicas (AERTS et al., 1999).

A estrutura molecular dos taninos é facilmente oxidável pela ação de enzimas vegetais específicas e por metais, como cloreto férrico, o que ocasiona o escurecimento de suas soluções (MELLO & SANTOS, 2001). Alguns testes colorimétricos são frequentemente utilizados para sua detecção. O teste com solução de gelatina fornece um precipitado ou turvação da solução, porém esse teste não é específico devido a resposta positiva de outros compostos fenólicos. Outro teste conhecido é a precipitação de taninos com cafeína ou soluções de cinchonina. Com o objetivo de diferenciar os grupos de taninos emprega-se o teste com cloreto férrico, onde os taninos condensados apresentam coloração esverdeada e os hidrolisáveis azul intenso (SIMÕES et. al., 2010). O teste de Stiasny é frequentemente

utilizado para quantificar taninos condensados (DOAT, 1978; PAES et al., 2006, TRUGILLHO et al., 1997).

2.5.3. Saponinas – Características gerais e efeito tóxico sobre moluscos

Quimicamente as saponinas são heterósidos de genina² esteróide ou triterpênica, possui uma parte com característica lipofílica (triterpeno ou esteróide) e outra parte hidrofílica (açúcares) (SCHENKEL et al., 2007). As saponinas esteroidais e triterpênicas apresentam distribuição diferenciada no reino vegetal. As esteroidais neutras são encontradas quase que exclusivamente em monocotiledôneas enquanto as triterpênicas encontram-se predominantemente em dicotiledôneas (SIMÕES et al., 2010) (Estruturas 3A e B).



Estrutura 3: Estruturas de saponinas. A - estrutura básica de uma saponina esteroidal; B - estrutura básica de uma saponina triterpênic. Fonte: LIMA (2009)

Essa classe tem como característica comum a propriedade de reduzirem a tensão superficial da água, característica que justifica sua ação detergente, emulsificante, de formação de espuma persistente. Esta característica é a mais comum dessa classe, razão da qual deriva seu nome (do latim *sapone* = sabão) (SIMÕES et. al., 2010). O comportamento

² Genina: Metabólitos de saponinas sem a/as moléculas de açúcar.

anfifílico¹³ e a capacidade de formar complexos com esteróides, proteínas e fosfolipídeos de membranas são responsáveis por um grande número de propriedades biológicas para essas substâncias, destacando-se a ação sobre membranas celulares, alterando a sua permeabilidade, ou causando sua destruição, essas propriedades podem justificar sua ação hemolítica e moluscicida (SCHENKEL et al., 2003).

Duas saponinas isoladas do extrato etanólico submetidos a partição em acetato de etila de *Swartzia langsdorffii* Raddi (Leguminosae) apresentaram atividade antifúngica para fungos patogênicos humanos *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans* (MARQUI et al., 2008).

Desde a descoberta de saponinas com potencial moluscicida isoladas de *Phytolacca dodecandra* L'Hér (Phytolaccaceae) essa classe de compostos tem merecido uma atenção especial (THILBORG et al., 1996). A presença de saponinas em algumas espécies de vegetais tem sido apontadas como responsável pelos efeitos moluscicidas em muitos trabalhos. Lemmich et al., (1995) obtiveram resultados positivos quanto ao efeito moluscicida para *B. glabrata* expostos ao extrato etanólico de *Catunaregam nilótica* (Stapf) Tirveng. Rubiaceae obtendo uma CL₅₀ de 3ppm. Após a análise cromatográfica do extrato foram identificadas quatro saponinas, que foram relacionadas a mortalidade dos moluscos.

O extrato metanólico bruto de *Gymnema sylvestre* R. Br. (Asclepiadaceae) foi fracionado e a fração metanólica desempenhou uma maior atividade moluscicida sobre *B. glabrata* e a essa atividade foi atribuída a presença de compostos hemolíticos evidenciados por cromatografia de camada delgada, supostamente saponinas (BRUSTOLIN & CORTEZ, 2000).

Treyvaud et al., (2000) evidenciaram a atividade moluscicida dos extratos metanólicos e aquosos de *P. dodecandra*, que contém 25% de saponinas nas bagas secas, a 200µg/ml e 25µg/ml respectivamente após 24 horas de exposição para *B. glabrata*.

A seiva de *F. foetida* contendo saponinas esteróidais foi testada sobre *S. octona* e avaliados os efeitos sobre aspectos biológicos e comportamentais. Essa seiva apresentou efeito moluscicida e ovicida sobre esse molusco (NASCIMENTO, 2008).

Saponinas isoladas de extrato etanólico da casca dos frutos de *S. saponaria* demonstrou uma pronunciada atividade moluscicida (LC₁₀₀/ 24 h = 3 mg/L) contra as espécies *B. glabrosus* e *B. glabrata* (LEMOS et al., 1992). A análise química para identificar saponinas

³ Anfifílico: Toda substância de origem orgânica ou inorgânica que possui em sua estrutura química uma parte polar e hidrofílica e outra apolar e hidrofóbica.

está baseada na característica principal desse grupo que é a formação de espuma persistente em água após agitação enérgica e adição de ácido mineral diluído (SIMÕES et al., 2010). Análises semi-quantitativas podem ser realizadas calculando-se o índice de espuma ou afrosímetro segundo OMS (WHO, 1992) e Farmacopéia Brasileira (2010).

3. Prospecção fitoquímica dos extratos aquosos de *Bidens pilosa* Linné e *Mikania glomerata* Sprengel (Asteraceae) e bioensaio toxicológico em adultos de *Subulina octona* (Bruguière, 1789) (Mollusca, Subulinidae).

Várias espécies de moluscos participam como hospedeiros intermediários no ciclo de vida de parasitos hospedeiros do homem e animais domésticos. Muitos ainda atuam como pragas agrícolas, em especial, as espécies terrestres. O uso de extratos vegetais em substituição aos moluscidas utilizados tem sido recomendado pela (WHO, 1983) devido aos menores impactos ambientais.

As espécies *Bidens pilosa* Linné e *Mikania glomerata* Sprengel (Asteraceae) apresentam-se amplamente distribuídas em todo território brasileiro. Esses vegetais apresentam classes de compostos tais como, flavonóides, taninos e saponinas que apresentam elevada solubilidade em água e comprovada ação moluscida (MARSTON & HOSTETTMANN, 1985; SIMÕES et al.; 2010; TREYVAUD et al., 2000; TSUZUKI, et al., 2004). A caracterização desses princípios ativos é frequentemente realizada por meio de reações colorimétricas (MOUCO et al., 2003; LOPES et al., 2011; SANTOS, 2010).

De acordo com a OMS (WHO, 1965) deve haver uma referência para os moluscidas como forma de comparação de eficiência entre os novos e os já existentes. Frequentemente utilizam-se as CL_{50} e CL_{90} obtidas em testes toxicológicos com moluscidas como forma de comparação para as diferentes substâncias. Nesses testes alguns fatores podem influenciar no valor dessas concentrações obtidas, como o número de animais expostos, o tempo e a forma de exposição (LEITE & AMORIN, 2006). Acredita-se que 30 animais para cada grupo exposto, o tempo de 24 horas de exposição e 24 horas de recuperação e a exposição dos animais à apenas uma quantidade pequena do extrato seja o mais indicado para esses testes toxicológicos.

A maioria das pesquisas é direcionada para moluscos aquáticos, em especial para o gênero *Biomphalaria* (Say, 1818) transmissores do *Shistosoma mansoni* (Sambon, 1907) (BRUSTOLIN & CORTEZ, 2000; GASPAROTTO Jr et al., 2005; KUMAR & SINGH, 2006; LEYTON et al., 2005) que de um modo geral, seguem a metodologia preconizada pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1965). Como o propósito é a comparação de resultados torna-se necessário a padronização de técnicas que possibilitem essa análise em espécies terrestres.

O molusco terrestre *S. octona* apresenta importância epidemiológica além de atuar como praga na agricultura (ALICATA, 1940; BESSA et al., 2000; CALDEIRA et al., 2007). Em altas densidades populacionais medidas de controle tornam-se necessárias visando a prevenção de doenças, além de reduzir possíveis prejuízos gerados na agricultura. Além disso, essa espécie atua como um bom modelo biológico, facilitando estudos de várias naturezas como a biologia, comportamento e testes com moluscidas (BESSA & ARAÚJO, 1995a, 1995b; BESSA et al., 2000, FERREIRA et al., 2009; NASCIMENTO, 2008; SOUZA, 2003).

Objetivou-se com esse estudo verificar a presença de flavonóides, taninos e saponinas nos extratos aquosos das partes aéreas de *B. pilosa* e *M. glomerata* e avaliar a atividade moluscida sobre adultos de *S. octona*, através do cálculo das (CL₅₀ e CL₉₀) bem como propor uma metodologia para testes toxicológicos com moluscos terrestres.

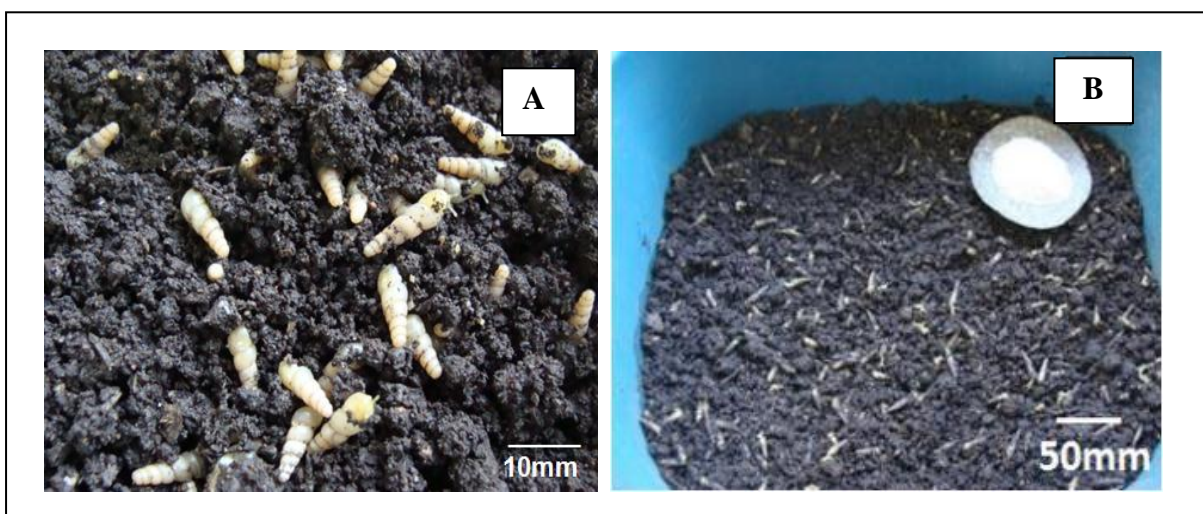
MATERIAL E MÉTODOS

3.1.1. Local dos experimentos e condições experimentais

Os experimentos foram realizados no laboratório de Biologia de Moluscos do Museu de Malacologia Prof. Maury Pinto de Oliveira da Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG. Os experimentos foram realizados sob temperatura, umidade e fotoperíodo naturais sendo registradas a temperatura média e umidade relativa do ar por termo-higrômetro (INCONTERM[®]).

3.1.2. Obtenção dos moluscos

Os moluscos adultos com idade de 60 dias e comprimento médio de concha de $9,5 \pm 1,7$ mm foram obtidos de matrizes presentes no mesmo laboratório (Fotografia 2A e 2B). Esses foram criados em recipientes de polietileno contendo como substrato terra vegetal esterilizada ($120^\circ\text{C}/1\text{h}$) e alimentados com ração para aves de corte (composição básica: proteína bruta 22%, cálcio 1,5% e fósforo 0,5%) e acrescida de carbonato de cálcio na proporção de 3:1 segundo (ARAÚJO & BESSA, 1993).



Fotografia 2: Moluscos *Subulina octona*. A - Indivíduos adultos; B – Matrizes. Fonte: Do autor.

3.1.3. Obtenção, identificação e processamento do material vegetal

As partes aéreas de *B. pilosa* foram coletadas em janeiro de 2011 no bairro São Benedito, na cidade de Juiz de Fora, MG, (S 21°45.014' HO 43°19.684' e 814 m de altitude) e *M. glomerata* (S 21° 44' 985''; HO 43° 19' 894''; 831 m de altitude) no mesmo bairro e época. As exsiccatas foram depositadas no herbário Padre Leopoldo Krieger da Universidade Federal de Juiz de Fora com registro CESJ 58.406 para *B. pilosa* e CESJ 58.407 para *M. glomerata*.

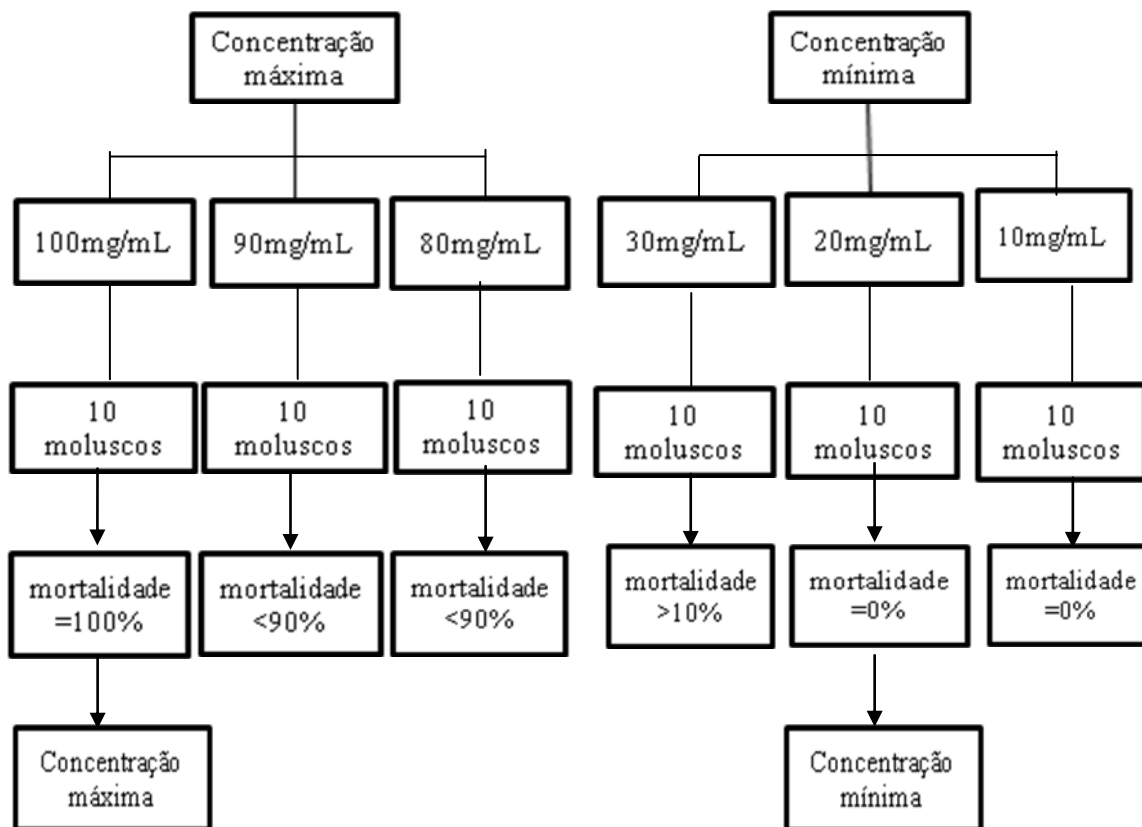
Após coletadas foram lavadas em água corrente e submetidas à secagem em temperatura ambiente por 10 dias (NETO & CAETANO, 2005) numa temperatura média de 26 ± 5 °C. As partes secas foram transferidas para recipiente plástico e mantida sob refrigeração para conservação (SIMÕES et al., 2010). Para preparação dos extratos essas foram trituradas e pesadas em balança analítica modelo Bosch SAE 200 e deixadas em processo de *maceração estática*⁴ a frio em água destilada por 72 horas seguida por uma filtração simples, e reservada a parte aquosa para a realização dos testes.

3.1.4. Testes pilotos

Para os dois extratos foram realizados testes pilotos para a determinação de duas concentrações limites. Uma concentração mínima que ocasionasse 100% de mortalidade (concentração máxima) e outra na máxima concentração que provocasse mortalidade próxima ao grupo controle (concentração mínima). Para a determinação da concentração máxima testou-se as concentrações de 100mg/mL, 90mg/mL e 80mg/mL, para a mínima foram testadas as de 10mg/mL, 20mg/mL e 30mg/mL, para esses testes foram utilizados 10 moluscos para cada concentração testada conforme Esquema 1. Dessas duas concentrações iniciais foram feitas três outras intermediárias, totalizando cinco concentrações utilizadas para o cálculo das CL₅₀ e CL₉₀ para os dois vegetais.

⁴ Maceração estática: Contato direto do vegetal com o solvente sem agitação.

As concentrações encontradas nos testes foram iguais para as duas plantas. A máxima foi de 100mg/mL e a mínima de 20mg/mL do vegetal bruto. As concentrações intermediárias determinadas foram 80mg/mL, 60mg/mL e 40mg/mL.



Esquema 1: Representação esquemática do processo adotado para a realização dos testes piloto para a obtenção das concentrações limites dos extratos aquosos de *Bidens pilosa* e *Mikania glomerata*.

3.1.5. Experimentos

3.1.5.1. Experimento I- Prospecção fitoquímica de *Bidens pilosa* Linné e *Mikania glomerata* Sprengel

➤ **Análise qualitativa de flavonóides**

Para a identificação de flavonóides foi realizado um decocto⁵ com 5g da planta seca em 100 mL de água destilada por 15 minutos. Após esse tempo as suspensões foram filtradas e usada a parte aquosa para a análise. Utilizado 2 tubos de ensaio, ao primeiro foram adicionados 5mL de solução extrativa e 5 gotas de solução de hidróxido de sódio a 10% (NaOH) e ao segundo tubo foi adicionado apenas 5 mL de extrato para o teste em branco. A presença de flavonóides é verificada pela formação da coloração amarela que varia de intensidade (MOUCO et al., 2003). A presença de chalconas e/ou auronas no extrato de *B. pilosa* é confirmada devido a formação da coloração amarela que muda para vermelho em meio básico (SIMÕES et al., 2010).

➤ **Análise qualitativa e quantitativa de taninos**

- Identificação de taninos com solução de gelatina

Realizou-se com decocto com 5g do vegetal seco em 100 mL de água destilada por 30 minutos seguido por uma filtração simples e reservado para os testes. Foi feito uma solução de gelatina (Merck) a 2,5% em água destilada (Sociedade Brasileira de Farmacognosia). Utilizou-se para os testes dois tubos de ensaio, ao primeiro adicionaram-se 2 mL de solução extrativa e cinco gotas de solução de gelatina, ao segundo tubo foi adicionado apenas 2 mL da solução extrativa para o teste em branco.

⁵ Decocto: Fervura de um vegetal em água (ou outro solvente) por um intervalo de tempo.

- Identificação de taninos com cafeína

Os taninos precipitam na presença de cafeína (SIMÕES et al., 2010). Para o teste com cafeína realizou-se o mesmo procedimento descrito anteriormente, porém com a substituição da solução de gelatina por solução de cafeína.

- Identificação de taninos com cloreto férrico

Para diferenciar as classes de taninos foi realizado o teste colorimétrico com cloreto férrico (FeCl_3), para isso utilizou-se o mesmo decocto do vegetal citado anteriormente. Foram utilizados dois tubos de ensaio, ao primeiro adicionaram-se dois mL da solução extrativa, 10 mL de água destilada e 5 gotas de cloreto férrico a 2% em metanol e ao segundo foi adicionada apenas a solução extrativa e água destilada na mesma quantidade sendo este o teste em branco.

- Identificação e quantificação de taninos condensados

O método utilizado foi o de Stiasny proposto por Doat (1978), onde foi feito um decocto com 10g do vegetal em 250 mL de água destilada por 30 minutos, após esse tempo as suspensões foram filtradas. Uma alíquota desse extrativo de 100 mL foi transferida para um béquer de 500 mL e em seguida foram adicionados 15 mL do reativo de Stiasny (5 mL de ácido clorídrico concentrado e 10 mL de formaldeído a 10% neutralizado) preparado minutos antes da reação. Após esse procedimento a solução final foi mantida em repouso por 24 horas. Nessas condições os taninos condensados formam complexos insolúveis, que podem ser separados por filtração simples.

Após a filtração do precipitado obtido na reação anterior, esse foi secado em estufa a 101 ± 2 °C até atingir peso constante, e em seguida foi pesado em balança analítica obtendo assim o número de Stiasny (quantidade em g de taninos condensado na alíquota) para esse teste as análises foram feitas em triplicata.

Para obter a porcentagem de taninos condensados na solução foi preciso determinar primeiramente o teor de sólidos totais presentes no extrato, esse foi determinado pelo teor de princípio ativo total extraído no extrato bruto. Para a determinação da massa total de princípio ativo extraído foi utilizado o resíduo gerado no decocto da reação anterior da seguinte forma:

A massa do resíduo gerado após a extração foi levada à estufa e seca a 101 ± 2 °C e após três pesagens sem variação de massa foi efetuado o seguinte cálculo de acordo com a equação 1.

$$\left[\text{MET} = \text{MI} - \text{MF} \right]_1$$

Equação 1: Massa de resíduo gerado após extração.

Onde

MET= massa de extrativo total;

MI= massa inicial do vegetal;

MF=massa final (seca) do vegetal após extração

A porcentagem de extrativos totais foi calculada de acordo com a equação 2.

$$\left[\% \text{ TET} = (\text{MET} / \text{MI}) \cdot 100 \right]_2$$

Equação 2: Percentual de extrativos totais

Onde

TET= teor de extrativo total

MET= massa de extrativo total

MI= massa inicial

Após pesar o precipitado formado obtêm-se a massa de taninos condensados na alíquota (n° de Stiasny). Para a obtenção do percentual de taninos no extrativo utiliza-se a equação 3.

$$\left[\% \text{ TTC} = (\text{n}^\circ \text{ de Stiasny} / \text{MET}) \cdot 100 \right]_3$$

Equação 3: Percentual de taninos no extrato

Onde

TTC= teor de taninos condensados no extrato total

n° de Stiasny= massa de tanino condensado no extrativo

MET= massa de extrativo total

O teor de taninos condensados na planta é calculado pela equação 4.

$$\left[\% \text{ TTCP} = (\text{TTC} \times \text{TET}) / 100 \right]_4$$

Equação 4: Percentual de taninos condensados no vegetal

Onde

TTCP= teor de taninos condensados no vegetal

TTC= teor de taninos condensados no extrato total

TET= teor de extrativos total

➤ **Análise qualitativa e semi-quantitativa de saponinas**

Para cada vegetal foi feito um decocto com 2g da planta seca em 10 mL de água destilada por 3 minutos. Após o resfriamento e filtração da solução extrativa foram adicionados 5 mL desses extratos em um tubo de ensaio e agitou-se energicamente por 15 segundos, após esse tempo deixou-se em descanso por 15 minutos. A presença de saponinas foi realizada baseada na formação de espuma persistente após o tempo de repouso e adição de 3 gotas de ácido clorídrico.

Para a análise semi-quantitativa realizou-se um decocto com 1g da planta seca em 100 mL de água destilada por 30 minutos. Após esse tempo as suspensões foram filtradas e utilizadas a parte aquosa para os testes. Utilizou-se 10 tubos de ensaio (16cm de altura e 16mm de diâmetro) numerados de 1 a 10, onde foram adicionados em cada um quantidades crescentes de extrato e completado o volume com água destilada para 10 mL (Farmacopéia Brasileira, 2010; WHO, 1992). O quadro 3 demonstra o procedimento.

Quadro 3: Volume (mL) de solução extrativa, água destilada e da solução final para cada tubo de ensaio.

Tubos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Solução extrativa (mL)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Água destilada (mL)	9	8	7	6	5	4	3	2	1	—
Volume total (mL)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Após completar o volume dos tubos esses foram tampados e agitados vigorosamente, por agitação manual por 15 segundos e em seguida deixados em repouso por 15 minutos. Após esse tempo foi anotado o volume de solução extrativa presente no tubo onde houve a formação de 1 cm de espuma. O cálculo para o índice de espuma ou afrosímetro foi realizado conforme equação 5.

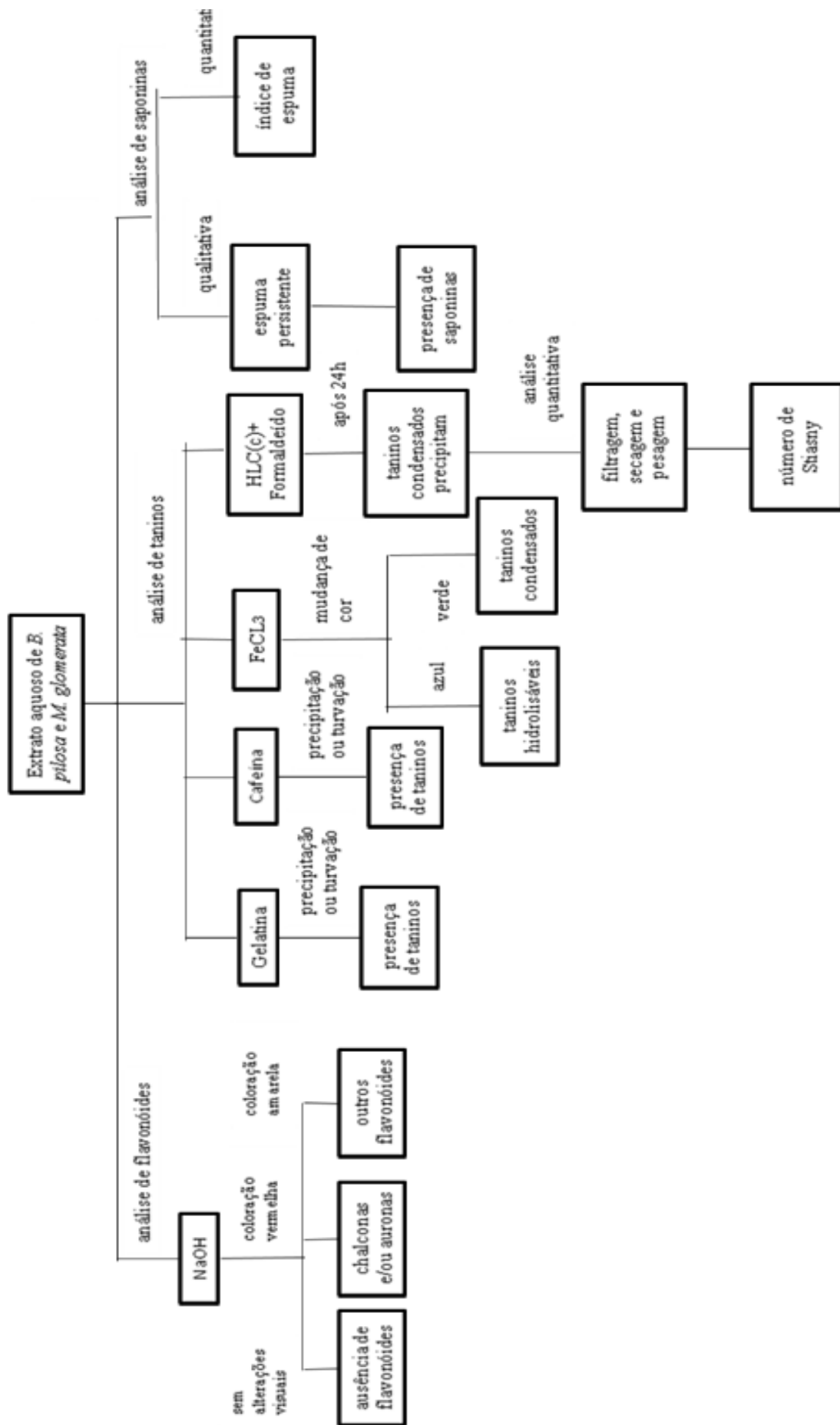
$$\left[I=1000/a \right]_5$$

Equação 5: Índice de espuma

Onde

I= índice de espuma ou afrosímetro;

a = volume de solução extrativa presente no tudo onde houve a formação de espuma persistente de 1cm. O esquema 2 mostra o procedimento adotado para o estudo fitoquímico.



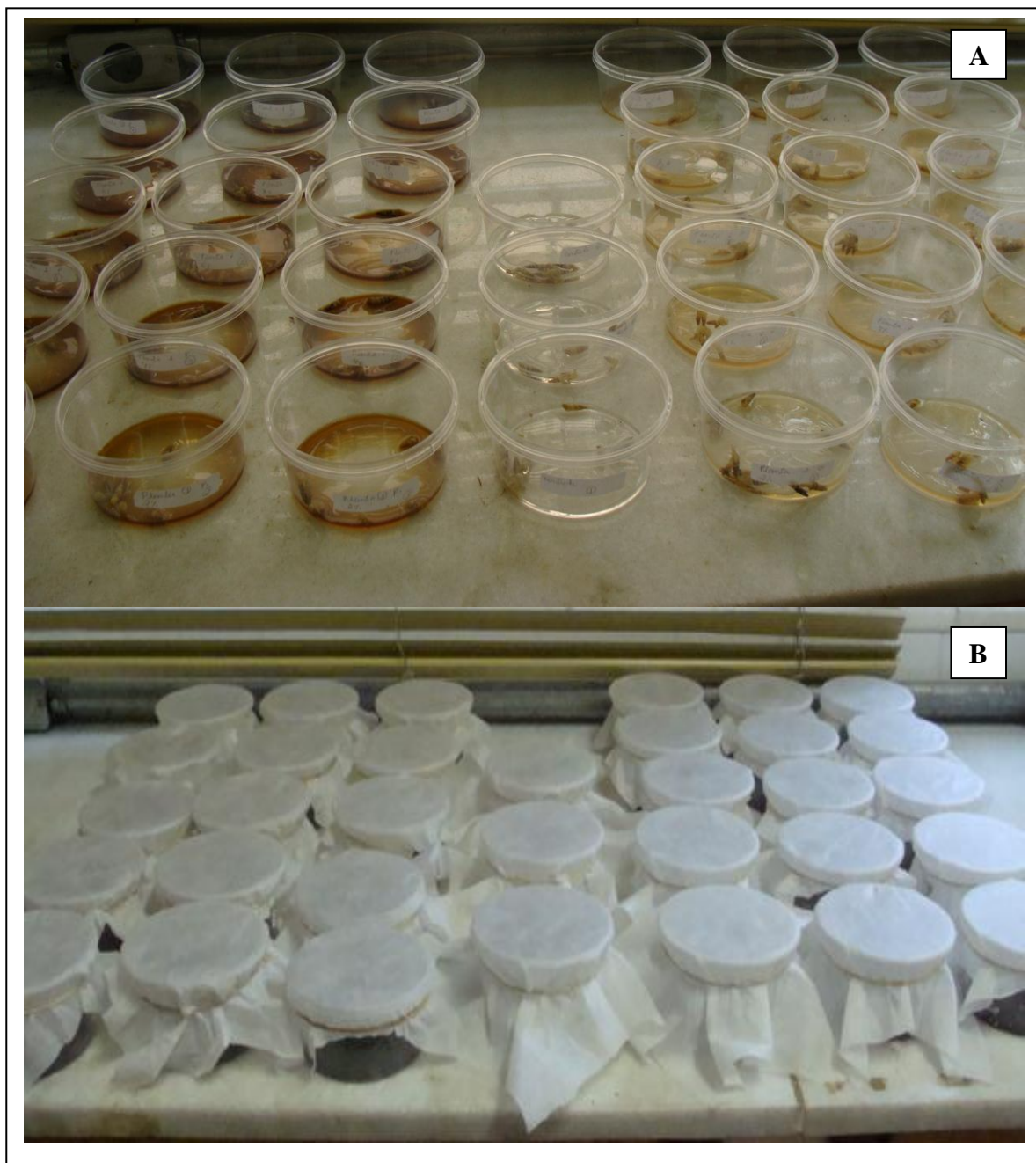
Esquema 2: Representação esquemática dos procedimentos adotados na análise fitoquímica.

3.1.5.2. Experimento II- Atividade moluscicida dos extratos aquosos de *Bidens pilosa* e *Mikania glomerata* sobre *Subulina octona* e cálculo das CL_{50} e CL_{90}

Esse estudo foi realizado entre os dias três e cinco de fevereiro de 2011, a temperatura e umidade relativa do ar registrada durante as 48 horas de experimento foram de 26 ± 3 °C e 75% de umidade relativa do ar.

Para avaliação e quantificação da atividade moluscicida os moluscos foram expostos as cinco concentrações previamente estabelecidas pelos testes pilotos. Para cada concentração foram utilizados 30 animais selecionados ao acaso e distribuídos em grupos (10 moluscos/grupo) em terrários de polietileno de (9cm de diâmetro e 6cm de profundidade). A forma de exposição foi por contato direto na solução, sendo aplicado sobre os animais 5 mL de extrato utilizando uma seringa. Para o controle utilizou-se o mesmo número de animais que receberam a mesma quantidade de água destilada.

Os animais permaneceram expostos aos tratamentos por 24 horas e após esse período foram transferidos para outros terrários de mesma dimensão contendo como substrato 50 g de terra vegetal esterilizada e umedecida com água destilada, por onde permaneceram por 24 horas em recuperação (Fotografia 3 A e 3B). Os moluscos não foram alimentados durante as 48 horas de teste. Ao final do período de recuperação foi verificada a mortalidade.



Fotografia 3: Moluscos *Subulina octona* ao longo do procedimento experimental adotado para os testes de atividade moluscicida de extratos aquosos de *Bidens pilosa* e *Mikania glomerata*. A – Moluscos sendo expostos aos extratos aquosos; B – Etapa de recuperação após a exposição ao extrato aquoso.

3.1.6. Análise estatística dos dados

A massa de taninos condensados foi comparada pelo teste ANOVA com ($p < 0,05$). A mortalidade dos grupos foi comparada pelo teste Kruskal-Wallis seguido por Student-Newman-Keuls com ($p < 0,05$), para esses testes foi utilizado o programa BioEstat 5.0. A intoxicação aguda foi expressa em concentrações sub-letais (CL_{50}) e letais (CL_{90}) que foram obtidas pela análise Probita (FINNEY, 1971) com intervalo de confiança de 95%. O programa BioStat 2008 versão 2.5 foi utilizado para execução das análises Probita e construção das curvas de concentração-resposta. Para verificar a relação entre concentração e mortalidade foi utilizada a correlação de Pearson ($-1 \leq r \leq 1$). Os gráficos da atividade moluscicida e correlação de Pearson foram feitos utilizando o programa Origin versão 6.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

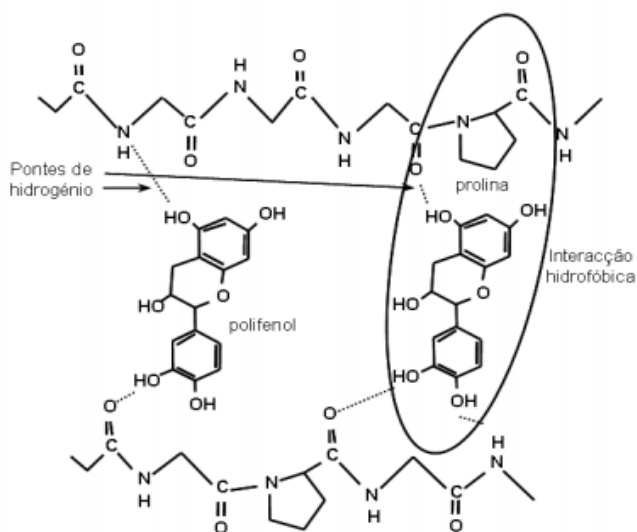
3.2.1. Experimento I- Prospecção fitoquímica de *Bidens pilosa* Linné e *Mikania glomerata* Sprengel

Os extrativos de *B. pilosa* apresentaram uma coloração amarelada que mudou para vermelhada após adição de solução de hidróxido de sódio (Fotografia 4A). Essa coloração é típica de chalconas e auronas (SIMÕES et al., 2010). A presença de flavonóides nessa espécie vegetal está de acordo com Borges (2009) e Brandão et al. (1997) e confirma os grupos chalconas e auronas conforme verificado por Hoffmann & Holzl (1988). Várias estruturas dessas classes já foram extraídas desse vegetal, isoladas e elucidadas. Outros dois flavonóides, foram isolados por Chang et al., (2007), *centaurein* e *centaureidin*, dessa espécie.

A presença de flavonóides também foi verificada em *M. glomerata* confirmando o mencionado por Bouzada et al. (2007) que foi evidenciada devido a mudança no tom da coloração amarelada após a adição de hidróxido de sódio (Fotografia 4B) (MOUCO et al., 2003). A coloração amarela aponta para a presença de outras classes de flavonóides que não as chalconas e auronas conforme verificado em *B. pilosa*.

O teste de identificação de taninos com solução de gelatina e/ou polifenóis foi positivo para *B. pilosa* devido a turvação da solução extrativa após adição dessa solução conforme identificado por Borges (2009) (Fotografia 4C). Este teste não apresentou claramente a formação de turvação, com o extrativo de *M. glomerata* deixando dúvidas com relação a presença de taninos (Fotografia 4D). A ligação entre os taninos e as proteínas ocorre provavelmente por pontes de hidrogênio entre grupos hidroxila dos taninos e sítios específicos das proteínas ou através de interações hidrofóbicas, principalmente nas ricas em prolina (Esquema 3). Embora o resultado com gelatina tenha apontado para a presença de taninos e/ou outros polifenóis o teste com cafeína apresentou resultado contrário para essa classe de compostos para as duas plantas (Fotografia 4E). Porém, o teste com cloreto férrico confirmou a presença de taninos conforme verificado na reação com gelatina. A coloração verde-musgo observada confirma a presença de taninos condensados em *B. pilosa* e em *M. glomerata* (Fotografia 5A e 5B) conforme mencionado por Valdés & Rego (2001) e Lima (2003). Este autor verificou a presença de taninos hidrolisáveis em *M. glomerata* o que não foi observado nesse experimento. Os taninos hidrolisáveis apresentam coloração azul intenso na presença de

cloreto férrico, em soluções com a presença dessas duas classes de taninos a coloração azul se sobrepõe a verde (SIMÕES et al., 2010), entretanto, isso não foi observado nesse trabalho.



Esquema 3: Representação esquemática das possíveis interações entre taninos e proteínas. Fonte: Carvalho (2007).

O teste de Stiasny também confirmou a presença de taninos condensados, o rendimento na extração, percentual de taninos no extrativo e no vegetal estão representados na Tabela 1. O teste ANOVA mostrou não haver diferenças significativas na massa de taninos condensados nos dois vegetais ($F=3,7202$; $p=0,1253$).

Tabela 1: Conteúdo de tanino (expresso em g/100 g de planta seca) em extrato aquoso das partes aéreas de *Bidens pilosa* e *Mikania glomerata*, percentual de taninos no extrato e percentual de taninos na planta.

Espécies	Massa de tanino na planta ($\text{g} \cdot 100^{-1}$)	Rendimento total extrato (%)	Taninos totais no extrato (%)	Taninos totais na planta (%)
<i>B. pilosa</i>	$3,38 \pm 1,29^a$	35,78	11,40	3,71
<i>M. glomerata</i>	$1,77 \pm 0,64^a$	13,58	15,16	2,05

^a=valores expressos em média \pm desvio padrão. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste ANOVA ($p > 0,05$).

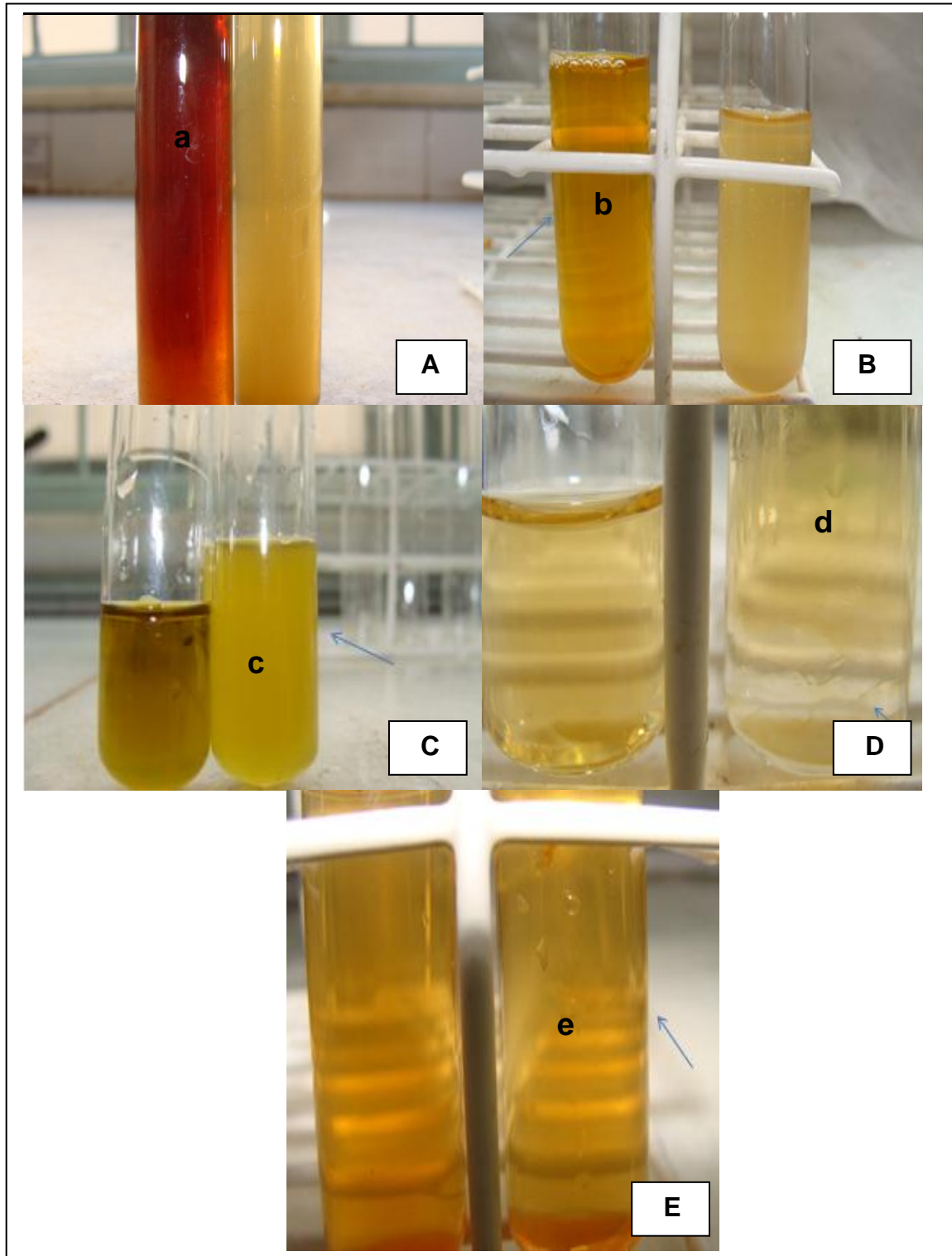
Os testes com gelatina, cloreto de ferro III e de Stiasny confirmaram a presença de taninos nesses extratos, o teste com cafeína mostrou-se ineficiente para identificar tal classe.

Não foram encontrados valores de taninos condensados como referência para esses vegetais. Entretanto, pode-se perceber que o teor de taninos condensados nos dois vegetais é

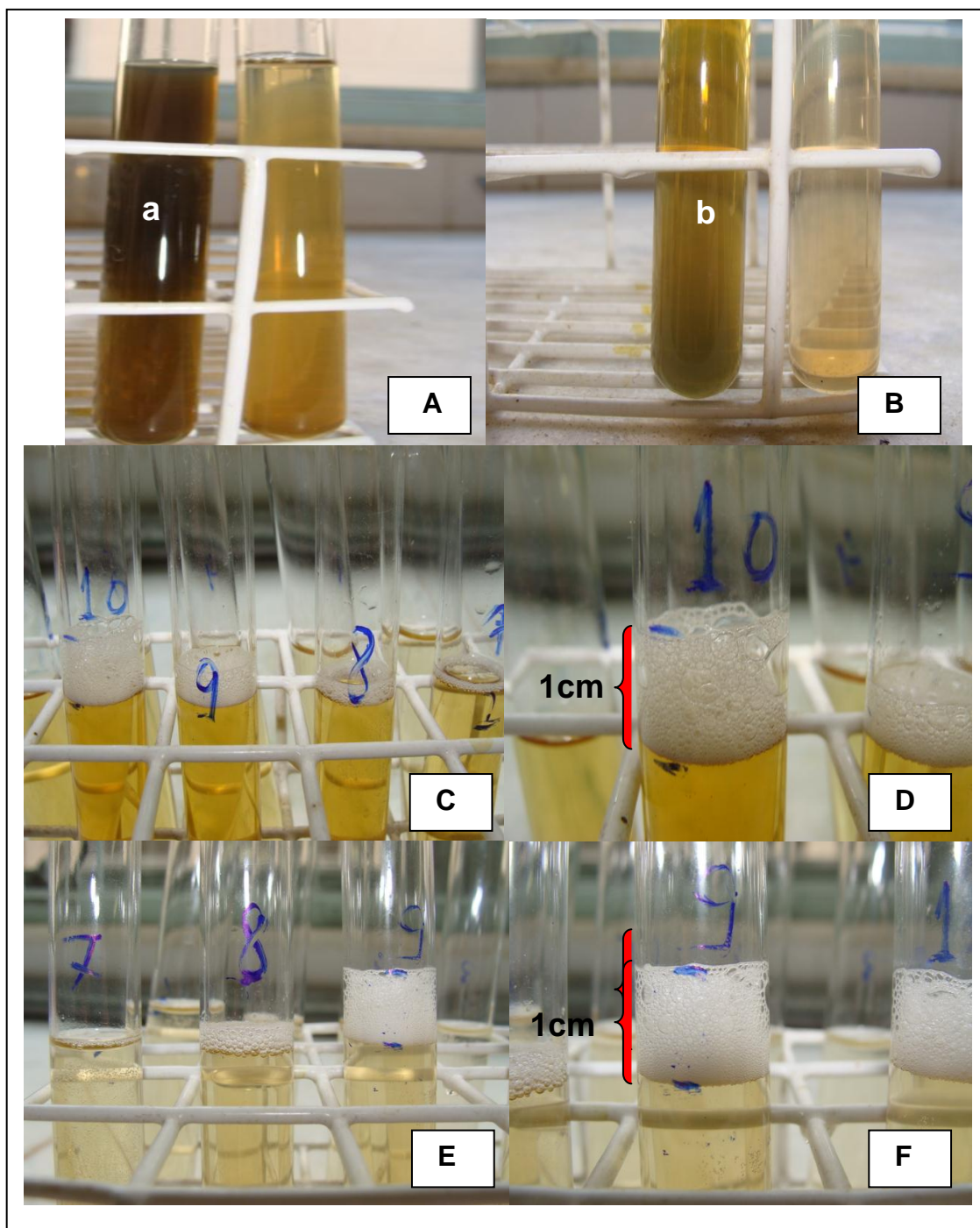
superior ao encontrado em extrato de outro vegetal testado experimentalmente em *S. octona*. França et al. (2009) verificaram a atividade repelente e deslocamento vertical de *S. octona*, e mortalidade de cerca de 17% após aplicação do extrato aquoso de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf (Poaceae) na diluição de 1:10. Pansera et al. (2003) encontraram um percentual de taninos condensados nesse vegetal de 0,01%. Isso indica um teor de taninos condensados inferior ao encontrado no presente estudo para *B. pilosa* e *M. glomerata*, neste sentido o uso desses vegetais pode ser mais vantajoso.

Foi verificada a presença de saponinas no extrato aquoso dos dois vegetais devido a formação de espuma persistente após 15 minutos de repouso, confirmando o citado na literatura (BORGES et al., 2009; VALDÉZ & REGO, 2001). O volume da solução extrativa que formou 1cm de espuma persistente no extrativo de *B. pilosa* e de *M. glomerata* foi de 10 mL e 9 mL respectivamente (Fotografia 5C, 5D; 5E e 5F). O índice de espuma calculado foi de 100 para o primeiro vegetal e 111 para o segundo. Não foi encontrado índice de espuma para essas espécies na literatura para comparações, entretanto para a mesma família foi encontrado índices de aproximadamente 250 para a espécie *Baccharis trimera* (Less.) DC (Asteraceae) coletadas no verão (BORELLA et al., 2006) que foi a mesma estação de coleta dos vegetais utilizados neste estudo. Em outra espécie da mesma família, *Eclipta alba* (L.) Hassk o índice encontrado foi de 100 (ARANTES et al., 2005) igual ao calculado no presente estudo para *B. pilosa*. Esses resultados mostram uma proximidade das concentrações de saponinas para uma mesma família. Borella et al. (2006) verificou que o índice de espuma verificado para *B. trimera* não variou estatisticamente nas coletas realizadas nas diferentes estações, concluíram ainda que substâncias com potencial afrogênico⁶, principalmente saponinas, podem não ser sensíveis às alterações sazonais.

⁶ Afrogênico: Substâncias que produzem grande quantidade de espuma quando em soluções aquosas.



Fotografia 4: Testes fitoquímicos para identificação de possíveis compostos com atividade moluscicida sobre *Subulina octona* em extratos aquosos de *Bidens pilosa* e *Mikania glomerata*. A) extrato aquoso de *Bidens pilosa* evidenciando a coloração vermelha (a) após adição de hidróxido de sódio (NaOH), característica para presença de flavonóides (chalconas e/ou auronas); B) extrato aquoso de *Mikania glomerata* após adição de NaOH (b) evidenciando a presença de outros flavonóides; C) extrato aquoso de *Bidens pilosa* após adição de gelatina, apresentando turvação (c) e indicando a presença de taninos e/ou polifenóis; D) extrato aquoso de *Mikania glomerata* evidenciando ausência de turvação (d) após adição de solução de gelatina; E) extrato aquoso de *Bidens pilosa* (e) evidenciando reação negativa ao teste da cafeína para identificação de taninos.



Fotografia 5: Testes fitoquímicos para identificação de possíveis compostos com atividade moluscicida sobre *Subulina octona* em extratos aquosos de *Bidens pilosa* e *Mikania glomerata*. A) extrato aquoso de *Bidens pilosa* evidenciando a coloração verde (a) após adição de cloreto férrico (FeCl_3) característica para presença de taninos condensados; B) extrato aquoso de *Mikania glomerata* após adição de cloreto férrico (FeCl_3) (b) característica para presença de taninos condensados C) extrato aquoso de *Bidens pilosa* após agitação e repouso de 15 minutos, indicando a presença de saponinas devido a formação de espuma (D) tubo 10 com 1cm de espuma; E) extrato aquoso de *Mikania glomerata* após agitação e repouso de 15 minutos, indicando a presença de saponinas devido a formação de espuma (F) tubo 9 com 1cm de espuma.

3.2.2. Experimento II- Atividade moluscicida dos extratos aquosos de *Bidens pilosa* e *Mikania glomerata* sobre *Subulina octona* e cálculo das CL_{50} e CL_{90}

A partir dos testes piloto foram obtidas as concentrações utilizadas nesse bioensaio. Essas concentrações bem como as verificadas em outros trabalhos com moluscos terrestres são relativamente maiores quando comparadas com as obtidas para moluscos aquáticos (FERREIRA et al., 2009; GASPATOTTO Jr., 2005; NASCIMENTO et al. 2006; NASCIMENTO, 2008; OLIVEIRA, 2007; SILVA et al., 2006; SOUZA et al., 2011; VASCONCELLOS & AMORIN, 2003) esse fato pode estar relacionado com as diferenças entre o hábitat e a fisiologia desses animais. A biodisponibilidade do moluscicida para moluscos aquáticos é maior devido à facilidade de dispersão e homogeneização dessas substâncias em água e devido às necessidades fisiológicas do molusco nesse sistema. Embora esses moluscos apresentem mecanismos de escape que muitas vezes lhe garantem a sobrevivência (JURBERG, 1988) esses sempre ficarão presentes sobre a atmosfera desse sistema permanecendo em contato com o moluscicida. Diferentemente dos aquáticos, os moluscos terrestres podem dispersar mais facilmente para outras regiões do terrário onde a concentração do moluscicida esteja mais baixa inclusive nas paredes do terrário permanecendo sobre este por algum tempo, diminuindo desta forma o contato direto com a solução.

Foi observado que após 20 minutos da aplicação dos extratos das duas plantas, nas duas concentrações mais altas, os moluscos já apresentaram ausência de coordenação motora após estímulo tátil juntamente com uma maior produção de muco, o que também foi observada para os tratados nas demais concentrações. O aumento da secreção de muco também foi observado por Santos (2005) em *L. unilamellata* quando expostos em solução de cafeína a 2,5g/L e 5g/L, resultado semelhante foi observado por Afonso-Neto (2010) sobre esta mesma espécie de molusco após a aplicação do extrato de *E. milli*. Essa elevada produção de muco pode estar relacionada com o mecanismo de ação desses moluscicidas e/ou os mecanismos de desintoxicação do molusco. Essa semelhança nos resultados dos diferentes trabalhos sugere que os mecanismos de atuação desses moluscicidas sejam semelhantes ao mecanismo de atuação de moluscicidas a base de metaldeído. Esse produto sintético age principalmente sobre células produtoras de muco, gerando disfunção do balanço hídrico ocasionado a dessecação do molusco podendo levar a morte (Instituto Ambiental do Paraná). Por outro lado, a liberação anormal de muco pode ser uma resposta do próprio molusco na

tentativa de eliminar parte do moluscicida absorvido pelo tegumento, aumentando desta forma sua chance de sobrevivência.

Ao final do período de exposição, tanto os moluscos expostos aos extratos de *B. pilosa* quanto os expostos a *M. glomerata* apresentaram a massa cefalopedial medianamente retraída, resultado oposto foi observado por Souza (2003) que verificou que diferentes concentrações de cafeína provocaram a exposição completa da massa cefalopediosa desse molusco. Segundo McCullough et al. (1980) a intoxicação pelo moluscicida provoca a ruptura do equilíbrio osmótico do molusco que está sob controle neuro-hormonal, com isso são dois os mecanismos que demonstram a morte desses. O primeiro é a retração da massa cefalopediosa para dentro da concha com a liberação de hemolinfa e o segundo é a projeção anormal do cefalópode para fora da concha. Com base nessa análise pode-se concluir que os mecanismos de intoxicação dos moluscicidas são dependentes dos princípios ativos que estes apresentam, pois para a mesma espécie de molusco foi observado mecanismos diferentes. Contudo, tornam-se necessários estudos toxicocinéticos e toxicodinâmicos para uma compreensão mais clara desses processos.

O teste Kruskal-Wallis mostrou diferenças significativas na mortalidade dos grupos para todas as concentrações em relação ao controle. As quatro concentrações mais altas de *B. pilosa* e de *M. glomerata* ocasionaram mortalidade significativamente maior em relação ao controle ($p < 0,05$). A mortalidade entre os grupos tratados com as duas plantas não diferiram entre si para todas as concentrações ($p > 0,05$). A mortalidade ocasionada na menor concentração de *M. glomerata* foi menor em relação às outras quatro concentrações ($p < 0,05$) diferentemente, para os grupos tratados com *B. pilosa* a mortalidade ocorrida na menor concentração apenas diferiu das três maiores ($p < 0,05$). Não foi observado mortalidade nos grupos controles. A mortalidade dos grupos está representada no Gráfico 1.

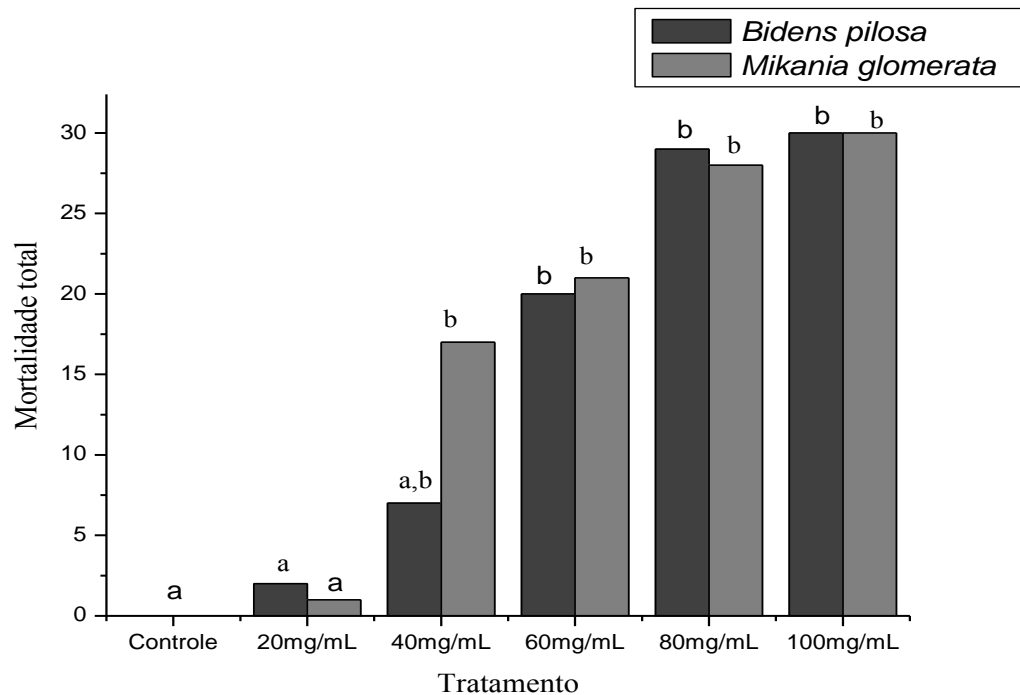


Gráfico 1: Mortalidade média de adultos de *Subulina octona*, expostos aos extratos aquosos das partes aéreas de *Bidens pilosa* e *Mikania glomerata*, após as 24 horas de recuperação.

^{a,b}=Letras diferentes = médias diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

O coeficiente de correlação de Pearson mostrou uma relação fortemente positiva entre a concentração e a mortalidade dos indivíduos tratados para as duas plantas (Gráficos 2 e 3). Essa característica é importante para o critério de seleção de um vegetal moluscicida. Uma planta para ser considerada um moluscicida vegetal em potencial deve ocasionar aumento de mortalidade quando em concentrações mais altas. Sobre esse aspecto, os vegetais *B. pilosa* e *M. glomerata* podem ser considerados potenciais moluscicidas vegetais.

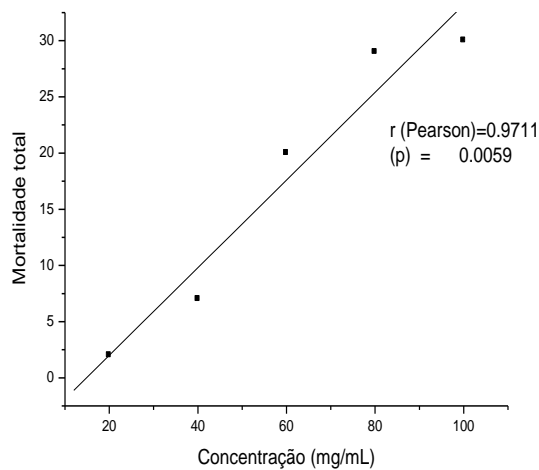


Gráfico 2: Correlação de Pearson entre concentração do extrato aquoso de *Bidens pilosa* e mortalidade de *Subulina octona*.

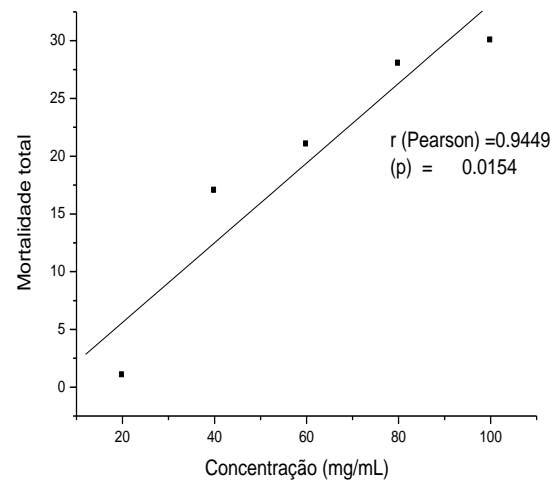


Gráfico 3: Correlação de Pearson entre concentração do extrato aquoso de *Mikania glomerata* e mortalidade de *Subulina octona*.

Estudos já comprovaram a atividade moluscicida de extratos metanólico e clorofórmico de 14 espécies vegetais da família Asteraceae coletadas na Bolívia e na Argentina sobre *B. peregrina* (BARDÓN et al., 2007). Hmamouchiu et al. (2000) verificaram atividade moluscicida da espécie *A. herba* sobre *B. truncatus* no Marrocos, sendo relatada a presença de saponinas e flavonóides nesse vegetal.

A atividade moluscicida sobre *S. octona* observada neste estudo pode ser atribuída a presença de flavonóides, taninos condensados e saponinas nos extratos de *B. pilosa* e *M. glomerata*. Esses metabólitos são solúveis em água (SIMÕES et al., 2010), fato que pode facilitar a sua absorção pelo tegumento do molusco. Treyvand et al. (2000) sugere que o efeito moluscicida em *B. glabrata* observado para o extrato aquoso e metanólico de *P. icosandra* é atribuído as saponinas presente nesses extratos. Nascimento (2008) verificou que o vegetal *F. foetida*, rico em saponinas esteroidais, apresentou atividade moluscicida e ovicida sobre *S. octona* quando exposto por 24 horas a diferentes concentrações da seiva. Resultado que torna essa classe de compostos promissora para o controle desse molusco. Outros trabalhos têm atribuídos a ação moluscicida a presença de saponinas (ABDEL-GAWAD et al., 1998; LEMMICH et al., 1995; MAGALHÃES et al., 2003; RAWI et al., 2011; SINGH & SINGH, 2009; THIILBORG et al., 1996;).

De acordo com Schenkel et al. (2003) a capacidade das saponinas em formar complexos com esteróides, proteínas e fosfolipídeos de membranas é responsável por um grande número de propriedades biológicas, destacando-se a ação sobre membranas celulares,

alterando a sua permeabilidade, ou causando sua destruição, essas propriedades podem justificar sua ação hemolítica e moluscicida. A atividade hemorrágica dessa classe de compostos foi verificada sobre *B. glabrata* (MENDES et al., 1993).

Segundo Schall et al. (1992) a inatividade de muitos extratos pode estar relacionada com a viabilidade de determinados princípios ativos durante o ano. Entretanto, conforme verificado por Borella et al. (2006) as saponinas apresentam estabilidade sazonal, fato que parece vantajoso para moluscicidas vegetais que apresentam essa classe de compostos.

Bezerra (2002) atribuiu a atividade moluscicida sobre *B. glabrata* à presença de taninos condensados nos extratos etanólico de *S. polyphyllum*. Outros estudos têm apontado a atividade moluscicida de taninos sobre moluscos aquáticos (MARSTON & HOSTETTMANN, 1985; RAWI et al., 2011; SCHAUFEBBERGER & HOSTETTMANN, 1983).

Os taninos podem formar complexos com celulose, pectinas, alcalóides, outros polifenóis e sais de metal pesado, todavia, sua característica mais marcante, que explica a maioria de suas propriedades biológicas é a capacidade de formar complexos insolúveis com proteínas e polissacarídeos (MAKKAR et al. 1987; OKUDA, 2005), essa característica pode justificar sua ação letal sobre moluscos.

Porém, para que esses efeitos possam ocorrer, a molécula de tanino deve conter grupamentos fenólicos suficientes para criar pontes entre as moléculas de proteína. Essa condição está ligada ao grau de polimerização da molécula de tanino que pode variar sua massa de 500 a 3000 Daltons⁷. De maneira geral, um mol⁸ de taninos pode ligar-se a doze moles de proteínas. Entretanto, quando existe um impedimento conformacional no polifenol a capacidade de complexação é reduzida (SIEBERT, 1996). Os polifenóis vegetais com pesos moleculares inferiores a 500 daltons como os ácidos fenólicos e flavonóides não apresentam a atividade biológica dos taninos (JANSMAN, 1993). Outro fator que interfere na associação entre taninos e proteínas é a quantidade de prolina no polipeptídeo. Essa afinidade das proteínas ricas em prolina pelo tanino condensado foi comprovada por Emmambux & Taylor (2003).

⁷ Dalton: Unidade de massa atômica desenvolvida pelo Químico e Físico inglês John Dalton. É expressa como $\frac{1}{12}$ da massa de um átomo de carbono-12.

⁸ Mol: Unidade para descrever quantidade de entidades elementares (átomos, íons, moléculas etc...). Cada Mol corresponde a $6,02 \times 10^{23}$ partículas.

A exposição dos moluscos a substâncias tóxicas pode causar um estresse fisiológico nesses animais ocorrendo frequentemente uma diminuição das reservas de carboidratos (MELLO-SILVA et al., 2006; OLIVEIRA, 2007, SILVA et al. 2011). Como segunda fonte de energia, esses utilizam as proteínas como processo compensatório Schmale & Becker (apud MELLO-SILVA et al., 2006). Estudos tem mostrado o aumento dos níveis de proteínas e ácido úrico na hemolinfa de moluscos expostos a soluções moluscicidas, o que indica a degradação dessas como fonte de energia (MELLO-SILVA et al., 2006), entretanto, as proteínas podem precipitar após complexar com os taninos tornando-se desta forma menos disponíveis para os moluscos. Além da complexação dos taninos com proteínas esses também podem se ligar a polissacarídeos, podendo também deixá-los indisponível como fonte de energia, o que pode ocasionar a morte dos moluscos pela falta de recursos energéticos para manter a homeostase. Os mecanismos de ação dos taninos sobre moluscos ainda não são bem conhecidos, estudos que relacionam estrutura-atividade podem ajudar a entender melhor esse processo em nível molecular.

Em relação aos flavonóides, esses podem atuar inibindo o sistema desintoxicante desse molusco. Silva (2007) verificou alterações na enzima do Citocromo P450 no molusco terrestre *Cantareus aspersus* (Müller) (Helicidae) exposto a folhas de fumo, *Nicotiana tabacum* (Solanaceae). Essa enzima faz parte de uma antiga família de proteínas com ampla distribuição em bactérias, plantas e animais. Atua nos processos de desintoxicação degradando vários xenobióticos⁹ e transformando-os em moléculas de fácil excreção Guecheva & Henrique (apud SILVA, 2007). As moléculas sobre as quais essas enzimas atuam podem ser de origem endógena ou exógena como drogas e pesticidas. Silva (2007) relacionou o dano ocorrido a essa enzima à presença também de flavonóides nos extratos de *N. tabacum* e verificou que houve um acúmulo de xenobióticos na glândula digestiva de *C. aspersus*. Se o mecanismo de desintoxicação de *S. octona* foi alterado pela presença de flavonóides nos extratos de *B. pilosa* e *M. glomerata* pode ter ocorrido um acúmulo desses princípios ativos (flavonóides, taninos condensados e saponinas) no organismo desse molusco o que provavelmente provocou sua morte.

Essas análises mostram à variedade de mecanismos de ação desses princípios ativos, e desta forma a mortalidade de *S. octona* observada nesse estudo provavelmente tenha sido provocado por essa mistura de princípios ativos que podem interagir de forma sinérgica,

⁹ Xenobiótico: Composto de origem exógena que causam alterações funcionais no organismo.

aditiva ou até facilitando a absorção de algum composto. Essa parece ser mais uma vantagem do uso de extratos vegetais, a variedade de princípios ativos que podem agir de forma conjunta de modo a diminuir as chances de sobrevivência do molusco. A relação concentração-resposta para *B. pilosa* e *M. glomerata* estão representadas nos Gráficos 4 e 5.

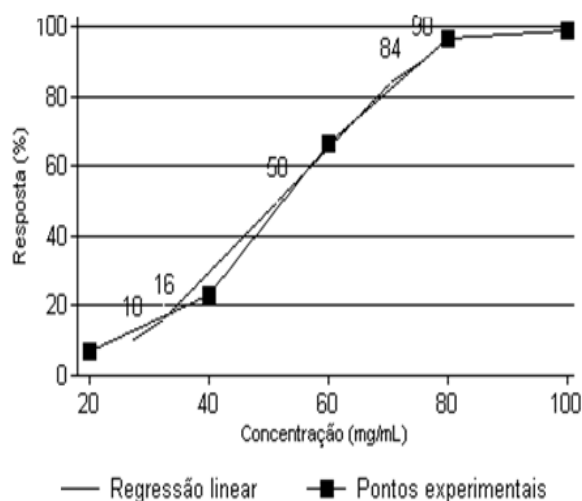


Gráfico 4: Relação concentração-resposta de *Subulina octona* exposta ao extrato aquoso das partes aéreas de *Bidens pilosa*. Resposta avaliada=letalidade, expressa em percentual de moluscos mortos.

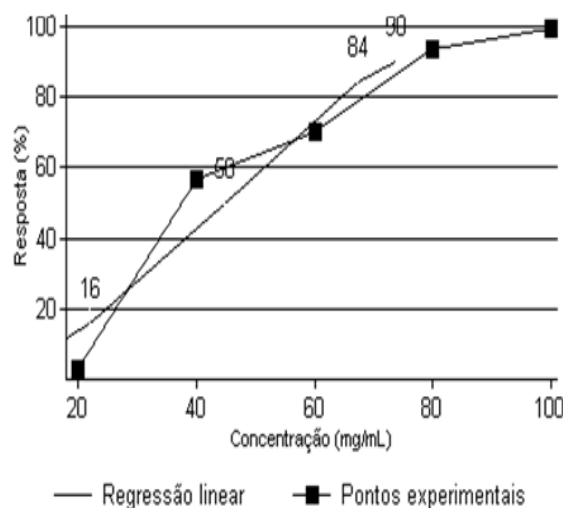


Gráfico 5: Relação concentração-resposta de *Subulina octona* exposta ao extrato aquoso das partes aéreas de *Mikania glomerata*. Resposta avaliada=letalidade, expressa em percentual de moluscos mortos.

É interessante ressaltar que a forma de distribuição dos pontos é diferente para cada relação concentração-resposta. Na maioria das vezes esses satisfazem uma curva linear ou sigmoidal, essa variação pode ser devido à variabilidade genética dos indivíduos onde um grande número de indivíduos é sensível a concentrações intermediárias (LEITE & AMORIN, 2006; MARTINS, 2008). As CL_{50} e CL_{90} encontrada pela análise Probita estão representadas na Tabela 2. A proximidade dessas concentrações de referência para os dois vegetais podem estar relacionada com as semelhanças nas concentrações de saponinas e taninos condensados, conforme visto anteriormente. Fato que sugere a ação secundária dos flavonóides na ação moluscicida ou uma concentração também semelhante nos dois vegetais.

Tabela 2: Relação entre a concentração dos extratos aquosos de *Bidens pilosa* e *Mikania glomerata* e a mortalidade de *Subulina octona* expostas a estes extratos. Regressão linear, R^2 , CL_{50} e CL_{90} e erro padrão. R= Resposta; C= Concentração.

Grupos	Regressão linear	R ²	CL ₅₀ /CL ₉₀ (mg/mL)	Erro padrão
<i>B. pilosa</i>	R= - 38,7177+ 1,7349. C	0,9991	51,4/74,1	4,1487
<i>M. glomerata</i>	R= - 14,3197+ 1,4512. C	0,9991	44,6/71,9	3,4672

Metodologias diferentes para a obtenção dessas concentrações podem impossibilitar comparações de eficiência. É importante ressaltar que estudos com cálculos dessas concentrações parâmetros para moluscos terrestres ainda são escassos na literatura (SOUZA, 2003, OLIVEIRA, 2007; AFONSO-NETO, 2010). Silva et al. (2008) publicaram uma nota detalhada para esses testes para *B. glabrata* adaptado ao uso de plantas medicinais. No mesmo sentido é necessário uma padronização de técnicas voltadas ao estudo de espécies terrestres.

Souza (2003) obteve uma CL₅₀ de 0,44g/L para cafeína e de 0,17g/L para o timol sobre *S. octona*, todavia, qualquer comparação de eficiência entre esses moluscidas são inapropriadas, pois as metodologias foram diferentes. Nesse estudo a autora utilizou o processo de imersão por 10 minutos e utilizou três grupos de cinco animais para cada concentração. Esse tempo pode ter sido suficiente para ocasionar a mortalidade dos moluscos por afogamento, visto que a autora levantou essa possibilidade devido à alta mortalidade dos grupos controle, cerca de 40%. Essa análise sugere que o processo de imersão talvez não seja a forma mais apropriada de exposição para moluscos terrestres. A escolha do número de animais utilizados também é relevante, sendo necessário que esses sejam estatisticamente representativos (LEITE & AMORIN, 2006), para tanto considera-se uma amostra pequena se $n < 30$ a partir do qual começa a tender a normalidade (POCINHO, 2009). A OMS (WHO, 1965) recomenda a utilização de no mínimo 30 moluscos para esses testes. Acredita-se que essa mesma quantidade possa ser utilizada para moluscos terrestres como padronização dessa variável. Oliveira (2007) calculou a CL₅₀ do látex de *E. splendens* sobre *A. fulica* e para isso também utilizou 30 animais para cada concentração.

Afonso-Neto et al. (2010) avaliaram a atividade moluscida de três espécies de euphorbiaceae sobre *L. unilamellata* encontrando para *E. milii* var. *splendens* uma DL₅₀ de 0,52µL/mL, entretanto, nesse experimento foi utilizado terra vegetal como substrato para a aplicação dos extratos, esse fator pode ter interferido nos resultados. Nascimento (2008) aplicou cinco concentrações da seiva de *F. foetida* sobre *S. octona* com a presença e ausência de substrato e verificou que o substrato interfere na ação moluscida proporcionado sítios de

proteção ao molusco. Para esses testes torna-se necessário um contato efetivo entre o extrato e a superfície corporal do molusco, visto que o seu provável mecanismo de absorção é através da superfície corpórea. Deste modo, uma pequena quantidade de extrato suficiente para manter o contato dérmico com o molusco e sem a presença de substrato pode ser mais indicado.

Oliveira (2007) realizou testes pilotos para verificar qual a melhor forma de exposição do molusco *A. fulica* ao látex de *E. splendens*. Para isso realizou três formas de exposição, a saber: A primeira metodologia utilizada foi o oferecimento do látex em placas de Petri para os moluscos, a segunda foi a pulverização do látex em folhas de alface que posteriormente foram oferecidos aos moluscos como alimento e por fim o terceiro método de exposição foi a pulverização do látex diretamente sobre os animais. Após esses testes, essa autora verificou, pelos dados de letalidade, que a terceira metodologia foi a melhor forma de exposição. Após o período de exposição, os animais foram transferidos para outros terrários contendo terra vegetal, permanecendo neste durante o período de recuperação. A metodologia de exposição utilizada no presente estudo foi semelhante à realizada por essa autora. Acredita-se que essa seja a forma mais indicada de exposição para moluscos terrestres nesses testes toxicológicos.

O tempo de exposição também pode influenciar o valor das concentrações parâmetros encontradas nesses testes, de modo geral, quanto maior o tempo de exposição maior é a intensidade do efeito moluscicida. Gasparotto Jr et al., (2005) verificaram um maior efeito moluscicida do extrato de *Calophyllum brasiliense* Camb (CLUSIACEAE) sobre *B. glabrata* quando expostos pelo maior tempo. O mesmo foi observado por Kumar & Sinhg (2003) com extratos vegetais de *Ferula asafoetida* (Umbelliferae) em *Lymnaea acuminata* Lamarck (Lymnaeidae). Sabe-se que as CL₅₀ e CL₉₀ são obtidas em testes de intoxicação aguda, sendo estes não excedendo o tempo máximo de 24 horas de exposição (MARTINS, 2008). A OMS (WHO, 1965) recomenda o tempo de exposição de 24 horas para moluscos aquáticos acrescido de 24 horas de recuperação. Afonso-Neto (2010) também manteve esse tempo recomendado, Souza (2003) utilizou um tempo de 10 minutos em imersão e Oliveira (2007) utilizou um tempo de 48 horas de exposição seguida por mais 48 horas de recuperação. Esta autora verificou dificuldades na análise de alguns parâmetros, inclusive ausência de mortalidade para intervalo de exposição menor. Entretanto, acredita-se que essas dificuldades podem ser solucionadas com a utilização de extratos mais concentrados para a obtenção de respostas mais rápidas. Desta forma acredita-se que o tempo de 24 horas de exposição acrescido de 24 horas de recuperação seja o mais indicado para a obtenção dessas concentrações de referência (CL₅₀ e CL₉₀) também para moluscos terrestres.

Em síntese, acredita-se que a padronização do número de animais, o tempo e a metodologia de exposição possam diminuir as possíveis variações nos valores das concentrações (CL₅₀ e CL₉₀) obtidas nesses testes com moluscos terrestres.

Também é interessante mencionar que a inclinação da reta nessas análises também é um importante parâmetro de comparação. De modo geral, inclinações mais planas indicam uma absorção deficiente, uma excreção ou desintoxicação rápida ou efeitos tóxicos que se manifestam algum tempo depois da administração. As inclinações mais íngremes indicam com frequência uma absorção rápida e um rápido começo dos efeitos tóxicos (LEITE & AMORIN, 2006). Pode-se analisar a inclinação da reta pela representação gráfica e/ou pelo coeficiente angular da reta. Analisando os Gráficos 2 e 3 pode-se perceber que a inclinação da reta no tratamento com *M. glomerata* é ligeiramente maior em relação à de *B. pilosa*, fato que é comprovado pelos coeficientes angulares (*B. pilosa*= 1,4512; *M. glomerata*= 1,7349) (Tabela 2). Isso indica que embora esses extratos tenham princípios ativos semelhantes os efeitos letais ocorrem de forma um pouco mais rápida para os tratados com *M. glomerata*.

A elucidação do mecanismo de ação desses moluscicidas se torna necessário a fim de avaliar o processo em nível molecular, tal processo necessita de estudos que avaliem os detalhes referentes ao perfil fitoquímico do vegetal bem como a resposta fisiológica do molusco frente aos constituintes químicos. Estudos sobre o isolamento, elucidação estrutural e estabilidade dessas substâncias são importantes para ampliar o conhecimento sobre sua toxidez, além de facilitar a síntese de análogos que possam apresentar atividade moluscicida ainda mais eficiente e menos tóxicos em relação aos produtos sintéticos.

Além da atividade moluscicida os vegetais utilizados em programas de controle devem crescer e se desenvolver facilmente em locais de endemia, não ser tóxicas ao homem e a animais domésticos e a extração dos princípios ativos em água deve ser preferível, pois torna o processo de extração barato e menos tóxico (JURBERG et al., 1989; SILVA et al. 2002; Ministério da Saude, 2008). Com base nessas exigências acredita-se que as espécies vegetais *B. pilosa* e *M. glomerata* se destacam por apresentar ampla distribuição geográfica, disponível durante todo ano, são plantas medicinais e os princípios ativos responsáveis pela atividade moluscicida são facilmente extraídos em água.

CONCLUSÕES

Sob essas condições em que foram realizadas os experimentos e com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

A presença de saponinas, flavonóides e taninos condensados foi confirmada nos extratos aquosos de *Bidens pilosa* e *Mikania glomerata*. Os índices de espuma encontrados foram relativamente próximos, fato que pode ser justificado por se tratar de espécies da mesma família.

Os dois vegetais utilizados neste estudo apresentam atividade moluscicida sobre adultos de *Subulina octona* sendo verificada correlação positiva entre a concentração e a mortalidade dos moluscos para as duas plantas. Então é recomendado o uso de maiores concentrações com o objetivo de intensificar os efeitos sobre os moluscos.

As diferentes respostas aos extratos de ambas as plantas sugerem uma variedade de mecanismos de ação dos princípios ativos dos vegetais.

Esses vegetais atendem as exigências determinadas e desta forma podem ser candidatos a programas de controle de *S. octona*.

4. Efeitos de sucessivas aplicações da CL₅₀ de *Bidens pilosa* Linné e *Mikania glomerata* Sprengel (Asteraceae) sobre aspectos biológicos e comportamentais em adultos de *Subulina octona* (Bruguière, 1789) (Mollusca, Subulinidade) em laboratório

Subulina octona (Bruguière, 1789) apresenta alta fecundidade e eclosão dos jovens, maturidade sexual precoce e curto período de incubação (BESSA & ARAÚJO, 1995a) além de realizar autofecundação (BESSA & ARAÚJO, 1995b), características que permitem a essa espécie rápido crescimento populacional. Esse molusco apresenta importância médica veterinária por atuar como hospedeiro intermediário de helmintos parasitos de humanos e animais domésticos, sua presença em ambientes antrópicos levanta a necessidade de medidas de controle como forma de controle da população de parasitos. Além disso, essa espécie atua como modelo biológico para testes de várias naturezas, inclusive testes com substâncias moluscidas (FERREIRA, 2009; NASCIMENTO, 2008).

Além da mortalidade, outros fatores são importantes de serem avaliados em estudos com moluscidas. Alterações sobre a reprodução e crescimento são variáveis importantes para se definir a eficiência de um moluscida, visto que uma diminuição da reprodução ou o retardamento do crescimento são características que podem contribuir para a diminuição do crescimento populacional, principalmente em espécies que apresentam uma relação proporcionalmente direta entre o tamanho corporal e a fecundidade, como é o caso de *S. octona* (D'ÁVILA, 2005a). Trabalhos com esse objetivo já foram realizados para as espécies de molusco terrestre tais como, *S. octona* e *B. similis* (FERREIRA et al., 2009; FERREIRA, et al., 2011; NASCIMENTO, 2008).

De acordo com Panigrahi & Raut (1994) um dos motivos da ineficiência do controle é o desconhecimento do comportamento padrão dos moluscos no ambiente, e das alterações comportamentais relacionadas ao contato com substâncias tóxicas e ou irritantes. Desta forma, são necessários estudos voltados para as observações comportamentais desses animais quando expostos às substâncias moluscidas como forma de verificar suas estratégias de sobrevivência.

Objetivou-se com esse estudo verificar os efeitos de sucessivas aplicações da CL₅₀ do extrato aquoso de *B. pilosa* e *M. glomerata* sobre sobrevivência, crescimento e reprodução de adultos de *S. octona* expostos por 24 e 48 horas e avaliar a ação repelente nos primeiros 10 minutos pós-aplicação.

MATERIAL E MÉTODOS

4.1.1. Local dos experimentos e condições experimentais

Estes experimentos foram realizados no laboratório de Biologia de Moluscos e Helminthos do prédio de Pós Graduação em Ciências Biológicas, Comportamento e Biologia Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG. Esses foram realizados sob temperatura, umidade e fotoperíodo naturais sendo registradas a temperatura média e umidade relativa do ar por termo-higrômetro.

4.1.2. Obtenção e manutenção dos adultos de *Subulina octona*

Os adultos com idade de 60 dias e comprimento médio de concha de $9,48 \pm 1,73$ mm utilizados neste estudo foram obtidos de matrizes do Laboratório de Biologia de Moluscos do Museu de Malacologia Prof. Maury Pinto de Oliveira da Universidade Federal de Juiz de Fora. Esses moluscos foram criados conforme descrito na Seção 3.1.2.

4.1.3. Obtenção, identificação e processamento do material vegetal

A obtenção, identificação e processamento do material vegetal estão descritas na seção 3.1.3. As concentrações utilizadas nesses testes foram as CL_{50} obtidas no experimento II da Seção 3.2.2, sendo 51,4 mg/mL para *B. pilosa* e 44,6 mg/mL para *M. glomerata*.

4.1.4. Experimentos

4.1.4.1. Experimento I- Efeitos de sucessivas aplicações da CL₅₀ do extrato aquoso de *Bidens pilosa* e *Mikania glomerata* sobre a sobrevivência, crescimento e reprodução de adultos de *Subulina octona*, expostos por 24 e 48 horas aos tratamentos

Esse estudo foi realizado durante 90 dias, no período entre 23 de fevereiro a 23 de maio de 2011, durante o período de realização desse estudo a temperatura máxima variou de 18°C a 30°C (média de 26°C), a temperatura mínima, de 14°C a 24°C (média de 18°C), e a umidade relativa do ar, de 50% a 91% (média de 72%).

Foram utilizados neste experimento 40 indivíduos adultos distribuídos em grupos (10 moluscos/grupo, com quatro repetições) para cada período de exposição e para o controle. O critério utilizado para a seleção dos indivíduos adultos foi a presença de ovos no útero visível pela transparência da concha (D'ÁVILA, 2005).

Os moluscos foram mantidos em terrário de polietileno com 50g de terra vegetal onde foram pulverizados 20 mL de extrato, os grupos controles receberam a mesma quantidade de água destilada. Esses foram mantidos no centro do terrário para garantir que todos recebessem a mesma quantidade de extrato. Os potes foram tampados com tecido de algodão e elástico para evitar a fuga dos animais. Após o período de exposição de 24 e 48 horas, os moluscos foram transferidos para outros terrários e estes foram umedecidos e os animais alimentados segundo (ARAÚJO & BESSA, 1993) a cada três dias. Foram feitas três aplicações dos extratos com intervalos de 30 dias onde os moluscos permaneceram pelos mesmos períodos de exposição.

O crescimento foi determinado através de medições mensais do comprimento da concha utilizando um paquímetro Kanon (Mardened Stainless 1/28 in. 1/20mm). As observações para análise de mortalidade foram realizadas a cada três dias, através de observação direta dos animais e os indivíduos mortos foram retirados do terrários. Foram registrados a mortalidade, crescimento, número de ovos produzidos e a eclosão.

4.1.4.2. Experimento II- Atividade repelente dos extratos de *Bidens pilosa* e *Mikania glomerata* sobre adultos de *Subulina octona*

Para esse experimento foram utilizados os mesmos grupos do experimento anterior, as observações para a análise de repelência foram realizadas nos primeiros 10 minutos após a primeira aplicação dos extratos e considerou-se como critério de repelência a migração dos indivíduos para as laterais do terrário (afastamento dos animais da região de aplicação) e deslocamento vertical.

4.1.5. Análise estatística dos dados

Os dados de mortalidade, crescimento, fecundidade e eclosão da prole foram comparados pelo teste Kruskal-Wallis seguido por Student-Newman-Keuls com 5% de significância utilizando o programa BioEstat versão 5.0. As curvas foram obtidas utilizando o programa Origin versão 6.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1. Experimento I- Efeitos de sucessivas aplicações da CL₅₀ do extrato aquoso de *Bidens pilosa* e *Mikania glomerata* sobre a sobrevivência, crescimento e reprodução de adultos de *Subulina octona*, expostos por 24 e 48 horas aos tratamentos

4.2.1.1. Experimento I- Efeitos de sucessivas aplicações da CL₅₀ do extrato aquoso de *Bidens pilosa* sobre a sobrevivência, crescimento e reprodução de adultos de *Subulina octona*, expostos por 24 e 48 horas aos tratamentos

Apenas um molusco tratado com o extrato e exposto por 24 horas morreu nos primeiros 30 dias. Embora a CL₅₀ seja uma estimativa da concentração que causa a mortalidade de 50% dos animais testados, era esperado um percentual aproximado de mortalidade desses moluscos após a primeira aplicação, contudo isso não foi observado. Esse resultado pode indicar uma interferência na ação moluscicida ocasionada pela presença do substrato, isso em campo pode representar a necessidade de aplicação de quantidades maiores ou maiores concentrações para obter o efeito letal sobre o molusco. Esse percentual aproximado foi observado após a segunda aplicação, onde nos grupos expostos por 24 horas a mortalidade foi de 67,5% e 50% para os grupos expostos por 48 horas. A sobrevivência dos moluscos, valores mínimos, máximos, média, desvio padrão e percentual de sobrevivência a cada aplicação estão representadas na Tabela 3.

Sabe-se que os gastrópodes pulmonados absorvem água pelo tegumento (COOK, 2001) e os princípios ativos presentes nesse extrato apresentam elevada solubilidade em água, desta forma a absorção dessas substâncias pelo tegumento é o provável via de intoxicação desse molusco. A proteção que o substrato oferece atua como uma barreira física que diminui o contato efetivo desses animais com o moluscicida e conseqüentemente aumentam as suas chances de sobrevivência. Nascimento (2008) verificou que a presença de substrato influencia na mortalidade de *S. octona* quando aplicou seiva de *F. foetida* nas concentrações de 0,1%, 0,25%, 0,5%, 1%, 3% e 5%. A mortalidade para os indivíduos adultos e jovens foi significativa para todas as concentrações, quando à ausência de substrato. Entretanto com a presença de substrato, a mortalidade só foi significativa nas duas maiores concentrações, essa autora concluiu que a presença de substrato confere sítios de proteção para esse molusco.

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados e controles para os dois períodos nos dois intervalos de exposição ($H=0,5294$; $p=0,9124$) na primeira aplicação. Contudo, após a segunda aplicação a mortalidade diferiu significativamente entre os grupos (24 horas: $H=5,3976$, $p=0,0209$; 48 horas: $H=4,7440$, $p=0,0304$), o tempo de exposição não diferiu entre os grupos tratados ($H= 0,7875$, $p= 0,3749$). A mortalidade dos grupos após a terceira aplicação foi maior apenas para os grupos expostos pelo maior tempo (24 horas: $H= 0,8514$. $P=0,3562$; 48 horas: $5,3976$, $p=0,0209$) não havendo diferenças estatísticas entre os tempos de exposição para os expostos ao extrato ($H=2,6142$, $p=0,1059$). A Tabela 3 apresenta os resultados para cada intervalo de aplicação.

Tabela 3: Número médio e percentual de moluscos *Subulina octona* sobreviventes após exposição ao extrato aquoso de partes aéreas de *Bidens pilosa* utilizando dois tempos de exposição, 24 e 48 horas, observados durante 30 dias.

Grupos		Número de moluscos sobreviventes $X \pm SD$	Percentual de sobrevivência (%)
Primeira aplicação	Controle exposto por 24hs	10 ± 0^a	100
	Controle exposto por 48hs	10 ± 0^a	100
	<i>B. pilosa</i> exposto por 24hs	$9,75 \pm 0,50^a$	97,5
	<i>B. pilosa</i> exposto por 48hs	10 ± 0^a	100
Segunda aplicação	Controle exposto por 24hs	$9,75 \pm 0,50^a$	97,5
	Controle exposto por 48hs	$9,75 \pm 0,50^a$	97,5
	<i>B. pilosa</i> exposto por 24hs	$3,00 \pm 2,90^b$	32,5
	<i>B. pilosa</i> exposto por 48hs	$5,00 \pm 3,20^b$	50,0
Terceira aplicação	Controle exposto por 24hs	$9,25 \pm 0,96^a$	95,0
	Controle exposto por 48hs	$9,75 \pm 0,50^a$	100
	<i>B. pilosa</i> exposto por 24hs	$1,75 \pm 2,36^a$	87,5
	<i>B. pilosa</i> exposto por 48hs	$1,75 \pm 3,50^{a,b}$	67,5

^{a,b}= médias seguidas por letras distintas diferem entre si significativamente pelo teste Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

A sobrevivência entre a primeira e segunda aplicação diferiu significativamente para os dois intervalos de exposição (24 horas: $H=5,3976$, $p=0,0209$; 48 horas: $H=5,3333$, $p=0,0209$). Esse resultado foi semelhante ao observado entre a segunda e terceira aplicação apenas para os grupos expostos por 24 horas (24 horas: $H=5,4634$, $p=0,0209$; 48 horas: $H=0,7590$, $p=0,3836$). Entre a primeira e terceira aplicação apenas houve diferença para os grupos expostos pelo maior tempo (24 horas: $H=1,7719$, $p=0,1832$; 48 horas: $H=5,3976$, $p=0,0209$).

Analisando o Gráfico 6 pode-se perceber que a diminuição da sobrevivência ocorreu acentuadamente após a segunda aplicação. Após a terceira aplicação a mortalidade foi menos pronunciada restando ao final dos 90 dias somente os indivíduos mais resistentes ao extrato. Embora, a terceira aplicação não tenha ocasionado efeitos sobre a sobrevivência desses indivíduos mais resistentes, os expostos por 48 horas tiveram médias de crescimento significativamente menores ($H=15,5883$, $p<0,0001$) em relação ao controle expostos pelo mesmo período. O menor crescimento pode representar um resultado positivo para o controle dessa espécie, uma vez que o tamanho corporal está relacionado com o número de ovos produzidos, como já foi observado por D'ávila & Bessa (2005b).

Resultado oposto foi observado para os grupos expostos por 24 horas ($H=2,8689$, $p=0,0903$), contudo, o crescimento dos grupos tratados foi significativamente menor no 60º dia ($H=4,5183$, $p=0,0337$) e no 30º dia ($H=22,6639$, $p<0,0001$). O crescimento dos grupos ao final do período de observação pode ser observado nos Gráficos 7 e 8. Esse resultado indica que quanto maior o tempo de exposição, maior é o grau de intoxicação do molusco e com isso maior é o gasto energético necessário para a desintoxicação. Desta forma ocorre uma diminuição do conteúdo energético que seria utilizado para o crescimento em prol da sobrevivência. Nascimento (2008) não verificou alterações expressivas sobre o crescimento desse molusco observado por 90 dias após aplicação da seiva de *F. foetida* nas cinco concentrações utilizadas.

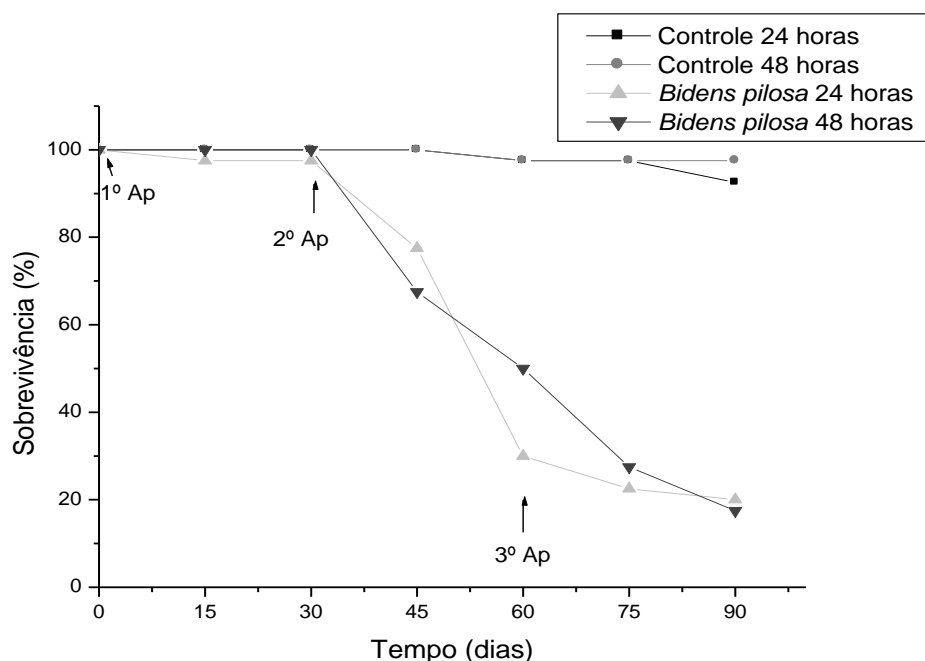


Gráfico 6: Percentual de sobrevivência de *Subulina octona*, exposta ao extrato aquoso de partes aéreas de *Bidens pilosa*, utilizando dois tempos de exposição, 24 e 48 horas, e sendo efetuadas observações por 90 dias. Ap= aplicação.

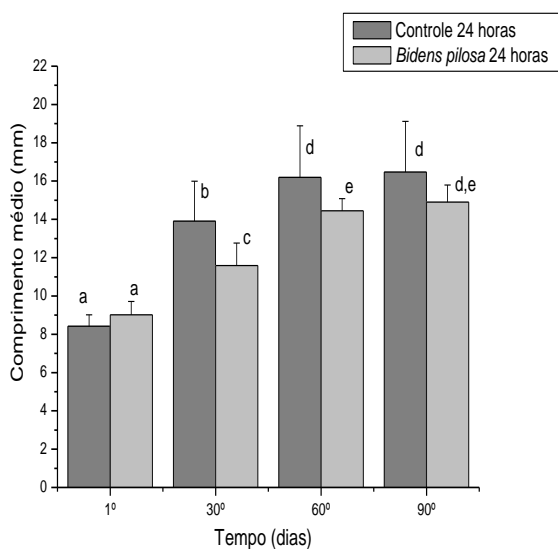


Gráfico 7: Tamanho médio de moluscos *Subulina octona* expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de *Bidens pilosa* por 24 horas de exposição. Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias ($p < 0,05$).

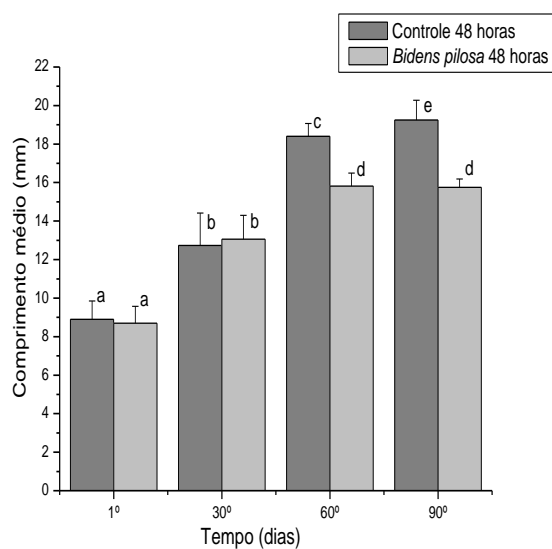


Gráfico 8: Tamanho médio de moluscos *Subulina octona* expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de *Bidens pilosa* por 48 horas de exposição. Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias ($p < 0,05$).

Com relação à reprodução, os testes mostraram não haver diferenças significativas sobre a fecundidade dos moluscos dos grupos tratados e controle, expostos pelo mesmo período após a primeira aplicação do extrato (24 horas: $H=0,7500$, $p=0,3865$; 48 horas: $H=0,3333$, $p=0,5637$). O tempo de exposição também não influenciou a fecundidade dos moluscos tratados com o extrato ($H=0,3333$, $p=0,5637$). Todavia, após a segunda aplicação houve redução significativa na fecundidade dos moluscos expostos ao extrato por 24 horas ($H=5,3333$, $p=0,0209$), esse resultado pode estar relacionado com o tamanho corporal dos animais deste tratamento. Todavia, não foram observadas diferenças sobre a fecundidade nos grupos expostos por 48 horas, ou seja, embora os moluscos expostos pelo maior tempo apresentassem diferenças estatísticas no crescimento no 60º dia, a fecundidade desses foi igual estatisticamente dos grupos controle expostos mesmo período. Porém, analisando os Gráficos 7 e 8 pode-se perceber que o tamanho médio dos moluscos exposto ao extrato por 48 horas não diferiu do controle no 30º dia. Tal diferença só pode ser verificada a partir do 60º, entretanto, nos grupos expostos por 24 horas a diferença no crescimento foi observada desde o 30º dia e inclusive no 60º dia, ou seja, o tempo de desigualdade estatística foi maior para esses grupos, o que pode ter influenciado numa menor fecundidade. Nascimento (2008) não verificou alterações sobre a fecundidade desse molusco em nenhuma das concentrações utilizadas da seiva rica em saponinas de *F. foetida* e da mesma forma não verificou alterações sobre o crescimento. Com base nos resultados obtidos pode-se sugerir que a baixa fecundidade observada em *S. octona* é uma consequência indireta dos efeitos desse extrato sobre o crescimento. O molusco durante o período de intoxicação pode diminuir as reservas de carboidratos que seriam utilizadas para o crescimento e utilizá-las para os mecanismos de desintoxicação (MELLO-SILVA et al., 2011). O número médio de ovos produzidos por molusco em cada aplicação está representado no Gráfico 9

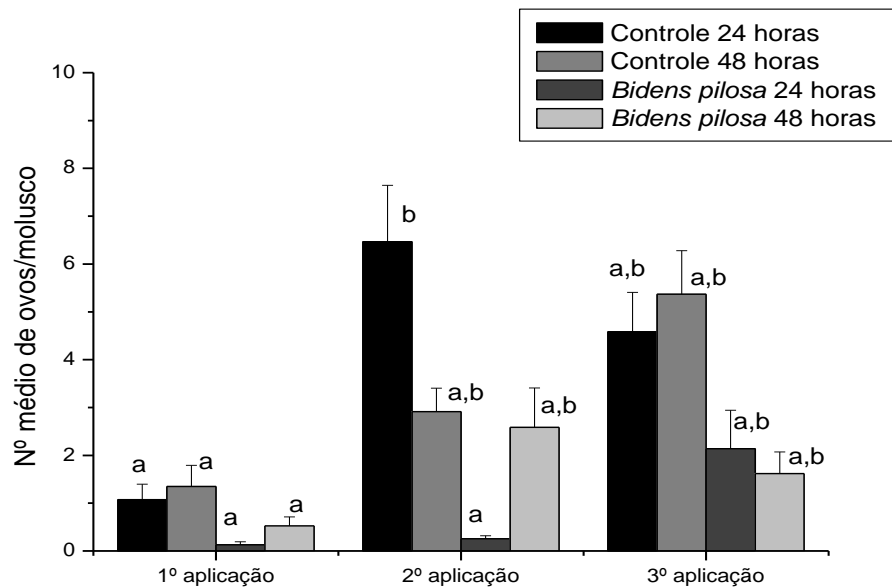


Gráfico 9: Número médio de ovos postos por molusco *Subulina octona* expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de *Bidens pilosa* utilizando diferentes tempos de exposição, 24 e 48 horas. Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias ($p < 0,05$).

A eclosão da prole proveniente dos adultos expostos aos tratamentos não diferiram significativamente para todos os intervalos de exposição ($p > 0,05$). A eclosão dos grupos pode ser observada no Gráfico 10. Trabalhos que avaliem a eclosão da prole proveniente dos adultos expostos são raros na literatura, principalmente para moluscos terrestres. Nascimento (2008) não verificou diferenças significativas na fecundidade bem como a eclosão da prole para as concentrações de 0,5% e 1% de *F. foetida* sobre *S. octona*. Neste trabalho, a autora verificou um percentual de eclosão de 94,8% para o controle e 96,5% e 94% para as concentrações de 0,5% e 1%, respectivamente. Esse percentual foi semelhante ao observado no presente estudo para as duas últimas aplicações. A ausência de atividade desses extratos sobre a prole demonstra que esses princípios ativos podem não apresentar efeito teratogênico nas concentrações utilizadas nessas condições experimentais.

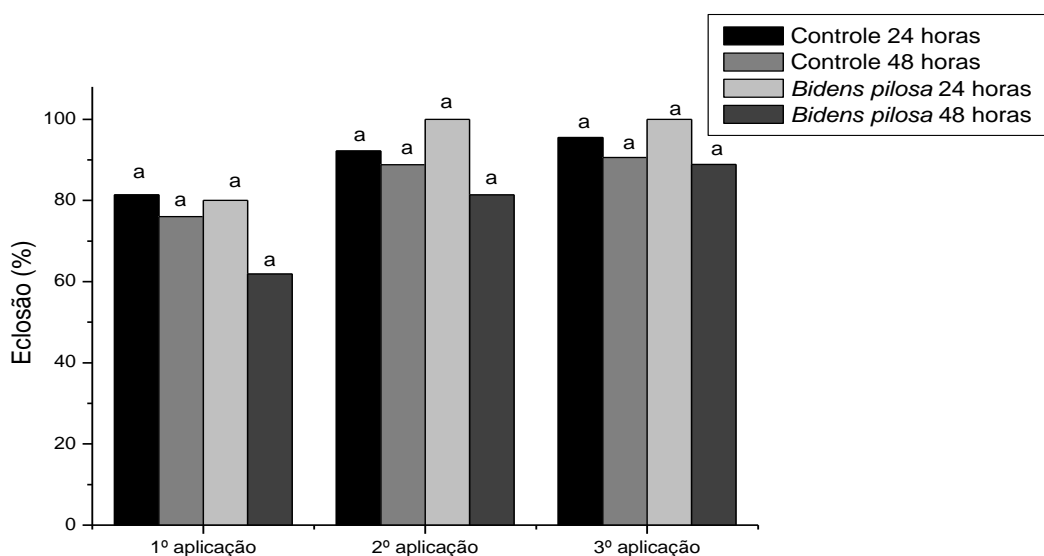


Gráfico 10: Percentual de eclodibilidade de moluscos *Subulina octona* provenientes de ovos postos por moluscos expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de *Bidens pilosa* utilizando diferentes tempos de exposição, 24 e 48 horas. Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos nesse estudo mostram a necessidade de reaplicações dos extratos para alcançar os efeitos desejados. *Subulina octona*, assim como outros moluscos, absorve água pelo tegumento (COOK, 2001) podendo dessa forma absorver as moléculas bioativas, sendo esse então o provável via de absorção dessas substâncias moluscicidas. Entretanto, para que isso ocorra é necessário um contato dérmico efetivo de forma a propiciar essa absorção. No presente estudo e nos resultados obtidos por Nascimento (2008), foi verificada a interferência do substrato nesse processo de intoxicação. As moléculas dos princípios ativos podem ser adsorvidas na matéria orgânica ficando indisponível para a ação moluscicida, além de favorecer sítios com concentrações não letais, favorecendo a sobrevivência desses moluscos. Em campo, isso pode representar a necessidade de reaplicações dos extratos a intervalos menores de tempo. A homogeneidade da aplicação também é importante para diminuir os sítios de proteção para os moluscos e diminuir as chances de desintoxicação e recuperação desses animais.

4.2.1.2. Experimento I- Efeitos de sucessivas aplicações da CL_{50} do extrato aquoso de *Mikania glomerata* sobre a sobrevivência, crescimento e reprodução de adultos de *Subulina octona*, expostos por 24 e 48 horas aos tratamentos

A mortalidade não diferiu estatisticamente entre os grupos expostos ao extrato e controles para os dois períodos de exposição após a primeira aplicação (24 horas: $H=1,3333$, $p=0,2482$; 48 horas: $H=3,1500$, $p=0,0759$). A sobrevivência dos grupos expostos ao extrato foi menor em relação ao controle após a segunda aplicação (24 horas: $H=5,3976$; $p=0,0209$; 48 horas: $H=5,3333$, $p=0,0209$), contudo, não foi observada diferença significativa entre os intervalos de exposição ($H=1,3494$, $p=0,2454$). Assim como na primeira aplicação, também não foi observada diferença significativa entre os grupos após a terceira aplicação (24 horas: $H=2,2152$, $p=0,1367$; 48 horas: $H=1,3333$, $p=0,2482$) e entre os dois períodos de exposição ($H=0,3500$, $p=0,5541$) Tabela 4 e Gráfico 11.

A sobrevivência entre os grupos após a segunda aplicação foi significativamente menor em relação a primeira aplicação para os dois intervalos de exposição (24 horas: $H=4,1325$, $p=0,0433$; 48 horas: $H=5,6000$, $p=0,0209$).

A mortalidade encontrada para os grupos expostos por 48 horas após a segunda aplicação foi semelhante a encontrada por Souza (2003) com cafeína a 1g/L sobre essa mesma espécie de molusco, em 24 horas de observação, todavia as metodologias de aplicação foram distintas.

Tabela 4: Percentual de sobrevivência de moluscos *Subulina octona* ao longo de três exposições ao extrato aquoso de partes aéreas de *Mikania glomerata*, utilizando dois tempos de exposição, 24 e 48 horas, sendo observados por 90 dias.

Grupos		Número de moluscos sobreviventes $\bar{X} \pm SD$	Percentual de sobrevivência (%)
Primeira aplicação	Controle exposto por 24hs	10 \pm 0 ^a	100
	Controle exposto por 48hs	10 \pm 0 ^a	100
	<i>M. glomerata</i> exposto por 24hs	8,75 \pm 1,89 ^a	87,5
	<i>M. glomerata</i> exposto por 48hs	8,50 \pm 1,00 ^a	85
Segunda aplicação	Controle exposto por 24hs	9,75 \pm 0,50 ^a	97,5
	Controle exposto por 48hs	9,75 \pm 0,50 ^a	97,5
	<i>M. glomerata</i> exposto por 24hs	3,75 \pm 2,22 ^b	50
	<i>M. glomerata</i> exposto por 48hs	1,5 \pm 1,91 ^b	30
Terceira aplicação	Controle exposto por 24hs	9,25 \pm 0,96 ^a	95
	Controle exposto por 48hs	9,75 \pm 0,50 ^a	100
	<i>M. glomerata</i> exposto por 24hs	1,5 \pm 1,30 ^a	77,5
	<i>M. glomerata</i> exposto por 48hs	0,25 \pm 0,50 ^a	87,5

^{a,b}= médias seguidas por letras distintas diferem entre si significativamente pelo teste Kruskal-Wallis (p<0,05).

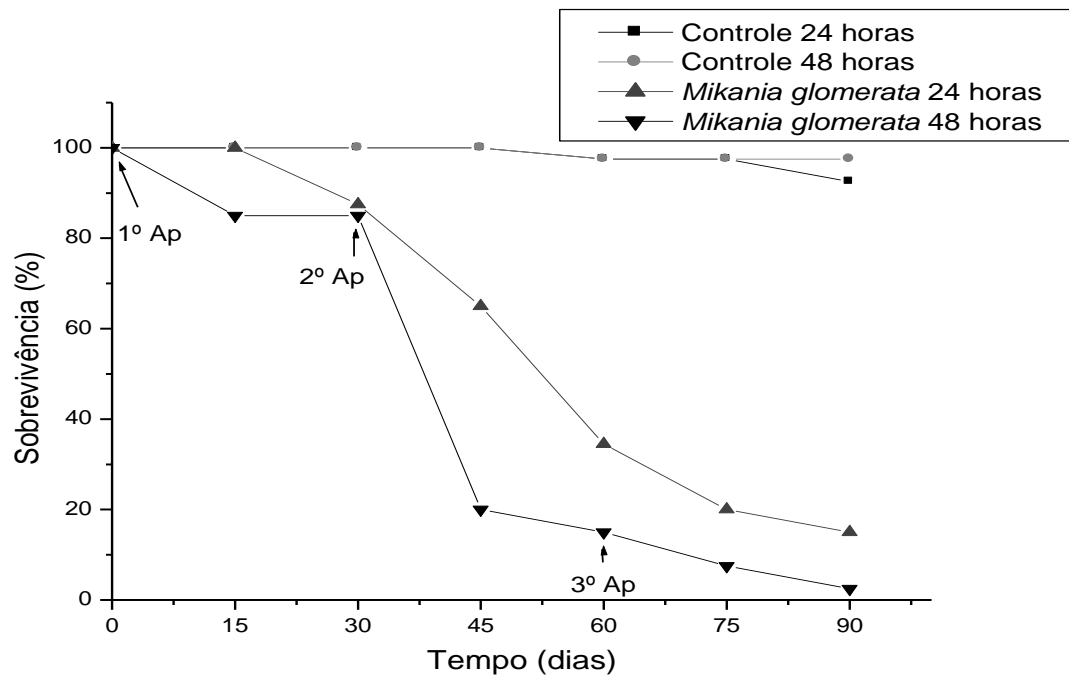


Gráfico 11: Percentual de sobrevivência de moluscos *Subulina octona* ao longo de três exposições ao extrato aquoso de partes aéreas de *Mikania glomerata*, utilizando dois tempos de exposição, 24 e 48 horas, sendo observados por 90 dias. Ap= aplicação.

Embora não tenha sido observada diferença estatística ao final do experimento na sobrevivência dos grupos tratados expostos pelos dois períodos pode-se perceber, de acordo com o Gráfico 11, que os grupos expostos pelo maior tempo sofreram os efeitos do extrato mais rapidamente, em outras palavras, pode-se dizer que o maior tempo de exposição representa maior tempo de intoxicação o que ocasionou maior eficiência em tempo de ação e ao final dos 90 dias restaram apenas os indivíduos mais resistentes. De acordo com a OMS (WHO, 1965) um dos motivos para a ineficiência e repovoamento dos moluscos é a presença de indivíduos resistentes aos efeitos do moluscicida. Desta forma, reaplicações a intervalos menores de tempo poderiam intensificar os efeitos sobre esses mais resistentes.

Com relação ao crescimento, a análise dos grupos expostos por 48 horas foi realizada até o 60º dia devido a alta mortalidade desses grupos após esse período. Ao final dos 90 dias de observação o crescimento dos grupos expostos pelo menor tempo não diferiu estatisticamente ($H=3,2021$, $p=0,0735$), todavia, houve diferença no 30º dia ($H=13,6438$, $p=0,0002$) e no 60º dia ($H=5,424$, $p=0,0200$). O crescimento dos grupos expostos por 48 horas foi significativo ao final de 60 dias ($H=14,8542$, $p<0,0001$) (Gráfico 12 e 13).

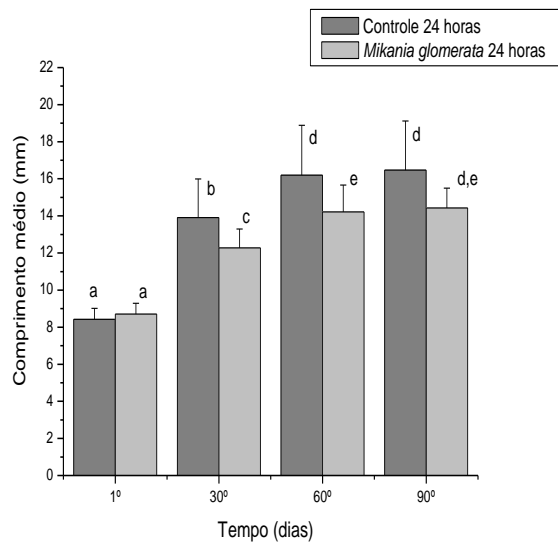


Gráfico 12: Tamanho médio de moluscos adultos de *Subulina octona* expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de *Mikania glomerata* por 24 horas de exposição. Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias ($p < 0,05$).

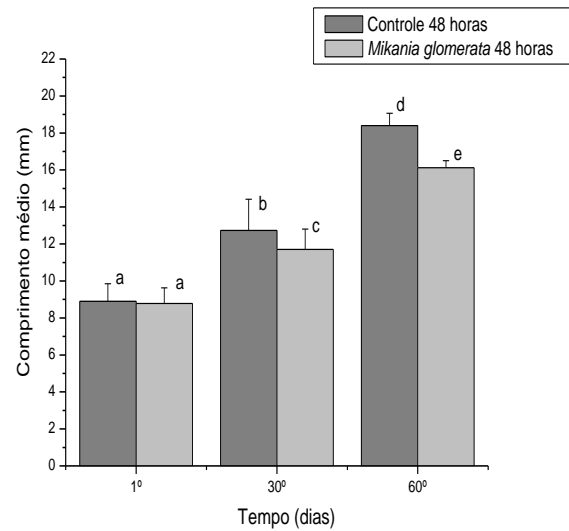


Gráfico 13: Tamanho médio de moluscos adultos de *Subulina octona* expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de *Mikania glomerata* por 48 horas de exposição. Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias ($p < 0,05$).

A fecundidade dos moluscos tratados com o extrato não diferiram significativamente após a primeira aplicação para os dois intervalos de exposição (24 horas: $H=0,3333$, $p=0,5637$; 48 horas: $H=0,0833$, $p=0,7728$). Contudo, essa diferença foi observada para os grupos expostos por 24 horas após a segunda aplicação, onde os grupos expostos ao extrato obteve menor fecundidade ($H=5,3333$, $p=0,0209$), o que não foi observada para os grupos expostos por 48 horas ($H=0,3333$, $p=0,5637$). A fecundidade média dos moluscos em cada aplicação está representada no Gráfico 14.

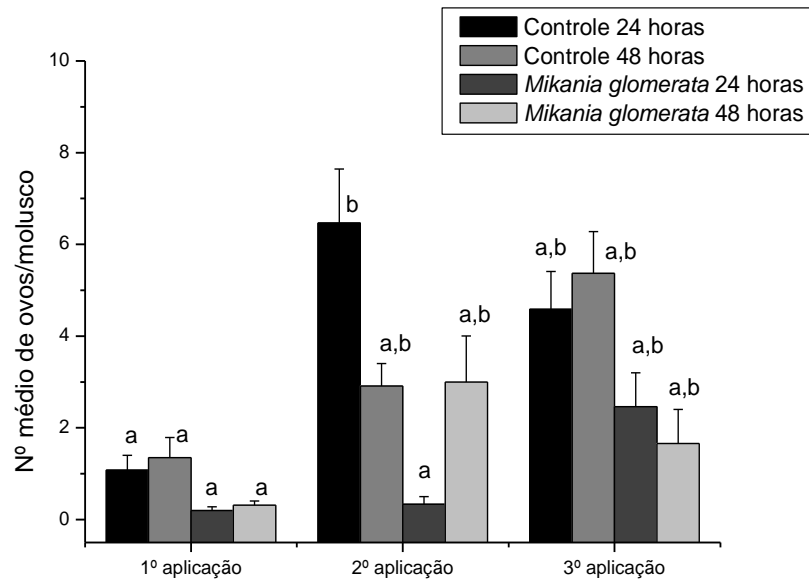


Gráfico 14: Número médio de ovos postos por molusco *Subulina octona* ao longo de três exposições ao extrato aquoso de partes aéreas de *Mikania glomerata*, utilizando dois intervalos de exposição, 24 e 48 horas. Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias ($p < 0,05$).

O teste Kruskal-Wallis mostrou não haver diferenças significativas sobre a eclosão ($p > 0,05$), esse resultado demonstra que a CL_{50} do extrato aquoso de *M. glomerata* também não exerceu efeito sobre a viabilidade dos ovos provenientes dos adultos expostos aos tratamentos (Gráfico 15).

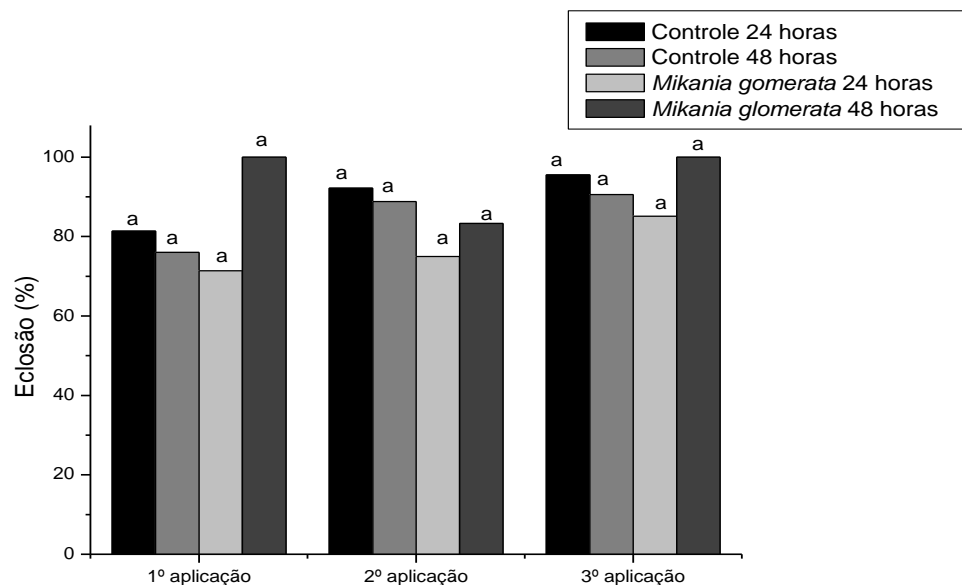


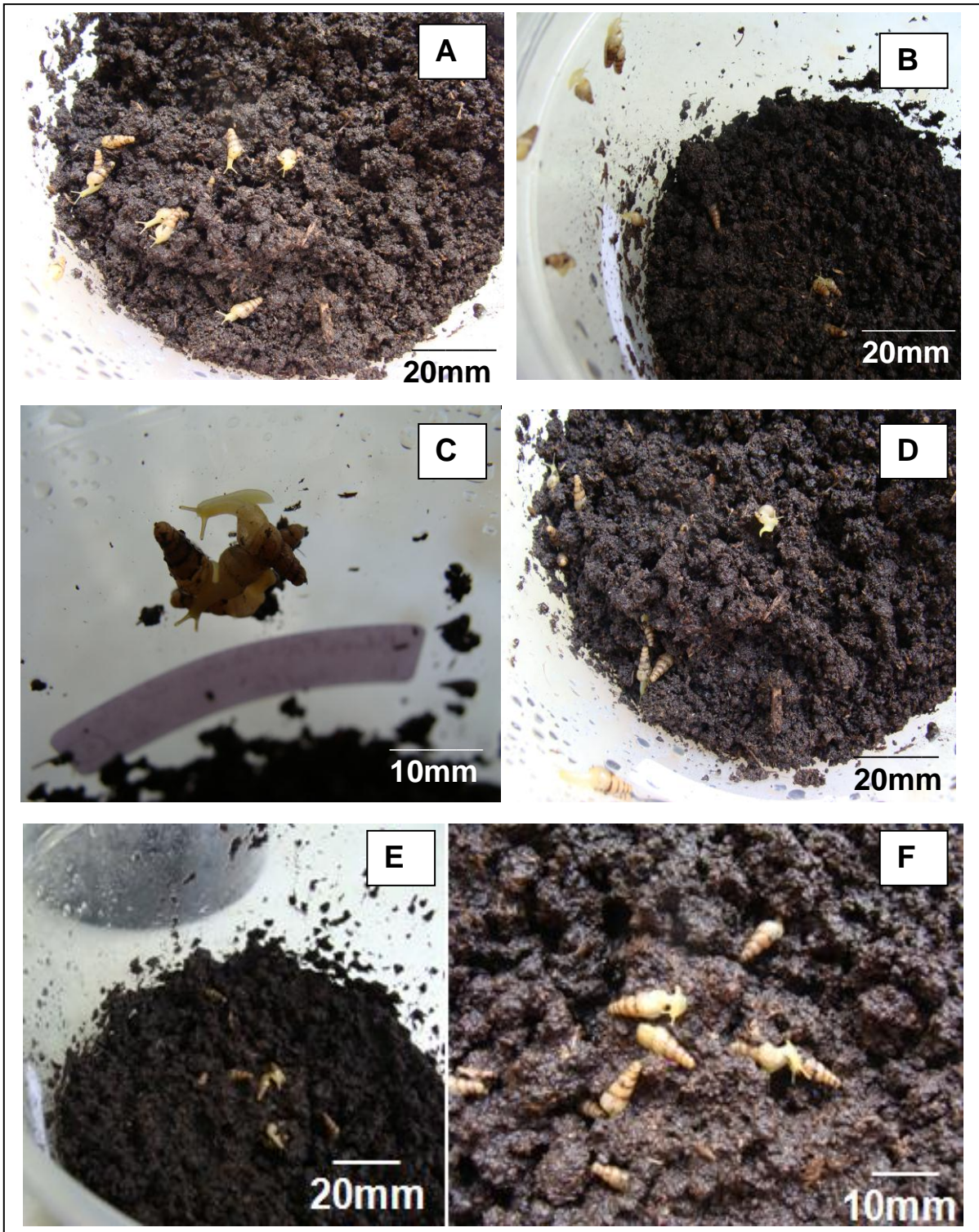
Gráfico 15: Percentual de eclodibilidade de moluscos *Subulina octona* provenientes de ovos postos por moluscos expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de *Mikania glomerata* utilizando diferentes tempos de exposição, 24 e 48 horas. Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias ($p < 0,05$).

Os resultados apresentados neste estudo demonstram a ação tóxica do extrato de *M. glomerata* sobre indivíduos adultos de *S. octona*, ocasionando efeitos sobre a sobrevivência, crescimento e reprodução. Após a terceira aplicação restaram os indivíduos mais resistentes ao extrato, sendo que para esses não houve diferença em relação a fecundidade dos moluscos controle. Esse resultado demonstra a necessidade de reaplicações como forma de intensificar os efeitos sobre essas variáveis.

4.2.2. Experimento II- Atividade repelente de *Bidens pilosa* e *Mikania glomerata* sobre adultos de *Subulina octona*

As CL₅₀ dos extratos de *B. pilosa* e de *M. glomerata* apresentaram efeito de repelência sobre *S. octona*, esse resultado pode ser verificado devido à fuga dos moluscos em direção as paredes do terrário e pelo deslocamento vertical logo após a aplicação do extrato (Fotografias 6A, B, C e D) diferentemente do grupo controle (Fotografia 6E e F).

Na exposição à *B. pilosa*, o comportamento mais comum foi o deslocamento vertical pelas paredes do terrário (Fotografia 6B e C) e para os expostos ao extrato de *M. glomerata* foi observado mais frequentemente um deslocamento horizontal para as laterais do terrário (Fotografia 6D). Os animais se afastaram do centro do terrário onde havia maior concentração dos extratos, e desta forma evitaram as doses letais do moluscicida. Devido à aplicação ter sido direcionada no centro do terrário, as laterais ficaram com ausência ou insuficiência de extrato, tornando a região mais tolerante para os moluscos. Os indivíduos do grupo controle permaneceram no mesmo local onde foi feita a aplicação da água destilada e logo em seguida se enterraram no substrato (Fotografia 6E e F).



Fotografia 6: A) Adultos de *Subulina octona* em fuga após adição do extrato aquoso das partes aéreas de *Bidens pilosa* (B) e (C) exibindo o deslocamento vertical; D) Adultos de *Subulina octona* em fuga para as laterais do terrário após adição do extrato aquoso das partes aéreas de *Mikania glomerata*; E) e F) Adultos de *Subulina octona* do grupo controle após aplicação de água destilada e permanecendo no centro de aplicação.

O comportamento de repelência também foi descrito por Souza (2003) para essa mesma espécie de molusco após aplicação de solução de cafeína. Souza et al. (2009) verificaram esse comportamento sobre adultos de *S. octona* após aplicação do extrato de *A. catártica*. De acordo com D'ávila (2003) o deslocamento vertical não é comum em *S. octona*, sendo mais frequente o deslocamento horizontal, portanto esse comportamento pode indicar um mecanismo de fuga dessa espécie quando em sistemas hostis.

Neste trabalho ficou evidente a ação repelente dos extratos de *B. pilosa* e *M. glomerata* pela exibição do comportamento de fuga da região de aplicação. Além disso, observou-se atividade dos moluscos no período diurno, que de acordo com D'ávila (2003) é horário típico de repouso. França et al. (2009) verificaram a atividade repelente e deslocamento vertical de *S. octona* após aplicação do extrato aquoso de *C. citratus*. Nascimento (2008) também verificou o deslocamento vertical em *S. octona* após aplicação de seiva de *F. foetida* na concentração de 5%. Esse comportamento parece ser uma estratégia de sobrevivência exibida por essa espécie quando em contato com substâncias irritantes e/ou moluscicida.

A atividade repelente sobre outros moluscos terrestres também tem sido relatada na literatura. Afonso-Neto (2003) verificou que indivíduos de *L. unilamellata* apresentaram comportamento de deslocamento horizontal e vertical na presença de extratos de *Euphorbia* spp, uma vez que esse subulinídeo, assim como *S. octona* também não apresenta frequentemente o deslocamento vertical, esse comportamento foi considerado com um mecanismo de fuga. Nascimento et al. (2006) verificou a ação repelente do extrato aquoso de *A. cathartica* sobre adultos de *B. similaris* após exposição aos tratamentos.

Jurberg (1988) sugere que a tendência de abandonar as soluções moluscicidas e o tempo fora delas é o provável mecanismo que garantem a sobrevivência dos animais. Segundo o Ministério da Saúde (2008) alguns comportamentos exibidos por moluscos aquáticos frente a substâncias moluscicida são responsáveis pela ineficiência desses produtos. Dentre esses comportamentos pode-se citar a retração do corpo para o interior da concha de forma a diminuir a superfície de contato com o produto, o enterramento desses moluscos também é frequentemente observado e o afastamento das regiões de maior aplicação, evitando doses letais do moluscicida. Esses comportamentos exibidos por moluscos aquáticos são também exibidos por terrestres e desta forma também podem ser a causa da ineficiência de moluscicidas

A atividade repelente verificada neste estudo contribui para o entendimento do comportamento de *S. octona* frente aos extratos de *B. pilosa* e *M. glomerata* que por sua vez

pode auxiliar os trabalhos em campo para a busca de metodologias de aplicação mais eficientes. É importante salientar que a atividade repelente por si só não contribui de forma eficiente para o controle dessa espécie de molusco, devido a capacidade de dispersar para outras regiões que não tenha sido feita a aplicação do extrato. A elevada capacidade reprodutiva e a possibilidade de realizar autofecundação (BESSA & ARAÚJO, 1995b) contribuem para o sucesso em colonizar novos ambientes (SANTOS & MONTEIRO, 2001). Entretanto, esse comportamento pode ser vantajoso nas culturas anuais, quando existe somente a intenção de afastar os moluscos no período de produção.

CONCLUSÕES

Sob essas condições em que foram realizadas os experimentos e com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

A primeira aplicação dos extratos das duas espécies vegetais não interferiu na sobrevivência dos moluscos, esse fato pode ter sido atribuído provavelmente a presença do substrato que pode oferecer proteção física para os moluscos.

A interferência negativa que os extratos aquosos das duas espécies vegetais ocasionaram sobre a fecundidade e o crescimento de *Subulina octona* é um resultado importante da atividade desses extratos, pois mostram os efeitos biológicos sobre esse molusco, que também são parâmetros relevantes na avaliação de um moluscicida.

Os extratos dos dois vegetais não influenciam na eclosão da prole provenientes dos adultos expostos aos extratos, esse resultado sugere que esses não apresentem atividade teratogênica sobre esse molusco.

O comportamento de repelência obtido para os dois vegetais pode ser vantajoso para culturas anuais, onde existe a intenção de afastar os animais do local de produção.

Os resultados encontrados neste estudo apontam para a necessidade de reaplicações desses extratos de forma a intensificar os efeitos, causando danos letais aos que forem mais resistentes e desta forma aumentar as chances do sucesso do controle.

5. Efeitos da CL₅₀ dos extratos de *Bidens pilosa* Linné e *Mikania glomerata* Sprengel (Asteraceae) sobre diferentes fases do desenvolvimento de *Subulina octona* (Bruguière,1789) (Mollusca, Subulinidae), em laboratório

Vários critérios são avaliados para se verificar a eficiência de um moluscicida, dentre eles a ação deste sobre as diferentes fases de desenvolvimento do molusco se destaca. Para que o controle populacional de uma espécie de molusco seja efetivo é necessário que o moluscicida seja ativo sobre as fases juvenis, adulta e também sobre os ovos (ALCANFOR, 2001; DUNCAN & STURROCK, 1987). Desta forma, estudos que buscam verificar os efeitos sobre as diferentes fases de vida são necessários a fim de contribuir de forma mais abrangente sobre o espectro de ação dessas substâncias.

Estudos sobre atividade moluscicida com extratos vegetais sobre as diferentes fases do desenvolvimento de moluscos terrestres, inclusive *S. octona* já foi verificado na literatura (FERREIRA, 2009; NASCIMENTO, 2006; NASCIMENTO, 2008).

Variáveis biológicas, tais como reprodução e crescimento também são parâmetros importantes de serem verificados, visto que uma diminuição da reprodução ou o retardamento do crescimento são características que podem contribuir para a diminuição do crescimento populacional, principalmente em espécies que apresentam uma relação proporcionalmente direta entre o tamanho corporal e a fecundidade, como é o caso de *S. octona* (D'ÁVILA, 2005b).

Objetivou-se com esse estudo verificar os efeitos dos extratos aquosos de *B. pilosa* e *M. glomerata* sobre a eclosão dos filhotes bem como a sobrevivência, crescimento e alcance de maturidade dos eclodidos e de jovens recém-eclodidos e de 30 dias idade expostos à CL₅₀ por períodos de 24 e 48 horas.

MATERIAL E MÉTODOS

5.1.1. Local dos experimentos e condições experimentais

Os experimentos foram realizados no laboratório de Biologia de Moluscos e Helminthos do prédio de Pós Graduação em Ciências Biológicas, Comportamento e Biologia Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG. Esses foram realizados sob temperatura, umidade e fotoperíodo naturais sendo registradas a temperatura média e umidade relativa do ar por termo-higrômetro.

5.1.2. Obtenção e manutenção dos ovos, jovens recém-eclodidos e de 30 dias

Os ovos, os jovens recém-eclodidos e com idade de 30 dias utilizados neste estudo foram retirados de matrizes do Laboratório de Biologia de Moluscos do Museu de Malacologia Prof. Maury Pinto de Oliveira da Universidade Federal de Juiz de Fora. Esses moluscos foram criados conforme descrito na Seção 3.1.2.

5.1.3. Obtenção, identificação e processamento do material vegetal

A obtenção, identificação e processamento do material vegetal estão descritas na Seção 3.1.3. As concentrações utilizadas nesses testes foram as CL₅₀ obtidas no Experimento II da Seção 3.2.2, sendo 51,4mg/mL para *Bidens pilosa* e 44,6 mg/mL para *Mikania glomerata*.

5.1.4. Experimentos

5.1.4.1. Experimento I- Efeitos das CL₅₀ de *Bidens pilosa* e *Mikania glomerata* sobre a eclosão de *Subulina octona*, expostos por 24 e 48 horas

Esse estudo foi realizado em 30 dias, no período entre 4 de abril a 4 de maio de 2011, durante esse período a temperatura máxima variou de 20,5°C a 26°C (média de 24°C), a temperatura mínima, de 18,5°C a 24°C (média de 21°C), e a umidade relativa do ar, de 81% a 84% (média de 82,5%).

Sessenta ovos foram distribuídos em quatro grupos (15 ovos/grupo, quatro grupos tratados) para cada intervalo de exposição, para *M. glomerata* e *B. pilosa*. Os ovos foram acondicionados em recipientes de polietileno com dimensão (9 cm de diâmetro e 6 de profundidade) contendo 50 g de terra vegetal esterilizada (120°C/1h).

Foram pulverizados 20 mL das CL₅₀ diretamente sobre os ovos que permaneceram expostos durante 24 e 48 horas. Grupos controle com mesma quantidade de ovos permaneceram expostos a 20 mL de água destilada durante os mesmos intervalos de tempo.

Após o período de exposição os ovos foram transferidos para outros terrários de mesma dimensão com terra vegetal esterilizada e umedecida com água de torneira a cada três dias. As observações para análise da eclosão foram realizadas em dias alternados totalizando 30 dias de observação.

5.1.4.2. Experimento II- Sobrevivência da prole proveniente dos ovos expostos aos tratamentos

Esse estudo foi realizado em 120 dias, no período entre 5 de abril a 3 de agosto de 2011, durante o período de realização desse estudo a temperatura máxima variou de 18°C a 28°C (média de 21,8°C), a temperatura mínima, de 14°C a 24°C (média de 18°C), e a umidade relativa do ar, de 50% a 91% (média de 78%).

Os filhotes eclodidos no experimento I foram mantidos nos mesmos recipientes e alimentados conforme descrito na Seção 3.1.2. A análise do alcance da maturidade, bem como de mortalidade foram realizadas a cada três dias.

5.1.4.3. Experimento III- Efeitos da CL_{50} de *Bidens pilosa* e *Mikania glomerata* sobre a sobrevivência, crescimento e alcance da maturidade sexual de jovens recém-eclodidos, expostos por 24 e 48 horas

Esse estudo foi realizado em 120 dias, no período entre 23 de fevereiro a 23 de junho de 2011, durante o período de realização desse estudo a temperatura máxima variou de 18°C a 30°C (média de 26°C), a temperatura mínima, de 14°C a 24°C (média de 18°C), e a umidade relativa do ar, de 50% a 91% (média de 72%).

Foram utilizados neste experimento 40 jovens recém- eclodidos para cada tratamento e intervalo de exposição. O tamanho médio dos jovens tratados com *B. pilosa* foi de $2,03\pm 0,23$ mm e para *M. glomerata* $2,03\pm 0,24$ mm. Os jovens foram distribuídos em grupos (10 moluscos/grupo, com quatro repetições). Esses foram mantidos em potes de polietileno contendo 50g de terra vegetal esterilizada onde foram pulverizados 20 mL de extrato em cada grupo tratado. Esses foram mantidos no centro do terrário para garantir que todos recebessem a mesma quantidade do extrato. Grupos controles foram distribuídos da mesma forma e receberam a mesma quantidade de água destilada. Após período de exposição, de 24 e 48 horas, esses foram transferidos para outros terrários e alimentados como descrito na Seção 3.1.2.

O crescimento foi determinado através de medições mensais do comprimento da concha utilizando um paquímetro Kanon (Mardened Stainless 1/28 in. 1/20mm). As observações para análise de mortalidade foram realizadas a cada três dias, através de observação direta dos animais, os indivíduos mortos foram retirados do terrários. O alcance da maturidade sexual foi realizado na mesma frequência e foi determinado através da presença de ovos no útero, visível pela transparência da concha (BESSA & ARAÚJO, 1995; D'ÁVILA & BESSA, 2005).

5.1.4.4. Experimento IV- Efeitos da CL₅₀ de *Bidens pilosa* e *Mikania glomerata* sobre a sobrevivência, crescimento e alcance da maturidade sexual de jovens de 30 dias, expostos por 24 e 48 horas

O tamanho médio dos jovens de 30 dias tratados com *B. pilosa* e com *M. glomerata* foram de $5,09 \pm 0,57$ mm e $6,00 \pm 0,58$ mm, respectivamente. O período de realização desse experimento e as condições ambientais foram iguais ao experimento III. O número de indivíduos, a metodologia de exposição bem como os parâmetros avaliados para esses animais seguiram a metodologia descrita anteriormente na seção 5.1.4.3- Experimento III.

5.1.5. Análise estatística dos dados

Foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$) para comparação entre as médias de eclosão, mortalidade e crescimento dos indivíduos expostos aos tratamentos, utilizando o software BioEstat versão 5.0. As curvas de sobrevivência e crescimento foram obtidas utilizando o programa Origin versão 6.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2.1. Experimento I- Efeitos das CL₅₀ de *Bidens pilosa* e *Mikania glomerata* sobre a eclosão de *Subulina octona*, expostos por 24 e 48 horas

5.2.1.1. Experimento I- Efeitos das CL₅₀ de *Bidens pilosa* sobre a eclosão de *Subulina octona*, expostos por 24 e 48 horas

O teste de Kruskal-Wallis seguido por Student-Newman-Keuls demonstrou serem significativamente menores as médias de eclosão dos grupos tratados com *Bidens pilosa* em relação ao controle para o mesmo período de exposição (24 horas: H= 9.3384; p=0,0024; 48 horas: H=23.6739; p<0,0001) Gráfico 16.

O tempo de exposição também influenciou as médias de eclosão nos grupos tratados com *B. pilosa*, sendo obtida para o maior período uma menor média de eclosão (H=5.2036; p=0,0229) Gráfico 16. Os grupos controles não diferiram entre si nos dois intervalos de tempo (H=0.0625; p=0,8026) sendo obtido um percentual de 98,3% e 94,6% para os grupos expostos por 24 e 48 horas respectivamente. As médias e desvio padrão, intervalo de variação e porcentagens de eclosão estão representadas na Tabela 5.

Estudos acerca da atividade ovicida sobre essa espécie de molusco terrestre são escassos na literatura. Santos (2005) verificou atividade ovicida em *S. octona* expostos a solução de cafeína a 2,5g/L e a 5g/L utilizando uma metodologia de imersão por 10 minutos. A eclosão obtida no presente estudo para os grupos expostos pelo maior tempo foi próxima a encontrada por essa autora na maior concentração de cafeína. A eclosão desse molusco também foi influenciada pela seiva, rica em saponinas de *F. foetida* (Nascimento, 2008). Essa autora obteve menores médias de eclosão com o aumento da concentração dessa seiva em ovos expostos por 24 horas. Bessa & Araújo (1995) verificaram uma taxa de eclosão de 94,8% para *S. octona* esse resultado representa uma elevada média de viabilidade dos ovos para essa espécie de molusco, essa média de eclosão foi próxima as obtidas neste experimento para os grupos controles exposto aos dois intervalos.

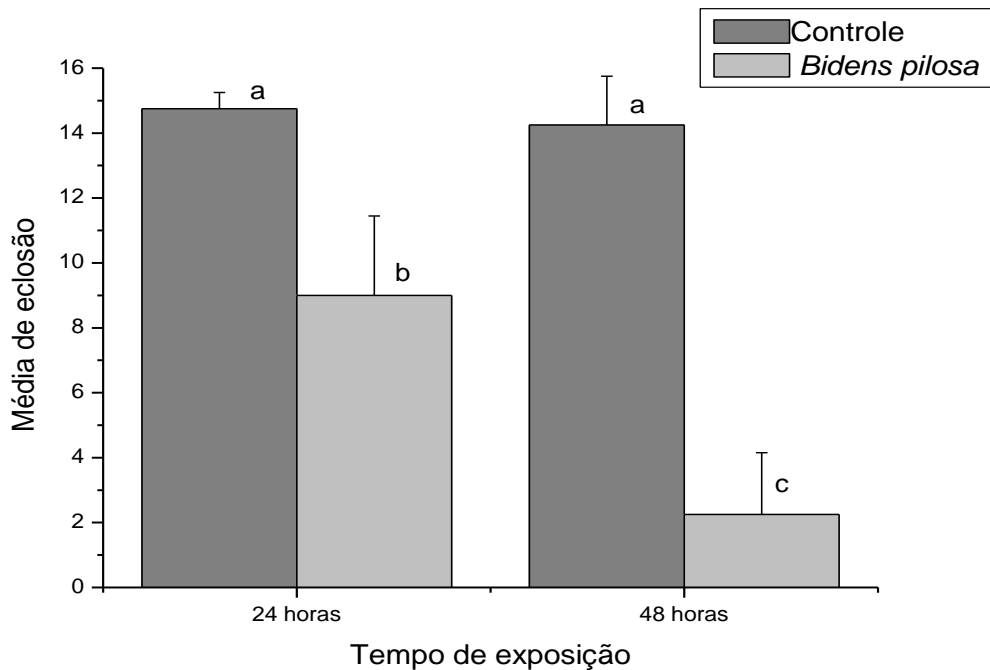


Gráfico 16: Médias de eclosão do molusco *Subulina octona*, expostos ao extrato aquoso de partes aeras de *Bidens pilosa*, utilizando diferentes tempos de exposição, 24 e 48 horas. Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias pelo teste Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Tabela 5: Eclodibilidade de moluscos *Subulina octona* provenientes de ovos expostos ao extrato aquoso de *Bidens pilosa* utilizando dois tempos de exposição, 24 e 48 horas, e 30 dias de observação.

Grupos		Eclodibilidade $X \pm SD$	Intervalo de variação	Percentual de eclosão (%)
Controle	24 horas	14,75±0,43 ^a	(14-15)	98,3
	48 horas	14,25±1,29 ^a	(12-15)	94,6
Expostos	24 horas	9,00±2,12 ^b	(6-12)	61,6
	48 horas	1,02±1,63 ^c	(1-5)	14,9

^{a,b,c}= médias seguidas por letras distintas diferem entre si significativamente pelo teste Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

5.2.1.2. Experimento I- Efeitos das CL_{50} de *Mikania glomerata* sobre a eclosão de *Subulina octona* expostos por 24 e 48 horas

Os resultados obtidos para os moluscos expostos ao extrato de *M. glomerata* foram semelhantes ao de *B. pilosa*. Os testes demonstraram que esse extrato influenciou negativamente a eclosão de *S. octona* nos períodos de exposição de 24 horas ($H=10.9357$; $p=0,001$) e 48 horas ($H= 21.9613$; $p<0,0001$), ocasionando a deterioração dos ovos após o período de observação. O tempo de exposição ao extrato também influenciou a taxa de eclosão, verificando-se eclodibilidade significativamente menor no maior período de exposição ($H=4.536$; $p=0,0343$) Gráfico 17. O percentual de eclosão, média, valores mínimos e máximos e desvio padrão estão representados na Tabela 6. Os resultados obtidos nesse experimento sugerem que o tempo de exposição dos ovos aos extratos está diretamente relacionado com as médias de eclosão, ou seja, com o aumento de tempo de exposição o efeito ovicida foi mais acentuado.

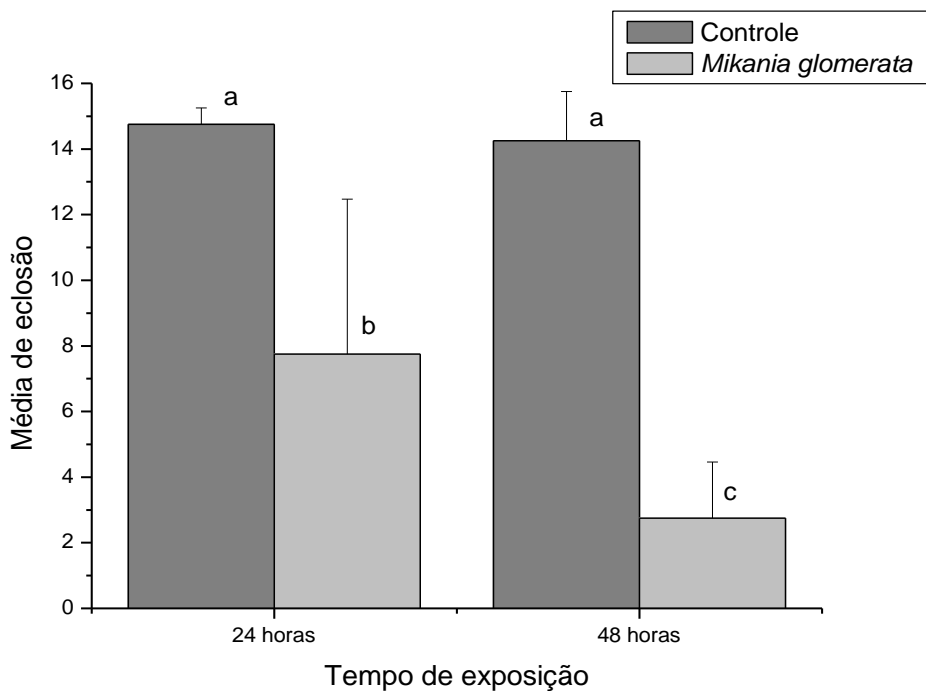


Gráfico 17: Médias de eclosão do molusco *Subulina octona*, expostos ao extrato aquoso de partes aeras de *Mikania glomerata*, utilizando diferentes tempos de exposição, 24 e 48 horas. Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias pelo teste Kruskal-Wallis ($p<0,05$).

Tabela 6: Eclodibilidade de *Subulina octona* tratados com *Mikania glomerata*, nos dois intervalos de exposição, observados durante 30 dias. (média, desvio padrão, intervalo de variação e percentual de eclosão).

Grupos		Eclodibilidade X±SD	Intervalo de variação	Percentual de eclosão (%)
Controle	24 horas	14,75±0,43 ^a	(14-15)	98,3
	48 horas	14,25±1,29 ^a	(12-15)	94,6
Expostos	24 horas	7,75±4,08 ^b	(1-11)	51,6
	48 horas	2,00±1,47 ^c	(1-5)	18,3

^{a,b,c}= médias seguidas por letras distintas diferem entre si significativamente pelo teste Kruskal-Wallis (p<0,05).

A alta fecundidade e viabilidade dos ovos verificada em *S. octona* (BESSA & ARAÚJO, 1995) contribuem para um rápido aumento populacional. Todavia as baixas médias de eclosão verificadas neste experimento representam um importante resultado para o controle dessa espécie, uma vez que quanto menor o número de jovens eclodidos, menores serão as populações de adultos potencialmente reprodutivos.

A inatividade de determinados extratos em ovos de moluscos tem sido questionada por alguns autores (LEYTON et al., 2005). Esses autores não verificaram atividade dos extratos aquosos e alcoólicos das folhas de *L. esculentum*, sobre ovos de *B. glabrata* nas concentrações que foram letais para os adultos. Pereira et al. (1978) testou extratos hexânicos das folhas de *E. cotinifolia* que se mostraram ativos em oviposturas de *B. glabrata* em concentrações aproximadamente 20 vezes superiores às eficazes em caramujos adultos. Santos (2005) não verificou diferença significativa sobre a eclosão de *B. similaris* quando expostos a soluções de cafeína a 2,5g/L e 5%. Souza et al (1992) verificou uma concentração letal em oviposturas de *B. glabrata* de 30 ppm, enquanto a concentração letal em adultos foi de 2 ppm do extrato hexânico da casca de *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae). Magalhães (2003) verificou que o extrato etanólico das sementes e frutos de *Swartzia langsdorffii*, rico em saponinas, não apresentou atividade sobre ovos de *B. glabrata* nas mesmas concentrações que foram ativas em adultos. Segundo Lemma & Yau (1974), o baixo efeito do moluscicida em ovos é provavelmente aos altos pesos moleculares que impedem a passagem desses pela membrana que envolve o ovo, todavia, os extratos de *B. pilosa* e de *M. glomerata* afetaram a eclosão de *S. octona* nas concentrações subletais calculadas para os adultos, mostrando-se vantajoso frente a outros moluscicidas. Esse resultado sugere que a

estrutura molecular dos princípios ativos responsáveis pela atividade tóxica desses vegetais apresenta uma estrutura molecular mais simplificada com poucas ramificações, o que então facilitaria a sua penetração pelos poros da membrana que envolve o embrião. Desta forma pode-se perceber que a concentração letal para adultos de *S. octona* também foi letal sobre seus ovos.

Acredita-se que a ação ovicida esteja mais relacionada com a ação dos taninos. Com Sabe-se que os ovos dos moluscos são ricos em proteínas, carboidratos e água para a nutrição do embrião, desta forma qualquer alteração da concentração desses nutrientes pode ocasionar danos letais ao embrião. Segundo Haslam (1998), os taninos complexam não apenas com proteínas, mas também com alguns polissacarídeos. Essa classe de compostos é solúvel em água (SIMÕES et al., 2010) e por isso podem penetrar mais facilmente pela membrana gelatinosa que envolve o embrião. Esses podem complexar com as proteínas e com os carboidratos presentes no vitelo causando sua precipitação e limitando a nutrição do embrião.

Além disso, o aumento da eficiência com o aumento do tempo de exposição indica que os princípios ativos desses extratos são estáveis pelo menos até 48 horas pós-aplicação. Uma vantagem que os moluscidas sintéticos apresentam sobre os vegetais é a estabilidade das suas moléculas bioativas (Morgan, 1982). Desta forma, muitas substâncias de origem natural que reconhecidamente apresentam atividade biocida precisam ser sintetizadas em laboratório para a obtenção de análogos que apresentem como característica principal uma maior estabilidade molecular. Todavia, neste estudo a atividade ovicida foi proporcional ao tempo de exposição, isso indica que essas moléculas bioativas permanecem no substrato sem sofrer degradação significativa pelo menos até 48 horas pós-aplicação. Essa estabilidade química parece ser uma característica vantajosa dos princípios ativos presentes nesses extratos quando essa está relacionada com a eficiência na atividade.

Somado a isso, para que o controle em campo seja bem sucedido é importante conhecer o comportamento da espécie quando o alvo é também os ovos. Características como preferência por habitat, construção do ninho e o período preferencial para realizar ovipostura são fatores essenciais para o sucesso do controle. De acordo com Araújo (1982) a presença de *S. octona* é mais frequente em épocas quentes e chuvosas do ano, habita-se no solo, sob pedras. Bessa & Araújo (1995) constataram a influência da temperatura sobre a fecundidade desse molusco, sendo observado maior número de oviposições nos meses mais quentes do ano. Os ovos são depositados no fundo do substrato, através de fendas abertas na terra pelo próprio molusco ao enterrar-se. Esses mesmos autores verificaram também que a espécie *S. octona* apresenta atividade noturna, sendo o período preferencial para realizar ovipostura, o

que também foi verificado por D'ávila (2003). Conhecer essas características possibilita um planejamento de controle de forma a otimizar o processo.

5.2.2. Experimento II- Sobrevivência da prole proveniente dos ovos expostos aos tratamentos

5.2.2.1. Sobrevivência da prole proveniente dos ovos tratados com a CL_{50} de *Bidens pilosa*, expostos por 24 e 48 horas

A sobrevivência dos recém-eclodidos dos grupos tratados foram menores quando comparados com a dos grupos controles expostos pelo mesmo período (24 horas: $H=11.8127$; $p=0,0027$; 48 horas: $H=15.4655$; $p=0,0004$). Os testes também mostraram que o tempo de exposição dos ovos aos extratos influenciou na sobrevivência dos eclodidos. A sobrevivência dos grupos tratados em 24 horas foi significativamente superior em relação aos expostos por 48 horas ($H=8.1699$; $p=0,0047$) não havendo sobreviventes ao final de 45 dias de observação (Gráfico 18). A sobrevivência dos grupos controle não diferiu entre si nos dois intervalos de exposição ($H=8,3333$; $p=0,2612$).

A mortalidade de 100% dos grupos tratados por *B. pilosa* expostos por 48 horas foi igual a encontrada por Santos (2005) para recém-eclodidos de *S. octona* provenientes de ovos tratados com cafeína a 5g/L. A semelhança tanto na porcentagem de eclosão quanto na sobrevivência dos eclodidos desses tratamentos poderiam indicar igualdade na eficácia desses moluscicidas, porém qualquer comparação desse tipo não seria apropriada visto que as metodologias de exposição foram diferentes.

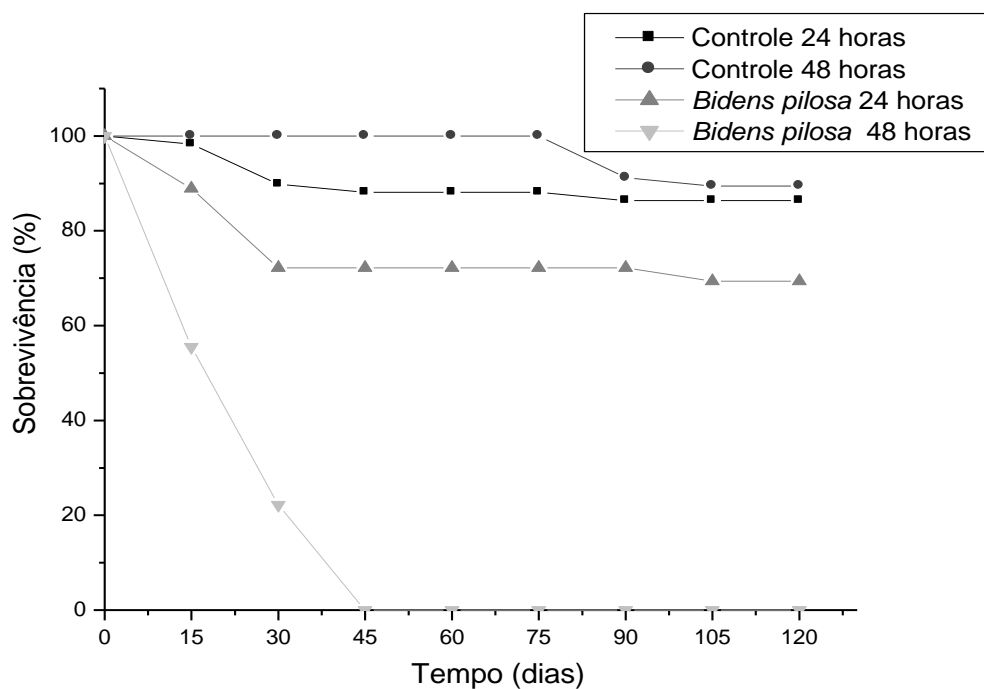


Gráfico 18: Sobrevivência da prole de *Subulina octona* proveniente de ovos expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de *Bidens pilosa*, utilizando dois tempos de exposição, 24 e 48 horas, em observações realizadas em 120 dias.

Analisando a curva de sobrevivência dos grupos tratados por 48 horas, pode-se perceber o delineamento de uma curva de regressão polinomial de grau dois até o 45º dia de observação (Gráfico 18; Gráfico 19). Além disso, os pontos obtidos nesta curva sugerem que os efeitos do extrato sobre a prole foi gradativo ao longo desse tempo, obtendo taxas decrescentes de sobrevivência. As taxas obtidas para os pontos um, dois e três representados na curva foram 2,93%/dia, 2,2%/dia e 1,53%/dia, respectivamente.

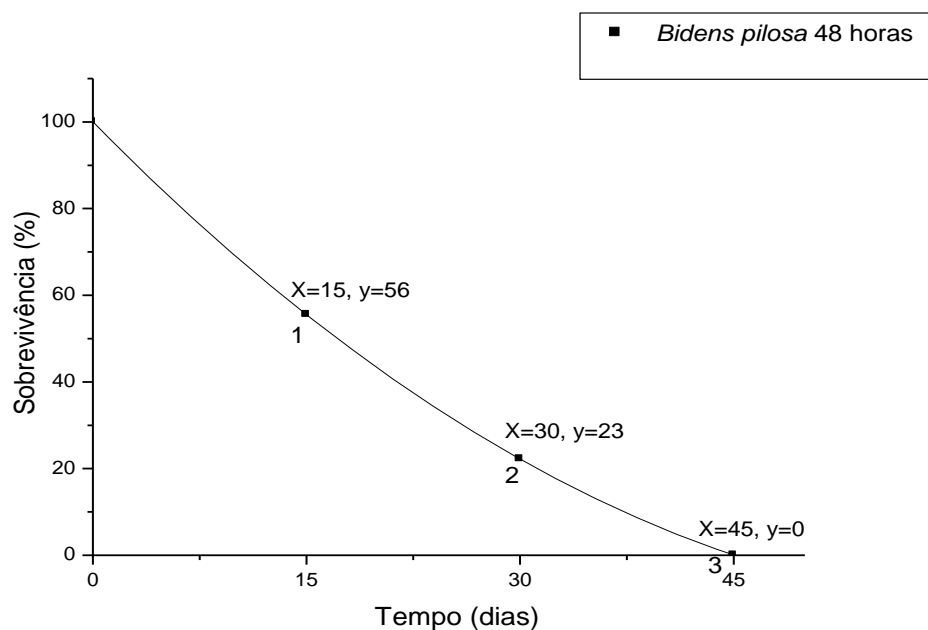


Gráfico 19: Relação entre percentual de sobrevivência e tempo após exposição de *Subulina octona* proveniente de ovos expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de *Bidens pilosa*, utilizando 48 horas de exposição, em observações realizadas durante 45 dias.

Não foi observado alcance de maturidade sexual para os grupos tratados e controles para os dois intervalos de exposição. Santos (2005) também não verificou alcance de maturidade sexual desse molusco tratados com cafeína a 2,5g/L e do controle em um período de 120 dias de observação. Esses resultados diferem dos encontrados por Bessa & Araújo (1995) que verificaram um tempo de 38 a 50 dias para o alcance da maturidade sexual, todavia este estudo foi realizado em uma temperatura superior, variando entre 23 - 26 °C a desse experimento. O alcance da maturidade sexual foi verificado por Marcus & Marcus (1968 apud BESSA & ARAÚJO, 1995) ao 109º dia de vida desse molusco, todavia esses autores não mencionaram as condições experimentais em que foram realizados os experimentos. As temperaturas e umidade relativa do ar registradas nesse estudo estão representadas nos Gráficos 20 e 21.

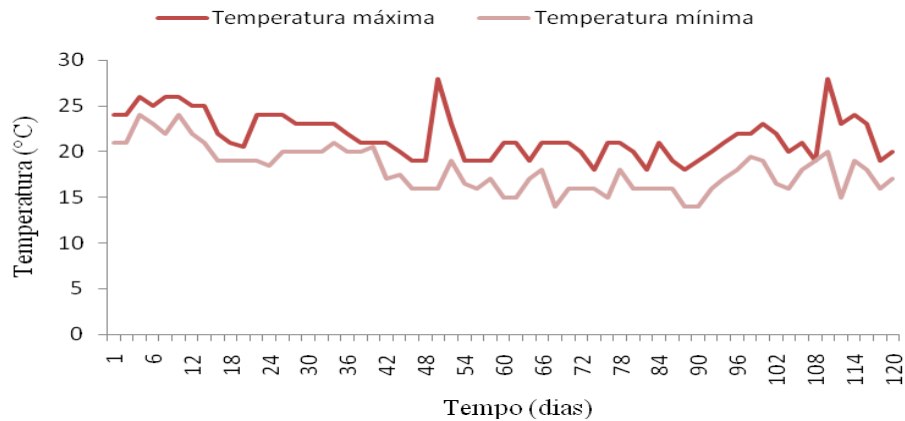


Gráfico 20: Temperaturas máximas e mínimas registradas durante 120 dias.

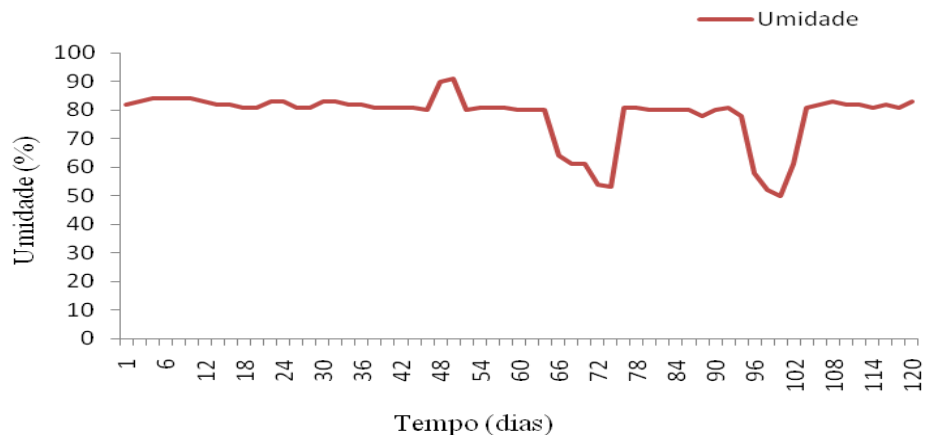


Gráfico 21: Umidade relativa do ar registradas durante 120 dias

Segundo D'ávila et al. (2004) vários fatores podem interferir no ciclo de vida de moluscos pulmonados, dentre eles a temperatura e umidade são muito importantes, pois regulam o ritmo de desenvolvimento das populações de moluscos, podendo interferir na reprodução e sobrevivência. Furtado et al. (2004) também afirma que essas variáveis interferem no crescimento, comportamento e reprodução. Esses autores verificaram que a umidade relativa do ar e a temperatura influenciam a produção de gametas em *B. similaris*. Parece que essas variáveis foram as principais pressões seletivas sobre esses grupos, visto que não houve alcance de maturidade nem mesmo dos grupos controle.

5.2.2.2. Experimento II- Sobrevivência da prole proveniente dos ovos tratados com a CL_{50} de *Mikania glomerata*, expostos por 24 e 48 horas

A sobrevivência dos jovens provenientes dos ovos tratados com *M. glomerata* durante 24 e 48 horas foi significativamente menores em relação aos grupos controle (24 horas: $H=8.1270$, $p=0,0047$; 48 horas ($H=10.5058$; $p=0,0023$) Gráfico 22.

Embora as média de eclosão para os grupos tratados com *M. glomerata* por 24 horas tenham sido maiores quando comparadas com os expostos por 48 horas, a sobrevivência dos jovens eclodidos não se comportou da mesma forma. A sobrevivência dos jovens provenientes do grupo exposto ao extrato por 48 horas foi superior a dos grupos tratados por 24 horas ($H=5.3333$; $p=0,0341$). Não foram observadas diferenças significativas no percentual de sobrevivência de jovens grupos controles nos periodos observados ($H=8,3333$; $p=0,2612$). Analisando as curvas de sobrevivência pode-se perceber uma interseção entre os grupos tratados nos dois intervalos de exposição (Gráfico 22). No 24º dia pós-exposição a sobrevivência dos grupos expostos por 24 horas era igual a dos grupos expostos por 48 horas, cujo valor era aproximadamente de 58%. A partir desse ponto os grupos se comportaram de maneiras distintas.

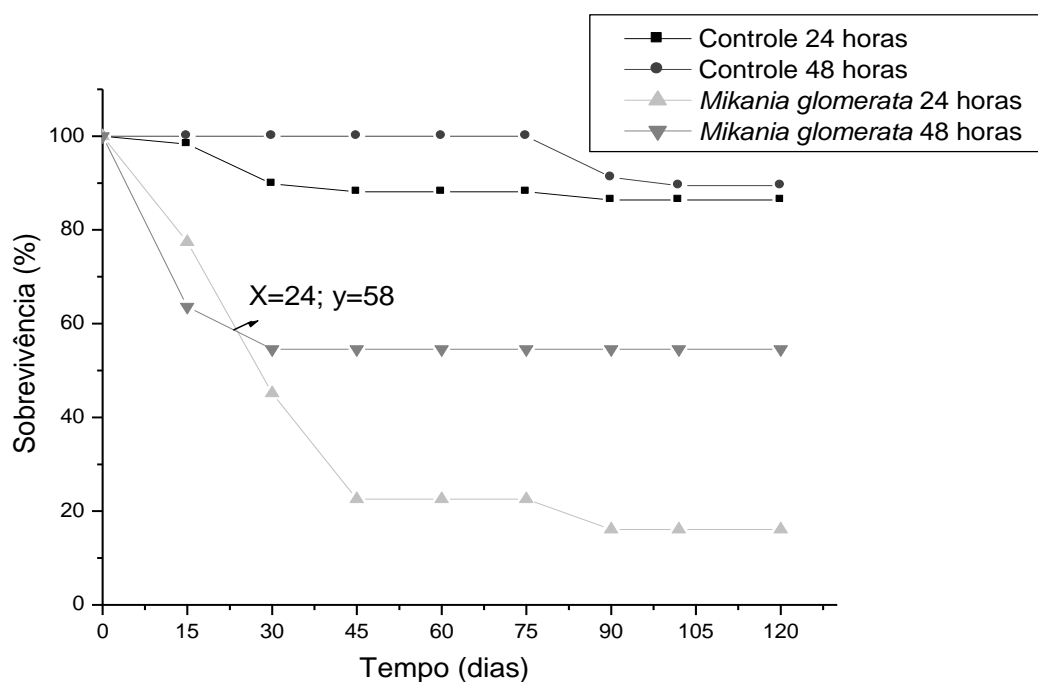


Gráfico 22: Sobrevivência de jovens de *Subulina octona*, expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de *Mikania glomerata*, utilizando dois tempos de exposição, 24 e 48 horas, em observações realizadas durante 120 dias.

Os grupos expostos por 48 horas tiveram uma leve queda na sobrevivência, em seguida manteve-se constante durante todo período de observação. De forma distinta, a sobrevivência dos grupos expostos por 24 horas manteve-se numa linearidade negativa até o 45º dia de observação, mantendo em seguida uma média relativamente constante.

Esses resultados indicam que a intensidade dos efeitos sobre a sobrevivência desses jovens eclodidos é equivalente até o 24º dia e após esse período os moluscos expostos por 24 horas foram mais sensíveis aos efeitos remanescentes do extrato de *M. glomerata*. Esse resultado pode estar relacionado à variabilidade genética dos indivíduos expostos por 24 horas, onde esses apresentaram menor resistência aos efeitos do extrato. Sabe-se que suscetibilidade individual é também um dos diferentes fatores que influenciam a toxidez de um praguicida (SUCEN- 2000-2001). Essa possibilidade parece ser apropriada para justificar essa diferença, uma vez que este resultado diverge dos outros obtidos nesse estudo.

Não foi observado alcance de maturidade sexual dos moluscos dos grupos tratados e controle durante todo período de observação, provavelmente esse resultado é devido as baixas temperaturas registradas durante esse período.

5.2.3. Experimento III- Efeitos da CL₅₀ sobre a sobrevivência, crescimento e reprodução de jovens recém eclodidos tratados com *Bidens pilosa* e *Mikania glomerata* expostos por 24 e 48 horas

5.2.3.1. Efeitos da CL₅₀ sobre a sobrevivência, crescimento e reprodução de recém-eclodidos tratados com *Bidens pilosa*, expostos por 24 e 48 horas

As observações foram realizadas até o 90º dia de experimento devido a alta mortalidade dos grupos tratados com o extrato exposto por 48 horas após esse período. A sobrevivência dos grupos expostos ao extrato foi significativamente reduzida ao final do experimento (24 horas: H=5.4634, p=0,0209; 48 horas: H= 5.6709, p=0,0209). O tempo de exposição ao extrato influenciou na sobrevivência dos moluscos tratados sendo obtido para o maior período de exposição uma menor sobrevivência (H= 4.5733, p=0,0433). Diferentemente dos expostos aos extratos, o tempo não influenciou na sobrevivência dos grupos controles. (H=0.35, p=0,5541). A sobrevivência dos grupos está representada no Gráfico 23, intervalo de variação, desvio padrão e percentual de sobrevivência na Tabela 7.

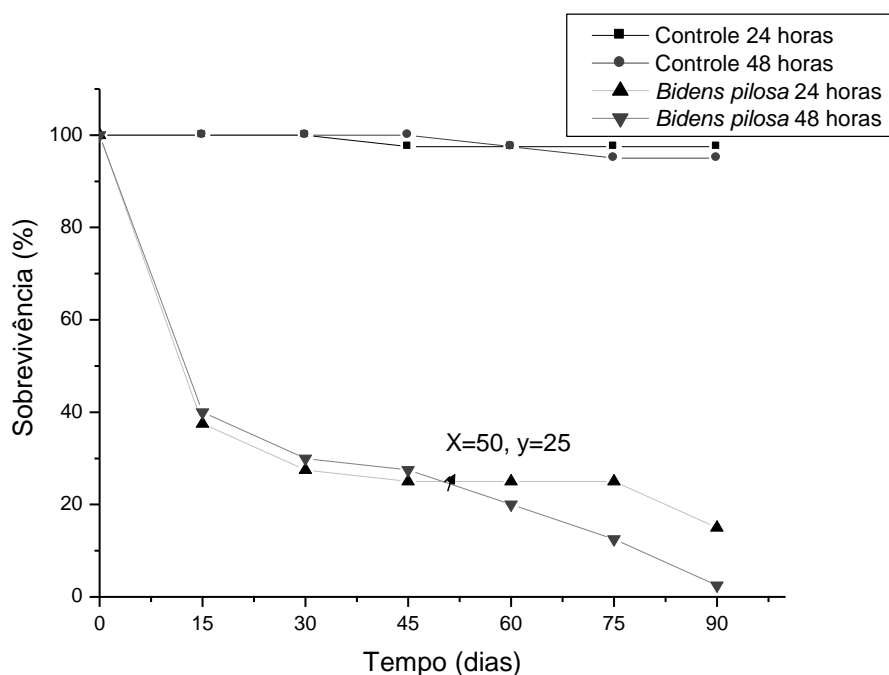


Gráfico 23: Sobrevivência de jovens recém eclodidos de *Subulina octona* expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de *Bidens pilosa*, utilizando dois intervalos de exposição, 24 e 48 horas, em observações realizadas durante 90 dias.

Tabela 7: Sobrevivência de recém- eclodidos de *Subulina octona* expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de *Bidens pilosa*, utilizando dois intervalos de exposição, 24 e 48 horas, observadas durante 90 dias. (valor máximo, mínimo, média, desvio padrão e percentual).

Grupos		Intervalo de variação	Sobrevivência $X \pm SD$	Percentual de eclosão (%)
Controle	24 horas	(9-10)	$9,75 \pm 0,50^a$	97,5
	48 horas	(9-10)	$9,50 \pm 0,58^a$	95,0
Expostos	24 horas	(1-2)	$1,50 \pm 0,58^b$	15,0
	48 horas	(0-1)	$0,25 \pm 0,50^c$	2,5

^{a,b,c} = médias seguidas por letras distintas diferem entre si significativamente pelo teste Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Analisando o Gráfico 23 pode-se perceber uma semelhança na queda de sobrevivência entre os grupos expostos aos extratos. A queda na sobrevivência dos moluscos foi similar até o 50º dia de observação, após esse tempo os grupos diferiram entre si. Além disso, nesse intervalo de semelhança foi observado que a queda na sobrevivência nesses grupos representa

uma curva de decaimento exponencial de 1° ordem (Gráfico 24). Essa curva demonstra que a sobrevivência dos moluscos foi bruscamente afetada aos primeiros 15 dias pós-exposição e em seguida a sua queda ocorreu de forma mais gradativa. Essa análise está de acordo com as taxas de sobrevivência obtidas com os três pontos representados na curva (Gráfico 24) As taxas encontradas foram de 4%/dia, 0,67%/dia e 0,17%/dia para os pontos um, dois e três respectivamente. A partir do ponto de interseção as duas curvas se comportaram de maneiras distintas, onde se pode observar que o grupo exposto por 48 horas seguiu uma linearidade negativa até o 90° dia atingindo uma sobrevivência de 2,5%. Ao contrário desses, o grupo 24 horas manteve constante o seu percentual de sobrevivência e após o 75° dia apresentou um decaimento de 10% na sobrevivência.

Além disso, pode-se perceber que cerca de 60% dos animais expostos ao extrato foram mais susceptíveis aos seus efeitos tóxicos, pois morreram nos primeiros 15 dias pós-aplicação, restando os mais resistentes, que por sua vez sofreram os efeitos residuais do moluscicida ao longo do tempo. Esses efeitos residuais podem estar relacionados com o acúmulo de princípios ativos no organismo do molusco durante o período de exposição, fato que sugere a ação insuficiente do mecanismo de desintoxicação. Isso pode ter ocorrido devido a ação dos flavonóides interferindo no sistema desintoxicante desse molusco.

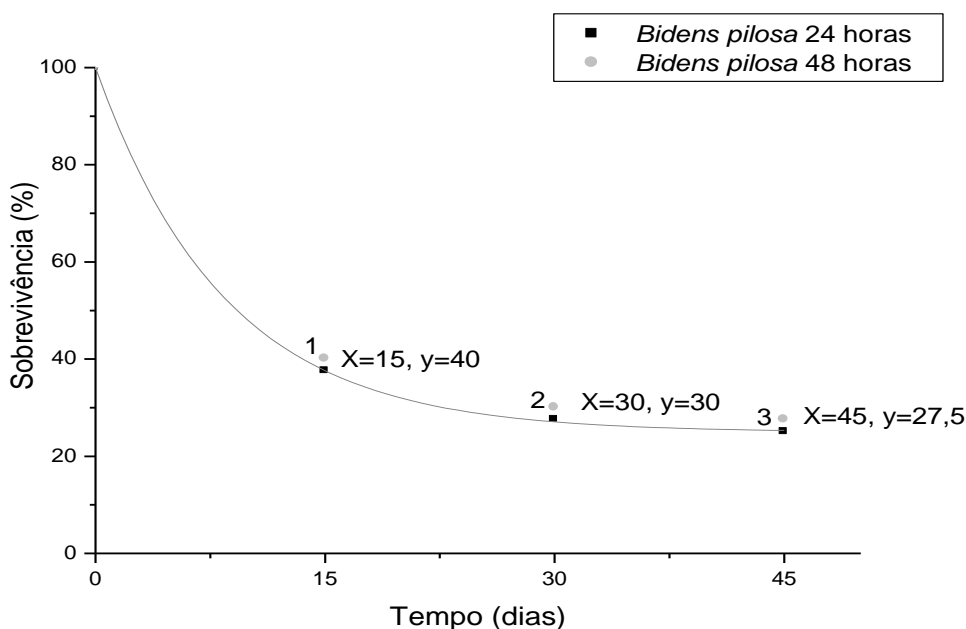


Gráfico 24: Sobrevivência de jovens recém eclodidos de *Subulina octona*, expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de *Bidens pilosa*, utilizando dois intervalos de exposição, 24 e 48 horas, observadas durante 90 dias, em observações realizadas durante 45 dias após a exposição.

Com relação ao crescimento, a análise dos grupos expostos ao extrato por 48 horas foi feita até o 60º dia de observação devido à alta mortalidade desses grupos após esse período. Os testes demonstraram que o tamanho médio dos grupos expostos por 24 horas não diferiu do controle no mesmo período de exposição ao final dos 90 dias de observação ($H=0.8628$, $p=0,353$). O tempo de exposição influenciou no crescimento desses molusco, o maior tempo de exposição ao extrato de *B. pilosa* resultou num menor crescimento em relação ao controle ($H= 8.6729$, $p=0,0033$) Gráfico 25 e 26. Mas qualquer comparação de eficiência neste sentido não é apropriada, pois as medidas para os grupos expostos por 48 horas foram feitas até o 60º e para esse mesmo período também houve diferença no crescimento dos grupos expostos por 24 horas, não se pode afirmar que o maior tempo de exposição é mais danoso ao crescimento.

O resultado negativo de moluscidas sobre o crescimento de *S. octona* já foi verificado por outros autores. Santos (2005) não verificou diferença sobre o crescimento desse molusco quando tratado com soluções de timol a 2,5g/L e 5g/L e observados por 120 dias. Resultado semelhante foi obtido por Nascimento (2008) que também não verificou alterações expressivas após aplicação de extrato de *F. foetida*, esses resultados demonstram a capacidade de recuperação dos indivíduos mais resistentes ao estresse provocado pela exposição aos agentes tóxicos.

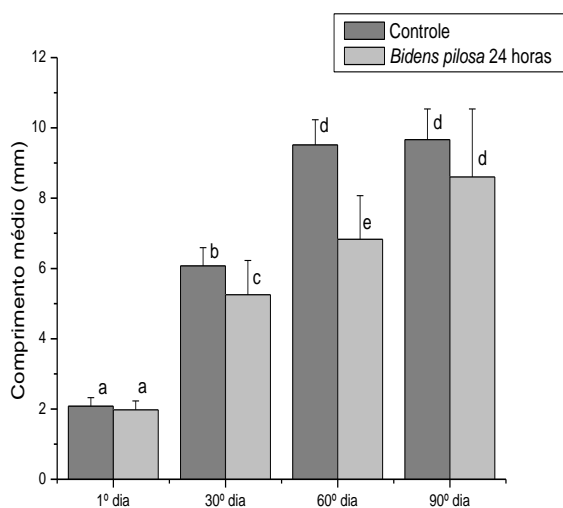


Gráfico 25: Tamanho médio de moluscos *Subulina octona* expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de *Bidens pilosa* por 24 horas de exposição. Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$).

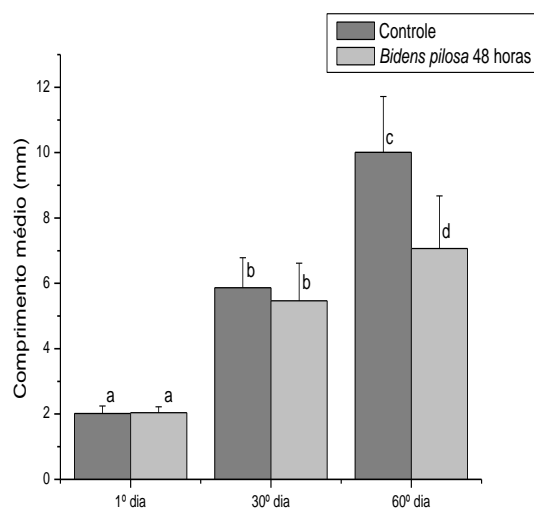


Gráfico 26: Tamanho médio de moluscos *Subulina octona* expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de *Bidens pilosa* por 48 horas de exposição. Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$).

Observou-se variação entre o tempo para alcance da maturidade sexual de acordo com o tempo de exposição ao extrato de *B. pilosa* e em relação ao controle. Para os grupos expostos por 24 horas foi observado que dois moluscos ao final dos 90º dia de experimento alcançaram a maturidade sexual com a idade média de $81 \pm 8,5$ dias. Os moluscos dos grupos controles nesse período, cinco (13%) atingiram a maturidade com idade média de $59 \pm 4,9$ dias. De forma distinta, os moluscos tratados por 48 horas não atingiram a maturidade sexual ao final do experimento, dos grupos controles exposto por 48 horas 14 (37%) atingiram a maturidade com idade média de $56,7 \pm 3,6$ dias. Esses resultados foram semelhantes ao encontrado por Nascimento (2008) para essa mesma espécie. Essa autora verificou alcance de maturidade sexual dos grupos controle em 60 dias enquanto os grupos expostos a seiva de *F. foetida* foi aos 90 dias. D'ávila & Bessa (2005a) verificaram que indivíduos de *S. octona* mantidas em terra vegetal, alcançaram a maturidade sexual, em média, com 59 dias. Esse resultado é semelhante aos dos grupos controle no presente estudo.

No presente estudo foi observado que após o alcance da maturidade sexual, os moluscos dos grupos controle diminuíram o seu ritmo de crescimento não sendo observadas diferenças significativas entre o 60º e 90º dia (Gráfico 25).

Esse resultado está de acordo com D'ávila & Bessa (2005b) que verificou uma desaceleração do crescimento de *S. octona* após o alcance da maturidade sexual, indicando um padrão de crescimento indeterminado. Segundo Cichon (1999), o padrão de crescimento indeterminado é uma estratégia eficaz quando a reprodução aumenta com o tamanho corporal, desta forma a baixa produtividade em detrimento do crescimento corporal num determinado momento pode ser compensado com uma maior produção futura. Esse aumento da produtividade relacionada com o tamanho corporal pode estar relacionado com o crescimento dos órgãos do aparelho reprodutor e maturação do ovotestis (D'ÁVILA, 2005).

5.2.3.2. Efeitos da CL_{50} sobre a sobrevivência, crescimento e reprodução de jovens recém eclodidos de *Subulina octona* tratados com *Mikania glomerata*, expostos por 24 e 48 horas

As observações foram feitas até o 75º de experimento devido a alta mortalidade dos moluscos dessa idade expostos ao extrato aquoso das partes aéreas de *M. glomerata*. A sobrevivência dos jovens recém-eclodidos tratados com *M. glomerata* (Fotografia 7) foi menor em comparação com o controle exposto pelo mesmo período (24 horas: $H=6.0541$;

$p=0,0209$; 48 horas: $H=6.137$; $p=0,0209$). Os grupos expostos aos extratos atingiram 100% de mortalidade ao final de 75º dia de observação (Gráfico 27 e Tabela 8).



Fotografia 7: Moluscos recém-eclodidos de *Subulina octona* expostos ao extrato aquoso de partes aéreas *Mikania glomerata* por 48 horas.

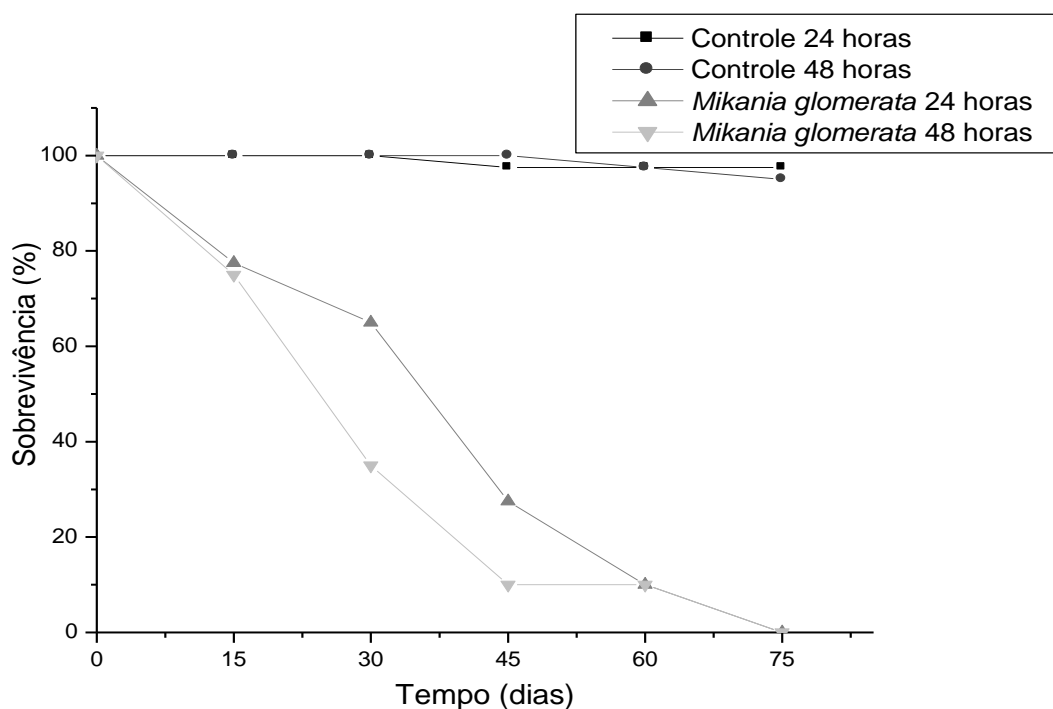


Gráfico 27: Sobrevivência de jovens recém eclodidos de *Subulina octona*, expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de *Mikania glomerata*, utilizando dois tempos de exposição, 24 e 48 horas, em observações realizadas durante 75 dias após a exposição.

Tabela 8: Sobrevivência de recém- eclodidos de *Subulina octona* expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de *Mikania glomerata*, utilizando dois intervalos de exposição, 24 e 48 horas, observadas durante 90 dias. (Intervalo de variação, média, desvio padrão e percentual).

Grupos		Intervalo de variação	Sobrevivência $\bar{X} \pm SD$	Percentual de eclosão (%)
Controle	24 horas	(9-10)	$9,75 \pm 0,50^a$	97,5
	48 horas	(9-10)	$9,50 \pm 0,58^a$	95,0
Expostos	24 horas	(0-0)	0 ± 0^b	0
	48 horas	(0-0)	0 ± 0^b	0

^{a,b} = médias seguidas por letras distintas diferem entre si significativamente pelo teste Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

As médias de tamanho para os grupos tratados e controle expostos para os dois intervalos estão representadas nos Gráficos 28 e 29. Para os grupos expostos aos dois períodos as medidas de comprimento foram registradas até o 60º dia devido a mortalidade total dos grupos tratados em 75 dias de observação. Ao final dos 60º dia de observação o crescimento dos grupos tratados diferiu dos controles nos dois intervalos de exposição (24

horas: $H=8.61$, $p=0,0034$; 48 horas: $H= 4.1951$, $p=0.0408$). Não houve diferença significativa no crescimento dos grupos tratados entre os dois intervalos ($H=0.2727$, $p=0,6015$). Diferentemente, os grupos controle diferiram entre si entre os períodos de exposição ($H=8.1028$, $p=0,0045$).

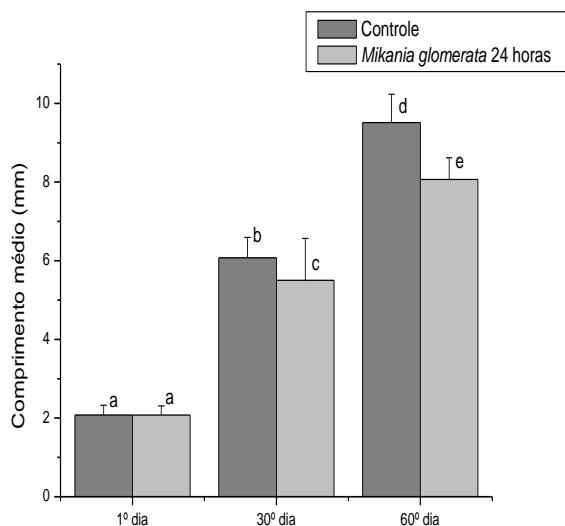


Gráfico 28: Tamanho médio de moluscos *Subulina octona* expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de *Mikania glomerata* por 24 horas de exposição. Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$).

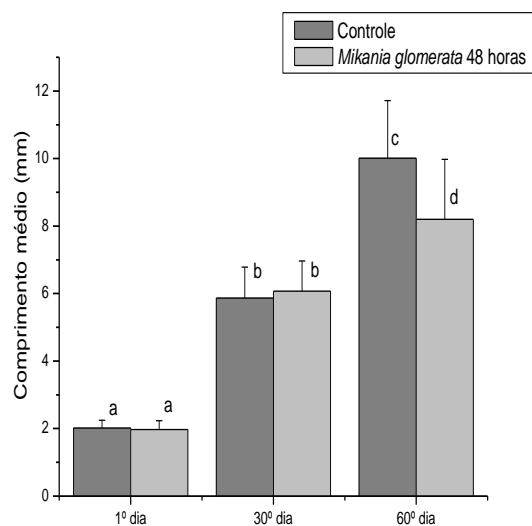


Gráfico 29: Tamanho médio de moluscos *Subulina octona* expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de *Mikania glomerata* por 48 horas de exposição. Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$).

O efeito desse extrato sobre o crescimento dessa espécie parece ser uma característica vantajosa para o sucesso do controle, uma vez que o tamanho corporal desse molusco está relacionado com a capacidade reprodutiva como já foi verificado por D'ávila (2005).

Não foi observado alcance de maturidade sexual para os grupos expostos ao extrato nos dois intervalos de exposição no período observado. Somente cinco dos moluscos (13%) dos grupos controle expostos por 24 horas e 14 (37%) de 48 horas atingiram a maturidade sexual ao final dos 75 dias de observação. A idade média dos moluscos foi de $59 \pm 4,9$ dias (24 horas) e $56,7 \pm 3,6$ dias (48 horas). A temperatura pode ter influenciado nesse resultado, uma vez que poucos indivíduos dos controles atingiram a maturidade nesse período.

5.2.4. Experimento IV- Efeitos da CL₅₀ sobre a sobrevivência, crescimento e reprodução de jovens de 30 dias de *Subulina octona* tratados com *Bidens pilosa* e *Mikania glomerata*, expostos por 24 e 48 horas

5.2.4.1. Efeitos da CL₅₀ sobre a sobrevivência, crescimento e reprodução de jovens de 30 dias de *Subulina octona* tratados com *Bidens pilosa*, expostos por 24 e 48 horas

A sobrevivência dos grupos tratados foi significativamente menor quando comparados aos controles no mesmo período de exposição (24 horas: $H= 5.3976$, $p=0,0209$; 48 horas: $H=5.6$, $p=0,0209$). Além disso, o tempo de exposição aos extratos também influenciou na sobrevivência, sendo que os jovens expostos pelo maior período tiveram médias de sobrevivência significativamente menores ($H= 4.7573$, $p= 0,0296$). Este resultado sugere que os princípios ativos, responsáveis pela atividade moluscicida, presente no extrato se mantêm ativos até 48 horas de aplicação. Não foi observado diferença significativa sobre a sobrevivência dos grupos controles nos dois intervalos ($H=0.0208$, $p=0,8852$) Gráfico 30 e Tabela 9.

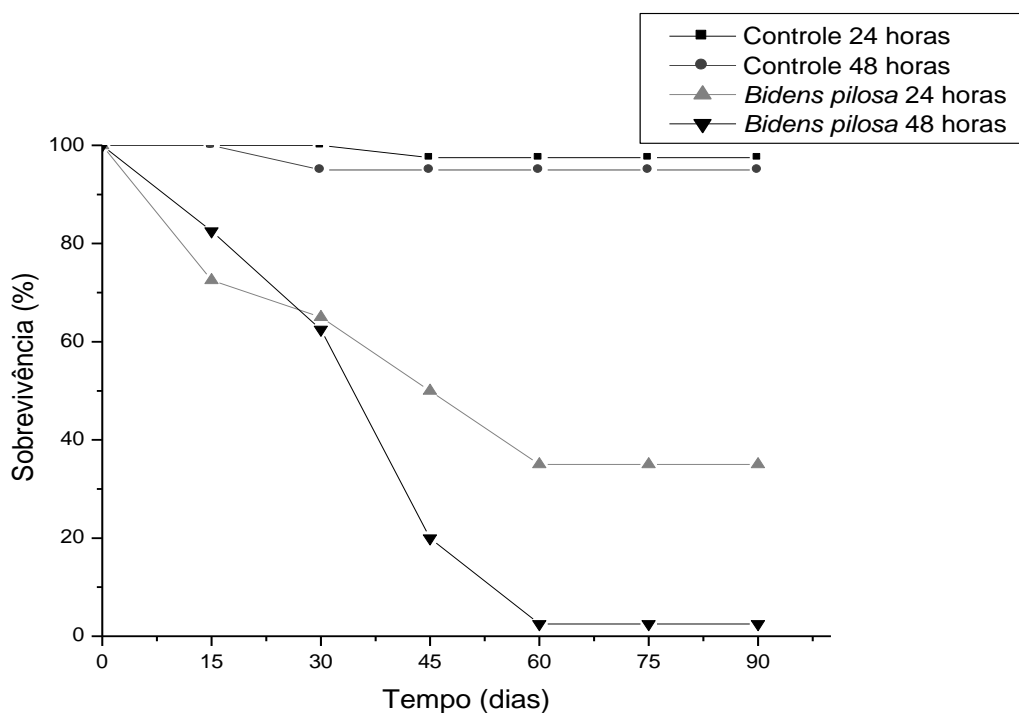


Gráfico 30: Sobrevivência de jovens de *Subulina octona* com 30 dias de idade, expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de *Bidens pilosa*, utilizando dois tempos de exposição, 24 e 48 horas, em observações realizadas durante 90 dias após a exposição.

Tabela 9: Sobrevivência de jovens de *Subulina octona* com 30 dias de idade, expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de *Bidens pilosa*, utilizando dois intervalos de exposição, 24 e 48 horas, observadas durante 90 dias. (Intervalo de variação, média, desvio padrão e percentual).

Grupos		Intervalo de variação	Sobrevivência X±SD	Percentual de eclosão (%)
Controle	24 horas	(9-10)	9,75±0,50 ^a	97,5
	48 horas	(8-10)	9,50±0,58 ^a	95,0
Expostos	24 horas	(0-6)	3,55±3,00 ^b	35,0
	48 horas	(0-1)	0,25±0,50 ^c	2,5

^{a,b,c}= médias seguidas por letras distintas diferem entre si significativamente pelo teste Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Analisando a queda de sobrevivência dos grupos expostos, pode-se perceber que os moluscos dos grupos expostos ao extrato pelo maior tempo apresentaram uma queda na sobrevivência delineando uma curva polinomial de ordem dois até o 45° dia de observação (Gráfico 31). Essa relação polinomial indica que a queda na sobrevivência foi gradativa ao longo do tempo até o 45° dia. As taxas de decaimento da sobrevivência são 1,2%/dia, 1,13%/dia e 2,88%/dia para os pontos um, dois e três representados na curva.

Essas taxas demonstram que a sobrevivência dos moluscos sofreu queda praticamente constante nos primeiros 30 dias e após esse período essa foi mais acentuada. Esse resultado indica que o extrato exerce um forte efeito residual sobre esses moluscos quando expostos pelo maior tempo. O maior tempo de exposição representa maior tempo para intoxicação e conseqüentemente um maior acúmulo desses princípios ativos no organismo desses animais

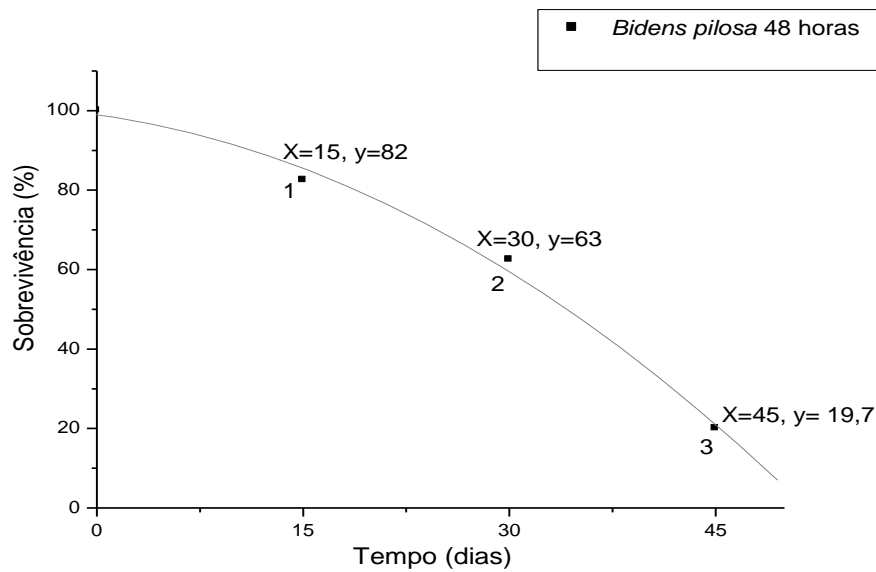


Gráfico 31: Sobrevivência de jovens de *Subulina octona*, com idade de 30 dias, expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de *Bidens pilosa*, expostos por 48 horas, com 45 dias de observação.

A sobrevivência observada para os grupos expostos por 24 horas foi semelhante a encontrada por Santos (2005) que obteve uma sobrevivência de 45% para *S. octona* nesta fase de vida tratada com solução de timol a 5g/L.

De maneira geral, curvas de sobrevivência obtidas neste estudo indicam que o extrato de *B. pilosa* ocasionou aos jovens de 30 dias um efeito retardado, indicando um forte efeito residual sobre o molusco nessa fase de desenvolvimento. O mesmo não foi observado para os jovens recém-eclodidos, estes responderam mais rapidamente aos seus efeitos tóxicos do extrato. Esses resultados demonstram que existe uma distinção na resposta do molusco frente a esse moluscicida dependendo da fase de desenvolvimento desses.

Souza et al. (1992) verificou uma maior sensibilidade de recém-eclodidos de *B. glabrata* ao extrato de *A. occidentale*. Neste experimento os autores testaram os extratos sobre indivíduos adultos, recém-eclodidos e ovos e observaram que o ácido anacárdio, princípio ativo oriundo desse vegetal, apresentou toxidez nas concentrações de 2,0 0,5 e 30 ppm respectivamente. Nascimento (2006) verificou atividade moluscicida dos extratos de *A. cathartica* em recém eclodidos de *B. similis* enquanto nos adultos apenas foi verificada a ação repelente. Essa distinção pode estar relacionada com o conteúdo energético dos indivíduos nas diferentes idades. Durante a exposição dos moluscos aos moluscicidas, esses podem diminuir sua reserva de energia armazenada devido ao estresse causado por essa exposição, como já verificado para *A. fulica* e *B. glabrata* (OLIVEIRA, 2007; MELLO-

SILVA et al., 2006), desta forma diminuem seus recursos energéticos para a sobrevivência futura. Os jovens de 30 dias de *S. octona* apresentam uma reserva de energia maior em relação aos recém-eclodidos que pode ser destinada a desintoxicação e sobrevivência dos moluscos nessa fase da vida. Por outro lado, acredita-se que a provável via de absorção dessas substâncias moluscicidas seja o tegumento, desta forma sugere-se que quanto maior a superfície corporal maior será o grau de intoxicação desse molusco. Entretanto, o tamanho corporal também pode favorecer determinados mecanismos de fuga. De maneira geral, indivíduos maiores podem fugir mais rapidamente dos sítios de aplicação do moluscicida e desta forma diminuem o tempo de contato com essas substâncias tóxicas, e conseqüentemente diminuem o grau de intoxicação. As medidas do comprimento dos moluscos foram feitas até o 30º dia para os grupos tratados expostos por 48 horas devido a alta mortalidade desses grupos após esse período. Os testes indicam diferenças significativas sobre as médias de comprimento de concha dos moluscos dos grupos tratados em relação aos controles (24 horas: $H=15.2005$, $p<0,0001$; 48 horas: $H= 34.0671$, $p<0,0001$) Gráfico 32 e 33.

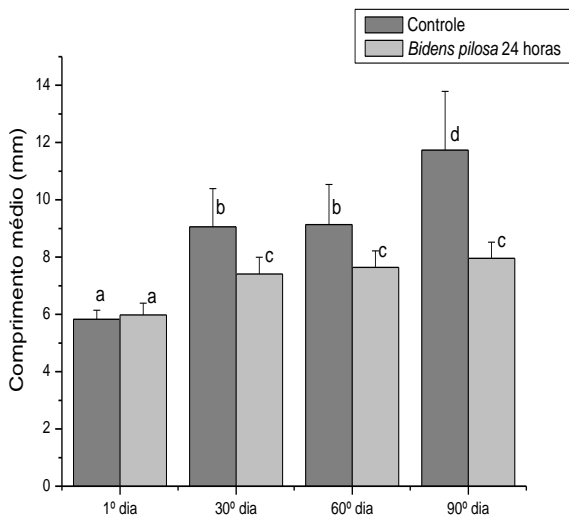


Gráfico 32: Tamanho médio de moluscos *Subulina octona* expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de *Bidens pilosa* por 24 horas de exposição. Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$).

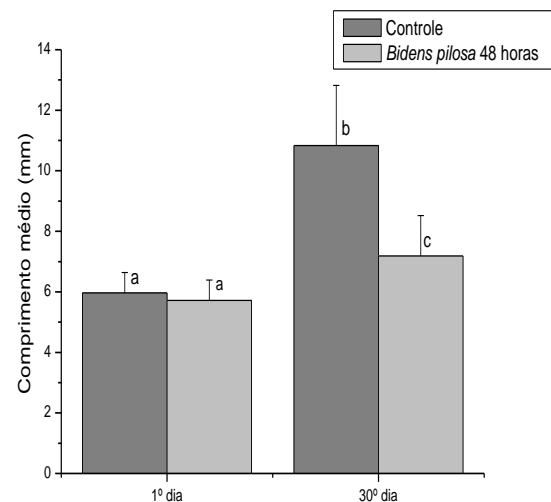


Gráfico 33: Tamanho médio de moluscos *Subulina octona* expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de *Bidens pilosa* por 48 horas de exposição. Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$).

Não foi observado alcance da maturidade sexual para os expostos aos extratos, para o controle 14 moluscos (36%) dos grupos expostos por 24 horas atingiram a maturidade com idade média de $67,4\pm 6,04$ dias e 20 (52%) com idade $59,6\pm 3,38$ dias para controle 48 horas. Santos (2005) observou o alcance de maturidade de jovens de 30 dias de *S. octona* tratados

com solução de cafeína a 2,5g/L e 5g/L com apenas 105 dias, fato que foi relacionado com as baixas temperaturas registradas no período de observação.

5.2.4.2. Experimento IV- Efeitos da CL_{50} sobre a sobrevivência, crescimento e reprodução de jovens de 30 dias de *Subulina octona* tratados com *Mikania glomerata*, expostos por 24 e 48 horas

Para os grupos expostos por 48 horas as primeiras mortes ocorreram três dias após a aplicação, além disso, ao final da 4ª quinzena a mortalidade atingiu 100% para estes grupos.

A sobrevivência dos moluscos dos grupos expostos por 24 horas foi significativamente menor em relação aos controles expostos pelo mesmo período ($H=5.6$; $p=0,0209$) resultado semelhante foi obtido para os grupos expostos por 48 horas ($H=6.0541$; $p=0,0139$). O percentual de sobrevivência dos grupos tratados e controles estão representados no Gráfico 34 e Tabela 10. Não foram verificadas diferenças significativas de sobrevivência entre os grupos tratados expostos por 24 e 48 horas ($H=1$; $p=0,3173$) provavelmente devido a alta mortalidade de ambos os grupos. Estes resultados demonstram que o efeito da CL_{50} sobre a sobrevivência de jovens de 30 dias é independente do período de exposição, para esses dois intervalos. Entretanto, de acordo com o Gráfico 34 a intensidade dos efeitos é maior na 1ª quinzena para os grupos expostos por 48 horas.

Além disso, pode-se perceber que a sobrevivência ao final de 15 dias para os grupos expostos por 48 horas era de aproximadamente 20%. Para atingir essa sobrevivência, os grupos expostos por 24 horas demoraram cerca de 80 dias. Este resultado indica que o dobro do tempo de exposição diminui em cinco vezes o tempo de ação. Em outras palavras, o dobro do período de exposição ocasiona uma rapidez de ação cerca de cinco vezes maior, para esse intervalo de sobrevivência.

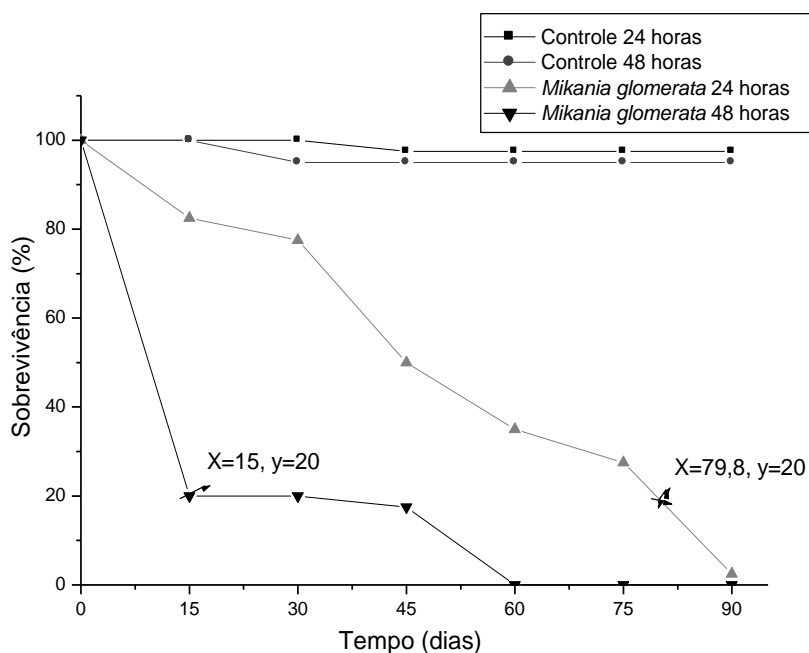


Gráfico 34: Sobrevivência de jovens de *Subulina octona* com 30 dias de idade, expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de *Mikania glomerata*, utilizando dois tempos de exposição, 24 e 48 horas, em observações realizadas durante 90 dias após a exposição. Pontos "X" e "Y" marcados para avaliar a eficiência, em tempo de ação, dos dois intervalos de exposição, 24 e 48 horas.

Tabela 10: Sobrevivência de jovens de *Subulina octona* com 30 dias de idade, expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de *Mikania glomerata*, utilizando dois intervalos de exposição, 24 e 48 horas, observadas durante 90 dias. (Intervalo de variação, média, desvio padrão e percentual).

Grupos		Intervalo de variação	Sobrevivência X±SD	Percentual de eclosão (%)
Controle	24 horas	(9-10)	9,75±0,50 ^a	97,5
	48 horas	(8-10)	9,50±1,00 ^a	95,0
Expostos	24 horas	(0-1)	0,25±0,50 ^b	2,5
	48 horas	(0-0)	0±0 ^b	0

^{a,b} = médias seguidas por letras distintas diferem entre si significativamente pelo teste Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Diferentemente, do que foi observado para os grupos tratados com *B. pilosa*, os efeitos sobre os recém-eclodidos expostos à *M. glomerata* foram mais retardatários em relação aos jovens de 30 dias para os grupos expostos pelo maior tempo. Esse resultado sugere que

existam outras variáveis que podem interferir na toxicidade dos extratos sobre esse molusco nessas fases de vida. Embora esses extratos apresentem classes de princípios ativos semelhantes, esses podem ser diferentes do ponto de vista molecular, com isso a susceptibilidade dos organismos numa fase de vida pode ser diferencial de acordo com a estrutura química. Em outras palavras, os jovens de 30 dias podem ser mais susceptíveis aos efeitos de determinadas estruturas químicas presentes nos extratos de *M. glomerata* e não em *B. pilosa*. Testes com os princípios ativos isolados relacionando estrutura-atividade nessas fases de vida de *S. octona* podem comprovar essa hipótese.

A análise do crescimento dos grupos tratados por 24 horas foi realizada até o 60º dia, enquanto a dos grupos expostos por 48 horas foram realizadas até o 30º dia, devido ao percentual de mortalidade de esses grupos terem atingido 100% nesses períodos (Gráficos 35 e 36). O crescimento dos grupos controles foi significativamente maior quando comparados com os tratados expostos ao mesmo período (24 horas: $H=6.9585$, $p=0.0084$; $H=11.6639$, $p=0,0006$).

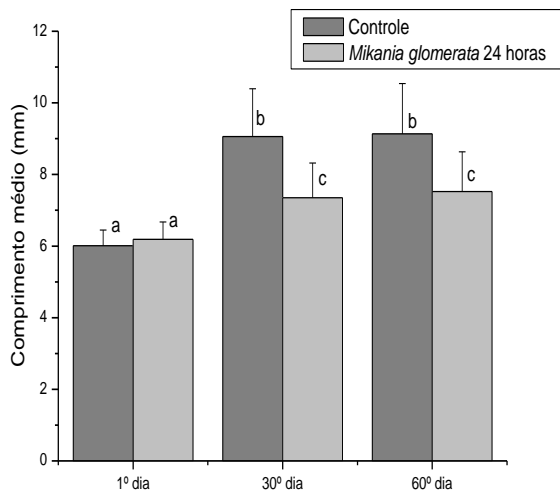


Gráfico 35: Tamanho médio de moluscos *Subulina octona* expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de *Mikania glomerata* por 24 horas de exposição. Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$).

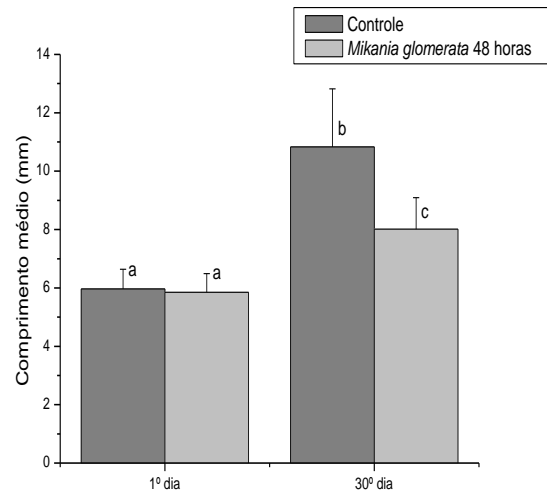


Gráfico 36: Tamanho médio de moluscos *Subulina octona* expostos ao extrato aquoso de partes aéreas de *Mikania glomerata* por 48 horas de exposição. Letras distintas indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$).

Com relação ao alcance de maturidade, apenas um molusco dos grupos expostos por 24 horas alcançou a maturidade sexual com 87,0 dias. Para os grupos expostos por 48 horas não foi observado alcance de maturidade sexual. Para o controle esse percentual foi de 36%

e 52,6% para 24 e 48 horas, respectivamente. A idade dos moluscos no alcance da maturidade sexual foi $67,4 \pm 6,04$ dias (controle 24 horas) e $59,6 \pm 3,38$ dias (controle 48 horas).

O efeito dos extratos vegetais utilizados neste estudo sobre a eclosão, sobrevivência e crescimento de *S. octona* nas fases de desenvolvimento avaliadas demonstram que esses vegetais podem ser utilizados para o controle dessa espécie, além de nortear futuras pesquisas para outras espécies de moluscos com importância epidemiológica.

CONCLUSÕES

Sob essas condições de análise e de acordo com os resultados obtidos neste experimento, pode-se concluir que:

A influência negativa que os extratos aquosos dos dois vegetais ocasionaram sobre a eclosão, sobrevivência dos jovens recém-eclodidos e de 30 dias de idade do molusco *Subulina octona* demonstra um resultado importante para o sucesso do controle, pois viabiliza o espectro de ação desses extratos sobre as diferentes fases de vida.

A interferência no crescimento ocasionada em *Subulina octona* pelos extratos aquosos dessas espécies vegetais é um resultado significativo para o controle desse molusco, uma vez que o tamanho corporal está relacionado com o número de ovos produzidos. Desta forma, o menor tamanho corporal influi num menor sucesso reprodutivo, fato que contribui para o controle da população.

A mortalidade ao longo do tempo observada em *Subulina octona*, nas diferentes fases de vida, demonstra um efeito cumulativo dos princípios ativos presentes nesses extratos.

Os resultados obtidos nesse estudo agregado a facilidade de obtenção desses vegetais tornam essas espécies promissoras para o controle de *Subulina octona* além de nortear futuras pesquisas para o controle de outras espécies de molusco.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-GAWAD, M.M.; EL-SAYEDU, M.M.; ABDEL-HAMEED, E.S. 1998. Molluscicidal steroidal saponins and lipid content of *Agave decipiens*. **Fitoterapia** 70 1999. 371-381.

ADEGAS, F.S.; VOLL, E. & PRETE, C.E.C. 2003. Embebição e germinação de sementes de picão-preto (*Bidens pilosa*). **Planta Daninha, Viçosa-MG**, 21(1): 21-25.

AERTS, T.J.; BARRY, T.N. & W.C. MCNABB. 2003. Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *In*. PANSERA, M.R.; SANTOS, A.C.A., PAESE, K.; WASUAM, R.; ROSSATO, M.; ROTA, L.D.; PAULETTI, G.F.; L.A. SERAFINI. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no nordeste do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 13 (1): 17-22.

AFONSO-NETO, I.S. 2003. **Atividade moluscicida e repelente do látex de três espécies de Euphorbia (EUPHORBIACEA) sobre Leptinaria unimellata (d'Orbigny, 1835) (Gastropoda, Subulinidae)**. Juiz de fora, 54p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Juiz de fora.

AFONSO-NETO, I.S.; BESSA, E.A. & G.L.G. SOARES. 2010. Avaliação da atividade moluscicida do látex de três espécies de Euphorbia (Euphorbiaceae) sobre *Leptinaria unilamellata* D'Orbigny, 1835 (Gastropoda- Subulinidae). **Revista Brasileira de Plantas Médicas Botucatu** 12(1):90-95.

ALCANFOR, J.D.X. 2001. **Ação de extratos de plantas do cerrado sobre Biomphalaria glabrata (Say, 1818), hospedeiro intermediário de Schistosoma mansoni (Sambon, 1907)**. Dissertação de mestrado, UFG. *In*: CORRÊA, M.C.R. 2006. Avaliação moluscicida das plantas *Pterodon emarginatus* Vogel 1837, *Magonia pubescens* St. Hil, e *Croton urucurana* Baill 1864, sobre *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e cercaricida sobre *Shistosoma mansoni* (Sambon, 1907). Dissertação de mestrado. Goiânia, Universidade Federal de Goiás.

ALICATA, J.E. 1940. The life cycle of *Postharmostomum gallinum*, the cecal fluke of poultry. **Journal of Parasitology** 26:135-146.

ALVAREZ, J. & WILLIG, M.R. 1993: Effects of treefall gaps on the density of land snails in the Luquillo experimental forest of Puerto-Rico. **Biotropica** 25(1): 100–110.

ÁLVAREZ, A. 1990. Evaluación de la actividad antiulcerosa de un extracto total y de três extractos obtenidos por fraccionamiento fitoquímico de *Bidens pilosa*. **Revista Cubana Farmácia** 24(2):297-303.

ÁLVAREZ, A. 1996. Efecto antiulceroso de una solución viscosa oral a partir de un extracto de *Bidens pilosa* en ratas. **Revista Cubana Planta Médica** (1):25-9.

AMATO, S.B. & BEZERRA, J.C.B. 1989. Parasitismo natural de *Bradybaena similares* (Férussac, 1821) por *Postarmostomum gallinum* Witenberg, 1923. **Memórias de Instituto Oswaldo Cruz** 84 (1): 75-79.

ANDERSEN, E., GUBLER, D.J., SORENSEN, K., BEDDARD, J. & L.R. ASH. 1986. First report of *Angiostrongylus cantonensis* in Puerto Rico. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 35(2):319-322.

ARAÚJO, J.L.B. 1982. **Alguns moluscos terrestres com hospedeiros intermediários de parasitos de animais domésticos, no Brasil: estudos sobre anatomia, sitemática e participação em helmintos**. Itajaí, 104. Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

ARAÚJO, J. L. B, & E. C. A BESSA. 1993. Moluscos de importância econômica do Brasil. II Subulinidae, *Subulina octona* (Bruguière) (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata, Stylommatophora). **Revista Brasileira de Zoologia** 10 (3): 489-497.

BACH, F.T. & E SILVA, C.A.T. 2010. Efeito alelopático de extrato aquoso de boldo e picão preto sobre a germinação e desenvolvimento de plântulas de alface. **Cultivando o Saber. Cascavel**, 3 (2):190-198, 2010.

BARDÓN, A.S.; BORKOSKY. S.; YBARRA, M.I.; MONTANARO, S.; CARTAGENA, E. 2007. Bioactive plants from Argentina and Bolivia. **Fitoterapia** 78: 227-231.

BEELEN, P. M. G.; FILHO, J. M. P. & BEELEN, R. N. 2008. Avaliação de taninos condensados em plantas forrageiras. **Associação Brasileira de Zootecnistas**. 26 a 30 de maio de 2008. João Pessoa, PB – UFPB/ABZ.

BESSA, E. C. A. & J. L. B. ARAÚJO. 1995a. Oviposição, tamanho de ovos e medida do comprimento da concha em diferentes fases do desenvolvimento de *Subulina octona* (Bruguière) (Pulmonata, Subulinidae) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia** 12(3): 647-654.

_____ & J.L.B. ARAÚJO, 1995b. Ocorrência de autofecundação em *Subulina octona* (Bruguière, 1789) (Pulmonata, Subulinidade) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia** 12(3):719-723.

BESSA, E.C.A, LIMA, W.S, DAEMON E., CURY M.C, ARAÚJO J.L.B, (2000) Desenvolvimento biológico de *Angiostrongylus vasorum* (Baillet) Kamensnky (Nematoda, Angiostrongylidae) em *Subulina octona* Bruguiere (Molusca, Subulinidae) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia** 17 (1):29-41.

BEZERRA, J.C.B, SILVA, I.A. FERREIRA, H.D. FERRI, P.H.; SANTOS, S.C. 2002. Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal plants. **Fitoterapia** 73: 428-430. Short report

BORELLA, J.C.; DUARTE, D.P.; NOVARETTE, A.A.G.; Jr MENEZES, A.; FRANÇA, S.C.; RUFATO, C.B.; SANTOS, P.A.S.; VENEZIANI, R.C.S.; LOPES, N.P. 2006. Variabilidade sazonal do teor de saponinas de *Baccharis trimera* (Less.) DC (Carqueja) e isolamento de flavona. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 16(4): 557-561, 2006.

BRUSTOLIN, A.; CORTEZ, D.A.G. 2000. Avaliação da atividade moluscicida da *Gymnema sylvestre* R. Br., (Asclepiadaceae). **Acta Scientiarum** 22(2):605-608, 2000.

BOLINA, R. C.; GARCIA, E. F. & DUARTE, M. G. R. 2009. Estudo comparativo da composição química das espécies vegetais *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip. Ex Baker. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 19(1B): 294-298.

BORGES, C.C. 2009. **Análise Farmacognóstica de *Bidens pilosa* (L.) (Asteraceae)**. Projeto de trabalho de conclusão de curso. Curso de Farmácia- Universidade do extremo Sul Catarinense UNESC. Criciúma.

BOUZADA, M.L.M. FABRI, L.R. DUARTE, G.G. & SCIO, E. Busca de novas drogas antimicrobianas a partir de vegetais. **Revista Principia**, 11. 2007. Disponível em: <http://www.ufjf.br/principia/files/2009/09/07.pdf>. Acessado em: novembro de 2011.

BRANDÃO MGL, KRETTLI AU, SOARES LSR, NERY CGC, MARINUZZI HC. 1997. Antimalarial activity of extracts and fractions from *Bidens pilosa* and other *Bidens* species (Asteraceae) correlated with the presence of acetylene and flavonoid compounds. **Journal of Ethnopharmacology** 57: 131–138.

BRANDÃO, M.G.L.; COSENZA, G.P.; MOREIRA, R.A. & R.L.M. MONTE-MOR. 2006. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Revista Brasileira Farmacognosia** 16: 408-420.

BRASIL. Ministério da Saude. Vigilância e Controle de Moluscos de Importância Epidemiológica. Diretrizes técnicas: **Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE)**. 2008. 2ª edição, Brasília.

BRASIL. Instituto Ambiental do Paraná. **Medidas de controle de *Achatina fulica***. Disponível:[http://www.redeprofauna.pr.gov.br/arquivos/File/MedidasdeControleAchatinafulica1\(1\).pdf](http://www.redeprofauna.pr.gov.br/arquivos/File/MedidasdeControleAchatinafulica1(1).pdf). Acesso: Novembro de 2011.

BRUSTOLIN, A. & D.A.G. CORTEZ. 2000. Avaliação da atividade moluscicida da *Gymnema sylvestre* R. Br., (Asclepiadaceae). **Acta Scientiarum** 22(2): 605-608.

CALDEIRA, R.L.; MENDONÇA, C. LGF.; GOVEIA, C. O. LENZI, H. L.; GRAEFF-TEIXEIRA, C.; LIMA, W. S.; MOTA, E. M.; PECORA, I. L.; MEDEIROS, A.M. Z. & CARVALHO, O. S. 2007. First record of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda: Metastrongylidae) in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 102(7): 887-889.

CANTANHEDE, S.P.D. *et al.* 2000. Atividade moluscicida de plantas: uma alternativa profilática. **Revista Brasileira de Farmácia** 20 (2):282-288, 2000.

CARVALHO, E.B. 2007. Estudos da interação entre proteínas e taninos: Influência da presença de polissacarídeos. **Tese de Doutorado**. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Portugal. 2007. Disponível em: http://www.fc.up.pt/fcup/contactos/teses/t_020380030.pdf. Acesso em Janeiro de 2012.

CARVALHO, O. S.; SCHOLTE, R. G. C.; MENDONÇA, C.L. F.; PASSOS, L. K. J.; CALDEIRA, R. L. 2011. Ocorrência de *Angiostrongylus cantonensis* no entorno dos principais portos da costa brasileira. **Anais do XXII Encontro Brasileiro de Malacologia** – 04 a 08 de setembro de 2011 – Fortaleza – CE. CD-ROM.

CHANG SL, CHIANG YM, CHANG CLT, YEH HH, SHYUR LF, KUO YH, WU TK, YANG WC. 2007. Flavonoids, centaurein and centaureidin, from *Bidens pilosa*, stimulate IFN- γ expression. **Journal of Ethnopharmacology**, 112: 232-236. 2007.

CHIEN SC, YOUNG PH, HSU YJ, CHEN CH, TIEN YJ, SHIU SY, LI TH, YANG CW, MARIMUTHU P, TSAI LFL, YANG WC. 2009. Anti-diabetic properties of three common *Bidens pilosa* variants in Taiwan. **Phytochemistry** 70: 1246-1254.

CICHON, M. 1999. Growth after maturity as a suboptimal strategy. *Acta Oecologica* 20 (1): 25-28.

COOK, A. 2001. Behavioral ecology, 447-488. In: G.M. BARKER (ed.). **The biology of terrestrial molluscs**. New Zeland, CABI publishing, 558 p.

_____; DIAS, R.J.P.; BESSA, E.C.A. & DAEMON, E. 2004. Resistência à dessecação em três espécies de moluscos terrestres: Aspectos adaptativos e significado para o controle de helmintos. **Revista Brasileira de Zoociências** (6): 115-127.

_____; BESSA, E. C. A. 2005a. Influência do substrato sobre a reprodução de *Subulina octona* (Brugüière) (Mollusca, Subulinidae), sob condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, 22(1):197-204.

_____; 2005b. Influência do substrato sobre o crescimento de *Subulina octona* (Brugüière) (Mollusca, Subulinidae), sob condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia** 22 (1): 205-211.

_____; DIAS, R.J.P. & E.C.A. BESSA. 2006. Comportamento agregativo em *Subulina octona* (Brugüière) (Mollusca, Subulinidae). **Revista Brasileira de Zoologia** 23(2): 357-363.

D'ÁVILA, S., ALMEIDA BESSA, E.C.; LIMA CALDEIRA, R.; DOS SANTOS CARVALHO, O. & FURTADO MENDONÇA C.L. 2011. Morfologia macro microscópica

do sistema reprodutor de moluscos pulmonados terrestres da família Subulinidae (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata). In: **Clama. VIII Congresso Latino Americano de Malacologia**, 2011. Puerto Madryn. Argentina. CD-ROM.

DEISLER, J.E. & ABBOTT, R.T., 1984: Range extensions of some introduced land molluscs in the Bahama Islands, with first reports for four species. – **The Nautilus** 98(1): 12–17.

DIAS, R.J.P.; BESSA, E.C.A.; D'ÁVILA, S. 2007. Influence of Substrate Humidity on Desiccation Resistance Capacity in *Subulina octona* (Mollusca, Subulinidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 50(1): 137-139.

DOAT, J. 1978. Les Tanins dans les bois Tropicaux. **Revue Bois et Florêt des Tropiques. Nogent**, n. 182: 37-35, Nov/Dec 1978.

DUNCAN, J. & STURROCK, R.F., 1987. Laboratory evaluation of potential plant molluscicides. In: **Plant molluscicides**. (K. E. Mott), pp. 251-265, New York: John Wiley & Sons.

DUNDEE D.S., 1974: Catalog of introduced molluscs of eastern North America (North of Mexico). – **Sterkiana**, 55: 1–37.

EMMAMBUX, N. M.; TAYLOR, J. R. 2003. Sorghum kafirin interaction with various phenolic compounds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 83, n. 5, p. 402-407, 2003.

FALCÃO, H.S.; LIMA, I.O.; SANTOS, V.L.; DANTAS, H.F.; DINIZ, M.F.F.M, BARBOSA-FILHO, J.M. & L.M. BATISTA. 2005. Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 15: 381-391.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Vol. I, 5º edição, Brasília, 2010.

FERREIRA, P; SOARES, G.L.G; D'ÁVILA, S. & E.C.A. BESSA. 2009. The Influence of Caffeine and Thymol on the Survival, Growth and Reproduction of *Subulina octona* (Brugüière, 1789) (Mollusca, subulinidae). **Journal of Brazilian Archives of Biology and Technology** 52(4):945-952.

_____ ; SOARES, G.L.G.; D'ÁVILA, S.; BESSA, E.C.A. 2009. The Influence of Caffeine and Thymol on the Survival, Growth and Reproduction of *Subulina octona* (Brugüière, 1789) (Mollusca, Subulinidae). **Brazilian Archives Biology Technology**, 52 (4): 945-952.

_____.; SOARES, G.L.G. D'ÁVILA, S.; BESSA, E.C.A. 2011. The influence of thymol+DMSO on survival, growth and reproduction of *Bradybaena similaris* (Mollusca: Bradybaenidae). **Zoologia** 28 (2): 145–150.

FILHO, R.B. 2010. Contribuição da Fitoquímica para o desenvolvimento de um País Emergente. **Química Nova** 33(1): 229-239.

FINNEY, D.J. 1971. **Probit analysis**. 3th ed. Cambridge University Press, London. 25pp.

FISHER, P.H. & J.C.H. CROSSE. 1878. Mission Scientifique au Mexique et dans l'Amérique Centrale. **Recherches Zoologiques**, Paris, 7 (1): 1-731.

FRANÇA, N.L.A.; SOUZA, M.I.A.; FERREIRA, S.C.S. & ARÉVALO, E.G. 2009. Comportamento e sobrevivência de moluscos terrestres em contato com extrato de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Staph em condições de laboratório. **61º Reunião anual da SBPC**.

FRIERRO, I.M.; SILVA, A.C.B.; LOPES, C.S.; MOURA, R.S.; BARJA-FIDALGO, C. 1999. Studies on the anti-allergic activity of *Mikania glomerata*. **Journal Ethnopharmacologic** 66:19-24.

FURTADO, M. C. V, BESSA, E. C. A. & M. C. M. CASTANÕN. 2004. Ovoteste de *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Mollusca, Xanthonychidae): histologia e produção de gametas. **Revista Brasileira de Zoociências** 6 (2): 7-17.

GASPAROTTO Jr. A.; BRENZAN, M.A.; PILOTO, I.C.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V.; FILHO, B.P.D. FILHO, R.E. & A.G. FERREIRA. 2005. Estudo Fitoquímico e avaliação da atividade moluscicida do *Calophyllum brasiliense* CAMB (CLUSIACEAE). **Química Nova** 28(4): 575-578.

GOMES, E. A. 2008. **Efeito de extratos de fungos sobre o comportamento, a sobrevivência, crescimento e reprodução de moluscos da espécie *Subulina octona* (Bruguiere, 1789) (Mollusca, Subulinidae) em condições de laboratório**. Juiz de fora, Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de juiz de fora.2008

GONZALEZ, A.; FERREIRA, F.; VAZQUEZ, A.; MOYNA, P.; PAZ, E.A. 1993. Biological screening of Uruguayan medicinal plants. **Journal Ethnopharmacology**, 39(3):217-220.

GUTIÉRREZ, A.G.; OTAROLA, R.Z.; TEXEIRA, B.J. 1998. Bioensayos en especies de Bodens con actividad terapêutica. **Ciencia e Investigación** 1 (2).

HAIDA, K. S., PARZIANELLO, L., WERNER, S., GARCIA, D. R., INÁCIO, C. V. 2007. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. Arquivos Ciência. **Saúde Unipar**, Umuarama 11 (3): 185-192.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical methods**. 1 o ed. N. York-USA. Great Britan Ltd. 1976.

HARBORNE, J. B. **The flavonoids (advances in research since 1986)**. 1 o ed. Chapman and Hall. London- GBR. 1994.

HART, C.R. 1979. The systematics of the *Bidens ferulaefolia* complex (Compositae). **Systematic Botany**,4: 130- 147.

HASLAM, E. 1998. Plant polyphenols (Syn. vegetable tannins) and chemical defense- a reappraisal. **Journal of chemical Ecology** 14 (10): 1789-1805.

HATTORI, S.; SHIMOKORIYAMA, M.; OKA, K. 1956. Localisation des pigments flavoniques dans *Cosmos sulphureus*. **Bulletin de la Societe de Chimie Biologique**, 38(2-3): 557-562.

HMAMOUCHIU, M.; LAHLOU, M. & AGOUMI, A.. 2000. Molluscicidal activity of some Moroccan medicinal plants. **Fitoterapia**, 71:308-314.

HOFFMANN, B. & HOLZL, J. 1988. A methylated chalcone glucoside from *Bidens pilosa*. **Phytochemistry**, 27(11): 3700-3701.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.; NAKAMURA, C.V. & B.P. FILHO. 2002. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infections diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 97: 1027-1031.

HSU YJ, LEE TH, CHANG CLT, HUANG YT, YANG WC. 2008. Anti-hyperglycemic effects and mechanism of *Bidens pilosa* water extract. **Journal of Ethnopharmacology** 122: 379-383.

HU, C.Q.; CHEN, K.; SHI, Q.; KILKUSKIL, R.E.; CHENG, Y.C.; LEE, K.H. 1994. A methylated chalcone glucoside from *Bidens pilosa*. **Journal of Natural Products**, 57(1):42-51.

JANSMAN, A. J. M. 1993. Tannins in feedstuffs for simple stomached animals. **Nutr. Res. Rew.**, v. 6, p. 209-236, 1993.

JURBERG, P.; BARBOSA, J.V. & L. ROTENBERG. 1988. The role of behavior in the survival of *Biomphalaria glabrata* em biossays with the plant molluscicide *Phytolacca dodecandra*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**. 83 (1): 41-46.

_____; VASCONCELLOS, M.C & N.M. MENDES. 1989. Plantas empregadas como moluscicidas: Uma visão crítica. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz** 84(1): 76- 83.

JUŘIČKOVÁ, L. 2006. *Subulina octona* (Bruguère, 1798) – a new greenhouse species for the Czech Republic (Mollusca: Gastropoda: Subulinidae). **Malacologica Bohemoslovaca** 5: 1–2.

KISSMANN, C. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: BASF Brasileira. 1992. 798 p.

KLOOS, H. & MCCULLOUGH, F.S. 1982. Plant Molluscicides. **Planta Medica** 46 (12): 195-209.

KUMAR, P., SINGH, D.K. 2006. Molluscicidal activity of *Ferula safetida*, *Syzygium aromaticum* and *Carum carvi* and their active components against the snail *Lymnaea acuminata*. **Chemosphere** 63: 1568–1574.

KUMARI P, MISRA K, SISODIA BS, FARIDI U, SRIVASTAVA S, LUQMAN S, DAROKAR MP, NEGI AS, GUPTA MM, SINGH SC, KUMAR JK. A promising anticancer and antimalarial component from the leaves of *Bidens pilosa*. **Planta Medica** v.1,59-61p, 2009.

LEITE, E. M. A. & AMORIM, L. C.A. 2006. **Noções Básicas de Toxicologia**. Depto. Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais. Disponível em:
<http://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=variabilidade%20gen%C3%A9tica%20dos%20animais%20cl50&source=web&cd=8&ved=0CE0QFjAH&url=http%3A%2F%2Fwww.farmacia.ufmg.br%2Fflato%2FAPTOXG2006.doc&ei=QRIPT6PvLMipgwfdmoT5Aw&usq=AFQjCNH0GEhzVqMoDDPpdcYtXeVBipnIWg>. Acesso em: Janeiro 2012.

LEMMA, A. & YAU, P. 1974. Studies on the molluscicidal properties of endod (*Phytolacca dodecandra*), III. **Ethiopian Medical Journal** 12:109-114.

LEMMICH, E.; CORNETT, C.; FURU, P.; JØRSTIAN, C.L.; KNUDSEN, A.D.; OLSEN, C.E.; SALIH, A. & S.T. THILBORG. 1995. Molluscicidal saponins from *Catunaregam nilotica*. **Phytochemistry** 39(1): 63-68.

LEMONS TLG, AL MENDES, MP SOUSA, R BRAZ-FILHO. 1992. New saponin from *Sapindus saponaria*. **Fitoterapia**, 53: 515-517.

LEYTON, V.; HENDERSON, T.O. MASCARA, D.; KAWANO, T. 2005. Atividade moluscicida de princípios ativos de folhas de *Lycopersicon esculentum* (Solanales, Solanaceae) em *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Planorbidae). **Iheringia, Sér. Zool.**, Porto Alegre, 95 (2):213-216.

LIMA, N.P.; BIASI, L.A.; ZANETTE, F.; NAKASHIMA, T. 2003. Estaquia semilenhosa e análise de metabólitos secundários de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip ex Baker). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 5(2):47-54.

LIMA, G.S., DABUS, D.M.M., TRENTIN, T.C., NEVES, M.F. 2008. *Platynosomum factosum*. **Revista Científica Eletônica de Medicina Veterinária**. Ano VI – Número 11 – Julho de 2008 – Periódicos Semestral.

LIMA, FG. & FIORAVANTI, M.C.S. 2009. **Ações biológicas das saponinas esteroidais em ruminantes**: Revisão de literatura. Universidade Federal de Goiás. Escola de Veterinária. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal. 2009. Disponível em: http://www.ufg.br/this2/uploads/files/66/Flavia_Gontijo_1c.pdf. Acesso em: Novembro de 2012.

LOPES, T. C.; GONÇALVES, J.R.S.; SOUZA, N. S.; MORAES, D. F. C.; AMARAL, F. M. M. ROSA, I.G. 2011. Avaliação moluscicida e perfil fitoquímico das folhas de Caryocar brasiliense Camb. **Cad. Pesq.**, São Luís, v. 18, n. 3, set./dez. 2011. Disponível em: <http://www.periodicoseletronicos.ufma.br/index.php/cadernosdepesquisa/article/viewFile/641/393>. Acesso em: Janeiro de 2012.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais**. 3.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2000. 608 p.

LUCCHETTI, L.; TEIXEIRA, D. F.; BARBI, N. S. & SILVA, A. J. R. 2009. *Bidens pilosa* L. (Asteraceae). **Revista Fitos**, 4 (2) Dezembro 2009.

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

LUSTRINO, D.; TUNHOLI- ALVES, V.M.; TUNHOLI, V.M.; BESSA, E.C.A. & J. PINHEIRO. 2008. *Allamanda cathartica* L. (apocynacea) seeds induces changes on carbohydrates deposits of *Bradybaena similares* (Férussac, 1821) (Mollusca, Bradybaenidae). **Revista Brasileira de Zoociências** 10(1): 23-27.

MAGALHÃES, A. F.; TOZZI, A. M. G. . A.; SANTOS, C. C.; SERRANO, D. R.; ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M.; MAGALHÃES, E.G.; MAGALHÃES, L. A. 2003. Saponins from *Swartzia langsdorffii*: Biological Activities. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 98(5): 713-718.

MALDONADO, J.F. 1945. The life cycle of *Tamerlania bragai* Santos, 1934 (Eucotylidae) a Kidney fluke of domestic pigeons. **Journal of Parasitology**, Lawrence 31(5):306-314.

MAKKAR, H.P.S.; DAWRA, R.K. & SINGH, B. 1987. Protein precipitation assay for quantitation of tannins: Determination of protein in tannin protein complex. **Anal. Biochem.** 166:435-439.

MARQUI, S.R.; LEMOS, R.B.; SANTOS, L.A.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A.J.; SCORZONI, L.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; YOUNG, M.C.M. & L. M.B. TORRES. 2008. Saponinas antifúngicas de *Swartzia langsdorffii*. **Química Nova** 31(4): 828-831.

MARSTON, A. & HOSTETTMANN, R. Plant molluscicides. **Phytochemistry** 24: 639-652. 1985.

MARTINS, L. R. R. [2008?]. **Avaliação da toxicologia**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. UFPR. Disponível em: http://pessoal.utfpr.edu.br/luciaregi/arquivos/UNIDADE5_avalua_toxicidade.pdf. Acesso em: 23/09/2011.

MCCLLOUGH, F.S.; GAYRAL, P.; DUNCAN, J.; CHRISTIE, J.D. 1980. Molluscicides in schistosomiasis control. **B World Health Organ** 58: 681-689.

MELLO-SILVA, C.C.; LIMA, M.; PINHEIRO, J.; BEZERRA, J.C.B & M.L.A. RODRIGUES. 2006. Alterações fisiológicas em *Biomphalaria glabrata* tratadas com extrato bruto de *Solanum malacoxylon*. **Ciência Animal**, 16(2): 61-70.

_____; VILAR, M.M. BEZERRA, J.C.B. VASCONCELLOS, M.C. PINHEIRO, J. & M.L.A. RODRIGUES. 2007. Reproductive activity alterations on the *Biomphalaria glabrata* exposed to *Euphorbia splendens* var. *hislopilii* latex. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 102(6): 671-674.

_____; VASCONCELLOS, M.C.; BEZERRA, J. C. B.; RODRIGUES, M. L. A. & PINHEIRO, J. 2011. The influence of exposure to *Euphorbia splendens* var. *Hislopilii* latex on the concentrations of total proteins and nitrogen product in *Biomphalaria glabrata* Infected with *Schistosoma mansoni*. **Acta Tropica**, 11:101-104.

MENDES, N.M.; GOMEZ, J.D.; ARAÚJO, N.; ZANI, C.L. & KATZ, N. 1993. Ensaios preliminares do *Guaiacum officinale* L. como moluscicida. **Revista Instituto Medicina Tropical**. São Paulo. 35(6):509-513.

_____; QUEIROZ R ; GRANDI. TSM: DOS ANJOS AMG; OLIVEIRA AB; ZANI C. L. 1999. Screening of Asteraceae" (Compositae) plant extracts for molluscicidal activity. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, 94:411-412.

MOUCO, G.B.; BERNARDINO, M.J.; CORNÉLIO, M.L. 2003. Controle de Qualidade de Ervas Medicinais. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. 31(2):68-73.

MOTT, K.E. **Plant Molluscicides**, UNDP/World Bank/WHO, John Wiley & Sons, New York. 1987. 326 pp.

MORGAN, R. **Enciclopédia das ervas e plantas medicinais**. São Paulo: Hemus, 1982, 555p.

NASCIMENTO, C.A.A., ARÉVALO, E., AFONSO-NETO, I.S., BESSA, E.C.A., SOARES, G.L.G. 2006. Efeito do extrato aquoso de folhas de *Allamanda cathartica* L. (Apocynaceae)

sobre *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Mollusca, Bradybaenidae) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zoociências** 8 (1):77-82.

_____. 2008. **Influência de *Furcraea foetida* (L.) Haw sobre a sobrevivência, crescimento, reprodução e comportamento de *Subulina octona* (Bruguière, 1789) (Mollusca, Subulinidae)**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora, MG. 2008.

NETO, P. A. S. P & L. C. CAETANO. 2005. **Plantas Medicinais: Do Popular ao Científico**. EDUDAL; Maceió: 90p.

NEVES, L.J.; SÁ, M. F.A. 1991. Contribuição ao Estudo das plantas medicinais *Mikania glomerata* Spreng. **Revista Brasileira de Farmácia** 72(2): 42-47.

OKUDA, T. 2005. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. **Phytochemistry** 66(17): 2012-2031.

OLIVEIRA, F. 1972. Contribuição para o estudo botânico de *Mikania hirsutissima* DC. var *hirsutissima*. II Morfologia externa e anatomia da folha, flor, fruto e semente. **Revista Farmácia e Bioquímica** 10: 15-36.

OLIVEIRA, F.; ALVARENGA, M.A. & G. AKISUE. 1984. Isolamento e identificação de compostos químicos de *Mikania glomerata* Spreng e *mikania laevigata* Schultz. Bip. Ex Baker. **Revista de Farmácia e Bioquímica** 20(2): 169-183.

OLIVEIRA, C. S. 2007. **Alterações nos depósitos de glicogênio e conteúdo de glicose na hemolinfa de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca, Gastropoda), hospedeiro intermediário de *Angiostrongylus*, exposta ao látex de coroa de cristo *Euphorbia splendens* var. *hislopilii***. Dissertação de mestrado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2007.

PAES, J.B.; DINIZ, C.E. F.; MARINHO, I. V. & LIMA, C.R. 2006. Avaliação do potencial tanífero de seis espécies florestais de ocorrência no semi-árido brasileiro. **Cerne**. Universidade Federal de Lavras. vol. 12(3): 232-238. Disponível em: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/html/744/74412304/74412304.html>. Acessado em: Outubro de 2010.

PANIGRAHI, A. & S.K.RAUT.1994. *Thevetia peruviana* (Apocynaceae) in the control of slug and snail pests. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 89 (2):247:250.

PATHAK, D.; PATHAK, K.; SINGLA, A.K. 1991. Flavonoids as medicinal agents — recent advances. **Fitoterapia**, 62(5):371-389.

PAULA, S. D. O. 2003. **Influência do substrato sobre o ciclo de vida e o comportamento de *Subulina octona* (Brugüière, 1789) (Mollusca, subulinidae) em condições de laboratório.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora, MG.106p.

PEREIRA, R.L.C.; IBRAHIM, T.; LUCCHETTI, L.; SILVA, A.J.R.; MORAES, V.L.G. 1999. Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of methanolic extract and the polyacetylene isolated from *Bidens pilosa* L., **Immunopharmacology** 43: 31-37.

PEREIRA, J. P.; SOUZA, C. P. & MENDES, N. M. 1978. Propriedades moluscicidas da *Euphorbia cotinifolia* L. **Revista Brasileira de Pesquisa Médica e Biológica** 11:345-351.

POCINHO, M. 2009. **Estatística volume 1: teoria e exercícios passo-a passo.** 82p. Disponível em: http://docentes.ismt.pt/~m_pocinho/Sebenta_estatistica%20I.pdf. Acesso em novembro de 2011.

RAINTREE NUTRITION. **Tropical Plant Database.** Disponível em: <http://rain-tree.com/picaopreto.htm>. Acessado em: Agosto de 2011.

RAWI, S.M.; AL-HAZMAI, M. & NASSR, F.S.A. 2011. Comparative study of the molluscicidal activity of some plant extracts of the snail vector of schistosoma mansoni, *Biomphalaria alexandrina*. **International Journal of Zoological Research** 7(2):169-189.

RIBEIRO, V.M. 2004. Controle de Helminthos de Cães e Gatos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 13(1): 88-95.

ROCHA, L., LUCIO, E.M.A., FRANÇA, H.S., SHARAPIN, N., 2008. *Mikania glomerata* Spreng: Desenvolvimento de um produto fitoterápico. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 18:744-747.

ROMUSSI, G.; PAGANI, F.1970. Constituents of *Bidens frondosa* L. **Bollettino Chimico Farmaceutico**, 109(8): 467- 475.

SALGADO, H.R.N.; RONCARI, A.F.F. & R.R.D. MOREIRA. 2005. Antidiarrhoeal effects of *Mikania glomerata* Spreng. (Asteraceae) leaf extract in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 15: 205-208.

SANTOS, P.F. 2005. **Influência da Cafeína e do Timol sobre a sobrevivência, o crescimento e a reprodução de três espécies de moluscos terrestres, sob condições de laboratório.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de juiz de fora. 2005. Juiz de Fora, MG.

SANTOS, S.B. & D.P. MONTEIRO. 2001. Composição de gastrópodes terrestres em duas áreas do Centro de Estudos Ambientais e Desenvolvimento Sustentado (CEADS), Vila Dois

Rios, Ilha Grande, Brasil – um estudo piloto. **Revista Brasileira de Zoologia** 18 (supl.1): 181-190.

SANTOS, S.C. 2005. **Caracterização cromatográfica de extratos medicinais de guaco: *Mikania laevigata* Shultz Bip. Ex Baker e *M. glomerata* Sprengel. e ação de *M. laevigata* na inflamação alérgica pulmonar.** Itajaí. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Itajaí.2005.

SANTOS N. C.; DIAS, C. N.; COUTINHO-MORAES, D.F.; VILANOVA, C. M.; GONÇALVES, J.R. S.; SOUZA, N. S., ROSA, I. G.; SOUZA, N. S.; ROSA, I. G. 2010. Toxicidade e avaliação de atividade moluscicida de folhas de *Turnera ulmifolia* L. **Revista Brasileira Biociências**. Porto Alegre, v. 8, n. 4, p. 324-329, out./dez. 2010.

SASHIDA, Y.; OGAWA, K.; KITADA, M.; KARIKOME, H.; MIMAKI, Y.; SHIMOMURA, H. New aurone glucoside and newphenylpropanoid glucosides from *Bidens pilosa*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.39, n.3, p.709-711, 1991.

SCHALL, V.T.; VASCONCELLOS, M.C.; ROCHA, R.S.; SOUZA, C.P.; MENDES, N.M. 2001. The control of the schistosome-transmitting snail *Biomphalaria glabrata* by the plant Molluscicide *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (syn *milli* Des. Moul): a longitudinal field study in an endemic area in Brasil. **Acta Tropica** 79: 165-170.

SCHAUFELBERGER D. & K. HOSTETTMANN. 1983. On the moluscicidal activity of tannin containing plants. **J. of med. P. Research** 48:105-107.

SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. 2003. *In*: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. & P. R. PETROVICK. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. p. 711-740.

SHIMOKORIYAMA, M.; GEISSMAN, T.A. 1960. Anthochlor pigments. XIV. Pigments of *Viguiera multiflora* and *Baeria chrysostoma*. **Journal of Organic Chemistry**, 25: 1956-1959.

SIEBERT, K.J.; TROUKHANOVA, N.V. & LYNN, P.Y. 1996. Nature of polyphenol-protein interaction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v 44: 80-85.

SILVIA, A.J. 2007. ***Bidens pilosa* L.** Fundação Herbarium- Curso de Fitomedicina a distância. Trabalho de conclusão do curso. Juiz de Fora, 2007.

SILVIA, F.R. 2007. **Genotoxicidade ocasionada pelas folhas do fumo (*Nicotina tabacum*) expostos ou não a agrotóxicos, em *Cantareus aspersus*.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RG. Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/10963/000600913.pdf?sequence=1>. Acesso em Dezembro de 2011.

SILVA, L. DURÇO, E.; BESSA, E.C.A. & PINHEIRO, J. 2011. Alterações na concentração de glicose na hemolinfa de *Subulina octona* (Brugüère, 1789) (Subulinidae) exposta à CL₅₀ de *Solanum paniculatum* Linné (Solanaceae). **Anais da XXII Encontro Brasileiro de Malacologia** – 04 a 08 de setembro de 2011 – Fortaleza – CE. Brasil. CD-ROM.

SILVA, N.F.S.; COGO, J. WIEPIESKI, C.C.P. & A. LAVERDE Jr. 2008. Bioensaio de atividade moluscicida adaptado para a avaliação de extratos de plantas medicinais. **Arquivos de Ciência Veterinária e Zoologia Unipar** 11(2): 179-181.

SILVA, T. M. S.; BRAZ-FILHO, R.; DE CARVALHO, M. G.; AGRA, M. DE F. 2002. **Biochem. Syst. Ecol.** 30, 1083.

_____; CÂMARA, C.A., AGRA, M.F., CARVALHO, M.G., FRANA, M.T., BRANDOLINE, S.V.P.B., PASCHOAL, L.S., BRAZ-FILHO, R. 2006. Molluscicidal activity of *Solanum* species of the Northeast of Brazil on *Biomphalaria glabrata*. **fitoterapia** 77: 449–452.

SILVA, M.I.G.; GONDIM, A.P.S.; NUNES, I.F.S. & FCF SOUSA. 2006. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Revista Brasileira de Farmacognosia** 16: 455-462.

SINGH, A. & SINGH, V.K. 2009. Molluscicidal activity of *Saraca osaca* and *Truja orientalis* against the fresh water snail *Lymnaea acuminata*. **Vet. Parasitol.** 164: 206-210.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. 2010. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª edição. UFRGS. p. 634 e712.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA. Disponível em: <http://www.sbfgnosia.org.br/>. Acesso em Agosto de 2011.

SOUZA, B.A., SILVA, L.C., MEIRELES, L.M.O., VARGAS, T.S., MACIEL, T.C., BESSA, E.C.A. 2009. Efeitos do extrato aquoso das folhas de *Allamanda cathartica* L. (Apocynaceae) sobre *Subulina octona* (Bruguère, 1789) e *Dysopeas muibum* (Marcus & Marcus, 1968) (Mollusca, Subulinidae). **Anais da XXXII Semana de Biologia da Universidade Federal de Juiz de Fora e XV Mostra de Produção Científica**, Juiz de Fora, MG. CD-ROM.

_____; SILVA, L.C.; DURÇO, E.; VARGAS, T.S.; BESSA, E.C.A. 2011. Influência do extrato aquoso de *Solidargo microglossa* D.C. (Asteraceae) sobre a sobrevivência, crescimento e alimentação de *Achatina fulica* (Bowdich, 1822) (Achatinidae). **Anais do VIII Congresso Latino Americano de Malacologia, Clama**. 2011. Puerto Madryn. Argentina. CD-ROM.

SOUZA, H. E. 2003. **Atividade moluscicida e fago-inibidora da cafeína e do timol, sobre três espécies de moluscos gastrópodes terrestres em condições de laboratório.** Juiz de Fora. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Juiz de Fora.

SOUZA, C.P.; MENDENS, M.N.; JANNOTTI-PASSOS, L.K.; PEREIRA, J.P. 1992. O uso da casca da castanha do caju, *Anacardium occidentale* como moluscicida alternativo. **Revista Instituto Medicina Tropical**, São Paulo 34 (5): 459-466.

SOARES, M.R.; COSTA, S.S.; JANSEN, J.M.; SILVA, C.A.; LOPES, C.S.; BERNARDO-FILHO, M.; NASCIMENTO, S.V.; CRIDDLE, D.N.; PORTELA, B.N.; RUBENICH, L.M.; ARAÚJO, R.G. & L.C. CARVALHO. 2002. Broncodilatador activity of *Mikania glomerata* Sprengel on humans bronchi and guinea-pig trachea. **Journal Pharm. Pharmacologic** 54: 249-256.

SOARES, A.K.A.; CARMO, G.C.; QUENTAL, D.P.; NASCIMENTO, D.F.; BEZERRA; F.A.F.; MORAES, M.O. & M.E.A. MORAES. 2006. Avaliação da segurança clínica de um fitoterápico contendo *Mikania glomerata*, *Grindelia robusta*, *Copaifera officinalis*, *Myroxylon toluifera*, *Nasturtium officinale*, própolis e mel em voluntários saudáveis. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 16: 447-454.

STEARNS, S.C. 1976. Life history tactics: a review of ideas. In: SILVA, L.C. 2009. **História de Vida de *Bulimulus tenuissimus* (D' Orbigny, 1835) (Mollusca, Bulimulidae): Variação nos depósitos dos substratos energéticos de acordo com a idade e sazonalidade.** Juiz de Fora. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Juiz de Fora.

SUCEN-2000-2001- **Segurança em Controle Químico de Vetores.** Disponível em: <http://www.bvsde.paho.org/bvsapud/p/fulltext/plagui/plagui.pdf>. Acessado em: Dezembro de 2011.

TSUZUKI, J. K.; HONDA, P. A.; MARCUSSI, V. M.; CORTEZ LONARDONI, M. V.C.; FERREIRA, D. A.PILOTO, I.C. P. 2004. Estudo fitoquímico e avaliação do potencial biológico de *Sapindus saponaria* L. **Arq. Apadec**, 8(supl.): Mai, 2004.

TALEB-CONTINI, S.H.; SANTOS, P.A.; VENEZIANI, R.C.S.; PEREIRA, A.M.S.; FRANÇA, S.C.; LOPES, N.P. & D.C.R. OLIVEIRA. 2006. Differences in secondary metabolites from leaf extracts of *Mikania glomerata* Sprengel obtained by micropropagation and cuttings. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 16: 596-598.

THILBORG, S.T.; CORNETT, C.; LEMMICH, E. 1996. Investigations of molluscicidal saponins from the Endod plant *Phytolacca dodecandra*. **Adv. Exp. Med. Biol.**, 404:151-64.

TREYVAD, V.; MARSTON, A.; DYATMIKO, W. & K. HOSTETTMANN. 2000. Molluscicidal saponins from *Phytolacca icosandra*. **Phytochemistry** 55:603-609.

TRUGILHO, P. F.; CAIXETA, R. P. LIMA, J.T. & MENDES, L.M. 1997. Avaliação do conteúdo em taninos condensados de algumas espécies típicas do cerrado mineiro. **Cerne**.

Lavras v.3: 1-13. Disponível em: http://www.dcf.ufla.br/cerne/artigos/13-02-20094134v3_n1_artigo%2001.pdf. Acessado em outubro de 2010.

TSUZUKI, J. K.; HONDA, P. A.; MARCUSSI, V. M.; CORTEZ LONARDONI, M. V.C.; FERREIRA, D. A.PILOTO, I.C. P. 2004. Estudo fitoquímico e avaliação do potencial biológico de *Sapindus saponaria* L. **Arq. Apadec**, 8(supl.): Mai, 2004.

VALDÉS, H.A.L. & REGO, H.P.L. 2001. BIDENS PILOSA LINNÉ. **Revista cubana Plantas Médicas** (1):28-33.

VASCONCELLOS, M.C. & V.T. SCHALL. 1986. Latex of “Coroa de Cristo” (*Euphorbia splendens*): Na Effective Moluscicide. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 81(4): 475-476.

VASCONCELLOS, M.C. & A. AMORIM. 2003. Moluscicidal Action of Latex of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B. (“Christ’s Crown”) (Euphorbiaceae) against *Lymnaea columella* (Say, 1817) (Pulmonata: Lymnaeidae), intermediate Host of *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 (Trematode: Fasciolidae). 1- Test in laboratory. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 98(4): 557-563.

VENEZIANI, R.C.S. & D.C.R. OLIVEIRA. 1999. Constituintes of *Mikania glomerata* Sprengel. **Biochemical Systematics and Ecology** 27: 99-102.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Memoranda: **Molluscicide screening and evaluation**. 1965. Bull World Health Organ 33: 567-576.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Reports Of The Scientific Group On Plant Moluscicide. 1983. **Bulletin of the World Health Organization** 61(6): 927-929.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Quality control methods for medicinal plant materials**. Genebra: WHO/Pharm/92.559, 1992. p. 33-35.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Specifications and evaluations for public health pesticides**. World Health Organization, Geneva, 2002. 24p.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo comprovaram a ação letal dos extratos aquosos de *Bidens pilosa* e *Mikania glomerata* sobre as diferentes fases do desenvolvimento de *Subulina octona* em condições de laboratório. Esses resultados podem nortear futuras pesquisas para outras espécies de molusco de importância para epidemiológica. Os princípios ativos frequentemente citados na literatura estão presentes nesses dois vegetais e são facilmente extraídos em água, fato que torna o processo de extração barato e ecologicamente correto. Essas plantas apresentam ampla distribuição geográfica e pode ser facilmente cultivadas, o que torna o acesso muito facilitado. São espécies amplamente utilizadas na medicina popular, e desta forma os riscos de intoxicação em humanos é pequeno. Entretanto é necessário destacar a importância de estudos ecotoxicológicos para ampliar o conhecimento sobre o espectro de ação desses extratos. O fracionamento desses extratos, o teste com as frações isoladas juntamente com a elucidação estrutural das moléculas bioativas são importantes para o campo da Agroquímica, pois direciona para a síntese de análogos mais estáveis. Estudos que relacionam estrutura-atividade podem contribuir para o entendimento do mecanismo de ação desses compostos. Enfim, a possível utilização de um moluscicida vegetal em campo requer o envolvimento de diversas especialidades com atuação multidisciplinar.

GLOSSÁRIO

Afro gênico:	Substâncias que produzem grande quantidade de espuma quando em soluções aquosas.
Anfifílico:	Toda substância de origem orgânica ou inorgânica que possui em sua estrutura química uma parte polar e hidrofílica e outra apolar e hidrofóbica.
Dalton:	Unidade de massa atômica desenvolvida pelo Químico e Físico inglês John Dalton.
Decocto:	Fervura de um vegetal em água ou outro solvente por um intervalo de tempo.
Fenilas:	Radical derivado do benzeno.
Genina:	Metabólitos de saponinas sem a/as moléculas de açúcar.
Maceração estática:	Contato direto do vegetal com o solvente sem agitação.
Mol:	Unidade para descrever quantidade de entidades elementares (átomos, íons, moléculas etc...). Cada Mol corresponde a $6,02 \times 10^{23}$ partículas.
Xenobiótico:	Composto de origem exógena que causam alterações funcionais no organismo.