

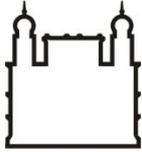
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biodiversidade e Saúde

AÇÃO MOLUSCICIDA DE *Moringa oleifera* LAM SOBRE O
MOLUSCO *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818) HOSPEDEIRO
INTERMEDIÁRIO DO *Schistosoma mansoni* (SAMBON, 1907) E
EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS EM ORGANISMOS AQUÁTICOS
NÃO ALVO

CESAR LUIZ PINTO AYRES COELHO DA SILVA

Rio de Janeiro
JUNHO DE 2013



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

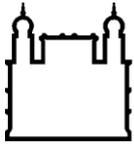
CESAR LUIZ PINTO AYRES COELHO DA SILVA

AÇÃO MOLUSCICIDA DE *Moringa oleifera* LAM SOBRE O MOLUSCO
Biomphalaria glabrata (SAY, 1818) HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO DO
Schistosoma mansoni (SAMBON, 1907) E EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS
EM ORGANISMOS AQUÁTICOS NÃO ALVO

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Darcílio Fernandes Baptista

RIO DE JANEIRO
JUNHO DE 2013



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

AUTOR: CESAR LUIZ PINTO AYRES COELHO DA SILVA

**AÇÃO MOLUSCICIDA DE *Moringa oleifera* LAM SOBRE O MOLUSCO
Blomphalaria glabrata (SAY, 1818) HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO DO
Schistosoma mansoni (SAMBON, 1907) E EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS
EM ORGANISMOS AQUÁTICOS NÃO ALVO**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Darcílio Fernandes Baptista

Aprovada em: 19/06/2013

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Arnaldo Maldonado Júnior - Presidente - IOC/FIOCRUZ

Prof. Dr. Jairo Pinheiro da Silva - Instituto de Biologia/UFRRJ

Prof. Dr. Jaime Lopes da Mota Oliveira - ENSP/FIOCRUZ

Prof. Dr. Alexandre Giovanelli - Instituto de Florestas/UFRRJ

Prof. Dr. Mauricio Carvalho de Vasconcellos - IOC/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 19 de junho de 2013

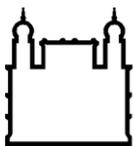
AGRADECIMENTOS

Projeto PROEP/CNPq/Fiocruz

Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental – LAPSA

Instituto Oswaldo Cruz – IOC / FIOCRUZ

Danielly de Paiva Magalhães pela colaboração com os testes ecotoxicológicos com os organismos não alvo.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

AÇÃO MOLUSCICIDA DE *Moringa oleifera* LAM SOBRE O MOLUSCO *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818) HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO DO *Schistosoma mansoni* (SAMBON, 1907) E EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS EM ORGANISMOS AQUÁTICOS NÃO ALVO

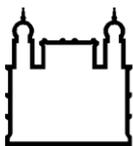
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Cesar Luiz Pinto Ayres Coelho da Silva

A esquistossomose é uma doença parasitária de veiculação hídrica causada pelo trematódeo *Schistosoma mansoni*, que afeta mais de 200 milhões de pessoas. Nas áreas de maior endemismo, o acesso ao suprimento de água é precário sendo obtida em poços, cacimbas e pequenos açudes, que se tornam também “criadouros artificiais” de caramujos infectados pelo *S. mansoni*. A doença é de profilaxia complexa, já que os moluscos aquáticos são de difícil controle, e pela parasitose incidir em zonas que favorecem um maior contato do homem com a água. No Brasil ocorrem dez espécies e uma subespécie do gênero *Biomphalaria*, sendo três espécies hospedeiras naturais do *S. mansoni*: *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila*. O controle químico é utilizado para reduzir as populações destes hospedeiros intermediários sendo a Niclosamida o moluscicida recomendado pela OMS, porém com alta toxicidade para muitos organismos aquáticos. Moluscicidas derivados de plantas têm provado sua efetividade, porém exigem cuidados no manuseio, pois muitas espécies são tóxicas a humanos e organismos não alvo. Iniciativas no passado para o uso de plantas como moluscicida foram pouco promissoras ou desencorajadas em programas em larga escala devido ao pequeno valor agregado que possuem para as comunidades ou gestores públicos. A planta *Moringa oleifera* não é tóxica sendo utilizada na alimentação humana e animal, com vários estudos realizados para testar seu múltiplo uso, principalmente quanto à sua

propriedade purificadora de águas. No presente estudo a semente moída de *M. oleifera* (ESSMol) foi avaliada pela primeira vez quanto à sua atividade moluscicida contra os moluscos *B. glabrata*, *Physa marmorata* e *Melanoides tuberculatus*. Sua ação ecotoxicológica também foi avaliada com o microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia* e o peixe *Danio rerio*. Os resultados mostraram que o ESSMol foi eficaz como moluscicida para *B. glabrata* (CL50 = 0,419 g/L; CL90=1,021 g/L e *P. marmorata* (CL50=0,339 g/L; CL90=0,789 g/L) mas sem atividade moluscicida para *M. tuberculatus*. Para os organismos não alvo os valores foram: CL50 = 0,12 g/L ($\chi^2 = 14,99$; gl = 3; $p < 0,05$) para *C. dubia*; e CL50 = 0,20 g/L ($\chi^2 = 2,57$; gl = 4; $p > 0,05$) para *D. rerio*. O efeito tóxico apresentado nos testes ecotoxicológicos com organismos não alvo ocorreu em concentrações que permitem a manutenção de populações naturais. O ESSMol demonstrou ser um produto ecologicamente menos agressivo ao ambiente e seguro para manipulação e utilização pelo homem. A grande inovação do uso da *M. oleifera* como moluscicida, é apresentar um potencial para agregação de valor também como alimento para humanos e animais e na prestação de serviço ecossistêmico como purificador da qualidade da água. O multi-uso da *M. oleifera* integrando a relação do homem, planta e ecossistemas, compõem uma cadeia na estrutura ecossistêmica que fortalece os processos ecológicos, envolvendo mais que apenas a ação sobre o ciclo de transmissão da esquistossomose.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

MOLLUSCICIDAL ACTIVITY OF *MORINGA OLEIFERA* LAM ON THE SNAIL *BIOMPHALARIA GLABRATA* (SAY, 1818) INTERMEDIATE HOST OF *SCHISTOSOMA* *MANSONI* (SAMBON, 1907) AND ECOTOXICOLOGICAL EFFECTS ON NON TARGET AQUATIC ORGANISMS

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Cesar Luiz Pinto Ayres Coelho da Silva

Schistosomiasis is a waterborne parasitic disease caused by the trematode *Schistosoma mansoni* which affects more than 200 million people. In the most endemic areas, access to water supply, especially in rural areas, is poor and is obtained from wells, ponds and small reservoirs, which also potentially end up turning into "artificial breeding" of snails infected by *S. mansoni*. The disease prophylaxis is complex, since their hosts, aquatic snails are difficult to control, and since this parasitosis occurs in very hot and irrigated areas favoring an increased human contact with the water. In Brazil there are 10 species and one subspecies of the genus *Biomphalaria*, three of which are natural hosts of *S. mansoni*: *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* and *Biomphalaria tenagophila*. Chemical control is used to reduce populations of vector snails being Niclosamide the only recommended by the WHO, demonstrating, however, severe toxicity to some aquatic organisms. Plant derived molluscicides have proven their effectiveness requiring, however, care in handling because some species possess toxic properties to humans and non-target organisms. Past initiatives to make effective the practice of use of plants with molluscicidal property have been unpromising or not carried forward in large scale programs due to the small value such plants have to target communities or public managers. The plant *Moringa oleifera* is non toxic to humans and used as food for humans and other animals with several studies having been done to test the multiple uses of this plant, particularly with respect

to its water purifying property. In this study the ground seed of *M. oleifera* (GSEMol) was first evaluated for its molluscicidal activity against the snails *B. glabrata*, *Physa marmorata* and *Melanooides tuberculatus*. Its ecotoxicological action was also evaluated for the microcrustacean *Ceriodaphnia dubia* and the fish *Danio rerio*. The results demonstrated that the GSEMol was an effective molluscicide for *B. glabrata* (LC50 = 0.419 g/L; LC90 = 1.021 g/L) and *P. marmorata* (LC50 = 0.339 g/L; LC90 = 0.789 g/L) but had no molluscicidal activity against *M. tuberculatus*. For the non-target organisms the values were: LC50 = 0.12 g/L ($\chi^2 = 14.99$, df = 3, p < 0.05) for *C. dubia*, and LC50 = 0.20 g/L ($\chi^2 = 2.57$, df = 4, p > 0.05) for *D. rerio*. The toxic effects shown in the ecotoxicity tests against non-target organisms however, occurred at concentrations which enable the maintenance of natural populations. The GSEMol proved to be a product environmentally less aggressive and safe for handling and use by man. The great innovation of the use of *M. oleifera*, besides being non toxic to humans, is to present the potential to add value as food for humans and animals as well as the provision of ecosystem services such as water purifier. The multi-potential use of *M. oleifera* integrating the relationship between man, plants and ecosystems, make up a chain in the ecosystem structure, strengthening the ecological processes involving more than just action on the transmission cycle of schistosomiasis.

ÍNDICE

RESUMO	v	
ABSTRACT	vii	
1	Introdução	1
	1.1 A Endemia	1
	1.2 Ciclo de Transmissão	2
	1.3 Moluscos	3
	1.4 Moluscidas Sintéticos	7
	1.5 Moluscidas de Origem Vegetal	8
	1.6 <i>Moringa oleifera</i> Lam	10
	1.7 Múltiplos Usos da <i>Moringa oleifera</i>	12
	1.8 Sua Utilização como Purificador de Água	13
	1.9 Justificativa	15
2	Objetivos	16
	2.1 Objetivo Geral	16
	2.2 Objetivos Específicos	16
3	Material e Métodos	17
	3.1 Planta	17
	3.2 Caramujos	18
	3.3 Bioensaios com Moluscos Alvo	18
	3.4 Bioensaios com Moluscos Não Alvo	20
	3.5 Experimentos de Toxicidade	21
	3.5.1 Preparo das amostras	22
	3.5.2 Teste de toxicidade aguda com <i>Ceriodaphnia dubia</i>	23
	3.5.3 Teste de toxicidade aguda com peixes <i>Danio rerio</i>	24
	3.6 Análise estatística	26

4	Resultados	27
	4.1 Bioensaios com Moluscos Alvo e Não Alvo	27
	4.1.1 Bioensaios com <i>Moringa oleifera</i> para avaliação da ação moluscicida em: <i>Biomphalaria glabrata</i> , <i>Physa marmorata</i> e <i>Melanoïdes tuberculatus</i>	27
	4.2 Testes com Organismos Aquáticos Não Alvo	29
	4.2.1 Teste de toxicidade aguda com <i>Ceriodaphnia dubia</i>	29
	4.2.2 Teste de toxicidade aguda com <i>Danio rerio</i>	31
5	DISCUSSÃO	33
6	PERSPECTIVAS	37
7	CONCLUSÕES	38
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
9	ANEXOS.....	48
	9.1 ANEXO A – Protocolo de testes moluscicidas	48
	9.2 ANEXO B – Protocolo de teste de toxicidade aguda com cladóceros	49
	9.3 ANEXO C – Protocolo de teste de toxicidade aguda com peixes	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1	Ciclo do <i>Schistosoma mansoni</i> Sambon, 1907. A: <i>S. mansoni</i> - vermes adultos acasalados; B: hospedeiro definitivo eliminando ovos nas fezes; C: eclosão dos miracídios na água; D: esporocistos primário e secundário no interior do hospedeiro intermediário; E: cercária livre na água em busca de um novo hospedeiro definitivo. (Fonte: Rey, 2001).....	2
Fig. 2	Distribuição geográfica de <i>Biomphalaria glabrata</i> no Brasil. (Extraída de Carvalho e Caldeira (2004)	5
Fig. 3	Distribuição geográfica de <i>Biomphalaria straminea</i> no Brasil. (Extraída de Carvalho e Caldeira (2004)	6
Fig. 4	Distribuição geográfica de <i>Biomphalaria tenagophila</i> no Brasil. (Extraída de Carvalho e Caldeira (2004)	6
Fig. 5	<i>Moringa oleifera</i> Lam., planta adulta com flores e frutos (foto do autor)	11
Fig. 6	Detalhe das sementes de <i>Moringa oleifera</i> Lam. A: semente sem casca; B: semente com casca (foto do autor).....	11
Fig. 7	Localização da árvore <i>Moringa oleifera</i> Lam. no campus da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil (Google Earth) (22°52'33"S 43°14'46"O)	17
Fig. 8	Exemplares das três espécies de moluscos <i>Melanooides tuberculatus</i> (A), <i>Physa marmorata</i> (B) e <i>Biomphalaria glabrata</i> (C) utilizados nos experimentos (foto do autor)	18
Fig. 9	Cápsula de porcelana e pistilo utilizados no preparo do extrato seco das sementes de <i>Moringa oleifera</i> Lam. (foto do autor)	19
Fig. 10	Bioensaios mostrando os béqueres com as diferentes concentrações do extrato seco das sementes de <i>Moringa oleifera</i> (ESSMol) sobre as três espécies de moluscos alvo. A: período de exposição; B: período de recuperação; C: moluscos vivos; D: moluscos mortos após a fase de recuperação (fotos do autor)	20
Fig. 11	<i>Ceriodaphnia dubia</i> (foto obtida da internet no site: (http://cfb.unh.edu/cfbkey/html/Organisms/CCladocera/FDaphnia/dae/GCeriodaphnia/Ceriodaphnia_dubia/ceriodaphnia.html acesso em 07/05/2013)	21

Fig. 12	O peixe <i>Danio rerio</i> (foto obtida na internet no site: www.taxateca.com acesso em 07/05/2013)	22
Fig. 13	Preparo das diluições para os testes com organismos não alvo (foto do autor)	23
Fig. 14	Montagem do experimento com <i>Ceriodaphnia dubia</i> contendo béqueres de 50 mL como recipientes de teste e o balão volumétrico com a solução de ESSMol para diluição concentrações teste (foto do autor)	24
Fig. 15	Montagem do teste toxicológico com peixes <i>Danio rerio</i> : Sequência de cristalizadores para cada concentração, indicando o procedimento de aeração (foto do autor)	25
Fig. 16	Experimento com peixes <i>Danio rerio</i> . cristalizador da esquerda: grupo tratado com <i>Moringa oleifera</i> . Béquer da direita: grupo de controle (foto do autor)	26
Fig. 17	Mortalidade (%) de <i>Biomphalaria glabrata</i> em diferentes concentrações (g/L) extrato seco das sementes de <i>Moringa oleifera</i> (ESSMol) (n=20)	28
Fig. 18	Mortalidade (%) de <i>Physa marmorata</i> em diferentes concentrações (g/L) extrato seco das sementes de <i>Moringa oleifera</i> (ESSMol) (n=20)	29
Fig. 19	Mortalidade (%) de <i>Ceriodaphnia dubia</i> em diferentes concentrações (g/L) de extrato seco das sementes de <i>Moringa oleifera</i> (ESSMol) (n=30)	30
Fig. 20	Mortalidade (%) de <i>Danio rerio</i> em diferentes concentrações (g/L) extrato seco das sementes de <i>Moringa oleifera</i> (ESSMol) (n=10)	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Espécies e subespécie de <i>Biomphalaria</i> descritas para o Brasil, assinalando as hospedeiras naturais, as potenciais e as não hospedeiras de <i>S. mansoni</i> (Fonte: Ministério da Saúde, 2008)	4
Tabela 2	Exposição de <i>Biomphalaria glabrata</i> , <i>Physa marmorata</i> e <i>Melanoides tuberculatus</i> ao extrato seco da semente seca de <i>Moringa oleifera</i> (ESSMol) (n=20)	27
Tabela 3	Exposição de <i>Ceriodaphnia dubia</i> ao pó da semente seca de <i>Moringa oleifera</i> (ESSMol) (n=30)	30
Tabela 4	Exposição de <i>Danio rerio</i> ao pó da semente seca de <i>Moringa oleifera</i> (ESSMol) (n=10)	31

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas.

CEDAE – Companhia Estadual de Águas e Esgotos - RJ

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

ESSMoI - Extrato Seco da Semente de *Moringa oleifera*

GSEMoI - Ground Seed Extract of *Moringa oleifera*

ISO – International Organization for Standardization

CL50 – concentração letal com efeito sobre 50% da população

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Endemia

A esquistossomose encontra-se efetivamente entre as mais importantes endemias do país em termos de saúde pública. Trata-se de uma doença parasitária de veiculação hídrica causada pelo trematódeo *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907), que afeta mais de 200 milhões de pessoas, com cerca de 85% de todos os casos ocorrendo nos países Africanos na região do Saara (Chitsulo et al., 2000).

O número de portadores de esquistossomose no Brasil é estimado em no mínimo 2,5 milhões de indivíduos parasitados e cerca de 25 milhões de pessoas vivendo em lugares com risco de contrair esta doença. De acordo com a endemicidade geográfica, podemos encontrar diferentes níveis no País; os estados de Minas Gerais, Bahia, Alagoas, Sergipe e Pernambuco são considerados como áreas de alta endemicidade, enquanto áreas de baixa e média, são registradas no Paraná, São Paulo, Espírito Santo, Rio Grande do Norte, Paraíba e Maranhão. Já os focos denominados como isolados estão indicados nos estados de Ceará, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Pará, Paraná, Piauí e Santa Catarina (MS, 2008; Rey, 2001).

A região Nordeste e Norte do estado de Minas Gerais são as áreas de maior endemismo, onde o acesso ao suprimento de água principalmente em áreas rurais é precário sendo obtida por poços, cacimbas e pequenos açudes, que potencialmente acabam se transformando também em “criadouros artificiais” de caramujos hospedeiros infectados por *S. mansoni*. Assim, com exceção de áreas mais desenvolvidas no Brasil e em alguns outros países (China, República Dominicana, Filipinas, Egito, Irã, Marrocos, Porto Rico e Venezuela) a maiorias dos 76 países endêmicos ainda são incapazes de adotar e executar políticas para redução da transmissão do parasito (OMS, 2011).

1.2 Ciclo de Transmissão

Os helmintos adultos do *S. mansoni* vivem nas veias mesentéricas do homem e de outros mamíferos e eliminam seus ovos ao ambiente através das fezes do hospedeiro. Quando atingem as coleções hídricas límnicas, os miracídios, larvas ciliadas, eclodem e nadam à procura de moluscos suscetíveis, onde penetram através de seu tegumento. Após três a cinco semanas de desenvolvimento e multiplicação por poliembrionia, as cercárias, formas larvais infectantes para o vertebrado, alcançam o meio aquático e nadam ativamente até o encontro do hospedeiro definitivo apropriado, penetrando ativamente através da pele. Por meio da circulação sanguínea chegam ao sistema porta-hepático, onde fazem postura dos ovos, os quais alcançam a luz intestinal. As manifestações clínicas variam, dependendo de uma série de fatores, desde casos assintomáticos até quadros graves (Rey, 2001; Coura & Amaral, 2004; Brasil, 2006). O ciclo evolutivo do *S. mansoni* está descrito na Figura 1.

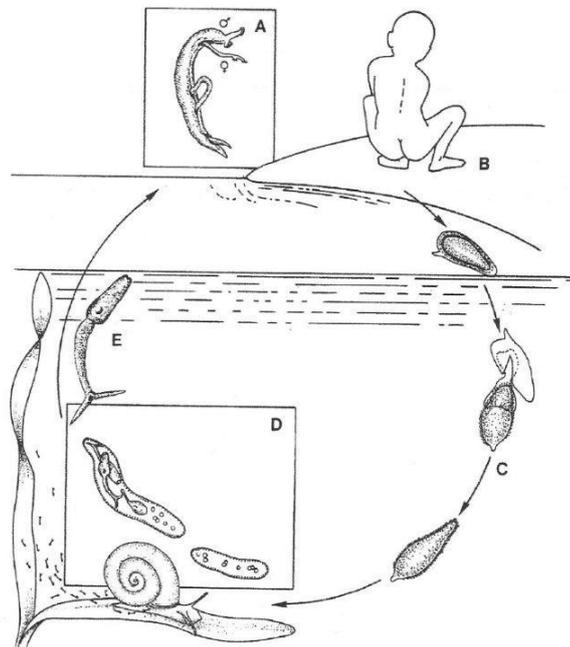


Figura 1 - Ciclo evolutivo do *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907.
A: *Schistosoma mansoni* - vermes adultos acasalados; **B:** hospedeiro definitivo eliminando ovos nas fezes; **C:** eclosão dos miracídios na água; **D:** esporocistos primário e secundário no interior do hospedeiro intermediário; **E:** cercária livre na água em busca de um novo hospedeiro definitivo. (Fonte: Rey, 2001).

Além da grande extensão de ocorrência da esquistossomose, a situação torna-se ainda mais grave, pois a doença é de profilaxia complexa, já que seus transmissores, moluscos aquáticos, são de difícil controle, e pela parasitose incidir em zonas muito quentes e irrigadas, favorecendo um maior contato do homem com a água (Pessoa, 1988).

Há ainda uma grande linha de estudos com reservatórios não humanos, principalmente roedores silvestres, tendo os primeiros relatos sido feitos por Amorim (1953) e Amorim et al. (1954). Kawazoe e Pinto (1983) conduziram experimentos em uma área de média endemicidade de esquistossomose mansônica humana para verificar a infecção natural dos roedores por *S. mansoni* e mostrar o seu papel como reservatório e disseminador de ovos do helminto. Atualmente ainda existem vários trabalhos importantes contribuindo para o conhecimento das relações desses animais silvestres com parasitoses de interesse médico e veterinário (D'Andrea et al., 2000; Maldonado Junior et al., 2001, 2006; Machado-Silva et al., 2011).

A imunização por vacina espera-se ser a forma mais efetiva para tratar a esquistossomose, principalmente pelo desenvolvimento da molécula SM14 (Tendler et al., 1996; Tendler e Simpson, 2008) porém ainda não está disponível para o uso em humanos. Em 1999, Katz publicou um artigo discutindo as dificuldades no desenvolvimento de uma vacina para a esquistossomose mansoni. A quimioterapia pelo praziquantel, até o presente momento, é a forma mais eficiente para o tratamento da doença ou diminuição da carga parasitária (Bergquist, 2008; Galvão et al., 2010; Olliaro et al., 2011).

1.3 Moluscos

Os moluscos da Classe Gastropoda possuem uma grande importância médica por ter vários táxons envolvidos em ciclos de parasitos. Os moluscos hospedeiros intermediários do *S. mansoni* são descritos como da família Planorbidae do gênero *Biomphalaria*, que constituem um elo imprescindível na

transmissão da doença. No Brasil ocorrem dez espécies do gênero *Biomphalaria* e uma sub-espécie, sendo separadas em relação à infecção por *S. mansoni*: como mostra a Tabela 1 (Ministério da Saúde, 2008)

Tabela 1 - Espécies e subespécie de *Biomphalaria* descritas para o Brasil, assinalando as hospedeiras naturais, as potenciais e as não hospedeiras de *S. mansoni* (Fonte: Ministério da Saúde, 2008).

	<i>Biomphalaria glabrata</i> (Say, 1818)
Hospedeiras naturais	<i>Biomphalaria tenagophila</i> (d'Orbigny, 1835)
	<i>Biomphalaria straminea</i> (Dunker, 1848)
Hospedeiras potenciais	<i>Biomphalaria amazonica</i> Paraense, 1966
	<i>Biomphalaria peregrina</i> (d'Orbigny, 1835)
Não hospedeiras	<i>Biomphalaria intermedia</i> (Paraense & Deslandes, 1962)
	<i>Biomphalaria kuhniana</i> (Clessin, 1883)
	<i>Biomphalaria schrammi</i> (Crosse, 1864)
	<i>Biomphalaria oligoza</i> Paraense, 1975
	<i>Biomphalaria occidentalis</i> Paraense, 1981
	<i>Biomphalaria tenagophila guaibensis</i> (Paraense, 1984)

Estudos bem detalhados sobre a morfologia das três espécies hospedeiras estão representados nos trabalhos de Paraense (1970, 1972) e Paraense e Deslandes (1955a,b,c). As duas espécies de hospedeiras potenciais foram investigadas quanto a susceptibilidade ao *S. mansoni* com resultados positivos para algumas cepas do parasito em laboratório (Corrêa e Paraense, 1971; Paraense e Corrêa, 1973). A respeito das outras espécies de *Biomphalaria* que não são hospedeiras naturais, existe um artigo sobre a

insusceptibilidade de *B. occidentalis* para linhagens do *S. mansoni* (Paraense e Corrêa, 1982).

Das três espécies hospedeiras naturais do *S. mansoni*, *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria straminea* têm sua área de ocorrência preferencialmente na região Nordeste e no Estado de Minas Gerais como mostram as Figuras 2 e 3, enquanto *Biomphalaria tenagophila* ocupa principalmente, as regiões Sudeste e Sul como apresenta a Figura 4. Estas áreas possuem condições ambientais particularmente favoráveis à manutenção dos criadouros desses moluscos, como: poços, cacimbas, açudes, riachos e áreas de captação de água que favorecem o contato humano nesses ambientes.

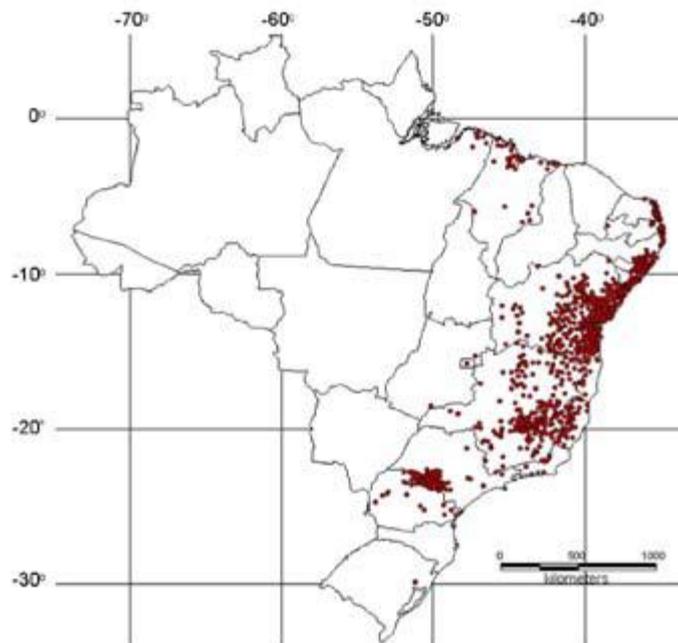


Figura 2 - Distribuição geográfica de *Biomphalaria glabrata* no Brasil. (Extraída de Carvalho e Caldeira (2004).



Figura 3 - Distribuição geográfica de *Biomphalaria straminea* no Brasil. (Extraída de Carvalho e Caldeira (2004).

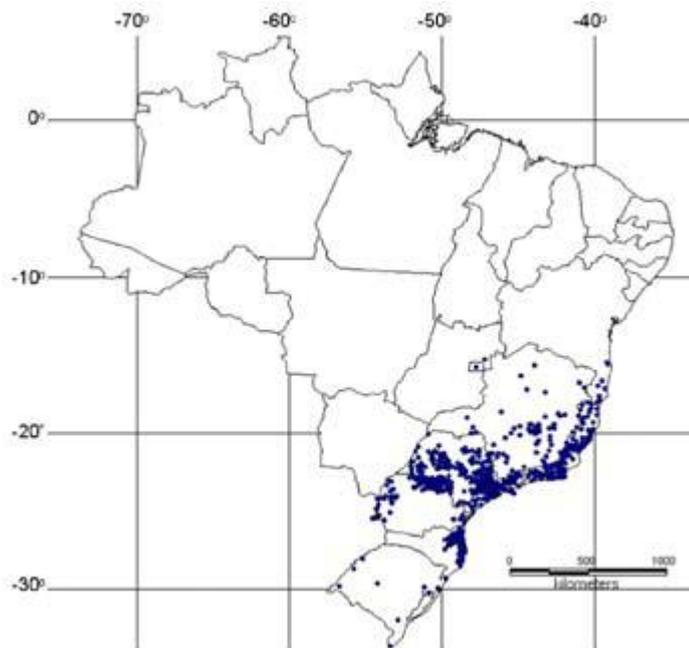


Figura 4 - Distribuição geográfica de *Biomphalaria tenagophila* no Brasil. (Extraída de Carvalho e Caldeira (2004).

Representantes de outros gêneros de moluscos não hospedeiros de *S. mansoni* como as espécies *Physa marmorata* Guilding, 1828, *Melanoides tuberculatus* (Müller, 1774) e *Lymnaea columella* Say, 1817, estão frequentemente associadas aos criadouros de *Biomphalaria*, tendo uma expressiva importância ecológica seja por ocupação de nicho ou competição por recursos. Portanto, qualquer estratégia de controle das espécies hospedeiras também pode afetar outras espécies que coabitam um ecossistema e precisam de atenção especial nas intervenções.

1.4 Moluscidas Sintéticos

O controle químico é uma das formas mais utilizadas para reduzir drasticamente e rapidamente as populações dos moluscos hospedeiros do *S. mansoni*, com a aplicação de produtos tóxicos nos criadouros dos planorbídeos, as substâncias moluscidas. Muitas drogas foram submetidas a ensaio com esse propósito, de maneira a reunir algumas propriedades indispensáveis, como: ser eficaz contra os moluscos, suas posturas e larvas do *S. mansoni*, mas que não afete o homem, a fauna e a flora locais; ser econômico e de baixo custo; ser de fácil aplicação e não apresentar risco para o indivíduo que o aplica, além de ser estável em diversas condições ambientais (MS, 2008).

Diversas substâncias foram utilizadas em larga escala com ação moluscida como, por exemplo, sulfato de cobre, pentaclorofenato de sódio (conhecido como pó-da-china), carbonato de cobre, entre outras. Entretanto, problemas como resultados insatisfatórios quanto à sua toxicidade em relação aos moluscos e por afetarem a fauna e a flora locais levaram ao desuso (Rey, 2001). Baixas concentrações (entre 0,1 e 0,5 mg/L) durante uma hora, de N-Tritilmorfolina (Frescon), têm ação sobre os moluscos. Apesar de não ser de alto custo, não mata os ovos dos moluscos, devendo ser reaplicada diversas vezes. Este produto não possui efeito tóxico para fauna e flora locais, mas devido à demanda limitada, não é mais comercializado sendo fabricado apenas sob encomenda (Webbe, 1987; Rey, 2001).

Atualmente o Bayluscide[®] (niclosamida) é o moluscicida considerado mais potente no combate aos caramujos do gênero *Biomphalaria* (MS, 2008). Ele apresenta alta toxicidade para os moluscos, mesmo em baixas concentrações (1 mg/L) após 8 horas de contato com os caramujos, sendo letal ainda para as posturas e larvas de *S. mansoni* (McCullough, 1992). Testes mostraram também sua letalidade para bio-ensaios realizados com *M. tuberculatus*, moluscos associados aos criadouros de *Biomphalaria* (Giovanelli et al., 2002).

O tratamento seletivo por moluscicidas em corpos d'água infestados por caramujos e que servem de locais de contato com seres humanos, tem sido alvo de estratégias de controle das populações de moluscos. A Niclosamida é o único moluscicida comercialmente disponível e recomendado pela OMS para uso em larga escala em programas de controle da esquistossomose. Entretanto, bioensaios ecotoxicológicos demonstram a severidade tóxica para alguns organismos aquáticos como peixes, insetos e outros moluscos (Andrews et al, 1982; Oliveira-Brett et al, 2002). Apesar da alta eficiência os moluscicidas químicos, apresentam limitações devido ao seu custo elevado em países com baixo nível de desenvolvimento e com altos índices de esquistossomose.

1.5 Moluscicidas de Origem Vegetal

Moluscicidas de origem vegetal se apresentam como o campo mais promissor para o encontro de uma solução viável tendo sido testadas mais de 1100 espécies de plantas, desde a década de 1930 (Kloos & McCullough, 1987). Extratos obtidos com solventes aquosos, alcoólicos e lipofílicos de caules, cascas, raízes, flores, folhas ou frutos têm sido testados (Duncan, 1987; Kloos & McCullough, 1987).

A avaliação da propriedade moluscicida de plantas normalmente é iniciada ao se selecionar a planta de maneira aleatória, realizando-se seguidamente, testes pra verificar sua letalidade (Jurberg et al, 1989). Segundo Jurberg et al. (1989), Kloos e McCullough em 1987, baseados no Banco de

Dados do Napralert, listaram a propriedade moluscicida de 571 plantas. Ainda no ano de 1987, pesquisadores chineses mostraram que, dentre cerca de 500 plantas testadas, 20 delas tinham um alto potencial moluscicida (Kuo, 1987). Ainda segundo Jurberg et al. (1989), foram analisadas 73 famílias com um total de 344 espécies. Destas, 214 exemplares de 26 espécies pertencentes a 18 famílias apresentaram mortalidade em concentrações inferiores a 100ppm. Estas famílias são: *Anarcadiaceae*, *Apocynaceae*, *Bignoniaceae*, *Celastraceae*, *Compositae*, *Euphorbiaceae*, *Graminaceae*, *Lauraceae*, *Magnoliaceae*, *Melastomaceae*, *Rhamnaceae*, *Rubiaceae*, *Rutaceae*, *Sapindaceae*, *Vochysiaceae*, *L. Caesalpinoideae*, *L. Mimosoideae*, *L. Papilionoideae*.

No entanto a aplicação limitada dessas plantas como produto moluscicida está em geral associada a efeitos toxicológicos em concentrações elevadas, dificuldade de manejo da planta e extração da substância ativa (Baptista et al. 1994). Inúmeros vegetais continuam sendo testados exaustivamente na busca de novas espécies com potencial moluscicida (Oliveira-Filho & Paumgarten, 2000; Mello-Silva et al, 2006; Santos et al 2010).

Moluscicidas derivados de plantas tem provado sua efetividade, entretanto são difíceis de serem manipulados, além disso, várias espécies, embora eficazes, em particular aquelas do gênero *Euphorbia* (Baptista et. al., 1994; Vasconcellos & Schall, 1986; Al-Zambagi et al, 2001; Giovanelli et al., 2001; Schall et al, 2001; Sing et al, 2005; Patel et al, 2011) exigem cuidados no manuseio por possuírem propriedades tóxicas a humanos e organismos aquáticos (Clark et al, 1997; Oliveira-Filho & Paumgarten 2000). Estudos bioquímicos das plantas do gênero *Euphorbia* têm sido feitos para tentar entender melhor sua forma de ação nos moluscos. No trabalho de Mello-Silva et al. (2011) foi demonstrada alteração no metabolismo de *B. glabrata* infectados com *S. mansoni* expostos a concentrações sub-letais do látex de *Euphorbia splendens* através da análise das proteínas totais e produtos nitrogenados. Oliveira-Filho & Paumgarten 2010 sugerem que o látex da *Euphorbia milii* possui atividade embriotóxica que contribui para efetividade do moluscicida.

As iniciativas no passado para tornar efetiva a prática do uso de plantas com propriedade moluscicida foram pouco promissoras ou não levadas adiante em programas em larga escala, devido ao pequeno valor agregado que essas plantas possuem. No caso das espécies da família Euphorbiaceae, em geral a agregação de valor se dava pelo seu potencial uso como planta ornamental, atividade que desperta pouco interesse para as comunidades alvo. Diante deste fato, acreditamos que *M. oleifera* seja uma excelente candidata, visto que atualmente procuram-se plantas que possuam potencial moluscicida capaz de agregar outros valores a seu uso e que beneficiem as comunidades que estão vulneráveis à transmissão da esquistossomose.

Um produto a ser usado como moluscicida, precisa reunir algumas propriedades indispensáveis, a exemplo do que ocorre com outros defensivos: deve ser eficaz contra os moluscos, mesmo quando empregado em baixas concentrações; ter baixo custo, propriedade que nem sempre depende da primeira; não pode ser tóxico ao homem, aos animais aquáticos ou às plantas; não pode ter efeitos acumulativos nos tecidos do homem e dos animais aquáticos e ser de fácil manipulação (Ministério da Saúde, 2008).

1.6 *Moringa oleifera* Lam

A *Moringa oleifera* pertencente à Ordem Papalerales, Família Moringaceae, é composta de apenas um gênero e quatorze espécies descritas até agora. É nativa da região Noroeste da Índia, atualmente difundida em diversos países tropicais (Duke, 1987).

Esta espécie é do tipo arbóreo de crescimento rápido, alcançando 12m de altura. Possui copa aberta com tronco delgado, folhas compostas bipinadas e flores perfumadas de cor creme como mostra a Figura 5. Os frutos parecidos com uma vagem, longos e traquinados são compostos de várias sementes escuras externamente, mas formados em seu interior por uma massa branca oleaginosa apresentada na Figura 6. A raiz possui casca de cor pardo-clara em sua parte externa e branca em seu interior, é espessa e mole. Seu lenho é mole, poroso e amarelado.



Figura 5 - *Moringa oleifera* Lam., planta adulta com flores e frutos – Campus Fiocruz, Rio de Janeiro (foto do autor).



Figura 6 - Detalhe das sementes de *Moringa oleifera* Lam. **A:** semente sem casca; **B:** semente com casca. (foto do autor)

No Brasil, há relatos de que sua introdução ocorreu a partir de 1950 sendo utilizada inicialmente apenas para ornamentação nos parques públicos (Silva & Kerr, 1999). Na região Nordeste existem varias ações como da Fundação Deusmar Queirós no Ceará que atua como mobilizadora na divulgação dos benefícios da *M. oleifera* desde 2000 através do projeto "Moringa a Semente da Vida". Em Sergipe, a EMBRAPA Tabuleiros Costeiros sediada em Aracaju possui varios projetos de pesquisa para diversos usos da planta, desde seu uso como purificador de águas e esgotos até como matéria vegetal forrageira para as criações animais. Com o objetivo de incentivar o desenvolvimento da cadeia produtiva e exploração agroindustrial da moringa na região Semiárida Brasileira, desde 2009 acontece anualmente o Encontro Nacional de Moringa – ENAM, para divulgação e fortalecimento desses projetos.

A propagação da semente da *M. oleifera* ocorre facilmente e seu plantio é direto, com produção de mudas a partir de sementes ou estacas. A taxa germinativa mais alta é obtida após a imersão da semente por 24 horas na água a temperatura ambiente e seu plantio em viveiro deve ser realizado imediatamente em seguida (Cáceres et al. 1992).

A idade da árvore em sua primeira frutificação varia, porém em condições ideais de manejo geralmente ocorre durante o primeiro ano. Sua floração normalmente acontece ao final da estação úmida, com perda das folhas no período seco. As suas vagens possuem tamanho variável e são separadas em curtas, médias e longas, variando de 15 a 90 cm. Acredita-se que cada árvore consiga produzir de 1000 até 1.600 vagens por ano e o número de sementes oscilando entre 10 a 20 por vagem. Pode-se classificar a produção anual de sementes como baixa, média e alta, sendo de 1.500 a 24.000 sementes/planta.

1.7 Múltiplos Usos da *Moringa oleifera*

Historicamente a planta foi difundida durante a colonização inglesa nos continentes africano e asiático do século XIX quando os viajantes levaram suas

sementes da Índia para a África Oriental, principalmente para o Sudão. As propriedades do óleo de suas sementes aumentaram consideravelmente seu valor comercial e a partir do século XIX foi observado que poderia ser utilizado no mecanismo de precisão dos relógios, por manter a lubrificação mais eficiente devido ao fato de não secar. Durante a Primeira Guerra Mundial servia como um dos ingredientes na fabricação de sabão. No Haiti é utilizado como óleo de cozinha. Uma pasta resultante da extração do óleo das sementes pode ser utilizada como fertilizante (Dahot, 1998). Estas são indicações da viabilização de seu uso em escala industrial. Do ponto de vista nutricional, as folhas de *M. oleifera* podem conter um percentual de 27% de proteínas, sendo ricas em vitamina A e C, cálcio e fósforo, podendo ser utilizada na alimentação humana e/ou animal (Dahot,1998). A planta é integralmente utilizada na medicina natural na Índia (Matos, 1998). Na Guatemala várias partes desta árvore são usadas como anti-inflamatório e antiespasmódico. O suco das suas raízes frescas misturado ao leite tem sido empregado na medicina popular como diurético, anti-lítico e digestivo, e também no tratamento da asma. No tratamento de queimaduras e ferimentos da pele, utiliza-se uma pomada feita com a massa branca do interior das sementes, tornando a cicatrização mais rápida (Eilert et al., 1981).

1.8 Sua Utilização como Purificador de Água

O efeito como coagulante primário das sementes de *M. oleifera* sobre as partículas em suspensão na água parece ser sua função mais promissora. Pesquisas com cotilédones de seis espécies do gênero *Moringa* têm demonstrado que estes possuem propriedades de coagulação semelhantes ao sulfato de alumínio. Um projeto piloto para o tratamento de água no Malawi na África, constatou que o alumínio é eficiente como coagulante em apenas uma faixa restrita de níveis de pH da água a ser tratada, enquanto que as sementes da *M. oleifera* atuam sem levar em conta o pH (Okuda et al., 2001). A perspectiva de purificação de água a um custo de apenas uma fração do tratamento químico convencional, favorece o uso das sementes trituradas da

M. oleifera como uma alternativa de mais alta importância pelo seu potencial de uso múltiplo com um alto valor agregado.

No tratamento físico das águas barrentas pela semente da *M. oleifera* são utilizadas duas etapas: na primeira etapa há a preparação da suspensão ativa com o pó da semente e na segunda etapa a clarificação da água que é obtida com o despejo da suspensão ativa na água a ser tratada. Este método apresenta duas vantagens: o efeito físico, levando à diminuição da turbidez da água pela coagulação do material em suspensão; e, já que grande parte de microrganismos patogênicos está fisicamente ligada às partículas em suspensão na água, há o efeito de tratamento biológico, eliminando estes microrganismos (Folkard et al., 1993; Sánchez-Martín et al., 2010). Ferreira et al. (2011), mostraram a atividade coagulante e antibacteriana do extrato aquoso de *M. oleifera*.

Há também a atividade anti-cianobacteriana sobre *Microcystis aeruginosa* (Lurling & Beekman, 2010), que é um grave problema de saúde pública global (de Figueredo et al, 2004). O trabalho de Olsen (1987), com purificação de água de baixa tecnologia, relatou a eliminação de 90% das cercárias de *S. mansoni* presentes na água. Diversos estudos foram feitos para verificar a toxicidade e citotoxicidade de *M. oleifera* em humanos e animais domésticos e não foram observados efeitos significativos (Gamila et al., 2004; Nair & Varalakshmi, 2011). Não há relatos de que o pó desta planta tenha endotoxinas.

Vários estudos têm sido feitos para testar a múltipla aplicabilidade da planta, principalmente com relação à sua propriedade purificadora de águas. A partir daí surgiu a proposta de testar o extrato seco das sementes de *M.oleifera* (ESSMol) como moluscicida.

1.9 JUSTIFICATIVA

Relevância do Uso de Moringa oleifera Em Um Programa de Controle da Esquistossomose

- Utilização de um produto natural de fácil obtenção com menor impacto ambiental (proteção a Biodiversidade).
- A planta é conhecida e usada pelo ser humano há vários séculos como purificador de águas naturais para consumo e várias partes da planta são usadas como alimento (raiz, folhas, frutos e sementes) para o homem e animais, não sendo classificada como uma planta tóxica.
- Uma vez confirmada a hipótese testada, introduz-se uma nova abordagem no controle de moluscos hospedeiros do *S. mansoni*, utilizando uma planta comestível e não tóxica ao ser humano que é usada como purificadora de água natural, podendo assim ser plantada e utilizada pela própria população de áreas endêmicas.
- Portanto, oferece fácil utilização e baixo custo para o controle de moluscos hospedeiros do *S. mansoni*, em relação ao controle químico de referência.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Avaliar a ação moluscicida do extrato seco da semente de *Moringa oleifera* Lam (ESSMol) sobre *Biomphalaria glabrata*, molusco hospedeiro do *S. mansoni* e os efeitos na fauna aquática associada.

2.2 Objetivos Específicos:

- 1- Testar se o ESSMol pode atuar como moluscicida de origem vegetal para *B. glabrata*, através da determinação das concentrações letais para 50% e 90% da população testada (CL50 e CL90).
- 2- Verificar se as espécies de moluscos não transmissores da esquistossomose *Physa marmorata* e *Melanoides tuberculatus* são mais resistentes à ação do ESSMol.
- 3- Avaliar a ação ecotoxicológica do ESSMol através de testes de toxicidez aguda com o microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia* (Richard, 1894) e o peixe *Danio rerio* (Hamilton, 1822).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Planta

As sementes usadas neste estudo vieram de um exemplar de *M. oleifera* de 4 anos de idade plantada no campus da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, Brasil (Fig. 7). As coletas foram feitas em dois períodos diferentes (abril de 2008, maio de 2010). Uma amostra do material foi depositada como espécime voucher número RB498458, no Herbarium do Jardim Botânico do Rio de Janeiro/DIPECJBRJ, sendo identificado por Marcus Alberto Nadruz Coelho como *Moringa ovalifolia* Dinter e Berger (sinonimia para *M. oleifera*).



Figura 7 – Localização da árvore *Moringa oleifera* Lam. no campus da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil (Google Earth) (22°52'33"S 43°14'46"O).

3.2 Caramujos

Os espécimes de caramujos límnicos utilizados neste estudo foram descendentes de exemplares coletados em Sumidouro, RJ, Brasil e mantidos no Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental (LAPSA) do Instituto Oswaldo Cruz, separados com diâmetro de concha variando de 8 mm a 18mm (Fig. 8).



Figura 8 - Exemplares das três espécies de moluscos: *Melanoides tuberculatus* (A), *Physa marmorata* (B) e *Biomphalaria glabrata* (C) utilizados nos experimentos (foto do autor).

3.3 Bioensaios com Moluscos Alvo

Os cotilédones de *M.oleifera* foram macerados utilizando cápsula de porcelana e pistilo como mostra a Figura 9 e o extrato seco (ESSMol), foi pesado em alíquotas separadas para cada concentração usada no teste. Cada

massa de extrato foi dissolvido em 1000 mL de água do fornecimento público (CEDAE) filtrada, e divididas em sete diferentes concentrações: 0,0 (controle), 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,5 e 2,0 g/L.



Figura 9 – Cápsula de porcelana e pistilo utilizados no preparo do extrato seco das sementes de *Moringa oleifera* Lam. (foto do autor).

Para determinar as concentrações sub-letais CL50 e concentrações letais CL90, foram utilizados 140 exemplares de *B. glabrata*. Em cada bequer contendo o extrato dissolvido foram colocados dez indivíduos *B. glabrata*, de acordo com a metodologia de bioensaios para plantas moluscicidas (OMS, 1983) como mostra a Figura 10(A). O período de exposição foi de 24 horas e a temperatura mantida em $25 \pm 1^\circ\text{C}$. O teste controle foi realizado simultaneamente aos bioensaios também em duplicata, como todo o experimento.

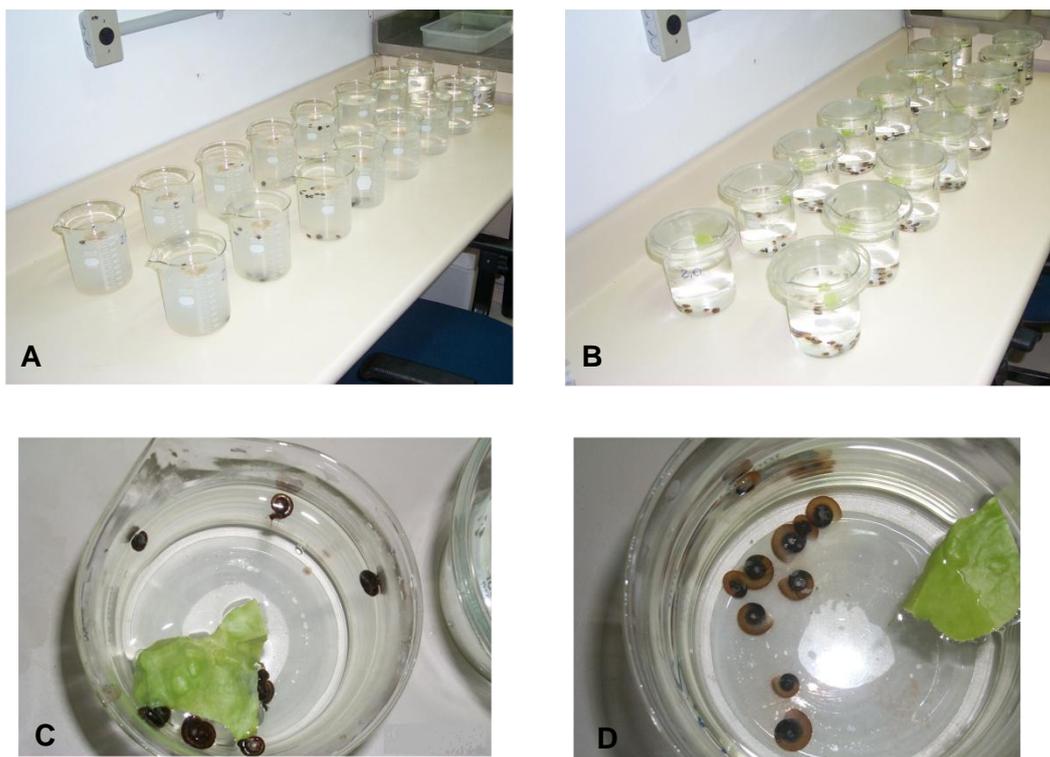


Figura 10 – Bioensaios mostrando os béqueres com as diferentes concentrações do extrato seco das sementes de *Moringa oleifera* (ESSMol) sobre as três espécies de moluscos alvo. **A:** período de exposição; **B:** período de recuperação; **C:** moluscos vivos; **D:** moluscos mortos após a fase de recuperação (fotos do autor).

Após este período (24 horas), os caramujos foram retirados e lavados em água filtrada (CEDAE), com o auxílio de uma peneira, com cuidado para não serem danificados, em seguida foram colocados em béqueres com água filtrada sem ESSMol, permanecendo por mais 24 horas, denominado de período de recuperação (Fig. 10B). Durante todo o experimento os caramujos foram alimentados com pedaços de alface fresca (Fig 10 C e D). Ao final do ensaio foram contados o número de caramujos mortos, vivos e o eventual comportamento de escape d'água.

3.4 Bioensaios com Moluscos não Alvo

Com o objetivo de verificar a especificidade do efeito letal do ESSMol sobre outras espécies de moluscos límnicos, foram realizados testes usando exemplares adultos de *P. marmorata* e *M. tuberculatus* (Figs 8 A e B)

procedentes de criadouros do LAPSA/IOC. Esses espécimes foram submetidos ao mesmo experimento com a mesma metodologia do bioensaio utilizada para *B. glabrata* com as mesmas concentrações: 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,5 e 2,0 g/L inclusive o controle sem o extrato.

3.5 Experimentos de Toxicidade

Foram realizados testes com outros organismos aquáticos usados como indicadores de ecotoxicidade como *C. dubia* (Fig 11) e *D. rerio* (Fig 12). O procedimento utilizado seguiu as recomendações da ABNT(2004) e Knie & Lopes (2004) detalhado a seguir.



Figura 11 - *Ceriodaphnia dubia* (foto obtida da internet no site: http://cfb.unh.edu/cfbkey/html/Organisms/CCladocera/FDaphnidae/GCeriodaphnia/Ceriodaphnia_dubia/ceriodaphniadubia.html acesso em 07/05/2013).



Figura 12 – O peixe *Danio rerio* (foto obtida na internet no site: www.taxateca.com acesso em 07/05/2013).

3.5.1 Preparo das amostras:

Foram preparadas soluções com o extrato de *M. oleifera* (ESSMol) utilizando água de abastecimento público filtrada e desclorada como diluente, nas concentrações 0,05; 0,07; 0,1; 0,5 e 1,0 g/L mais o grupo controle, para realização de teste ecotoxicológico com peixes (Fig.13).

Na segunda solução foi utilizada água mineral natural Minalba® como diluente, devido a padronização de método para esse organismo, nas concentrações 0,005; 0,01; 0,05; 0,1 e 0,5 g/L mais o grupo controle, para realização de teste ecotoxicológico com microcrustáceo. As soluções foram preparadas no dia do teste. Em cada teste foram utilizadas 5 concentrações preparadas a partir das soluções-mãe e testadas em sistema estático (não houve troca das diluições até o final do teste). Ao final foram medidos os parâmetros pH e oxigênio dissolvido (mg/L).

A diferença nas concentrações experimentais entre os grupos de organismos não alvo, se deve à diferente sensibilidade destas espécies a concentrações mais altas usadas para os testes com os moluscos, que foram determinadas em pré-testes para possibilitar o teste de estabelecimento da CL50.



Figura 13 - Preparo das diluições para os testes com organismos não alvo (foto do autor).

3.5.2 Teste de toxicidade aguda com *Ceriodaphnia dubia*:

Os ensaios seguiram as Normas NBR 12713 (ABNT, 2004) com adaptações. Foram utilizados 30 neonatos do microcrutáceo com o tamanho variando em torno de 1mm tendo 24 horas de nascido, divididos em três réplicas de 10 indivíduos por concentração teste (N=30 por concentração). Colocados em béqueres com capacidade de 50 mL, preenchidos com 30mL da solução (Fig.14). Os controles foram expostos somente à água de diluição. Foi utilizada água mineral natural Minalba como diluente. O tempo de exposição foi de 48 horas sob temperatura constante de 23,5° C e coberto com folha de papel alumínio para abrigo de luz em estufa B.O.D. As concentrações finais do oxigênio dissolvido (OD mg/l) foram monitoradas no início e no final dos experimentos, amostras com concentrações abaixo de 2 mg/l de OD foram descartadas das análises.

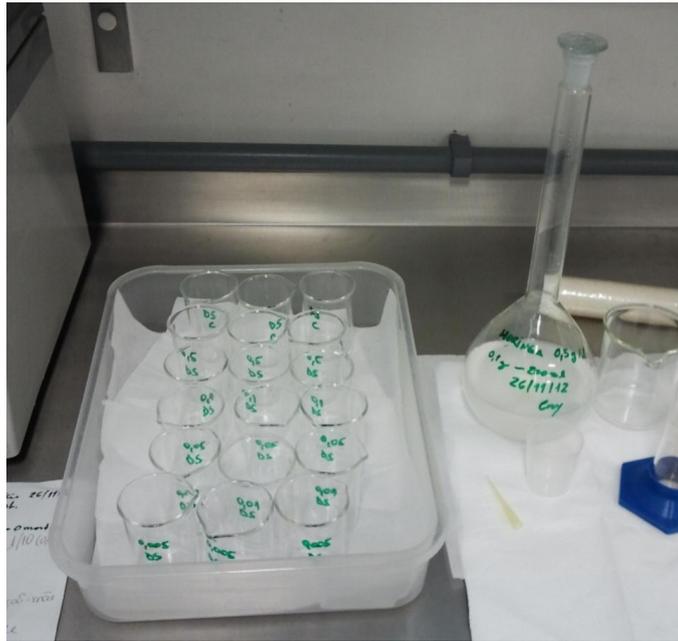


Figura 14 - Montagem do experimento com *Ceriodaphnia dubia* contendo béqueres de 50 mL como recipientes de teste e o balão volumétrico com a solução de ESSMol para diluição concentrações teste (foto do autor).

3.5.3 Teste de toxicidade aguda com peixes Danio rerio:

Os procedimentos dos testes toxicológicos com peixes seguiram o padrão adotado nos Manuais de Normas Técnicas da CETESB L5.019 (CETESB, 1990).

O método consiste na exposição de 10 indivíduos por béquer de 3 litros. Foram utilizados peixes adultos de 2,5 a 3,5 cm de comprimento recomendados para teste ecotoxicológicos de acordo com a norma ISO 7346, por um período contínuo de 24 a 96 horas, ao abrigo de luz, para determinação da CL50: 24-96h.

O teste foi realizado sem réplica em cristalizadores com capacidade de 5L preenchidos com 3L de concentração-teste. O controle foi exposto somente à água de diluição (água de abastecimento público filtrada e desclorada). Foram utilizados 10 peixes jovens, machos e fêmeas por concentração. A fim de manter um nível mínimo de oxigênio, cada cristalizador recebeu aeração

constante com ar comprimido por diafragma de acionamento elétrico (bomba para aquário) do início ao final do experimento (Figs 15 e 16).



Figura 15 - Montagem do teste toxicológico com peixes *Danio rerio*: Sequência de cristalizadores para cada concentração, indicando o procedimento de aeração (foto do autor).



Figura 16 - Experimento com peixes *Danio rerio*. cristalizador da esquerda: grupo tratado com *Moringa oleifera*. Béquer da direita: grupo de controle (foto do autor).

3.6 Análise Estatística

As determinações das concentrações letais CL50 e CL90, para todos os experimentos, foram obtidas através da aplicação do teste estatístico de Análise Probita (Finney, 1971) com um programa de computador específico desenvolvido em DBase. A CL50 é aquela que expressa a concentração estimada onde 50% dos organismos não sobrevivem ou ficam imóveis (no caso de *C. dubia*).

4 RESULTADOS

4.1 Bioensaios com Moluscos Alvo e Não Alvo

4.1.1 Bioensaios com *Moringa oleifera* para avaliação da ação moluscicida em: *Biomphalaria glabrata*, *Physa marmorata* e *Melanoides tuberculata*:

Os resultados mostraram que o extrato seco da semente de *M. oleifera* (ESSMol) apresentou atividade moluscicida para *B. glabrata* com as concentrações letais CL50 = 0,419 g/L e CL90 = 1,021 g/L ($\chi^2 = 4,078$; gl = 5; $p > 0,05$) e para *P. marmorata* CL50 = 0,339 g/L e CL90 = 0,789 g/L ($\chi^2 = 7,832$; gl = 5; $p > 0,05$) nos dois casos não foi observada diferença significativa. Já para a espécie *M. tuberculatus* não foi observada mortalidade, ou seja, o produto não apresentou atividade moluscicida (Tabela 2).

Tabela 2 – Exposição de *Biomphalaria glabrata*, *Physa marmorata* e *Melanoides tuberculatus* ao extrato seco das sementes de *Moringa oleifera* (ESSMol) (n=20).

Concentrações (g/L)	<i>Biomphalaria glabrata</i>			<i>Physa marmorata</i>			<i>Melanoides tuberculatus</i>		
	Nº de mortos	%	Escape da água	Nº de mortos	%	Escape da água	Nº de mortos	%	Escape da água
0,0	0	0	1	0	0	3	0	0	3
0,4	9	45	0	12	60	2	0	0	0 ^a
0,6	15	75	0	20	100	0	0	0	0
0,8	16	80	0	20	100	0	0	0	0
1,0	20	100	0	19	95	1	0	0	0
1,5	20	100	0	20	100	0	0	0	0 ^b
2,0	20	100	0	20	100	0	0	0	0

^a - todos os indivíduos apresentaram-se retraídos. Consideramos na análise de 24h todos os mortos para que o teste de toque não pudesse causar nenhuma interferência sobre os resultados. ^b - Dois estavam bastante retraídos na concha.

Foi observado o escape da água, um importante comportamento de proteção desses moluscos, principalmente no controle (concentração 0,0 mg/L) para as três espécies. O efeito observado da ação do ESSMol sobre os caramujos testados neste estudo foi a retração na concha sem resposta ao estímulo de toque e a presença de hemorragia da hemolinfa, características apresentadas por todos os indivíduos considerados mortos.

Nas figuras 17 e 18 estão demonstradas as curvas de mortalidade para *B. glabrata* e *P. marmorata*, que foram ascendentes de acordo com aumento das concentrações de teste, indicando um tendência de mortalidade concentração-dependente.

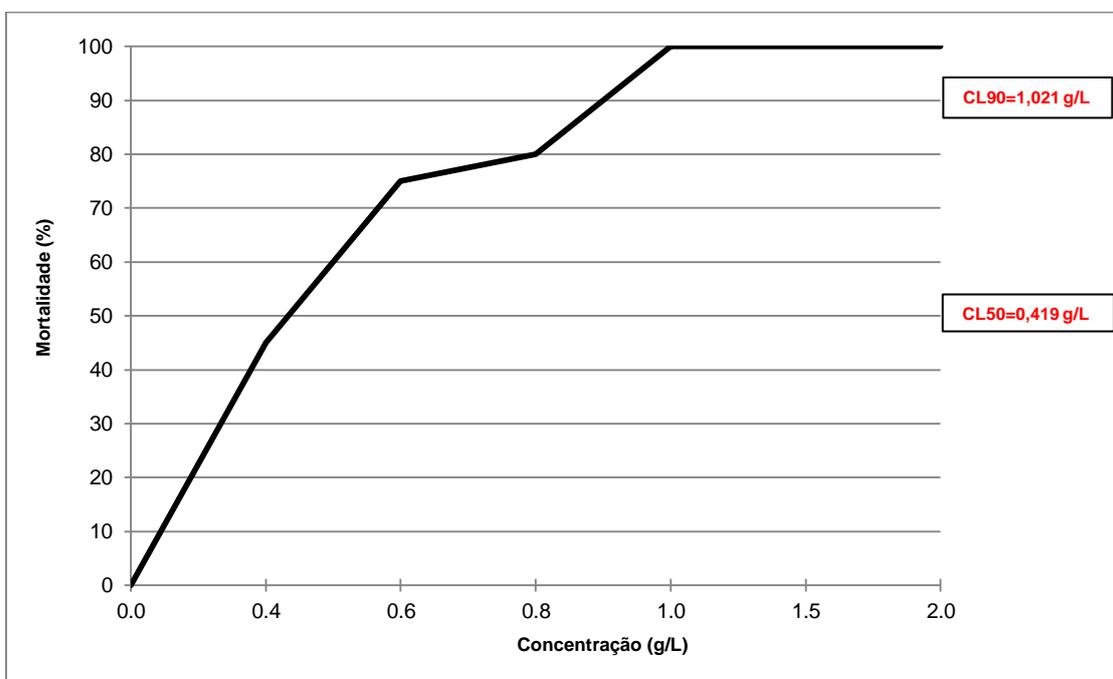


Figura 17 - Mortalidade (%) de *Biomphalaria glabrata* em diferentes concentrações (g/L) do extrato seco das sementes de *Moringa oleifera* (ESSMol) (n=20).

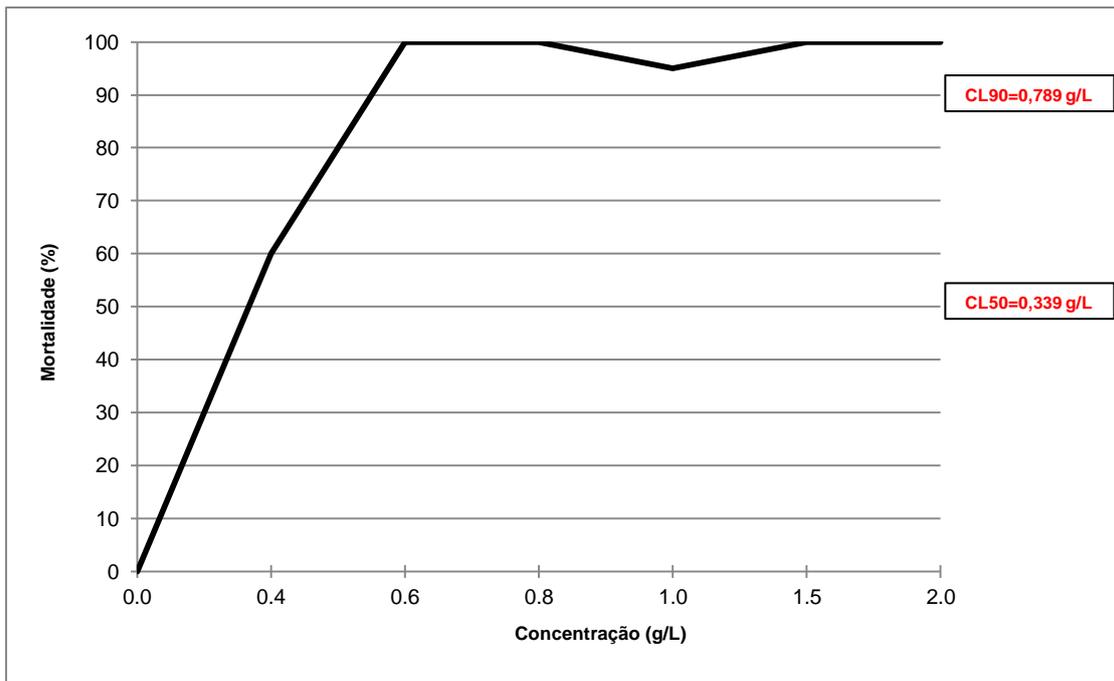


Figura 18 - Mortalidade (%) de *Physa marmorata* em diferentes concentrações (g/L) do extrato seco das sementes de *Moringa oleifera* (ESSMol) (n=20).

4.2 Testes com Organismos Aquáticos Não Alvo

Nos testes ecotoxicológicos os valores para CL50 (Tabelas 3 e 4) mostraram que o ESSMol apresentou efeito tóxico em 50% dos grupos experimentais com *C. dubia* e *D. rerio*.

4.2.1 Teste de toxicidade aguda com *Ceriodaphnia dubia*:

Os valores das concentrações sub-letais no final dos experimentos foram: CL50 = 0,12 g/L ($\chi^2 = 14,99$; gl = 3; $p < 0,05$) para *C. dubia*, apresentando diferença significativa. Neste teste foi observada a motilidade dos indivíduos, onde foram considerados imóveis aqueles incapazes de nadar na coluna d'água até 15 segundos após uma leve agitação do recipiente, além dos indivíduos aparentemente mortos. Não foi detectado nenhum comportamento anormal dos ceriodaphnias sobreviventes.

Na Figura 19 pode-se verificar que as curvas de mortalidade para *C. dubia* também foram ascendentes de acordo com aumento das concentrações de teste, indicando uma tendência de mortalidade concentração-dependente.

Tabela 3 – Exposição de *Ceriodaphnia dubia* do extrato seco das sementes de *Moringa oleifera* (ESSMol) (n=30).

Concentração (g/L)	Imobilidade em 24h			Imobilidade em 48h			pH	O.D. ^b
	R1 ^a	R2 ^a	R3 ^a	R1	R2	R3		
0,00	0	0	0	0	0	0	6,95	5,6
0,005	3	0	0	4	1	0	7,56	5,3
0,01	0	0	0	0	1	0	7,78	5,2
0,05	1	2	2	1	5	7	7,84	5,1
0,1	1	1	3	5	3	6	7,87	5,0
0,5	7	9	10	10	10	10	7,62	3,6

^a – réplicas dos experimentos; ^b – oxigênio dissolvido.

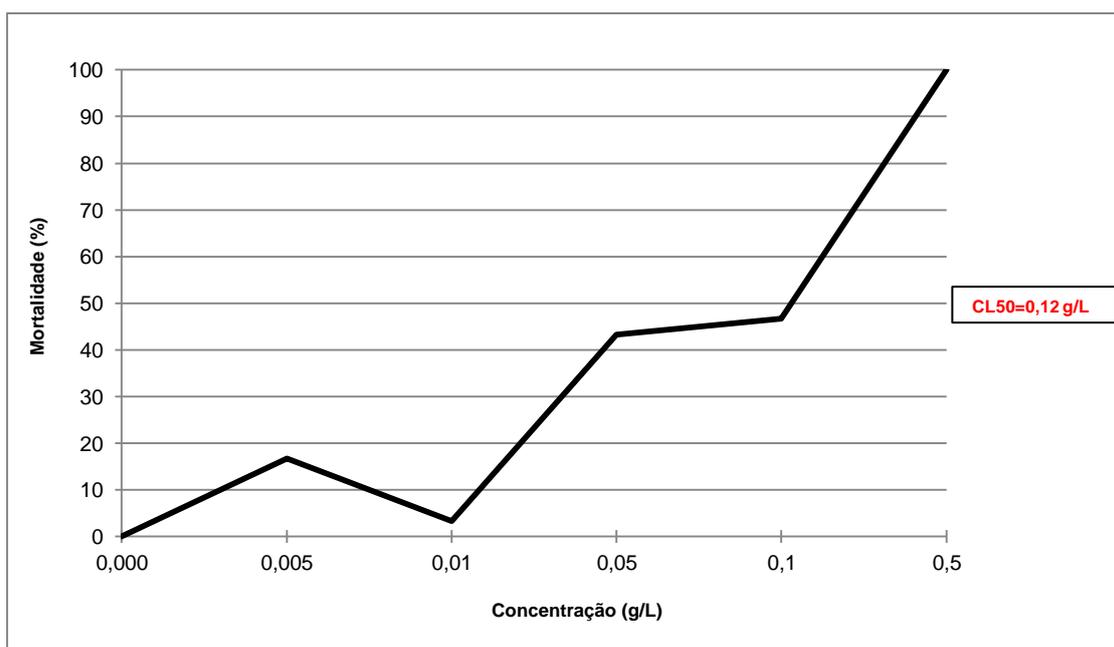


Figura 19 – Mortalidade (%) de *Ceriodaphnia dubia* em diferentes concentrações (g/L) do extrato seco das sementes de *Moringa oleifera* (ESSMol) (n=30).

4.2.2 Teste de toxicidade aguda com *Danio rerio*:

Para o peixe *D. rerio* os valores das concentrações sub-letais no final dos experimentos foram: CL50 = 0,20 g/L ($\chi^2 = 2,57$; gl = 4; $p > 0,05$). não apresentando diferença significativa. Neste teste foi observado o estado geral dos peixes, quanto a natação alterada, posição do corpo e velocidade de deslocamento. Não foi observado nenhum comportamento alterado ou mudanças visíveis em relação ao grupo controle, nas concentrações que apresentaram efeito tóxico, os indivíduos mortos ficavam imóveis no fundo do recipiente ou flutuando na superfície da água. Os peixes mortos eram retirados do recipiente teste quando observados.

A Figura 20 apresenta as curvas de mortalidade para *D. rerio* também foram ascendentes de acordo com aumento das concentrações de teste, indicando uma tendência de mortalidade concentração dependente.

Tabela 4 – Exposição de *Danio rerio* ao extrato seco das sementes de *Moringa oleifera* (ESSMol) (n=10).

Concentração g/L	Mortalidade				pH	O.D ^a
	24h	48h	72h	96h		
0,00	0	1	1	1	7,0	5,8
0,05	0	0	0	0	7,16	6,2
0,07	1	1	1	2	7,20	5,8
0,1	1	2	2	2	7,18	5,9
0,5	8	9	9	9	6,98	6,3
1,0	10	10	10	10	6,65	6,0

^a – oxigênio dissolvido.

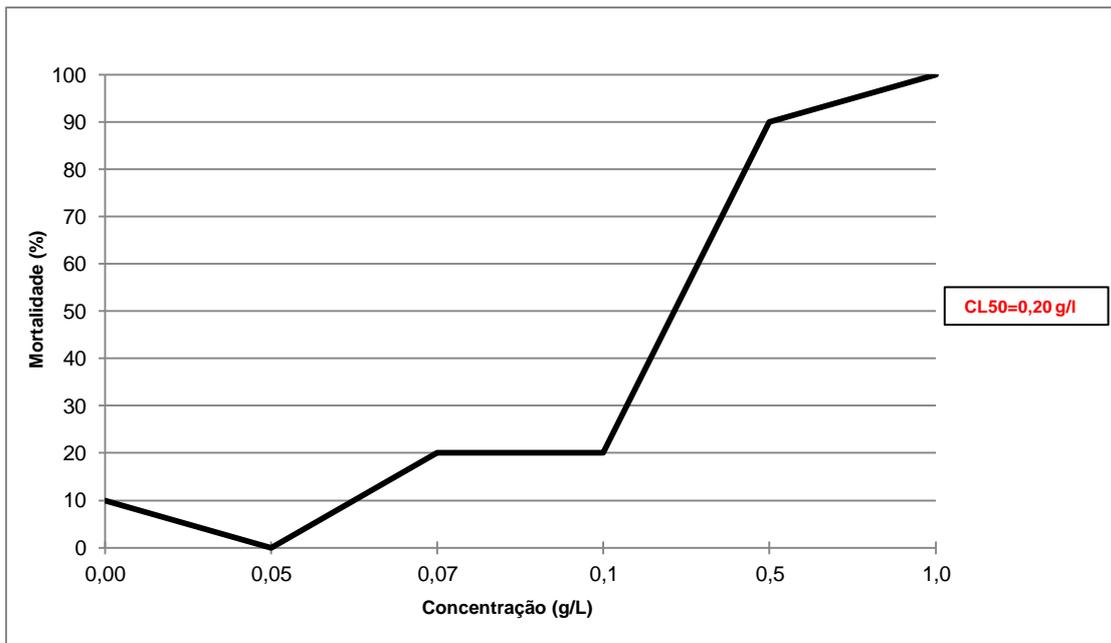


Figura 20 - Mortalidade (%) de *Danio rerio* em diferentes concentrações (g/L) do extrato seco das sementes de *Moringa oleifera* (ESSMol) (n=10).

5 DISCUSSÃO

Os bioensaios realizados neste trabalho confirmaram que houve ação moluscicida do ESSMol para *B. glabrata* e *P. marmorata*, porém, não houve efeito letal para *M. tuberculatus*, um dos moluscos não alvo testados. O fato desta última espécie possuir um opérculo córneo que funciona como uma tampa da abertura da concha, pode explicar a resistência à ação tóxica do produto moluscicida, a partir da retração na concha, como já foi relatado para outra espécie de molusco prosobrânquio *Pomacea* sp. (Vasconcellos & Amorim, 2003). Este comportamento de proteção apresentou grande eficiência para a espécie *M. tuberculatus*, garantindo a sobrevivência de 100% dos indivíduos submetidos ao teste. *B. glabrata* e *P. marmorata* também apresentaram o comportamento de retração na concha, porém não sendo tão eficiente por não apresentarem o opérculo córneo. Particularmente nos ensaios com *B. glabrata*, foi possível observar o derrame de hemolinfa (hemorragia, principalmente nas concentrações mais altas), uma vez que possui o pigmento (vermelho) hemoglobina de fácil visualização no meio líquido. Nos ensaios com *P. marmorata* não foi possível observar o derrame de hemolinfa, por ser transparente nesta espécie não apresentando o pigmento vermelho.

Como até o presente momento não foi publicado nenhum artigo científico referente ao uso do ESSMol como moluscicida para caramujos das espécies *B. glabrata*, *P. marmorata* e *M. tuberculatus*, não é possível comparar com resultados pré-existentes. Entretanto Rocha-Filho et al. (2012) apresentaram um resumo sobre a atividade moluscicida do extrato aquoso de flores de *M. oleifera* em *B. glabrata*, onde estabeleceram a $CL_{50}=0,237\%$. Transformando esse valor para g/L tem-se o valor da $CL_{50}=1,185$ g/L, enquanto que em nosso presente trabalho com o ESSMol obtivemos a $CL_{50}=0,419$ g/L também para *B. glabrata*, ou seja uma concentração quase três vezes menor observado em nosso experimento.

Os mecanismos de ação do produto sobre as espécies testadas não foram avaliados no presente estudo. Entretanto, segundo Schwarz (1996) as sementes da *M. oleifera* contém quantidades significativas de proteínas

solúveis com carga positiva. Quando o pó das sementes é adicionado a água turva, as proteínas liberam cargas positivas atraindo as partículas carregadas negativamente, como barro, argila, bactérias, e outras partículas presentes na água. O processo de floculação ocorre quando as proteínas se ligam com as cargas negativas, agregando as partículas presentes na água. A Moringa pode clarificar não somente águas com alta turbidez, mas também com média ou baixa turbidez. Outros autores mostram que o pó da semente de *M. oleifera* tem um efeito aglutinador que está relacionado às lectinas que promovem a adesão das partículas em suspensão no meio líquido (Gassensmidt et al., 1995; Ndabigengesere et al., 1995; Okuda et al., 2001; Ghebremichael et al., 2005). Tal propriedade das lectinas, promovem a agregação de partículas sólidas em suspensão acarretando em um processo de clarificação e purificação da água. Característica esta que poderia beneficiar as populações localizadas em áreas de transmissão da esquistossomose e que dependem do uso de águas de cacimbas e pequenos poços para abastecimento, onde tais locais acabam servindo de criadouros artificiais de moluscos e são potencialmente focos de transmissão. Assim, ação de controle aos moluscos hospedeiros com soluções do ESSMol atuaria também como purificador das águas.

Santos et al. (2005), verificaram a atividade hemoaglutinante das lectinas, portanto, pode-se sugerir que a absorção dessas lectinas com poder hemoaglutinante, poderiam produzir um efeito tóxico no nível do sistema circulatório devido a alteração no processo de desregulação da hemoglobina presente na hemolinfa dos moluscos.

Em um capítulo sobre Atividade Inseticida de Lectinas e Metabólitos Secundários, Paiva et al. (2012) relatam as propriedades inseticidas das lectinas de *M. oleifera* e outras plantas sobre várias ordens de insetos em experimentos em que se observa a depleção nutricional no tubo digestivo desses insetos pela ação das lectinas. Portanto, o mecanismo físico de entrada e que irá gerar o efeito tóxico sobre os moluscos, potencialmente poderia ser decorrente da ingestão do pó da planta. Entretanto neste caso ainda é desconhecido o potencial mecanismo de ação tóxica do ESSMol. Outros dois

estudos testaram o efeito tóxico do extrato aquoso de *M. oleifera* em larvas de *Aedes aegypti* (Coelho et al, 2009; Ferreira et al, 2009) mostrando a ação letal sobre essas larvas e ainda o atraso no desenvolvimento larval.

Em um trabalho sobre a toxicidade do látex de *E. milii*, que também é um produto natural de origem vegetal, Oliveira-Filho e Paumgartten (2000) testaram os efeitos tóxicos sobre espécies aquáticas não alvo e concluíram que esse produto vegetal possui um alto grau de seletividade para os caramujos hospedeiros do *S. mansoni*, comparada a Niclosamida que é o moluscicida de referência.

Apesar de ter apresentado efeito tóxico nos testes ecotoxicológicos com organismos não alvo, o ESSMol demonstra ser um produto ecologicamente menos agressivo ao ambiente em relação a Niclosamida e possivelmente mais seguro para manipulação e utilização pelo homem.

Partindo da informação do cálculo da produtividade de sementes por árvore de *M. oleifera* é de 24.000 sementes/planta (como descrito na introdução) e que para ter 1g do ESSMol precisa-se de 6 sementes (aproximadamente) podemos projetar que cada árvore pode fornecer 4.000 g (4Kg) de ESSMol. Utilizando a CL90 estabelecida para *B. glabrata* que foi de 1,02 g/L podemos dizer que a produção de sementes de só uma árvore e capaz de “tratar” aproximadamente 4.000 litros de água. Tendo esse “tratamento” o valor agregado de clarificação, purificação da água e controle de moluscos hospedeiros naturais do *S. mansoni*. Além disso, a possibilidade de armazenamento das sementes por anos, obtendo um estoque garantido e pronto para o uso.

Tendo em vista o multi-uso potencial da *M. oleifera* integrando a relação do homem, planta e ecossistemas (aquático e terrestre), tais interações compõe uma cadeia na estrutura ecossistêmica, a qual fornece as fundações que podem fortalecer os processos ecológicos que ocorrem entre esses elementos da cadeia ambiental envolvendo mais que apenas a ação sobre o ciclo de transmissão da esquistossomose (Turner & Daily, 2008; Daly & Farley, 2004). Entendemos que uma das funções definidas pela “Avaliação do Milênio”

que classifica em serviços de provisão e abastecimento de água e alimento, serviços culturais e serviços de suporte citados como preceitos da Convenção sobre Diversidade Biológica (Sukhdev, 2008), poderiam ser maximizados através do uso de uma estratégia integrada do uso desta planta no controle dos moluscos hospedeiros de *S.mansoni*.

6 PERSPECTIVAS

Investir em pesquisas que determinem o princípio ativo da ESSMol que causa mortalidade e o modo de ação do produto nos moluscos alvo.

Realizar os bioensaios com ESSMol principalmente com as outras espécies hospedeiras naturais e outros moluscos límnicos, verificando também os efeitos em moluscos jovens e desovas.

Dar prosseguimento em bioensaios ecotoxicológicos agudos e crônicos com uma diversidade maior de organismos não alvo (algas, helmintos e insetos aquáticos).

Como estratégia de planejamento dentro de um programa piloto de controle, a planta poderia ser cultivada e utilizada pela própria população, orientada pelo serviço de saúde, a baixo custo.

Continuar esta linha de pesquisa direcionada para produtos de origem vegetal mais específicos para o controle de moluscos aquáticos hospedeiros naturais do *S. mansoni* e outros helmintos de interesse médico e veterinário. Que sejam mais seguros e com menor impacto ambiental, visando a proteção da biodiversidade e que possam ser utilizados pela população para outras finalidades (alimentação humana e animal), e também na melhoria de condições de fornecimento de água para abastecimento e consumo, potencializando a instauração de um programa multi-uso e integrado de controle.

7 CONCLUSÕES

A atividade moluscicida do ESSMol, nunca antes testada para esta finalidade, demonstrou eficácia contra os moluscos *B. glabrata* e *P. marmorata*.

Para a espécie *M. tuberculatus* não foi observada mortalidade, ou seja, o ESSMol não apresentou atividade moluscicida para esta espécie de molusco.

O ESSMol apresentou efeito tóxico para o microcrustáceo *C. dubia* e para o peixe *D. rerio* porém, em concentrações que permitem a manutenção de populações naturais.

Devido a suas características não tóxica para o homem e animais domésticos, nutricional e coadjuvante no processo de purificação de água para consumo humano, torna-se um produto natural de origem vegetal de importância estratégica, para uma mudança de paradigma dentro dos programas de controle de moluscos hospedeiros do *S. mansoni*.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. Ecotoxicologia aquática. Toxicidade aguda. Método de ensaio com *Daphnia* spp (Cladocera, Crustácea). NBR 12713; 2004.

Al Zanbagi NA, Barrett J, Banaja AAA. Laboratory evaluation of the molluscicidal properties of some Saudi Arabian euphorbiales against *Biomphalaria pfeifferi*. *Acta Trop* 2001;78:23-29.

Amorim JP. Infecção experimental e natural de murídeos pelo *Schistosoma mansoni*[nota prévia]. *Rev bras Malar* 1953;5:219-22.

Amorim JP; Rosa DA, Lucena DT. Ratos silvestres, reservatórios do *Schistosoma mansoni* no nordeste do Brasil. *Rev. bras. Malar.* 1954;6:13-28.

Andrews P, Thyssen J, Lork ED. The biology and toxicology of molluscicides, Bayluscide. *Pharmacol Ther* 1982;19:245-295.

Baptista, DF, Vasconcellos, MC, Lopes, FE, Silva, IP, Schall, VT. Perspectives of using *Euphorbia splendens* as a molluscicide in schistosomiasis control programs. *Southeast Asian J Trop Med Publ Health* 1994;25(3):340-345.

Bergquist R. A century of schistosomiasis research. *Acta Trop* 2008;108:65-68.

Brasil, Ministério da Saúde, Guia de Vigilância Epidemiológica e Controle da Mielorradiculopatia Esquistossomótica. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília, Série A: Normas e Manuais Técnicos, 28p. 2006.

Cáceres A, Freire V, Girón LM, Avilés O, Pacheco G. *Moringa oleifera* L. (Moringaceae): ethnobotanical studies in Guatemala. *Econ Botany* 1992;45(4):522-523.

Carvalho OS, Caldeira RL. *Identificação morfológica de Biomphalaria glabrata, B. tenagophila e B. straminea hospedeiros intermediários do Schistosoma mansoni*. Belo Horizonte: Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, 2004.1 CD. (Série Esquistossomose;n.6).

CETESB, São Paulo. Implementação de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. São Paulo: L5.019– Testes de toxicidade Aguda com peixes. Parte I – Sistema Estático. p. 1-7: 1990.

Chitsulo L, Engels D, Montresor A, Savioli L. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop* 2000;77:41-51.

Clark TE, Appleton CC, Drewes SE. A semi-quantitative approach to the selection of appropriate candidate plant molluscicides – a South African application. *JEthnopharmacol* 1997;56:1-13.

Coelho JS, Santos NDL, Napoleão TH, Gomes FS, Ferreira RS, Zingali RB, Coelho LCBB, Leite SP, Navarro DMAF, Paiva PMG. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. *Chemosphere* 2009; 77:934-938.

Corrêa LR, Paraense WL. Susceptibility of *Biomphalaria amazonica* to infection with two strains of *Schistosoma mansoni*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1971;13:387-390.

Coura JR, Amaral RS. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004;99(Suppl. I):13-19.

Dahot MU. Vitamin contents of the flowers and seeds of *Moringa oleifera* L. *J Biochem* 1998;21(1-2):21-24.

Daly HE, Farley J. *Ecological Economics: principles and applications*. Island Press, Washington, DC, 2004.

D'Andrea PS, Maroja LS, Gentile R, Maldonado Junior A, Cerqueira R, Rey L. The parasitism of *Schistosoma mansoni* (Digenea:Trematoda) in a naturally infected populations of water rats, *Nectomys squamipes* (Rodentia-Sigmodontinae) in Brazil. *Parasitol* 2000; 120(6): 573-582.

Duke JA. Moringaceae: horseradish-tree, drumstick-tree, sohnja, moringa, murunga-kai, mulungay. In: Benge, MD. *Moringa a multipurpose tree that purifies water*. Ed. Boston, Science and Technology for Environment and Natural Resources, 1987. p. 19-28.

Duncan J. The Biochemical and Physiological Basis of the Mode of Action of Molluscicides. In: Mott KE. Plant Molluscicides. Ed. UNDP/ World Bank/ WHO, 1987. p. 27-44.

Eilert U, Wolters B, Nahrstedt A. The antibiotic principle of seeds of *Moringa oleifera* and *Moringa stenopetala*. J Med Plant Res 1981;42:55-61.

Ferreira PMP, Carvalho AFU, Farias DF, Cariolano NG, Melo VMM, Queiroz MGR, Martins AMC, Machado-Neto JG. Larvicidal activity of the water extract of *Moringa oleifera* seeds against *Aedes aegypti* and its toxicity upon laboratory animals. An Acad Brasil Cienc 2009;81(2):207-216.

Ferreira RS, Napoleão TH, Santos AF, Sá RA, Carneiro-da-Cunha MG, Morais MM, Silva-Lucca RA, Oliva ML, Coelho LC, Paiva PM. Coagulant and antibacterial activities of the water-soluble seed lectin from *Moringa oleifera*. Lett Appl Microbiol 2011;53(2):186-92.

de Figueiredo DR, Azeiteiro UM, Esteves SM, Gonçalves FJ, Pereira MJ. Microcystin-producing blooms a serious global public health issue. Ecotoxicol Environ Saf 2004;59(2):151-163.

Finney DJ. Probit Analysis, 3rd ed., New Deli, Cambridge University Press, 1971.

Folkhart GK, Sutherland JP, Grant WD. Natural coagulants at pilot scale. In: Pickford J., Editor. Water, Environment and Management: Proceedings of the 18th WEDC Conference, Aug 30-Sept 3 1992, Kathmandu, Nepal: Loughborough University Press, 1993. p. 51-54.

Galvão AF, Favre TC, Guimarães RJPS, Pereira APB, Zani LC, Felipe KT, Domingues ALC, Carvalho OS, Barbosa CS, Pieri OS. Spatial distribution of *Schistosoma mansoni* infection before and after chemotherapy with two praziquantel doses in a community of Pernambuco, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2010; 105: 555-562.

Gamila HA, Gamila EE, Ali MA. The cytotoxicity and antimicrobial efficiency of *Moringa oleifera* seeds extracts, Intern J Environ Studies 2004;61(6):699-708.

Gassenschmidt U, Jany KD, Tauscher B, Nierbergall H. Isolation and characterization of a flocculating protein from *Moringa oleifera* Lam. Bioch Biophys Acta 1995;1243(3):477-481.

Giovanelli A, Coelho da Silva CLPA, Medeiros L, Vasconcellos MC. The molluscicidal activity of the latex of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* on *Melanoides tuberculata* (Thiaridae), a snail associated with habitats of *Biomphalaria glabrata* (Planorbidae). Mem Inst Oswaldo Cruz 2001;96(1):123-125.

Giovanelli A, Coelho da Silva CLPA, Medeiros L, Vasconcellos MC. The molluscicidal activity of the Niclosamide (Bayluscide WP70®) on *Melanoides tuberculata* (Thiaridae), a snail associated with habitats of *Biomphalaria glabrata* (Planorbidae). Mem Inst Oswaldo Cruz 2002;97(5):743-745.

Ghebremichael KA, Gunaratna KR, Henriksson H, Brumer H, Dalhammar G. A simple purification and activity assay of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed. Water Res 2005;39(11):2338-2344.

Jurberg P, Vasconcellos MC, Mendes NM. Plantas Empregadas como Moluscicidas. Uma Visão Crítica. Mem Inst Oswaldo Cruz 1989;84(Supl. I):76.

Katz N. Dificuldades no desenvolvimento de uma vacina para a esquistossomose mansoni. Rev Soc Brasil Med Trop 1999; 32(6):705-711.

Kawazoe U, Pinto ACM. Importância epidemiológica de alguns animais silvestres na esquistossomose mansônica Rev Saúde Públ 1983;17(5):345-366.

Kloos H, McCullough FS. Plants with Recognized Molluscicidal Activity. In: Mott KE. Plants Molluscicides. Ed. UNDP/ World Bank/ WHO, 1987. p. 45-108.

Knie JLW, Lopes EWB. Testes Ecotoxicológicos: Métodos, Técnicas e Aplicações. Ed. FATMA/GTZ, 2004. 289 pp.

Kuo YH. Plant molluscicide studies in the People's Republic of China. In: Mott KE. Plant Molluscicides. Ed. UNDP/ World Bank/ WHO, 1987. p.289-298.

Lurling M, Beekman W. Anti-cyanobacterial activity of *Moringa oleifera* seeds. J Appl Phycol 2010;22(4):503-510.

Machado-Silva JR, Neves RH, Rodrigues-Silva R, Figueiredo de Oliveira RM, Maldonado Júnior A. Assessment of *Akodon cursor* (Rodentia, Sigmodontinae) as permissive host to *Schistosoma mansoni* infection: morphology of adult worms. Acta Parasitol 2011; 56(2): 147-153.

Maldonado Junior A, Gentile R, Fernandes CM, D'Andrea, PS, Lanfredi RM, Rey L. Helminth communities of *Nectomys squamipes* (Rodentia: Sigmodontinae) naturally infected by the exotic trematode *Schistosoma mansoni* in southeastern Brazil. J Helminthol 2006; 80: 369-375.

Maldonado Junior A, Coura R, Garcia JS, Lanfredi RM, Rey L. Changes on *Schistosoma mansoni* (Digenea: Schistosomatidae) worm load in *Nectomys squamipes* (Rodentia: Sigmodontinae) concurrently infected with *Echinostoma paraensei* (Digenea: Echinostomatidae).. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001; 96 (Suppl. I): 193-198.

Matos FJA. Farmácias vivas. Sistema de utilização de plantas medicinais projetados para pequenas comunidades. 3 ed., Fortaleza. Ed. EUFC, 1998.

McCullough FS. The Role of Mollusciciding in Schistosomiasis Control. Ed. WHO/ SCHISTO, 92.107. 1992.

Mello-Silva CC, Vasconcelos MC, Pinheiro J, Rodrigues ML. Physiological changes in *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Pulmonata: Planorbidae) caused by sub-lethal concentrations of the latex of *Euphorbia splendens* var. *hislopilii* N.E.B (Euphorbiaceae). Mem Inst Oswaldo Cruz 2006;101:3-8.

Mello-Silva CC, de Vasconcellos MC, Bezerra JC, Rodrigues Mde L, Pinheiro J. The influence of exposure to *Euphorbia splendens* var. *hislopilii* latex on the concentrations of total proteins and nitrogen products in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*. Acta Trop 2011;117(2):101-4.

Ministério da Saúde (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: diretrizes técnicas.

Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE). Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2 ed., Brasília. Ed. do Ministério da Saúde. 2008.

Nair S, Varalakshmi KN. Anticancer, cytotoxic potential of *Moringa oleifera* extracts on HeLa cell line. J Nat Pharm 2011;2:138-42.

Ndabigengesere A, Narasiah KS, Talbot BG. Active agents and mechanism of coagulation of turbid waters using *Moringa oleifera*. Water Res 1995;29(2):703-710.

Okuda T, Base AU, Nishijima W, Okada M. Isolation and characterization of coagulant extracted from *Moringa oleifera* seed by salt solution. Water Res 2001;35(2):405-410.

Oliveira-Brett AM, Goulart MOF, De Abreu FC. Detection of the damage caused to DNA by niclosamide using an electrochemical DNA-biosensor. Biosens Bioelectron 2002;17:913–915.

Oliveira-Filho EC, Paumgarten FJR. Toxicity of *Euphorbia milii* Latex and Niclosamide to snails and nontarget aquatic species. Ecotoxicol Environ Safe 2000;46:342-350.

Oliveira-Filho EC, Geraldino BR, Coelho DR, De-Carvalho RR, Paumgarten FJ. Comparative toxicity of *Euphorbia milii* latex and synthetic molluscicides to *Biomphalaria glabrata* embryos. Chemosphere 2010;81(2):218-27.

Olliaro PL, Vaillant, M T, Belizario VJ, Lwambo NJS, Ouldabdallahi M, Pieri OS, Amarillo ML, Kaatano GM, Diaw M, Domingues ALC, Favre TC, Lapujade O, Alves F, Chitsulo L. A multicentre randomized controlled trial of the efficacy and safety of single-dose Praziquantel at 40 mg/kg vs. 60 mg/kg for treating intestinal Schistosomiasis in the Philippines, Mauritania, Tanzania and Brazil. Plos Neglect Trop D 2011; 5(6): e1165.

Olsen A. Low technology water purification by bentonite clay and *Moringa oleifera* seed flocculation as performed in Sudanese villages: Effects on *Schistosoma mansoni* cercariae, Water Res 1987;21:517-522.

OMS - Organização Mundial da Saúde Report of scientific working group on plant molluscicide and guidelines for evaluation of plant molluscicide. Geneva TDR/SCH_SWE4/83:3, 1983.

OMS - Organização Mundial da Saúde. Weekly epidemiological record nº 9, 2011;86: 73-80.

Paiva PMG, Napoleão TH, Sá RS, Coelho LCBB. Insecticide activity of lectins and secondary metabolites. In: Perveen F. Insecticides. Advances in integrated pest management. Ed. In Tech, 2012. p. 579-598.

Paraense WL. Planorbídeos hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni*. In: Cunha AS (Org.). Esquistossomose mansônica. São Paulo, Ed. Sarvier, Universidade de São Paulo, 1970.

Paraense WL. Fauna planorbídica do Brasil. In: Lacaz CS, Baruzzi RG, Siqueira Jr W (Orgs). Introdução à Geografia Médica do Brasil. São Paulo. Universidade de São Paulo, 1972.

Paraense WL, Corrêa LR. Susceptibility of *Biomphalaria peregri* from Brazil and Ecuador to two strains of *Schistosoma mansoni*. Rev Inst Med Trop São Paulo 1973;15:127-130.

Paraense WL, Corrêa LR. Unsusceptibility of *Biomphalaria occidentalis* to infection with a strain of *Schistosoma mansoni*. Mem Inst Oswaldo Cruz 1982;77:55-58.

Paraense WL, Deslandes N. Observations on the morphology of *Australorbis glabratus*. Mem Inst Oswaldo Cruz 1955a;53:87-103.

Paraense WL, Deslandes N. Observations on the morphology of *Australorbis glabratus*. Mem Inst Oswaldo Cruz 1955b;53:121-134.

Paraense WL, Deslandes N. Studies on *Australorbis centimetralis*. I. Morphology, in comparison with *A. glabratus*. Rev Brasil Biol 1955c;15:293-307.

Patel AV, Wright D, Blunden G, Sumner S, Rice J. Stable Molluscicide Formulation of an Aqueous Extract of *Euphorbia myrsinites*. *Phytother Res* 2011;25:1412-1414.

Pessoa S. *Parasitologia Médica*. 11 ed., Rio de Janeiro, Ed. Guanabara-Koogan, 1988. p. 362–420.

Rey L. *Parasitologia*, 3 ed., Rio de Janeiro, Ed. Guanabara-Koogan, 2001.

Rocha-Filho CAA, Pontual EV, Albuquerque LP, Silva LRS, Coelho, LCBB, Melo AMMA, et al. Atividade moluscicida do extrato de flores de *Moringa oleifera* sobre embriões e adultos de *Biomphalaria glabrata*. 52º Congresso Brasileiro de Química. Recife, Pernambuco, Brasil. 2012. www.abq.org.br/cbq/2012/trabalhos/7/654-14379.html.

Sánchez-Martín J, Ghebremichael K, Beltrán-Heredia J. Comparison of single-step and two-step purified coagulants from *Moringa oleifera* seed for turbidity and DOC removal. *Bioresour Technol* 2010;101(15):6259-61.

Santos AFS, Argolo ACC, Coelho LCBB, Paiva PMG. Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seed. *Water Res* 2005;39(6):975-980.

Santos NC, Dias CN, Coutinho-Moraes DF, Vilanova CM, Gonçalves JRS, Souza NS, Rosa IG. Toxicidade e avaliação de atividade moluscicida de folhas de *Turnera ulmifolia* L. *Rev bras Bioc* 2010;8(4):324-329.

Schall VT, Vasconcellos MC, Rocha RS, Souza CP, Mendes NM. The control of the schistosome transmitting snail *Biomphalaria glabrata* by the plant molluscicide *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (syn. Milli Des Moul.): a longitudinal field study in an endemic area in Brazil. *Acta Trop* 2001;79:165-170.

Silva AR, Kerr WE. *Moringa uma nova alternativa para o Brasil*. Fortaleza, Ed. UFC DIRIU, 1999.

Singh SK, Yadav RP, Tiwari S, Singh A. Toxic effect of stem bark and leaf of *Euphorbia hirta* plant against freshwater snail *Lymnaea acuminata*. *Chemosphere* 2005;59:263-270.

Schwarz D. Water clarification using *Moringa oleifera*. German Appropriate Technology Exchange (Gate) Information Service /GTZ, Berlin 1996.

Sukhdev P. The Economics of Ecosystems and Biodiversity. Interim Report of the Convention on Biological Diversity. European Communities, Cambridge, United Kingdom. 2008.

Tendler M, Simpson A. The biotechnology-value chain: Development of Sm14 as a schistosomiasis vaccine. *Acta Trop* 2008; 108: 263-266.

Tendler M, Brito CA, Vilar MM, Freire NMS, Diogo CM, Almeida MSS, Silva JF, Savino W, Garrat R, Simpson AJG. A *Schistosoma mansoni* fatty-acid binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine. *PNAS USA* 1996; 93: 269-273.

Turner RK, Daily GC. The Ecosystem Services Framework and Natural Capital Conservation *Environ Res Econ* 2008;39:25-35.

Vasconcellos MC, Amorim A de. Activity of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B. (Euphorbiaceae) latex against *Lymnaea columella* (Say, 1817) (Pulmonata: Lymnaeidae), intermediate host of *Fasciola hepatica*, Linnaeus, 1758 (Trematoda: Fasciolidae). 2: Limited Field-testing. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003;98(7):981-985.

Vasconcellos MC, Schall VT. Latex of "Coroa de Cristo" (*Euphorbia splendens*): an effective molluscicide. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1986;81:475-476.

Webbe G. Molluscicides in the Control of Schistosomiasis. In: Mott KE. *Plant Molluscicides*. Ed. UNDP/ World Bank/ WHO, 1987. p. 1-26.

9.2 ANEXO B

PROTOCOLO DE TESTE DE TOXICIDADE AGUDA COM CLADÓCEROS:

Organismo teste: _____

Responsável: _____

Substância teste: _____

Data de início: ___/___/___ às ___:___ h

Data de Término: ___/___/___ às ___:___ h

Concentrações	Tempo de exposição	Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3	
		Total	Mortos	Total	Mortos	Total	Mortos
C1	24 hs						
	48 hs						
C2	24 hs						
	48 hs						
C3	24 hs						
	48 hs						
C4	24 hs						
	48 hs						
C5	24 hs						
	48 hs						
C6	24 hs						
	48 hs						

	C1		C2		C3		C4		C5		C6	
pH												
O.D.(mg/L)												

Observações: _____

9.3 ANEXO C

PROTOCOLO DE TESTE DE TOXICIDADE AGUDA COM PEIXES:

Organismo-teste: _____ Responsável: _____

Amostra-teste: _____

Requisitante: _____

Data de início: ___/___/___ às ___:___ Data de Término: ___/___/___ às ___:___

Concentrações	Tempo de exposição	Réplica 1		Réplica 2		% Mort.	pH	OD	Cond	TDS	Sal.
		Total	Mortos	Total	Mortos						
	24 h										
	48h										
	72h										
	96h										
	24 h										
	48h										
	72h										
	96h										
	24 h										
	48h										
	72h										
	96h										
	24 h										
	48h										
	72h										
	96h										
	24 h										
	48h										
	72h										
	96h										

CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA AMOSTRA:

Data de Chegada	pH	O.D.	Condutividade	TDS	Salinidade
___/___/___					

Tratamento da amostra:
