

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

BETHÂNIA RIBEIRO DE ALMEIDA

**MALACOLOGIA DOS GÊNEROS *Lymnaea* E *Biomphalaria* NA MESORREGIÃO
SUL ESPÍRITO-SANTENSE, E A AVALIAÇÃO DE EXTRATOS DE *Melia
azedarach*, *Azadirachta indica*, E *Cymbopogon winterianus* COMO AGENTES
MOLUSCICIDAS.**

ALEGRE – ES

2010

BETHÂNIA RIBEIRO DE ALMEIDA

**MALACOLOGIA DOS GÊNEROS *Lymnaea* E *Biomphalaria* NA MESORREGIÃO
SUL ESPÍRITO-SANTENSE, E A AVALIAÇÃO DE EXTRATOS DE *Melia
azedarach*, *Azadirachta indica*, E *Cymbopogon winterianus* COMO AGENTES
MOLUSCICIDAS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito final para obtenção do Título de **Mestre em Ciências Veterinárias**, linha de pesquisa em Diagnóstico e Terapêutica das Enfermidades Clínico-Cirúrgicas.

Orientador: Prof. Dr. Olavo dos Santos Pereira Júnior

Co-orientador: Profa. Dra. Isabella Vilhena Freire Martins

ALEGRE – ES

2010

BETHÂNIA RIBEIRO DE ALMEIDA

**MALACOLOGIA DOS GÊNEROS *Lymnaea* E *Biomphalaria* NA MESORREGIÃO
SUL ESPÍRITO-SANTENSE, E A AVALIAÇÃO DE EXTRATOS DE *Melia
azedarach*, *Azadirachta indica*, E *Cymbopogon winterianus* COMO AGENTES
MOLUSCICIDAS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito final para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e Terapêutica das Enfermidades Clínico-Cirúrgicas.

Aprovada em 27 de agosto de 2010.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Olavo dos Santos Pereira Júnior
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Profa. Dra. Louisiane de Carvalho Nunes
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo

*Ao meu esposo,
pela paciência, carinho, incentivo e auxílio integral em todas as fases deste estudo.*

Aos meus pais pelo amor de cada dia.

Ao meu orientador, pelos ensinamentos, apoio e confiança em todos os momentos

Aos meus amigos, pela dedicação e companheirismo.

Aos que amo, por sempre fazerem parte da minha vida.

Aos moluscos, por colaborarem em todas as etapas e por serem objeto de estudo.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me guiar no caminho da luz, conceder a oportunidade de realizar meus sonhos, e iluminar minha vida com suas palavras.

À Universidade Federal do Espírito Santo e ao Curso de pós-graduação em Ciências Veterinárias por terem me recebido e acolhido nesses dois anos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) e a Indústria Farmacêutica Ouro Fino, pelo apoio financeiro ao estudo.

Ao meu esposo, Fabiano Costa Santiliano, pelo companheirismo, paciência, carinho, apoio, auxílio, estímulo, e, por estar sempre presente nos momentos mais difíceis deste estudo. Muito obrigada, você foi fundamental nesta relevante etapa da minha vida profissional. Te amo!.

À minha família, meus pais, Delson de Almeida Pires e Marina Lucia Ribeiro de Almeida, por todo apoio, paciência, fé, amor e cuidado ao longo desses anos, por terem me dado a vida e me ensinado a caminhar, e por me proporcionaram a chance de estar alcançando mais esta vitória.

A minha avó Carmem Velasquez pelo eterno incentivo e palavras de perseverança.

A minha avó Maria Cecília de Almeida, que muito contribui com suas orações em todas as etapas de minha vida, inclusive para realizar este curso, e, que, mesmo não mais estando entre nós, continua me incentivando e intercedendo por mim na realização de meus sonhos.

Aos meus queridos amigos, de infância, da escola, da faculdade e de muitos outros lugares, que mesmo à distância sempre me apoiaram transmitindo muito carinho e positivismo.

Aos colegas de trabalho, na Prefeitura Municipal de Mimoso do Sul e Piúma, por proporcionarem coleguismo, ambiente de trabalho agradável e por me auxiliarem em algumas etapas dos experimentos.

Ao Professor Olavo dos Santos Pereira Júnior por ter me acolhido como um pai desde os meus primeiros passos na tentativa de ingressar no programa. Sou eternamente grata ao senhor pela orientação, pelos conhecimentos, e pelas

oportunidades proporcionadas durante todo o curso. Agradeço a este meu querido padrinho pela dedicação, amizade, confiança, paciência, compreensão, atenção integral e palavras confortáveis em todos os momentos difíceis durante deste curso.

À Professora Isabella Vilhena Freire Martins, pela co- orientação e confiança durante a realização do curso.

A professora Mariana Drummond Costa Iguinacchiti, pelo acompanhamento, ensinamento, e pelas sugestões e correções durante a elaboração deste estudo.

Aos professores Taís Cristina Bastos Soares e Heberth de Paula, pelo apoio e companheirismo durante a realização dos estudos no Laboratório de Bioquímica do Centro de Ciências Agrárias da UFES.

Aos professores do programa de pós-graduação por terem ministrado as disciplinas, pelos ensinamentos e pelo acolhimento durante o curso.

Aos colegas do curso de pós-graduação, pela amizade e ajuda durante a realização dos projetos e das disciplinas.

Aos alunos de graduação Leonardo Alvarez, Renato, Érica e Henrique pelo apoio e auxílio durante a realização dos experimentos laboratoriais, e, principalmente das coletas, que apesar de em muitas situações apresentarem-se de difícil realização e em horários e dias adversos, demonstraram total dedicação para o desenvolvimento deste estudo, revelando uma equipe de extrema união.

À aluna do curso de pós-graduação e amiga, Danielle Porcari Alves, pelo primeiro incentivo a realização deste curso, e, pela amizade, apoio, dedicação, paciência e companheirismo em todas as fases de realização deste curso em momentos diversos e difíceis ao longo deste período. Amiga, se não fosse sua insistência, não estaria aqui hoje realizando mais um sonho, obrigada.

Enfim, a todos que eu amo e que tenho muito carinho, e, que mesmo distante contribuíram com muito apoio, por sempre terem feito parte da minha vida e me ajudado de alguma forma em todos os momentos difíceis!

Muito Obrigada por ajudarem em todas as etapas!

BIOGRAFIA

BETHÂNIA RIBEIRO DE ALMEIDA, filha de Delson de Almeida Pires e Marina Lucia Ribeiro de Almeida, nasceu em 01 de maio de 1982, no município do Mimoso do Sul, Espírito Santo.

Formou-se no ensino fundamental na Escola de Ensino Fundamental Monsenhor Elias Tomasi, município de Mimoso do Sul, Espírito Santo, no ano de 1995.

No ano de 1998 concluiu o ensino médio na escola Guimarães Rosa, no município de Cachoeiro do Itapemirim, Espírito Santo.

Em março de 1999, ingressou no curso de Farmácia, na Universidade Iguazú, no município de Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, diplomando-se Farmacêutica Industrial em janeiro de 2003.

Em fevereiro de 2003, iniciou suas atividades na Farmácia Costa e Venturini LTDA, atuando como diretora técnica. No mesmo ano, iniciou o curso de Pós – Graduação em Farmacologia clínica, na Universidade do Grande Rio, no município de Duque de Caxias, Rio de Janeiro, recebendo o título de especialista em dezembro de 2004.

No mês de fevereiro de 2004, foi aprovada em concurso público da Prefeitura Municipal de Mimoso do Sul, Estado do Espírito Santo, e no mês de maio de 2004, ingressou como Farmacêutica, responsável técnica e coordenadora da Farmácia de Manipulação Municipal. No ano de 2007, iniciou suas atividades na Prefeitura Municipal de Mimoso do Sul, como farmacêutica atuante no setor de Vigilância Sanitária. Atualmente trabalha na referência técnica do Programa de Educação em Saúde Municipal e coordena o Programa de Erradicação de Drogas, Controle do Tabagismo, e outros fatores de risco ao câncer.

No ano de 2005 iniciou o curso de Pós - graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas pela Universidade Iguazú, no município de Itaperuna, Rio de Janeiro, como bolsista parcial, recebendo o título de especialista em 2006. No mesmo ano, foi aprovada em processo seletivo pela Prefeitura Municipal de Guarapari, sendo contratada em maio de 2007, como farmacêutica responsável pelo Centro de Testagem e Diagnóstico em DST-AIDS, e, pela Farmácia Básica da Unidade de

Saúde Dr. Arnaldo Magalhães, mantendo vínculo até maio de 2007. Ainda no ano de 2006, ingressou no curso de Pós- graduação Gestão em Assistência Farmacêutica no SUS, pelo Instituto Salutaris de Ensino em parceria com a Escola de Santa Tereza (ESFA) no município de Vitória- Espírito Santo, como bolsista integral, recebendo o título de especialista no ano de 2007.

Em dezembro de 2007 foi aprovada no processo seletivo do governo do estado do Espírito Santo para o cargo de farmacêutica, sendo contratada em maio de 2008 para atuar como farmacêutica responsável pela Farmácia Estadual de Alto Custo da Superintendência Regional de Saúde, no município de Cachoeiro do Itapemirim, Espírito Santo até o mês de abril de 2008. Em fevereiro de 2008, foi aprovada no concurso público da Prefeitura Municipal de Piúma, Estado do Espírito Santo, e no mês de setembro de 2008, ingressou como farmacêutica, atuando no Hospital Municipal Nossa Senhora da Conceição. Em dezembro de 2008, foi convidada a assumir a Gerência Técnica de Assistência Farmacêutica da Prefeitura Municipal de Piúma, onde atualmente é responsável pelo setor.

Iniciou o curso de pós-graduação em Ciências Veterinárias, nível Mestrado, em março de 2008, no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, sob orientação do Prof. Dr. Olavo dos Santos Pereira Júnior.

A relação entre as populações de homens, vetores e agentes etiológicos é bastante complexa e não parece estar no horizonte, para os próximos anos, a miragem de uma vida livre de infecções (MASCARINI, 2003).

RESUMO

Moluscos do gênero *Biomphalaria* e *Lymnaea* possuem grande importância médica, por serem caracterizados como hospedeiros intermediários do parasito *Schistosoma mansoni* e do parasito *Fasciola hepatica* respectivamente. Neste estudo foi avaliada a presença desses moluscos em 14 municípios situados na mesorregião Sul Espírito-Santense, pertencentes às Bacias hidrográficas dos rios Itapemirim, Itabapoana e Benevente. Para a identificação dos moluscos foi utilizada avaliação morfológica e molecular. Para todos os 14 municípios georreferenciados foram encontrados moluscos da espécie *B. tenagophila* e *L. columella*. Entretanto, a preocupação com o desenvolvimento de resistência destes moluscos a substâncias moluscidas e sua baixa seletividade ocasionam na busca de substâncias biodegradáveis de origem vegetal. Este estudo analisou então a eficácia de extratos fitoterápicos compostos de *Melia azedarach* var *azedarach*, *Azadirachta indica* A. Juss, e *Cymbopogon winterianus* como possíveis agentes moluscidas. Foram testados extratos alcoólicos, acetato de etila e hexânicos extraídos de caules e folhas dos vegetais cinamomo, nim e citronela como agentes moluscidas para a espécie *Lymnaea columella*, hospedeiro intermediário da *Fasciola hepatica*. Os extratos nim, cinamomo e citronela demonstraram-se eficazes no controle dos moluscos analisados em baixas concentrações, diluídos em etanol, acetato de etila e hexano, e, inibiram a ovoposição dos moluscos, impedindo sua reprodutibilidade, e, por conseguinte, a disseminação destas doenças parasitárias.

Palavras-chave: Esquistossomose; Fasciolose; Drogas Moluscidas.

ABSTRACT

Mollusks of the genders *Biomphalaria* and *Lymnaea* have great medical importance as intermediate hosts of the parasites *Schistosoma mansoni* and *Fasciola hepatic*. In this study, the occurrence of these mollusks was evaluated in 14 counties located in the catchments of the following rivers: Itapemirim, Itabapoana and Benevente in Southern Espírito Santo State, Brazil. The species *B. tenagophila* e *L. columella* were found in all counties assessed. Furthermore, the tolerance of these mollusks to molluscicides and their low selectivity raises concerns and show the importance of finding new vegetable biodegradable substances to control these mollusks. This study assessed the use of vegetable extracts originated from *Melia azedarach var azedarach*, *Azadirachta indica* A. Juss, and *Cymbopogon winterianus* as natural molluscicides. Hidroalcoholic, ethyl acetate and hexane crude extracts, obtained from leaves of plants, such as chinaberry, neem and citronella, were tested as molluscicides against *Lymnaea columella*, which is the intermediate host of *Fasciola hepatica*. The low concentration extracts of neem, citronella and chinaberry diluted in ethanol, ethyl acetate and hexane shown to be effective in controlling snails and inhibiting the oviposition of shellfish, preventing its reproduction, and, therefore, the spread of these parasitic diseases.

Keywords: Schistosomiasis; Fascioliasis; molluscicides.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Mapa de regiões endêmicas para esquistossomose mansônica no Brasil. Modificado de: www.ibge.gov.br.....28
- Figura 2: Ciclo biológico do *Schistosoma mansoni*. Adaptado de: www.dpd.cdc.gov.....32
- Figura 3: Mapa de regiões endêmicas para fasciolose hepática no Brasil. Modificado de: www.ibge.gov.br.....44
- Figura 4: Ciclo biológico da *Fasciola hepatica*. Adaptado de: www.dpd.cdc.gov.....46
- Figura 5: Estrutura química do fármaco Niclosamida. Adaptado de Gasparotto Jr et al., 2005.....51

Capítulo 1. Inquérito epidemiológico, levantamento malacológico e análise da infecção por *Schistosoma mansoni* em moluscos do gênero *Biomphalaria*, no distrito de Anutiba - Alegre, ES, Brasil

Figura 1. Marcação dos pontos de coleta de moluscos *Biomphalaria tenagophila* no Córrego Boqueirão e afluentes no distrito de Anutiba, município de Alegre/ES. (●): pontos onde foram encontrados os moluscos *B. tenagophila*; (Δ): pontos onde não foram encontrados os moluscos *B. tenagophila*.....67

Figura 2. Respostas ao questionário Sm1, referente a comunidade que reside as margens do Córrego Lambarzinho e afluentes (Córrego do Óleo e Córrego das Pedras) no distrito de Anutiba, município de Alegre/ES. Perguntas: 1. Alguém de sua família tem costume de nadar em rio, açude, cachoeira, ou outro local; 2. Já ouviu falar na doença Xistose (*esquistossomose ou barriga d'água ou mal do caramujo*); 3. Alguém de sua família já teve Xistose; 4. Você já viu ou ouviu falar de

algum córrego, rio, açude, cachoeira, ou outro local onde exista caramujos; ; 5. Alguém de sua família trabalha no cultivo de arroz, ou em alguma atividade que tenha contato direto com água; 6. Sua casa possui: esgoto tratado.....71

Capítulo 2. Levantamento malacológico e Identificação molecular de moluscos do gênero *Biomphalaria*, hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*, na região Sul do Espírito Santo, Brasil

Figura 1a: Mapa do estado do Espírito Santo.....88

Figura 1b: Carta malacológica para moluscos do gênero *Biomphalaria* na mesorregião sul do estado do Espírito Santo.....88

Figura 2: Gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo (05 mg/mL) referente à amplificação do fragmento de aproximadamente 1300 pares de bases da primeira região interna do DNAr de *Biomphalaria* ssp., coletados em diferentes municípios da Mesoregião Sul Espírito-Santense. M: Marcador de peso molecular 100 pares de bases (pb). As colunas 1 - 14 representam respectivamente os municípios onde ocorreram as coletas; 1: Alegre; 2: Atílio Vivácqua; 3: Cachoeiro de Itapemirim; 4: Castelo; 5: Itapemirim; 6: Guaçuí; 7: Jerônimo Monteiro; 8: Marataízes; 9: Mimoso do Sul; 10: Muniz Freire; 11: Muqui; 12: Presidente Kennedy; 13: Piúma; 14: Vargem Alta.....90

Figura 3: Gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo (05mg/mL) referente ao perfis de restrição de aproximadamente 850 e 550 pares de bases (pb) (PCR-RFLP) característico para *Biomphalaria tenagophila*, obtido da digestão do fragmento de 1300 pb (produto amplificado da primeira região interna do DNAr), utilizando a enzima *DdeI*. M: Marcador de peso molecular 100 pb. 1 - 14: municípios da Mesoregião Sul Espírito-Santense, onde ocorreram as coletas. 1: Alegre; 2: Atílio Vivácqua; 3: Cachoeiro de Itapemirim; 4: Castelo; 5: Itapemirim; 6: Guaçuí; 7: Jerônimo Monteiro; 8: Marataízes; 9: Mimoso do Sul; 10: Muniz Freire; 11: Muqui; 12: Presidente Kennedy; 13: Piúma; 14: Vargem Alta.....90

Capítulo 3. Levantamento malacológico e Identificação molecular de moluscos do gênero *Lymnaea*, hospedeiro intermediário da *Fasciola hepatica*, na região Sul do Espírito Santo, Brasil

Figura 1a: Mapa do estado do Espírito Santo.....111

Figura 1b: Carta malacológica para moluscos do gênero *Lymnaea* na mesorregião sul do estado do Espírito Santo.....111

Figura 2: Gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo (05 mg/mL) referente a amplificação do fragmento de aproximadamente 600 pares de pares da primeira região interna ribossomal do DNA- ITS1 de *Lymnaea ssp.*, coletados em diferentes municípios da Mesoregião Sul Espírito-Santense. M: Marcador de peso molecular 100 pares de bases (pb). As colunas 1 - 14 representam respectivamente os municípios onde ocorreram as coletas; 1: Alegre; 2: Atílio Vivácqua; 3: Cachoeiro de Itapemirim; 4: Castelo; 5: Itapemirim; 6: Guaçuí; 7: Jerônimo Monteiro; 8: Marataízes; 9: Mimoso do Sul; 10: Muniz Freire; 11: Muqui; 12: Presidente Kennedy; 13: Piúma; 14: Vargem Alta.....115

Figura 3: Gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo (05 mg/mL) referente ao perfis de restrição de aproximadamente 400 e 250 pares de bases (pb) (PCR-RFLP) da região ribossomal ITS 1, característico para *Lymnaea columella*, obtido da digestão do fragmento de 600 pb (produto amplificado da primeira região interna do DNAr), utilizando a enzima *Ddel*. M: Marcador de peso molecular 100 pb. 1 - 14: municípios da Mesoregião Sul Espírito-Santense, onde ocorreram as coletas. 1: Alegre; 2: Atílio Vivácqua; 3: Cachoeiro de Itapemirim; 4: Castelo; 5: Itapemirim; 6: Guaçuí; 7: Jerônimo Monteiro; 8: Marataízes; 9: Mimoso do Sul; 10: Muniz Freire; 11: Muqui; 12: Presidente Kennedy; 13: Piúma; 14: Vargem Alta.....115

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1. Inquérito epidemiológico, levantamento malacológico e análise da infecção por *Schistosoma mansoni* em moluscos do gênero *Biomphalaria*, no distrito de Anutiba - Alegre, ES, Brasil.

Tabela 1. Distribuição de moluscos *Biomphalaria tenagophila* no Córrego Boqueirão e afluentes no distrito de Anutiba, município de Alegre/ES e características ambientais.....69

Tabela 2: Moluscos da espécie *B. tenagophila* sadios e infectados com *S. mansoni*, coletados no distrito de Anutiba, município de Alegre/ES.....69

Capítulo 2. Levantamento malacológico e Identificação molecular de moluscos do gênero *Biomphalaria*, hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*, na região Sul do Espírito Santo, Brasil

Tabela 1. Distribuição de moluscos *Biomphalaria tenagophila* em 14 municípios da mesorregião sul do estado do Espírito Santo e características ambientais.....87

Capítulo 3. Levantamento malacológico e Identificação molecular de moluscos do gênero *Lymnaea*, hospedeiro intermediário da *Fasciola hepática*, na região Sul do Espírito Santo, Brasil

Tabela 1. Distribuição de moluscos *Lymnaea columella* em 14 municípios da mesorregião sul do estado do Espírito Santo e respectivas características ambientais.....110

Capítulo 4. Análise da eficácia de extratos fitoterápicos compostos de *Melia azedarach* var *azedarach*, *Azadirachta indica* *Azedarach* Juss, e *Cymbopogon winterianus* como agentes moluscicidas para moluscos da espécie *Lymnaea columella*

Tabela 1. Avaliação dos efeitos de mortalidade dos moluscos da espécie *L. columella* expostos aos extratos de nim obtidos em etanol, acetato de etila e hexano diluídos em DMSO.....133

Tabela 2. Avaliação do efeito de mortalidade dos moluscos da espécie *L. columella* expostos aos extratos de cinamomo obtidos em etanol, acetato de etila e hexano diluídos em DMSO.....134

Tabela 3. Avaliação dos efeitos de mortalidade dos moluscos da espécie *L. columella* expostos aos extratos de citronela obtidos em etanol, acetato de etila e hexano diluídos em DMSO.....135

Tabela 4. Doses Letais ideais dos extratos de nim, cinamomo e citronela no controle de moluscos da espécie *L. columella*.....136

Tabela 5. Avaliação da ovoposição de moluscos da espécie *L. columella* expostos aos extratos de nim, cinamomo e citronela, obtidos em etanol, acetato de etila e hexano.....137

LISTA DE SIGLAS e/ou ABREVIATURAS

B. tenagophila – *Biomphalaria tenagophila*

CCA – Centro de Ciências Agrárias

ELISA – Ensaio Imunossorvente Ligado a Enzima

ES – Espírito Santo

F. hepatica – *Fasciola hepatica*

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IDAF – Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal

L. columella – *Lymnaea columella*

OMS – Organização Mundial da Saúde

Pb – pares de bases

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

RFLP – Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição

S. mansoni – *Schistosoma mansoni*

SESA – Secretaria de Saúde do estado do Espírito Santo

UFES – Universidade Federal do Espírito Santo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
2. REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1. As doenças parasitárias	23
2.2. A Esquistossomose mansônica.....	26
2.2.1. Histórico e Epidemiologia da esquistossomose.....	26
2.2.2. Ciclo de vida do <i>Shistosoma mansoni</i>	29
2.2.3. Biologia e Identificação de moluscos do gênero <i>Biomphalaria</i>	32
2.2.4. Detecção de moluscos do gênero <i>Biomphalaria</i> infectados por <i>Schistosoma mansoni</i>	37
2.3. A Fasciose hepática.....	38
2.3.1. Epidemiologia da fasciose hepática.....	40
2.3.2. Ciclo de vida da <i>Fasciola hepatica</i>	44
2.3.3. Biologia e Identificação de moluscos do gênero <i>Lymnaea</i>	47
2.3.4. Detecção de moluscos infectados por <i>Fasciola hepatica</i>	49
2.4. Plantas com potencial ação moluscicida	50
2.4.1. <i>Melia azedarach var azedarach</i>	54
2.4.2. <i>Azadirachta indica Azedarach Juss</i>	55
2.4.3. <i>Cymbopogon winterianus Jowit</i>	57
CAPÍTULO 1.....	59
3. Cap. 1 – Inquérito epidemiológico, levantamento malacológico e análise da infecção por <i>Schistosoma mansoni</i> em moluscos do gênero <i>Biomphalaria</i> , no distrito de Anutiba - Alegre, ES, Brasil.....	60
3.1. RESUMO.....	60
3.2. ABSTRACT.....	61
3.3. INTRODUÇÃO.....	62
3.4. MATERIAL E MÉTODOS.....	64
3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
3.6. CONCLUSÕES.....	72
3.7. REFERÊNCIAS.....	73

CAPÍTULO 2.....	78
4. Cap. 2 - Levantamento malacológico e Identificação molecular de moluscos do gênero <i>Biomphalaria</i> , hospedeiro intermediário do <i>Schistosoma mansoni</i> , na região Sul do Espírito Santo, Brasil.....	79
4.1. RESUMO.....	79
4.2. ABSTRACT.....	80
4.3. INTRODUÇÃO.....	81
4.4. MATERIAL E MÉTODOS.....	83
4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	86
4.6. CONCLUSÕES.....	94
4.7. REFERÊNCIAS.....	95
CAPÍTULO 3.....	101
5. Cap. 3 - Levantamento malacológico e Identificação molecular de moluscos do gênero <i>Lymnaea</i> , hospedeiro intermediário da <i>Fasciola hepatica</i> , na região Sul do Espírito Santo, Brasil.....	102
5.1. RESUMO.....	102
5.2. ABSTRACT.....	103
5.3. INTRODUÇÃO.....	104
5.4. MATERIAL E MÉTODOS.....	106
5.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	109
5.6. CONCLUSÕES.....	116
5.7. REFERÊNCIAS.....	117
CAPÍTULO 4	123
6. Cap. 4 - Análise da eficácia de extratos fitoterápicos compostos de <i>Melia azedarach var azedarach</i> , <i>Azadirachta indica Azedarach Juss</i> , e <i>Cymbopogon winterianus</i> como agentes moluscidas para moluscos da espécie <i>Lymnaea columella</i>	124
6.1. RESUMO.....	124
6.2. ABSTRACT.....	125
6.3. INTRODUÇÃO.....	126

6.4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	128
6.5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	131
6.6.	CONCLUSÕES.....	138
6.7.	REFERÊNCIAS.....	139
7.	CONCLUSÕES GERAIS.....	145
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	146

1. INTRODUÇÃO

A Esquistossomose mansônica é uma doença condicionada à presença de molusco do gênero *Biomphalaria*, suscetíveis ao *Schistosoma mansoni* (PAZ, 1997; CALDEIRA et al, 2004). O conhecimento sobre a distribuição geográfica das espécies de *Biomphalaria* é importante para o controle e vigilância epidemiológica da esquistossomose (BARBOSA et al, 2006). A expansão dessa parasitose para a região sul do estado do Espírito Santo pode estar correlacionada com a ocorrência de moluscos vetores, *Biomphalaria* sp., portadores de *S. mansoni*, já que as condições ambientais são plenamente atendidas para desenvolvimento completo de seu ciclo biológico.

Outra parasitose de relevância na região refere-se à fasciolose hepática, causada pelo parasito *Fasciola hepatica* e/ou *Fasciola gigantica*. A fasciolose trata-se de uma doença que resulta em elevadas perdas econômicas aos produtores pecuaristas da região, e que ocasionalmente pode acometer o ser humano (PILE et al, 2001; QUEIROZ et al, 2002). Esta doença apresenta como hospedeiro intermediário, moluscos *Lymnaea* sp., considerado, se contaminado, peça fundamental no ciclo biológico da mesma.

A ausência de uma carta malacológica do sul do estado do Espírito Santo suscita pesquisas sobre a fauna malacológica da região visando a localização e identificação dos hospedeiros intermediários para *S. mansoni* e *F. hepatica*, em municípios da região.

Atualmente os produtos químicos moluscidas acarretam malefícios aos animais consumidores da água do local de aplicação pelos resíduos oriundos, causando intoxicação aos mesmos, o que resulta na busca de novos compostos ativos a base de vegetais. Diversos testes utilizando extratos a base de *Melia azedarach* var *azedarach* (cinamomo), *Azadirachta indica* A. juss (nim) e *Cymbopogon winterianus* Jowitt (citronela), tem apresentado drogas potenciais destinadas a diversas aplicações, tais como efeitos inseticidas, antifúngicos e antiparasitários. Entretanto, na literatura pesquisada não foram encontradas indicações de aplicações destes extratos com fins moluscidas, o que justifica a realização deste estudo na região descrita.

Procurando colaborar para a melhoria desses conhecimentos, são apresentados neste estudo, pontos da presença de espécies *Biomphalaria* e *Lymnaea*, seguidos de circunstâncias que envolvem os conhecimentos sobre a distribuição das espécies hospedeiras intermediárias da endemia na região mencionada. Relata-se também a possibilidade dos moluscos infectados por *S. mansoni* em municípios localizados na região sul do Espírito Santo no Brasil, assim como a verificação da eficiência de extratos fitoterápicos como agentes, considerando que atualmente no Brasil somente é permitido o uso da droga niclosamina como moluscicida, a qual em uso contínuo apresenta toxicidade (GRAEFF, et al 2001; GASPAROTTO JR. et al, 2005).

Motivados por estes dados, e por saber que o dimensionamento das áreas colonizadas por moluscos de importância médica são úteis ao controle e vigilância epidemiológica para a esquistossomose e fasciolose, o principal objetivo deste estudo foi realizar o levantamento malacológico e a identificação molecular de moluscos do gênero *Biomphalaria* e *Lymnaea*, na região sul do Espírito Santo e analisar a eficiência de extratos fitoterápicos compostos de *Melia azedarach* var *azedarach*, *Azadirachta indica* A. Juss, e *Cymbopogon winterianus* como agentes moluscicidas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - AS DOENÇAS PARASITÁRIAS

As parasitoses constituem-se em um grave problema de saúde pública, sendo considerado segundo CORREIA e colaboradores (2005) um problema médico-sanitário. O equacionamento deste problema refere-se à necessidade de conhecimentos dos fatores de risco que favorecem o surgimento, a manutenção e a propagação dos agentes infecciosos (LUDWIG et al, 1999; ZAIDEN et al, 2008). Nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, nas áreas rurais e nos subúrbios das grandes cidades, a frequência de parasitoses está relacionada às baixas condições de infra-estrutura e saneamento básico da população, e ao baixo nível de instrução da população (ROCHA et al, 2000a; ARAÚJO, 2005; ZAIDEN et al, 2008). Apesar dos avanços no campo dos medicamentos antiparasitários polivalentes (OLIVEIRA et al, 2007), estas infecções estão diretamente relacionados às condições sanitárias, aos comportamentos inerentes a certos grupos populacionais (ARAÚJO, 2005), que contribuem significativamente para problemas econômicos, sociais e médicos (TIAGO et al, 2005). Em sociedades menos desenvolvidas, embora nem sempre com base em estatísticas fidedignas, é usual expressar em milhões o número de indivíduos infectados por enteroparasitas (MONTEIRO et al, 1988).

Considerado uma associação entre os seres vivos, o parasitismo representa um tipo de relação onde há unilateralidade de benefícios, sendo um dos associados prejudicado (CORREIA et al, 2005; TIAGO et al, 2005). Alterações relacionadas ao meio ambiente, tais como: aumento da concentração populacional, baixas condições higiênicas e hábitos alimentares inadequados, são fatores pré-determinantes para multiplicação do parasito ou do vetor junto a uma população susceptível (TIAGO et al, 2005). A presença de parasitos pode aumentar quantitativamente e qualitativamente conforme condições ambientais favoráveis, possibilitando, em alguns casos, a ocorrência de poliparasitismo, situação debilitante para o indivíduo (ZAIDEN et al, 2008).

A infecção por parasitos influencia muitos aspectos fenotípicos do hospedeiro, incluindo a fisiologia, a história de vida, o comportamento e a seleção sexual (TIBIRIÇÁ et al, 2009). No caso das verminoses, estas podem acometer a saúde dos indivíduos, possibilitando o aparecimento de sintomas como diarreia, cólicas, redução do desenvolvimento físico, alterações psicossomáticas e sociais, podendo, em alguns casos, interferir diretamente na qualidade de vida da população afetada (CORREIA et al, 2005; ZAIDEN et al, 2008).

Dentre as infecções parasitárias, destacam-se as parasitoses gastrointestinais, existindo cerca de vinte principais que acometem o homem. Dentre estas, destacam-se como as mais comuns as geohelmintoses (OMS, 2002). É estimado que 1,5 bilhão de pessoas (um quarto da população mundial) encontram-se infectadas com geohelmintos (ARAÚJO, 2005) (parasitoses intestinais que podem provocar alta morbidade, principalmente em mulheres e crianças).

Segundo MONTEIRO e colaboradores (1988), as parasitoses gastrointestinais aumentam significativamente sua frequência à medida que piora o nível socioeconômico, chegando a ser de nove vezes a diferença de prevalência existente entre os estratos socioeconômicos extremos da população. Os estudos sobre a prevalência de enteroparasitoses, são poucos e dispersos, sendo a maioria deles realizada em amostras de bases populacionais mal definidas, como usuários de serviços de saúde, alunos de escolas públicas e comunidades urbanas carentes (FERREIRA et al, 2000).

Dos fatores que interferem no desenvolvimento pleno da atividade pecuária, as parasitoses gastrintestinais ocupam lugar de destaque (MOTA et al, 2003). De acordo com FALBO e colaboradores (2008), o parasitismo por nematódeos gastrintestinais tem se constituído num dos principais fatores limitantes à exploração de caprinos e ovinos no Brasil. O avanço da agricultura e da pecuária próximo às áreas naturais proporcionou um contato maior entre as populações humanas e de seus animais domésticos com as populações de animais silvestres, facilitando a disseminação de agentes infecciosos e parasitários para novos hospedeiros e ambientes (SILVA, 2004).

No Brasil, as parasitoses intestinais ainda se encontram bastante disseminadas e com alta prevalência em seres humanos (FERREIRA et al, 2000;

ROCHA et al, 2000a). Segundo CASTRO e colaboradores (2004), a questão específica do saneamento básico no Brasil é alarmante. Dados do IBGE (1999) demonstravam que mais de 50% dos domicílios não tinham acesso a sistema de esgotamento sanitário e apenas 15% do esgoto coletado recebia tratamento. Essa situação traz graves consequências para a qualidade de vida da população, principalmente para a parcela da população de menor poder aquisitivo, e, particularmente, nas faixas etárias mais jovens (CASTRO et al, 2004; CORREIA et al, 2005).

Casos de parasitoses ressaltam a importância do peridomicílio na transmissão da doença, uma vez que a maioria dos focos tem localização peri ou intradomiciliar. Considerando padrão de distribuição espacial desses focos, observa-se que a dinâmica de transmissão não pode ser analisada apenas a partir da distribuição dos vetores, sendo necessário situar os focos no contexto epidemiológico onde estão inseridos (ARAÚJO et al., 2002).

Em decorrência dos efeitos deletérios à saúde dos indivíduos e, sobretudo, das repercussões econômicas, vários programas de controle têm sido dirigidos para as parasitoses intestinais em diferentes países. No entanto, constata-se um descompasso entre o êxito alcançado por estes nos países desenvolvidos e aquele verificado nas economias em desenvolvimento (LUDWING et al, 1999). Na pecuária, o controle de parasitoses vem sendo realizado por meio do uso de anti-helmínticos, desconsiderando em alguns casos os fatores epidemiológicos predominantes na região, o que pode interferir diretamente na população parasitária ambiental e, conseqüentemente, na infecção do rebanho. Programas de controle parasitário eficientes são baseados em informações sobre a disponibilidade de larvas no ambiente, detecção de fontes de infecção, conhecimento sobre as exigências climáticas para eclosão de ovos e viabilidade larvar (MOTA, et al, 2003). Vale ressaltar que o uso inadequado de anti-helmínticos pode selecionar nematódeos com resistência a uma ou mais drogas, fenômeno descrito desde a década de 90 (FALBO et al, 2008).

A implementação de medidas relacionadas ao saneamento básico e programas contínuos visando educação sanitária nas comunidades, possibilitará

uma melhoria da condição de vida, e, conseqüentemente, do desenvolvimento dos infectados por parasitoses (UCHÔA et al, 2001).

No cenário atual, o elevado custo financeiro das medidas técnicas e a falta de projetos educativos com a participação da comunidade dificultam a implementação das ações de controle (LUDWING et al, 1999). Medidas preventivas baseadas em informações educativas para as comunidades podem reduzir a freqüência de tratamentos químicos e quando associadas a outras formas de controle podem reduzir a dependência dos anti-helmínticos (MOTA et al, 2003).

2.2. A ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA

Considerada uma das mais antigas doenças humanas, a esquistossomose mansônica é uma endoparasitose, cuja distribuição geográfica está diretamente relacionada com a presença do agente etiológico *Schistosoma mansoni* e de moluscos do gênero *Biomphalaria* (AMARAL e PORTO, 1994; COIMBRA JR, 1981; CALDEIRA et al, 2009). Estima-se que cerca de 250 milhões de indivíduos distribuídos em 76 países da África, Ásia e América são afetados por esta endemia (ENGELS et al, 2002).

Uma infecção introduzida pode não se estabelecer numa região devido a fatores exclusivamente biológicos. Este é o caso da não ocorrência no Brasil, da esquistossomose hematóbica e da tripanossomíase africana (doença do sono), doenças que foram introduzidas, mas não se estabeleceram pela inexistência de agentes biológicos específicos (SILVA, 1985).

2.2.1. HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA DA ESQUISTOSSOMOSE

Em 1850, Theodore Bilharzs, médico e biólogo alemão, professor da cidade do Cairo - Egito, durante a realização de uma autópsia em camponeses egípcios do sexo masculino, isolou um parasita trematódeo do sistema porta-hepático, que por apresentar um nítido dimorfismo sexual e habitat intravascular, foi denominado *Distomum haematobium* (JARCHO, 1968; AMARAL e PORTO, 1994). Posteriormente, Weiland, em função da característica fenda corporal apresentada

pelos machos, sugeriu a denominação de *Schistosoma* (ROLLISON e SOUTHGATE, 1987). No ano seguinte, Cobbold, na intenção de homenagear Bilharzia, propôs a denominação de Bilharzia para o gênero, entretanto prevaleceu a denominação de *Schistosoma* em respeito às regras de nomenclatura científica (ROLLISON e SOUTHGATE, 1987). Em 1902, após encontrar ovos com espículas laterais em pacientes das Antilhas, Manson descobriu uma nova espécie de *Schistosoma* (diferente do *Schistosoma haematobium*, na qual os ovos apresentavam espícula terminal), que em 1907 foi descrita por Sambon como *Schistosoma mansoni* (AMARAL e PORTO, 1994).

As descobertas seguintes a esses achados permitiram a identificação das diferentes espécies do gênero *Schistosoma*. Atualmente existem seis espécies de *Schistosoma* que podem infectar o ser humano: *S. mansoni*; *S. hematobium*; *S. japonicum*; *S. intercalatum*; *S. mekongi* e *S. malayensis* (COURA e AMARAL, 2004).

É nas raízes históricas do desenvolvimento social e econômico do Brasil-colônia que se encontra a origem para a endemização da esquistossomose. Provavelmente, a esquistossomose foi introduzida no Brasil algumas décadas após o descobrimento, com a chegada dos navios com escravos africanos oriundos de regiões sabidamente endêmicas, em meados do século XVI (ARAUJO, 1986; PAZ, 1997; PARAENSE, 2002; BARBOSA, et al, 2006).

Durante anos a esquistossomose permaneceu incógnita no Brasil até que, em 1907 o médico baiano Pirajá da Silva reconheceu sua existência no país, descrevendo em 1908 o verme adulto do parasita *S. mansoni*, única espécie que encontrou condições de adaptação nas Américas. A partir de 1916, o médico sanitário Adolph Lutz realizou estudos relacionados a biologia do parasita de seus hospedeiros intermediários e de métodos de diagnóstico (AMARAL e PORTO, 1994). Considerado um consenso pela maioria dos estudiosos no assunto, a esquistossomose mansônica foi introduzida em São Paulo, assim como em outros estados do Sudeste e do Sul, devido à migração de indivíduos originários das zonas endêmicas do Nordeste, notadamente da Bahia, Pernambuco, Alagoas e Sergipe, assim como da porção setentrional do estado de Minas Gerais. Esta corrente migratória se intensificou com o surto de industrialização verificado a partir do final da década de 1940, justamente quando a esquistossomose passa a ser reconhecida

como problema de saúde pública nos estados de São Paulo, Paraná e Rio de Janeiro (SILVA, 1985).

Atualmente a esquistossomose mansônica, doença infecciosa, de caráter crônico ou agudo, endêmica em vários estados do Brasil (ARAÚJO, 2000), com estimativas de que existam 30 milhões de pessoas vivendo em áreas expostas ao risco de infecção e cerca de 6 a 7 milhões de pessoas infectadas pelo parasita (OMS, 1993). A ocorrência deste parasito está intimamente relacionada a precárias condições sócio-ambientais apresenta-se como maiores prevalências em humanos na região Nordeste (ARAÚJO-FILHO, 2000), apresentando – se como vasta área endêmica, do Maranhão ao Espírito Santo (COURA e AMARAL, 2004) e nos estados de Minas Gerais (SOUZA et al, 1987). Também existem focos em áreas isoladas, no Distrito Federal e nos estados do Pará, Piauí, Goiás, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Figura 1). Além disso, há casos oriundos de áreas endêmicas em quase todo o território nacional, principalmente nos estados que são considerados pontos para a migração como Rondônia (COURA e AMARAL, 2004).



Figura 1: Mapa de regiões endêmicas para esquistossomose mansônica no Brasil. Modificado de: www.ibge.gov.br.

Em Pernambuco, a doença é historicamente endêmica na Zona da Mata (Figura 1), porém a recente notificação de casos de esquistossomose aguda e de focos de vetores da doença no litoral desse estado apontam para uma expansão da endemia com mudanças no seu perfil clínico-epidemiológico (ARAÚJO et al, 2002).

Surtos de esquistossomose aguda em regiões turísticas do estado do nordeste estão cada vez mais frequentes no Brasil, pois a transformação da ocupação e do uso da terra gerou a dispensa de mão-de-obra pelos antigos agricultores, e pequenos empresários, donos de estabelecimentos turísticos (MASSARA et al, 2008).

A esquistossomose mansônica, considerada por muito tempo uma "endemia rural", atualmente é encontrada na periferia e mesmo nas grandes cidades, como nos casos de Salvador, Fortaleza e Belo Horizonte (GUIMARÃES et al, 1997).

No município de Belo Horizonte–MG, desde o primeiro relato de ocorrência dessa parasitose, têm sido efetuados levantamentos malacológicos para a localização e controle dos focos de transmissão. Nos últimos anos os criadouros de moluscos foram reduzidos devido ao progresso e medidas de urbanização. Atualmente os focos, com raras exceções, se encontram na periferia ou municípios vizinhos, sendo que eventualmente, em um criadouro pode ocorrer a substituição de uma espécie hospedeira por outra (SOUZA et al, 1998).

A necessidade da adoção de medidas urgentes de combate a esta parasitose gastrointestinal fica clara ao se considerar que, em 17 dos estados brasileiros, existem áreas endêmicas de transmissão desta doença (GUIMARÃES et al, 1997).

2.2.2. CICLO DE VIDA DO *Schistosoma mansoni*

O *Schistosoma mansoni* trata-se de um parasito trematódeo, do gênero *Schistosoma*, família Esquistossomatidae, classe Trematoda e sub-classe Digenea. Este parasito apresenta ciclo biológico do tipo heteroxênico, com acentuado dimorfismo sexual e diferentes estágios de desenvolvimento (ROLLINSON e SOUTHGATE, 1987).

Os vermes adultos habitam o sistema porta-hepático do ser humano e de outros hospedeiros vertebrados (Figura 2), onde se acasalam e realizam a

ovoposição nos ramos terminais da via mesentérica inferior e nas vénulas da parede intestinal (WILSON, 1980). Pressupõe-se que a longevidade do parasita no ser humano seja de 5 a 6 anos, embora alguns casais podem sobreviver até 30 anos, quando ocorre acentuada diminuição da ovoposição. Fêmeas em idade média de dois anos ovopõem, diariamente, cerca de 300 ovos (ROLLINSON e SOUTHGATE, 1987).

Cerca de 30% dos ovos depositados na parede intestinal são eliminados pelas fezes, o restante permanece retido na parede do intestino e no parênquima hepático, podendo em alguns casos, atingir os pulmões por meio do sistema circulatório. Em menor frequência, estes ovos podem ser levados a outros órgãos tais como: medula óssea, cérebro, baço, coração, dentre outros (WILSON, 1980). Os ovos eliminados no ambiente externo em meio às fezes líquidas, apresentam sobrevivência de 24 horas e até de cinco dias em fezes formadas (WILSON, 1980).

Os ovos secretam antígenos solúveis, ocasionando um processo inflamatório granulomatoso principalmente no fígado e intestino, podendo resultar em fibroses, hipertensão portal, hemorragias e em alguns casos ocasionar letalidade (WILSON, 1980). O início da formação do granuloma é mediado por linfócitos T “helper” CD4+ secretores de citocinas padrão Th1, sendo que na fase crônica pode ocorrer imunomodulação para as células secretoras do padrão Th2 (ASAHI et al, 2003).

Segundo WILSON (1980), o homem ao lançar os ovos no meio ambiente o homem atua como fonte disseminadora da doença, o que explicaria a grande difusão pelo mundo. Ao alcançarem o ambiente externo em meio às fezes, os ovos em contato com água doce e sob fatores favoráveis (luz intensa, pressão osmótica, oxigenação da água e temperatura entre 25 a 30°C) eclodem liberando a primeira forma livre do parasita, o miracídio. Este nada até encontrar um hospedeiro susceptível. Em torno de 70% dos casos, a penetração ocorre via pés e antenas dos caramujos (Figura 2).

No molusco, as larvas transformam-se em esporocistos primários, e pela multiplicação das células germinativas produzem os esporocistos secundários, que migram ao sistema hemolinfático até atingirem o hepatopâncreas e as gônadas. Nestes órgãos cada esporocisto secundário, por meio de reprodução assexuada, origina um elevado número de cercárias, que conforme a temperatura do ambiente

elimina as mesmas um mês após a infecção. Considerada a segunda larva do ciclo, a cercária, forma infectante para o ser humano, é eliminada pelo molusco na água e nada até encontrar o hospedeiro definitivo (Figura 2). Normalmente as cercárias são eliminadas durante o período diurno, devido à maior luminosidade (WILSON, 1980).

As cercárias respondem a estímulos ambientais que geram aumento dos seus ritmos de natação, e, por conseguinte, ampliam a probabilidade de contato com o hospedeiro definitivo. Estes estímulos são precisamente aqueles que o ser humano desencadeia ao entrar na água, tais como turbulência, sombra e sinais químicos liberados na pele do hospedeiro (WILSON, 1987).

As cercárias possuem três tipos de glândulas: glândulas acetubulares, glândula da cabeça e glândula sub-tegumentar, que contém vesículas secretoras pré – formadas, as quais desempenham relevante papel na invasão do hospedeiro e/ ou transformação do parasita (DORSEY, 2002).

Em contato com a pele do hospedeiro, a cercária atravessa o epitélio estratificado da epiderme e a derme, ultrapassando obstáculos (colágeno, elastina e fibroblastos) a fim de que consiga atingir os vasos sanguíneos ou o sistema linfático. Durante o período de penetração, a cercária perde o cauda e o glicocálix originando o esquistossômulo (CRABTREE e WILSON, 1986).

As larvas não destruídas pelos mecanismos de defesa do organismo humano, penetram nos vasos sanguíneos e passivamente são encaminhadas ao lado direito do coração e pulmões (Figura 2). Essa migração do esquistossômulo ocorre pelo sistema sanguíneo, ou com maior raridade, pelo sistema linfático. Os esquistossômulos em contato com os vasos pulmonares tornam-se mais delgados e longos, com cerca de 400 μm , e, via corrente sanguínea atingem o lado esquerdo do coração, sendo posteriormente disseminados por todo o corpo humano (PEREIRA JUNIOR, 2005).

Os esquistossômulos que atingem o sistema porta-hepático permanecem vivos, se alimentam e promovem o pareamento. O casal de parasitos migram para as veias mesentéricas onde concluem sua maturação. A postura dos primeiros ovos inicia-se cerca de trinta dias após a penetração na pele (BASCH e SAMUELSOM, 1990). O ciclo biológico do parasita *S. mansoni* encerra-se com a liberação de fezes

contaminadas em água doce próximo à população local de moluscos susceptíveis (Figura 2).

Vale ressaltar que a existência de portadores de uma doença infecciosa numa dada área não é suficiente para que se estabeleçam doenças parasitárias, considerando que sua transmissão depende de inúmeras variáveis, como é o caso da esquistossomose.

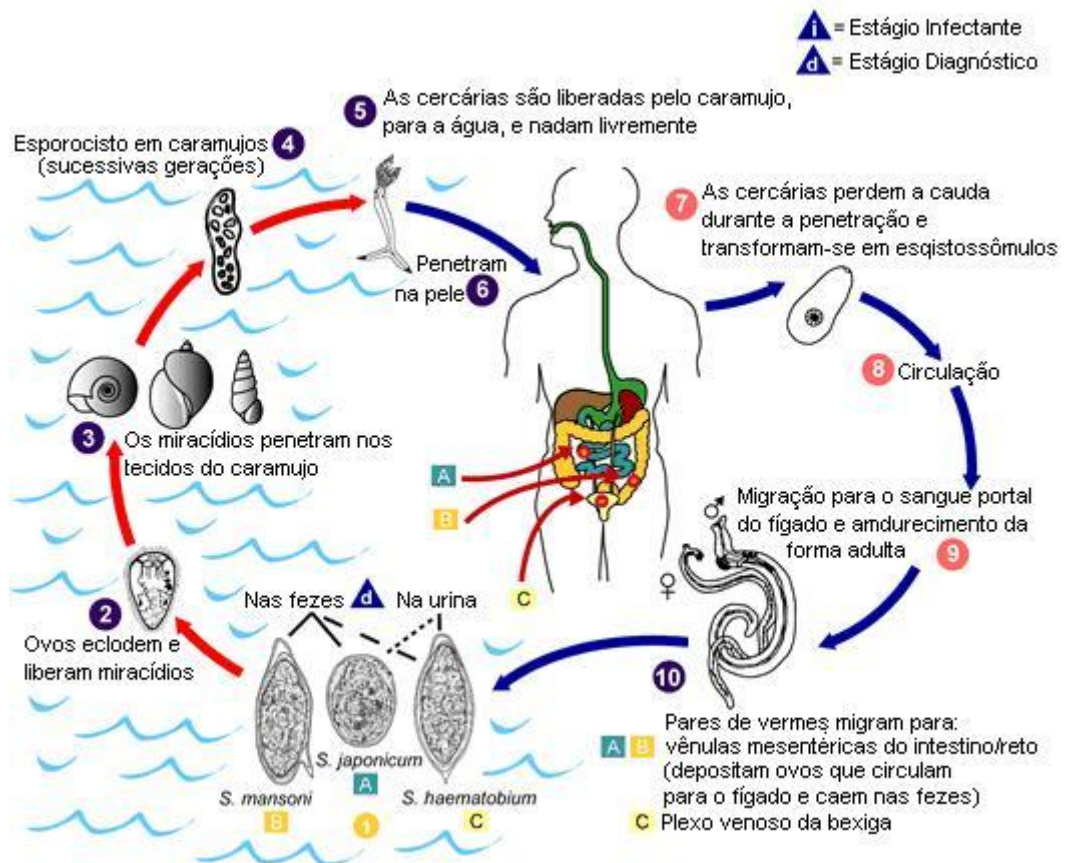


Figura 2: Ciclo biológico do *Schistosoma mansoni*. Adaptado de www.dpd.cdc.gov

2.2.3. BIOLOGIA E IDENTIFICAÇÃO DE MOLUSCOS DO GÊNERO *Biomphalaria*

Moluscos do gênero *Biomphalaria* são caramujos planorbídeos que habitam água doce e são considerados os hospedeiros intermediários do trematódeo *Schistosoma mansoni* (SOUZA et al, 1987).

Como adaptação morfológica para superar as situações adversas do meio, vários moluscos planorbídeos apresentam um conjunto de projeções formadas na

superfície interna da concha. Esta estrutura encontrada em *Australorbis glabratus* (*Biomphalaria glabrata*) por PARAENSE e DESLANDES (1956) e PARAENSE (1957). A estivação consiste na diminuição da atividade metabólica diante de uma condição desfavorável seca ou quente, uma característica adaptativa de sobrevivência bastante comum nos gastrópodes, inclusive em espécies pulmonadas (TELES, 1989). Outra adaptação bastante importante para os planorbídeos refere-se a capacidade que eles apresentam de se enterrarem no substrato nos períodos de seca extrema, o que serve como um comportamento adicional para a proteção contra a dessecação, favorecendo sua sobrevivência (PAZ, 1997).

Para a formação de suas conchas, os moluscos necessitam de carbonato de cálcio, sendo inclusive capazes de fugir de águas muito pobres em cálcio ou então formar conchas finas e pouco resistentes. A dureza total da água também é considerada um dos fatores controladores da densidade populacional e da distribuição de caramujos (PAZ, 1997).

Caramujos planorbídeos são encontrados em maior abundância e diversidade em ambientes onde o pH varia entre 6,5 e 8,5. Condiciona-se a ocorrência destes moluscos em ambientes aquáticos que apresentam um pH mínimo de 6,0 (PAZ, 1997). Em condições naturais, todavia, já foram encontradas espécies em ambientes com pH tão baixo quanto 4,0 e 4,8 (MILWARD DE ANDRADE, 1954). O regime pluviométrico e a temperatura também são um dos principais fatores reguladores da vida e dos processos vitais de planorbídeos vetores de doenças (OLAZARRI, 1981).

SIOLI (1953), estudando a distribuição de planorbídeos na região Amazônica, concluiu que a dispersão destes organismos sofria uma nítida limitação em consequência da acidez de vários de seus corpos d'água (pH entre 4,5 e 5,15), considerando ainda que as condições muito ácidas do ambiente constituem um dos fatores mais poderosos de corrosão das conchas de moluscos.

Segundo GRISOLIA e FREITAS (1985) a condutividade da água, de um modo geral, é considerada um fator influenciador da produtividade aquática, na abundância, na vitalidade e na distribuição de moluscos de água doce, auxiliando o pulmão a respirar o ar atmosférico. Os moluscos pulmonados apresentam uma pseudobrânquia que os capacita à respiração aquática, quando submersos. Tal estrutura anatômica habilita os moluscos do gênero *Biomphalaria* a uma vida anfíbia

e os tornam aptos a viverem, de certo modo, independente do teor de oxigênio dissolvido na água (MALEK, 1958). Esta adaptação é muito importante para estes moluscos, notadamente nas regiões onde os corpos de água estão sujeitos a períodos de estiagem prolongados e nos locais onde, em certas etapas do ciclo hidrológico, apresentam hipoxia ou anoxia na coluna d'água. Além disso, o aumento da quantidade de oxigênio dissolvido no ambiente não proporciona um melhor ritmo de crescimento aos planorbídeos, uma vez que caramujos com diâmetros de 0,3 cm podem suportar tensões baixas deste gás (FREITAS et al, 1975). O aumento da concentração de oxigênio dissolvido na água reduz a taxa de mortalidade, sendo um fator determinante para caramujos recém-eclodidos, uma vez que sua maior concentração permite um melhor desenvolvimento quando estes vivem juntos com os caramujos adultos (PAZ, 1997).

Os moluscos do gênero *Biomphalaria* habitam e se desenvolvem com intensidade em diversas regiões do país (CALDEIRA, 2000). Estes planorbídeos não formam populações em águas correntes com velocidade superior a 30 cm/s em locais arenosos desprovidos de vegetação e sujeitos à ação constante de ondas. Em geral, eles são encontrados em lagoas, lagos, poças, cisternas, pântanos, banhados, remansos de rios, riachos, canais de irrigação e de drenagem, plantações de agrião e de arroz e em quaisquer áreas natural ou artificialmente alagadas (PAZ, 1997). Vivem de preferência em águas rasas, tendo como substrato o leito lodoso ou rochoso e a vegetação enraizada ou flutuante mais próxima das margens, sendo também capazes de deslizar, em posição invertida, contra a película superficial de uma coleção de água tranqüila (PAZ, 1997).

Alguns autores relacionam a presença de caramujos à qualidade das águas (PAZ, 1997). GRISOLIA e FREITAS (1985), estudando a Represa do Horto Municipal de Belo Horizonte, constataram que, dentre as características físicas, químicas e climatológicas consideradas importantes condicionadores de hábitat de moluscos de água doce, destacam-se a temperatura, chuvas, salinidade, disponibilidade de sais dissolvidos, pH, nutrientes e poluição. Na maioria dos habitats favoráveis a sua colonização, observam-se certos traços comuns, como riqueza de microflora e matéria orgânica, pouca turbidez, boa insolação, pH entre 6

a 8, teor de salinidade abaixo de 3% e temperatura média entre 20 e 25°C (PAZ, 1997).

Parâmetros mais focalizados não determinam, isoladamente, as melhores condições de habitat dos caramujos, mas um conjunto de fatores podem indicar as melhores condições tróficas, responsáveis pela manutenção de um substrato de perifíton e detritos orgânicos suficientes para manter populações de moluscos bem estabelecidas (PAZ, 1997).

Em relação à reprodução são considerados hermafroditas simultâneos, reproduzindo-se por autofecundação ou fecundação cruzada, cujo investimento na função masculina foi avaliado por seus órgãos sexuais em relação ao diâmetro da concha (MONTEIRO e KAWANO, 1998). Alterações na fertilidade e no esquema do crescimento somático de planorbídeos infectados são bem documentadas, como, por exemplo, o gigantismo em espécies de *Biomphalaria* infectados por *S. mansoni* (TIBIRIÇÁ et al, 2009).

Dez espécies e uma subespécie do gênero *Biomphalaria* são descritos (COURA e AMARAL, 2004; CARVALHO et al, 2009). Os registros de ocorrência dos planorbídeos do gênero *Biomphalaria* são importantes porque este grupo reúne as espécies de caramujos que atuam como hospedeiros intermediários de *S. mansoni* (CORREA et al, 1970).

Na Venezuela sete espécies de *Biomphalaria* têm sido reportados: *B. glabrata*, *B. straminea*, *B. prona*, *B. kuhniana*, *B. havanensis*, *B. schrammi* e *B. obstructa*; sendo a primeira espécie responsável pela transmissão do *Schistosoma* no país (CALDEIRA et al, 2000). As espécies *B. tenagophila* e *B. straminea* são predominantes nos rios do estado do Paraná, no Brasil; na Artigas e no Salto, território Uruguaio; nas localidades de Misiones, Chaco, Corrientes e Entre Rios na Argentina; e nas localidades de Itapúa e Las Misiones no Paraguai (BORDA e REA, 2007).

Dentre as espécies de *Biomphalaria* ocorrentes no Brasil são vetores importantes do *S. mansoni*: *B. glabrata*, *B. tenagophila*, *B. stramineae*, *B. pererina* e *B. amazônica*. Ambos considerados hospedeiros em potencial, baseado em dados de infecção em condições laboratoriais (CAMPOS, 2001; COURA e AMARAL, 2004; BORDA e REA, 2007).

A espécie *B. glabrata* é considerada o mais importante vetor do *S. mansoni* na América, por eliminar a maior quantidade de cercárias: 1000 a 3000 ao dia (WILSON, 1980; PARAENSE, 2001). Dentre as características morfológicas desta espécie destaca-se a concha espiralada, cuja função é proteger as partes moles do molusco, formada por numerosos órgãos. O corpo, por sua vez, é constituído pela cabeça com tentáculos finos, olhos, boca, sola plantar ou pé revestida por cílios que auxiliam no movimento do molusco e pela massa visceral, constituída pelos sistemas respiratório, circulatório, excretor, digestivo, nervoso e reprodutor. A reprodução é realizada por autofecundação e preferencialmente por fecundação cruzada, com produção de uma placa de desova contendo dezenas de ovos, capaz de resistir à dessecação (PAZ, 1997). Entretanto, existem populações dessa espécie pouco suscetíveis ao parasita e alguns aspectos da evolução parasitária nesses moluscos, com exceção das reações histopatológicas são pouco conhecidos (GUIMARÃES et al, 1997). O mecanismo de defesa do molusco *B. glabrata* contra a larva do *S. mansoni* revela o encapsulamento desta e posterior fagocitose realizada pelos hemócitos (SANTOS et al, 2005). Essa espécie tem seu maior domínio no Sudeste da Bahia e na metade oriental de Minas Gerais somada ao território adjacente do Espírito Santo e estende-se continuamente em todas as direções incluindo a faixa costeira e interiores em Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte, além de ocorrências isoladas citadas nos estados do Pará, Maranhão, Goiás, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e recentemente, Rio Grande do Sul (FERNANDEZ et al, 2001).

B. straminea, em face do exame da concha e dos órgãos genitais masculinos e femininos, apresenta concha contendo um diâmetro aproximado de 1 cm e um giro corporal volumoso diferindo neste aspecto de *B. peregrina* e *B. intermédia*. O enrugamento muito acentuado na parede vaginal demonstra-se característico também da espécie (CORRÊA et al, 1970).

A espécie *B. tenagophila* apresenta distribuição limitada ao sul da Bahia. Esta espécie se mostra incapaz de resistir à dessecação do ambiente e por isso prolifera apenas em corpos de água permanentes (PAZ, 1997).

A correta identificação dos moluscos do gênero *Biomphalaria* é de suma relevância para os estudos da esquistossomose (PARAENSE, 1975; PEPE, 2006). A

alta variabilidade morfológica e genética, o tamanho reduzido de algumas espécies e a similaridade interespecífica dificulta a identificação correta das diferentes espécies desse molusco (VIDIGAL et al, 2000; PEPE, 2006). A identificação dessas espécies são baseados na comparação das características morfológicas e órgãos do sistema reprodutivo masculino e feminino (CALDEIRA et al, 2000). A identificação específica no gênero *Biomphalaria* baseia-se, fundamentalmente, na morfologia comparativa entre as conchas, na anatomia dos órgãos do aparelho genital e na presença da crista renal (TIBIRIÇÁ et al, 2009).

Atualmente técnicas de biologia molecular são utilizadas como ferramentas adicionais a identificação morfológica dessas espécies. Dentre as técnicas mais usadas destacam-se a PCR e a RFLP, que por serem altamente sensíveis, específicas e reprodutíveis, permitem distinguir as diferentes espécies através de perfis específicos e distintos (CALDEIRA et al, 1998; VIDIGAL et al, 2000; VARGAS et al, 2003; CALDEIRA et al., 2004).

A manutenção de conhecimentos permanentemente atualizados sobre a distribuição geográfica das espécies dos moluscos transmissores de *S. mansoni* é fundamental para a eficiência dos programas de controle e vigilância epidemiológica da esquistossomose (TELES, 2005).

O conhecimento sobre a epidemiologia dos parasitos e suas interações com os hospedeiros em um determinado ambiente são os requerimentos mais importantes no estabelecimento de um sistema de controle efetivo (MOTA et al, 2003). Estes dados tornam-se vitais para o melhor conhecimento dos focos naturais das zoonoses, estabelecendo assim os fatores de risco existentes em determinados ecossistemas e a circulação de agentes entre os animais silvestres (SILVA, 2004).

2.2.4. DETECÇÃO DE MOLUSCOS DO GÊNERO *Biomphalaria* INFECTADOS POR *Schistosoma mansoni*

Estudos sobre a susceptibilidade dos hospedeiros intermediários à infecção por diferentes cepas de *S. mansoni* têm sido descritos (COIMBRA JR, 1981; CALDEIRA et al, 2004).

O grau de infecção das diversas espécies de *Biomphalaria sp.* como possíveis hospedeiros intermediários do *S. mansoni* varia de acordo com diferentes fatores, tais como: idade, variação genética, sistema imunológico e áreas geográficas que apresentam os trematódeos (CARVALHO et al, 2009).

Segundo CALDEIRA e colaboradores (2004) a verificação da taxa de infecção de moluscos do gênero *Biomphalaria* com o parasito *S. mansoni* é realizado após exposição dos moluscos por duas horas sob foco de luz. MAGALHÃES e DIAS (1973) utilizaram o mesmo procedimento utilizando lâmpadas incandescentes de 60 wats. Para SOUZA (1986), após a exposição à luz a procura por cercárias deve ser realizada em lupa. Esta técnica também foi utilizada por COIMBRA JR. (1981) nos experimentos de infecção de moluscos da espécie *B. tenagophila* e *B. glabata*. FERNANDES e colaboradores (2001), examinaram moluscos individualmente em estereomicroscópio após a exposição à luz de lâmpadas incandescentes (60W), durante 6 horas, para detectar infecção por *S. mansoni*.

2.3. A FASCIULOSE HEPÁTICA

Dentre as enfermidades que afetam os animais domésticos de importância econômica, a fasciolose hepática é uma das parasitoses mais relevantes e frequentes (MULLER, et al, 1998; PEREZ et al, 1998). Embora a fasciolose resulte em uma doença subclínica, no rebanho bovino, as consequências econômicas são significativas devido principalmente às perdas associadas com a condenação de fígados, perda de peso, letargia, interferência na fertilidade, redução da produção de carne e leite, altos custos com tratamentos antihelmínticos (fasciolicidas) e mortes dos animais (SERRA-FREIRE, 1995; GORMAN et al, 1998; ECHEVARRIA, 2004; LIMA et al, 2009).

A *Fasciola hepatica*, agente causal da fasciolose, é um parasito de ductos biliares de bovinos e ovinos, podendo parasitar também equídeos, caprinos, bubalinos, dentre outros mamíferos. Recentemente, a fasciolose vem sendo considerada uma zoonose emergente pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2002), revelando-se como um sério problema de saúde pública (CORAL et al, 2007).

Na ovinocultura esta doença parasitária pode causar morbidade e mortalidade, com índices que podem chegar a 20%, sendo estes animais considerados altamente sensíveis às infecções (FARIA et al, 2008; MATTOS et al, 2009; OLIVEIRA e SPÓSITO FILHA, 2009). MATTOS e colaboradores (2009) descreveram as perdas econômicas no Brasil referentes à produção de lã, carne, leite, condenação de fígados e morte dos ovinos que representam em torno de 15 a 20%.

Esta doença pode ocorrer de forma aguda, geralmente quando o animal ingere grande quantidade de metacercárias em pouco tempo (OLIVEIRA e SPÓSITO FILHA, 2009). Em geral, as formas jovens migram pelo parênquima hepático, destruindo as células e causando focos hemorrágicos difusos, podendo provocar a morte súbita dos hospedeiros devido a um quadro de hemorragia intensa no fígado (OLIVEIRA e SPÓSITO FILHA, 2009). Segundo ANTUNES (2005), esta fase raramente se manifesta em bovinos, ocasionalmente em terneiros (bezerros), devido ao desenvolvimento de imunidade adquirida, gerada pelas repetidas infecções crônicas.

Na fase crônica, considerada a mais importante em bovinos, o fígado apresenta-se pálido, com lobo ventral atrofiado, calcificação das lesões tissulares, fibrose e acentuado engrossamento da parede dos ductos biliares (hiperplasia) de maneira que estes se tornam visíveis na superfície do órgão (OLIVEIRA e SPÓSITO FILHA, 2009). Nas infecções maciças, com anemia e hipoalbuminemia, os terneiros podem apresentar edema submandibular. A migração de fascíolas para o pulmão, formando abscessos, é relativamente comum em bovinos (ANTUNES, 2005). Esta fase é responsável pela manutenção das infestações dos pastos e transmissão da parasitose (OLIVEIRA e SPÓSITO FILHA, 2009).

Contaminações secundárias agudas podem ocorrer em ovinos e bovinos, associadas normalmente a lesão causada pela migração de formas jovens no tecido hepático que proporciona um ambiente favorável à esporulação da bactéria *Clostridium novyi*, tipo B, no fígado (ECHEVARRIA, 2004). GOMES e colaboradores (2002) evidenciaram os prejuízos ocorrentes nos hospedeiros vertebrados, inclusive o homem, que acarretam em consequência as infecções subclínicas.

Para o diagnóstico desta importante parasitose várias técnicas têm sido utilizadas, sendo necessário considerar os sintomas apresentados, uma vez que na fase inicial da infecção ainda não existem ovos nas fezes (OLIVEIRA e SPÓSITO FILHA, 2009). Dentre elas destacam-se as técnicas diretas e indiretas. A técnica direta mais simples, é a observação do parasito adulto nos ductos biliares dos animais, mediante necrópsia e inspeção pós morte (OLIVEIRA e SPÓSITO FILHA, 2009). Nas demais técnicas diretas, o objetivo é evidenciar a presença do ovo do parasito, exame coproparasitológico (GORMAN et al, 1998).

A detecção de ovos nas fezes, trata-se do diagnóstico de rotina principalmente utilizado nas regiões onde não há disponibilidade da realização de técnicas mais avançadas. Sua sensibilidade é de até 30% para animais que apresentam pequeno número de ovos nas fezes ou para aqueles em que o período pré-patente da infecção ainda não se instalou (MATTOS et al, 2009).

Recentemente testes imunológicos e sorológicos que detectam anticorpos e antígenos circulantes têm sido empregados como uma alternativa para o diagnóstico da fasciolose hepática (GORMAN et al, 1998; MATTOS et al, 2009; PAZ-SILVA et al, 2004). O método de ELISA tem sido testado permitindo obter com sucesso, um diagnóstico precoce da infecção (GORMAN et al, 1998).

De acordo com OLIVEIRA e SPÓSITO FILHA (2009), resultados favoráveis no controle dessa parasitose referem-se à atuação no ambiente visando o controle do hospedeiro intermediário – *Lymnaea* e nos animais parasitados – *F. hepatica*. A limitação da população de moluscos pode ser feita por meio da modificação do seu habitat isto é, diminuindo-se as áreas alagadas das pastagens, com o uso de drenagem, assim como a utilização de predadores naturais, com a criação de aves aquáticas. Já para os animais parasitados, o uso de fasciolicidas reduz o grau de infestação por metacercárias das pastagens.

2.3.1. EPIDEMIOLOGIA DA FASCIULOSE HEPÁTICA

A fasciolose refere-se a uma doença parasitária (FARIA et al, 2008) causada por duas espécies de trematódeos: *Fasciola hepatica* e *Fasciola gigantica* (MATOS et al, 2009), os quais são capazes de limitar a criação de diversas espécies de animais domésticos de interesse zootécnico, além de acometer o homem como

hospedeiro ocasional (BARROS, 2002). Estima-se que cerca de 2,4 milhões de pessoas já estejam infectadas (RUBEL et al, 2005) e que aproximadamente 180 milhões de pessoas apresentam risco de infecção no mundo (CORAL et al, 2007). O prognóstico é dificultado, considerando tratar-se de doença de notificação não compulsória pela Vigilância Epidemiológica, não apresentando protocolos específicos de sintomatologia (RUBEL et al, 2005) e a epidemiologia é influenciada conforme tipo de pastejo realizado pelos animais (OLIVEIRA e SPÓSITO FILHA, 2009), cuja prevalência apesar de elevada em áreas que apresentam criações de ruminantes (QUEIROZ et al, 2002), revelam que tais zonas cuja enfermidade constitui um problema veterinário relevante não coincidem com aquelas em que áreas consideradas endêmicas a fasciolose humana (CORAL et al., 2007).

Segundo OLIVEIRA e SPÓSITO FILHA (2009), o trematódeo *F. hepatica*, conhecido popularmente como baratinha do fígado ou saguapé, é um verme achatado, de corpo foliáceo e digenético, necessitando de um hospedeiro intermediário para completar seu desenvolvimento (LIMA et al, 2009). Atualmente, quase por unanimidade em todas as regiões endêmicas, as espécies do gênero *Lymnaea* são aceitas como hospedeiro intermediário de *F. hepatica* (BARROS et al, 2002).

O primeiro registro de *F. hepatica* aconteceu no século IX, com a ocorrência de “doença do fígado” em ovinos, no Tratado de Saúde Animal do Mundo Árabe. Posteriormente, em 1739, Jehan de Brie (1379) in Taylor (1965), relacionou lesões no fígado a presença de *F. hepatica*, classificando as lesões como “podridão do fígado” em ovinos. Em meados do século XVII, Francisco Redi, descreveu a primeira ilustração da forma adulta do parasito no fígado de um bovino (MENDES, 2006).

LEUCKART (1882) na Alemanha descreveu o ciclo biológico da *F. hepatica*, sendo, portanto, o primeiro trematódeo a ter o ciclo biológico descrito. Logo, THOMAS (1883), na Inglaterra, citou a participação de *Lymnaea truncatula* como o hospedeiro intermediário da *F. hepatica*, e descrevendo suas formas larvais. Em 1914, foi descrito a descoberta da fonte de infecção por meio da ingestão de metacercárias e a migração das mesmas até o parênquima hepático.

Devido a condições climáticas no Chile, a *Fasciola hepatica*, se apresenta em todo o território, apresentando elevada frequência em bovinos, sendo a zoonose de

maior prevalência notificada pelos matadouros, com prevalência total de 30,1% durante o período de 1989 a 1995 (GORMAN et al, 1998). Casos humanos de fasciolose tem sido notificados no México, Cuba, Costa Rica, Porto Rico, Uruguai, Argentina, Chile, Peru e Venezuela (SOUZA et al, 2002).

No Brasil, a primeira citação foi realizada no Estado do Rio de Janeiro, na região Sudeste (PILE et al, 2001), por Lutz, em 1921, pelo achado ocasional de fígados de bovinos no município de Três Rios (MENDES, 2006). No período de 1946 a 1947, Ribeiro, relatou uma incidência de 2,93 a 3,40 % compreendendo entre carcaças e vísceras de bovinos condenados nos estados de São Paulo, Mato Grosso, Goiás e Zona do Triângulo Mineiro (MENDES, 2006). Em 1965, Correia avaliou em 7,99 % o índice de infecção de bovinos abatidos em matadouro no estado do Rio Grande do Sul (MENDES, 2006). A partir de 1967, existência de fasciolose bovina e humana no Vale do Paraíba foram assinaladas (UETA, 1979). Na mesma região FRANÇA, em 1969, relatou o parasito em 10,1% dos bovinos inspecionados no Matadouro Municipal de Taubaté (MENDES, 2006), sendo autóctones do Vale do Paraíba 8 dos 24 casos humanos assinalados até o ano de 1979 no Brasil (UETA, 1979). No mesmo período, segundo HONER, a maior área enzoontica do país localizava-se na região Sul, com relevância na região Centro Sul do Vale do Paraíba (MENDES, 2006).

Em Santa Catarina, entre 1980 e 1981, foram realizados exames de fezes em 770 bovinos com aptidão leiteira, nas regiões que compreendem o Vale do Itajaí e o Litoral Catarinense (BOTELHO, 2002). UENO e colaboradores (1982), em Santa Vitória do Palmar, no Rio Grande do Sul, avaliaram a importância econômica da fasciolose na exploração pecuária, revelando várias áreas endêmicas próximas as regiões de fronteira do Sul do estado.

Tradicionalmente, a fasciolose tem sido diagnosticada nas espécies bovina, caprina, ovina e equina nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, contudo, outras áreas de ocorrência têm sido relatadas, sendo que nesses relatos, observa-se o baixo índice de registros da infecção por *Fasciola hepatica* em búfalos no País, e a falta de registro no Estado do Rio de Janeiro (PILE et al, 2001).

Segundo SERRA-FREIRE (1995), nos estados da região Sul e Sudeste do Brasil, com exceção do Espírito Santo, tem sido notificada a incidência da fasciolose

bovina (TOSTES et al, 2004), principalmente em sua forma crônica (SERRA-FREIRE, 1995). Até os dias atuais a doença já foi registrada nas regiões Centro-Oeste, Nordeste e Sul (PILE et al, 2001), sendo que a maior frequência de casos tem sido registrada na região Sul, entretanto, durante os últimos anos, no Vale de Paraíba, região Sudeste, o número de registros em animais aumentou e houve menção de casos humanos no Estado do Rio de Janeiro (PILE, et al, 2001). De acordo com SERRA-FREIRE (1999), a *F. hepatica* está presente em quatro das cinco regiões geográficas brasileiras, distribuindo-se seguramente em oito estados do Brasil (Figura 3). Segundo o autor, a região Sul apresentou o maior coeficiente de ocorrência da fasciolose, sendo que no Rio Grande do Sul o parasitismo aconteceu em 23,87% dos municípios, cujo município de Santa Vitória do Palmar (RS) apresentou 25 a 100% de mortes de ovinos e, também, os mais altos índices de fígados em frigoríficos, ou seja, 50% para bovinos e 7% para ovinos (MÜLLER, 1998). No estado de Santa Catarina o parasitismo aconteceu em 43,69% dos municípios (QUEIROZ, 2005), cujos estudos realizados no Vale do Rio dos Bugres, Planalto Catarinense, constataram uma prevalência de 49,1% no rebanho bovino daquela localidade (BOTELHO, 2002). No estado do Paraná o parasitismo acometeu 36,77% dos municípios, e, relatos evidenciam a presença da doença também em bubalinos, no litoral do Paraná – Brasil (QUEIROZ, 2005).

Estados brasileiros tais como Mato Grosso do Sul, Bahia, São Paulo e Paraná tem revelado notificações de casos de fasciolose em humanos (SOUZA et al, 2002).

O estado de São Paulo detém o maior número de ocorrências da região Sudeste, com 22,45% dos municípios acometidos com a doença (MULLER, 1999). A região do Vale do Itajaí e do Litoral Norte apresentaram prevalência de 46,7%, e, a região que engloba o Litoral Centro foi de 39,4%, enquanto que no Litoral Sul a prevalência foi de 48,3%(BOTELHO, 2002).



Figura 3: Mapa de regiões endêmicas para fasciolose hepática no Brasil. Modificado de: www.ibge.gov.br.

2.3.2. CICLO DE VIDA DA *Fasciola hepatica*

A fasciolíase é uma zoonose causada pelo trematódeo parasito de herbívoros *Fasciola hepatica*, e que acomete principalmente o fígado, a vesícula biliar e as vias biliares de ovinos, bovinos, caprinos, suínos, alguns animais silvestres e ocasionalmente, o homem. (PILE *et al.*, 2001; BARROS, 2002). Trata-se do primeiro trematódeo a ter o ciclo biológico descrito na Alemanha a partir dos estudos de Leuckart (1882), em que citou a participação do hospedeiro intermediário *Lymnaea truncatula* (MENDES, 2006).

O ciclo evolutivo da *F. hepatica* é considerado indireto (RUBEL *et al*, 2005), por requerer dois hospedeiros, o hospedeiro vertebrado, geralmente ruminantes (SOUZA *et al*, 2002) e ocasionalmente o homem (BARROS, 2002), e o hospedeiro invertebrado, moluscos pulmonatas do gênero *Lymnaea* (SOUZA *et al*, 2002). O ciclo de vida do parasito (Figura 4) inicia-se quando os hospedeiros vertebrados se infectam ao ingerir o pasto contaminado com metacercárias (TOSTES *et al*, 2004). No caso do homem, hospedeiro vertebrado ocasional, a transmissão ocorre pela água ou pela ingestão de vegetais contaminados com os ovos liberados nas fezes do hospedeiro invertebrado (OLIVEIRA e SPÓSITO FILHA, 2009).

A metacercária, fase infectante para os hospedeiros definitivos, encontra-se nas pastagens e em águas contaminadas. Sua sobrevivência no ambiente está relacionada diretamente a fatores climáticos, especialmente a temperatura e a umidade, cuja maior longevidade infectiva ocorre na faixa de 10 a 15 °C (MULLER et al, 1999).

As metacercárias, cujo ciclo pode ser mantido em condições laboratoriais, podem ser observadas nas superfícies das conchas de moluscos (GOMES et al, 2002). Segundo FARINAZZO e colaboradores (2001), nos hospedeiros vertebrados, essas formas infectantes encistam no intestino delgado, migram através da parede intestinal, caem na cavidade abdominal e penetram no parênquima hepático, atingindo os ductos biliares, onde se fixam e se desenvolvem até atingirem a maturidade para se reproduzirem.

Os ovos produzidos pelo parasito nos dutos biliares acumulam-se na vesícula biliar, e através do ducto colédoco passam para os intestinos delgado e grosso (OLIVEIRA e SPÓSITO FILHA, 2009). Os ovos não embrionados liberados pelas *Fasciolas sp.* adultas são eliminados juntamente com as fezes (TOSTES et al, 2004). De acordo com MENTZ e colaboradores (2004), os ovos eliminados com as fezes do hospedeiro definitivo geralmente são considerados viáveis e apresentam grande capacidade de resistência e evolução, mesmo sob condições desfavoráveis.

Segundo GOMES e colaboradores (2002), a possibilidade da distribuição da parasitose ser mais ampla do que a registrada, deve ocorrer considerando a epidemiologia da enfermidade depender de fatores como os biológicos e climáticos além do manejo inadequado dos animais que ao permanecerem sem tratamento, contribuem para a contaminação do pasto, através da eliminação de ovos nas fezes.

Na água ou em áreas úmidas ou alagadiças com temperatura acima de 10⁰C, os ovos passam por um desenvolvimento embrionário, até sofrerem eclosão (FARINAZZO et al, 2001). O período necessário para eclosão depende das condições ambientais. Na época do verão ocorre em aproximadamente 21 dias; no inverno, esse período pode ser superior a 90 dias (OLIVEIRA e SPÓSITO FILHA, 2009). Ao eclodirem, são liberados as formas larvais de miracídios (FARINAZZO et al., 2001). Estes nadam ativamente atraídos por quimiotaxia dos caramujos, em especial as espécies *L. viatrix* e *L. columella*, seus hospedeiros invertebrados

(FARINAZZO *et al.*, 2001). No molusco, o miracídio sofre alterações, transformando-se em esporocisto e, posteriormente, em rédias (FARINAZZO *et al.*, 2001; TOSTES *et al.*, 2004; OLIVEIRA e SPÓSITO FILHA, 2009). Estes últimos se desenvolvem e originam as cercárias (OLIVEIRA e SPÓSITO FILHA, 2009).

As cercárias ao serem liberadas pelo molusco na água nadam até um substrato, geralmente plantas ou pedras, se encistam, perdem a cauda e dão origem as metacercárias, formas infectantes para o hospedeiro vertebrado (TOSTES *et al.*, 2004). As metacercárias são consideradas as formas de resistência ao ambiente, podendo sobreviver por diversas semanas, sendo sua viabilidade maior em temperaturas abaixo de 20°C (OLIVEIRA e SPÓSITO FILHA, 2009).

O ciclo no molusco pode durar de dois a três meses, conforme as condições ambientais (OLIVEIRA e SPÓSITO FILHA, 2009).

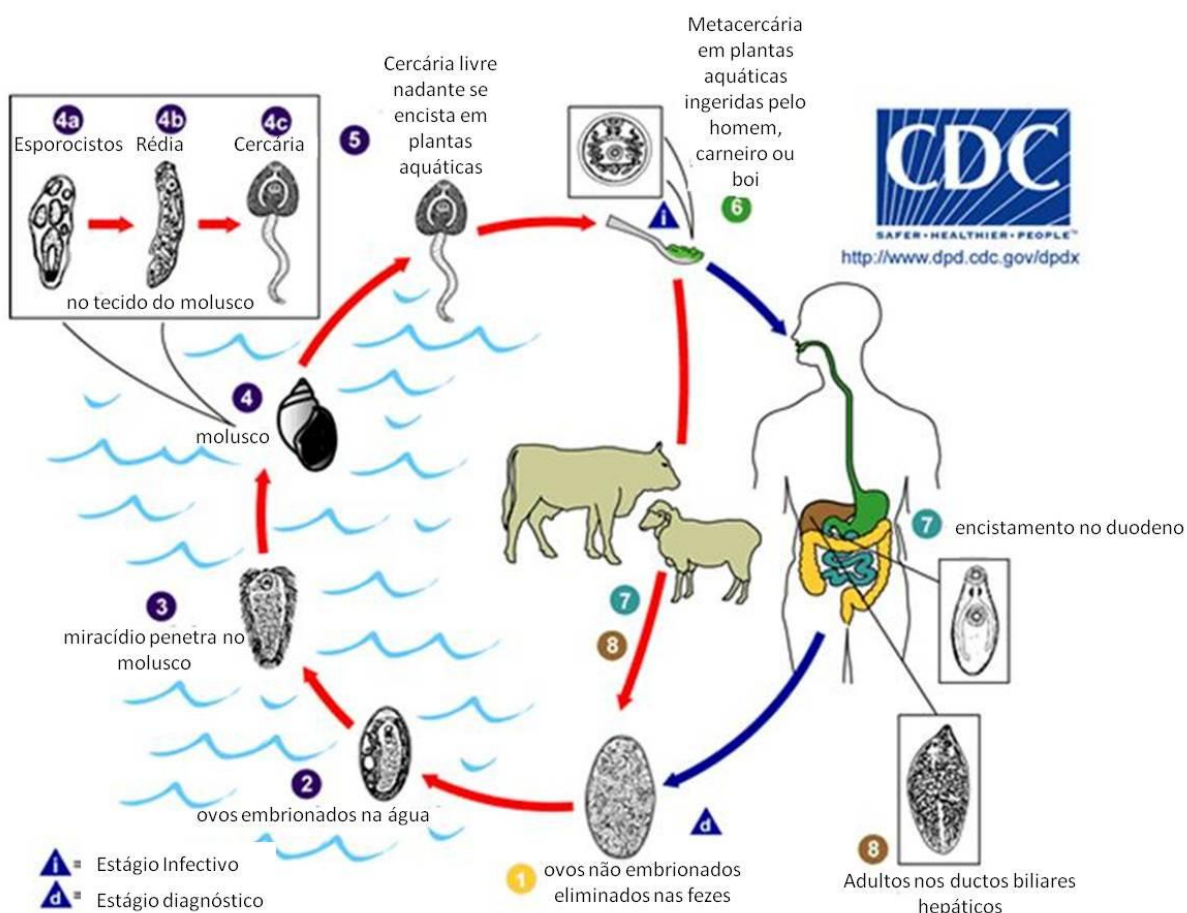


Figura 4: Ciclo biológico da *Fasciola hepatica*. Adaptado de: www.dpd.cdc.gov

Características biológicas, climáticas e topográficas regionais são considerados fatores influentes para a manutenção do ciclo biológico da *F. hepatica* (TOSTES et al, 2004). A presença do hospedeiro definitivo eliminando ovos e contaminando as pastagens constituem um dos importantes aspectos envolvidos na epidemiologia e controle da fasciolose (MENDES, 2006).

2.3.3. BIOLOGIA E IDENTIFICAÇÃO DE MOLUSCOS DO GÊNERO *Lymnaea*

Indivíduos do gênero *Lymnaea* são moluscos pulmonados, hospedeiros intermediários da *F. hepatica* (PEREZ et al, 1998; VELÁSQUEZ, 2006). Existem mais de vinte espécies de moluscos do gênero, os quais transmitem os parasitos *F. hepatica* e *F. gigantica* responsáveis pela doença fasciolose em ruminantes e humanos (SOUZA et al, 2002), e *Paramphistomum* ssp., responsável pela parasitose paramphistomoses em ruminantes (VELÁSQUEZ, 2006). A presença destes moluscos é, portanto, considerada imprescindível para o estabelecimento dos focos da fasciolose (OLIVEIRA e SPÓSITO FILHA, 2009).

A espécie *Lymnaea columella* tem sido largamente estudada por vários autores (UETA, 1980; MULLER et al, 1998; PILE et al, 2001; ARAÚJO et al, 2002; BARROS et al, 2002; KLEIMAN et al, 2004; PEREZ et al, 2007), não somente em relação ao seu comportamento frente à infecção pelos trematódeos, mas também sob o aspecto estritamente biológico, principalmente referente a sua reprodução (UETA, 1976). Em condições favoráveis, produzem cerca de 3000 ovos ao mês, devido a sua capacidade de auto-reprodução (UETA, 1976; OLIVEIRA e SPÓSITO FILHA, 2009). Sua população aumenta durante as estações chuvosas e diminui com temperaturas baixas nos períodos de seca, apesar de sobreviverem na lama seca durante vários meses e resistirem também às baixas temperaturas (OLIVEIRA e SPÓSITO FILHA, 2009). O reconhecimento de coleções hídricas a fim de verificar a presença de hospedeiros intermediários são relevantes para caracterizar uma área propícia ao desenvolvimento (LIMA et al, 2009)

Membros da família Lymnaeidae estão presentes no ecossistema aquático no mundo (VELÁSQUEZ, 2006). Na Argentina, a relevância epidemiológica e a distribuição geográfica desses indivíduos não são precisamente conhecidas,

existindo grande incerteza em relação à taxonomia das espécies que compõem esse gênero (KLEIMAN et al, 2004). PARAENSE (2004) realizou importantes estudos referentes às características taxonômicas de *Lymnaea spp.* na América do Sul, descrevendo as características morfológicas reprodutivas destes moluscos.

O interesse pelo estudo dos moluscos das espécies *Lymnaea* no Brasil vem crescendo desde a descrição de casos humanos autóctones de fasciolose (MULLER et al, 1998). No país, foram registradas quatro espécies pertencentes ao gênero *Lymnaea*, sendo: *L. columella* (GONZALES et al. 1974); *L. viatrix* (REY, 1957); *L. cubensis* (REZENDE et al. 1973) e *L. rupestris* (PARAENSE, 1982). Dentre estas, somente as três primeiras foram caracterizadas como hospedeiras intermediárias em diferentes localidades do país (GOMES et al, 2002; OLIVEIRA e SPÓSITO FILHA, 2009). A espécie *L. columella* é considerada o hospedeiro intermediário da fasciolose hepática de maior interesse epidemiológico no Brasil, devido a sua ampla distribuição (ARAÚJO et al, 2002; PREPELITCHI et al, 2003).

Moluscos das espécies *L. columella* e *L. viatrix* podem ser encontrados em córregos de águas límpidas e de correnteza fraca. *L. viatrix* também é encontrado em solos argilosos, em canais de irrigação com pouca água e em lodos e brejos. A espécie *L. cubensis* foi observado em margens de riachos de águas límpidas e correnteza forte (OLIVEIRA e SPÓSITO FILHA, 2009).

No país, os estudos sobre a biologia dos caramujos transmissores da fasciolose são escassos e bastante recentes, pois até 1964 não havia registro de trabalhos referentes aos aspectos biológicos destes moluscos (UETA, 1976). Rezende (1973), no Rio de Janeiro e Gonzales (1974), no Rio Grande do Sul descreveram espécies de *L. columella* naturalmente infectados. Mas, somente em 1975 foram publicados estudos sobre a biologia destes moluscos (UETA, 1976). UENO e colaboradores (1982) descreveram a presença de duas espécies de Limnédeos, atuantes como hospedeiro intermediário de *F. hepatica*, *L. viatrix* e *L. columella*, ambas distribuídas na região sul do país. Em 1998, ABILIO e WATANABE registraram a ocorrência de *L. columella* (Gastropoda: Lymnaeidae) associado a macrófitas aquáticas no estado da Paraíba. Moluscos do gênero *Lymnaea* também foram encontrados nos estados de Rio Grande do Sul, Santa

Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Amazonas e Bahia (SOUZA et al, 2002).

No Estado do Rio de Janeiro foram registradas a ocorrência de *L. columella* nos municípios de Niterói, Itaguaí, Magé, São Gonçalo, Paraíba do Sul, Três Rios, Barra do Piraí, Teresópolis, Petrópolis, Cachoeira de Macacu e Campos dos Goytacazes (MULLER, 1998; GOMES et al, 2000). Observou-se também no estado a presença de *L. viatrix*, porém em menor proporção se comparada a alguns municípios da Região Sul do país, principalmente os do Rio Grande do Sul (ECHEVARRIA, 1985; MATTOS e UENO, 1985).

A identificação de *L. columella*, no município de Campos dos Goytacazes, bem como, sua diferenciação em relação a outras espécies, foram realizadas por GOMES e colaboradores (2002) de acordo com suas características de morfologia externa e interna.

Nos últimos anos, diversas técnicas de Biologia Molecular estão sendo utilizadas para a identificação de *Lymnaea sp.*, o que tem permitido estabelecer o perfil genético característico de cada espécie (PAZ-SILVA et al, 2004; VARGAS et al, 2003).

2.3.4. DETECÇÃO DE MOLUSCOS INFECTADOS POR *Fasciola hepatica*

O poder de infecção do trematódeo é alto, pois um único miracídio, ao penetrar no hospedeiro intermediário, resulta em mais de 4.000 cercárias (OLIVEIRA e SPÓSITO FILHA, 2009).

Uma técnica direta comumente utilizada para a análise da infecção de moluscos infectados por *F. hepatica* é a exposição dos mesmos à luz artificial (lâmpada de 60 W), seguido da análise para a presença de cercária.

Outra técnica direta, útil para a detecção de moluscos do gênero *Lymnaea* infectados pelo parasito *F. hepatica*, é o método de esmagamento dos moluscos entre duas lâminas e posterior exame da amostra para verificação da presença de formas evolutivas de *F. hepatica*.

Segundo UETA (1980), na maioria das vezes, somente constata-se a presença de infecção por *F. hepatica* ao examinar moluscos da espécie *L. columella*

mortas ou moribundas. No entanto, estudos experimentais, a nível molecular, têm sido realizados nos Estados Unidos, visando o diagnóstico de *F. hepatica* nos hospedeiros intermediários invertebrados (VARGAS et al, 2003).

2.4. PLANTAS COM POTENCIAL AÇÃO MOLUSCICIDA

Programas de controle de endemias delimitam-se ao tratamento quimioterápico dos indivíduos doentes, ação comprovadamente paliativa e repetitiva, além de tóxicas e poluidoras (BARBOSA et al, 1996). Atualmente, programas de controle integrado de moluscos fazem-se essenciais, sendo recomendados como medidas estratégicas preventivas associadas ao tratamento de pessoas doentes e à melhoria das condições socioeconômicas e de saneamento básico (PILE et al, 2001).

Várias formas de controle de moluscos têm sido utilizadas, contudo, sem resultados satisfatórios (ARAÚJO et al, 2002). Dentre estas, destaca-se a radiação ionizante. Moluscos, peixes e anfíbios, nos primeiros estágios do desenvolvimento embrionário são sensíveis a este tipo de radiação, sendo as modificações radioinduzidas (MELO, 1998). Outra forma de controle da população de moluscos é uso de moluscidas, substâncias utilizadas para o extermínio dos moluscos, especialmente caramujos que vivem e se alimentam de folhagens em estufas, jardins, lavouras e campos. Esta estratégia tem sido utilizada para controlar caramujos vetores de parasitos importantes em saúde pública (SILVA et al, 2008).

Substâncias moluscidas são consideradas um fator crucial para o controle da esquistossomose. No momento, apenas a substância sintética niclosamida (N-(2'-cloro-4'nitrofenil) - 5 clorosalicilanilida), é recomendada pela Organização das Nações Unidas (ONU) como potencial moluscida (GRAEFF et al, 2001; SILVA et al, 2008). No entanto, em certos países, o uso desta substância em versão sintética tem causado problemas de toxicidade, contaminação do meio ambiente e resistência dos caramujos (*Biomphalaria glabrata*) transmissores da esquistossomose (GASPAROTTO JR. et al, 2005).

O fármaco niclosamida (Figura 5) trata-se de um princípio ativo especialmente desenvolvido para controle dos moluscos gastropodos de água doce que atuam

como hóspedes intermediários de parasitos causadores da esquistossomose, fasciolose e outras afecções causados por trematodos (GRAEFF et al, 2001). Este fármaco também é indicado para uso humano no controle da teníase (*Taenia solium* e *saginata*) e da himenolepíase (*Hymenolepis nana* e *H. diminuta*), causando inibição da fosforilação oxidativa das mitocôndrias dos cestódios (GRAEFF et al., 2001).

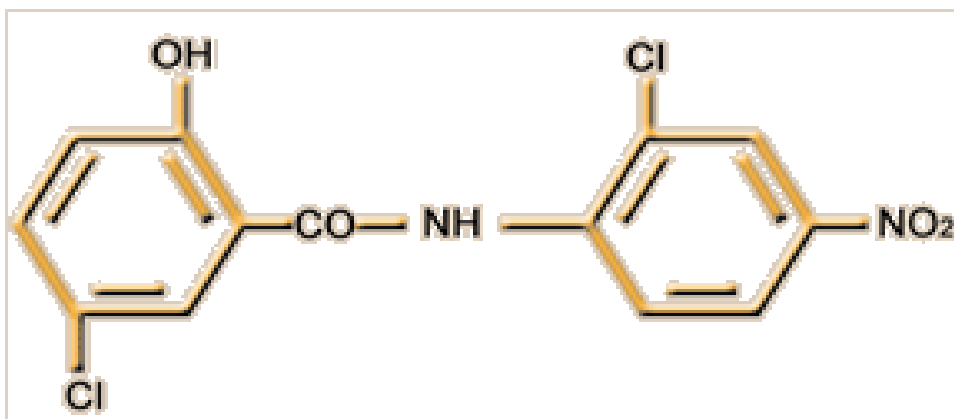


Figura 5: Estrutura química do fármaco Niclosamida. Adaptado de Gasparotto Jr et al., 2005.

Drogas moluscidas acarretam prejuízos ao ambiente, e a recolonização das áreas afetadas tornam o processo de aplicação dispendioso e operacionalmente difícil de ser realizado (PILE et al, 2001).

A preocupação com o desenvolvimento de resistência dos caramujos a essas substâncias, a baixa seletividade que apresentam (podem atuar sobre outras espécies da fauna) e a procura por substâncias facilmente biodegradáveis têm aumentado o interesse pelo uso de moluscidas de origem vegetal (SILVA et al., 2008).

A busca de novos fármacos que possam auxiliar no controle da fasciolose hepática e da esquistossomose, bem como um estudo a respeito de suas ações no parasito são de extrema relevância para a pecuária e para aos serviços de Vigilância Epidemiológica, tendo em vista os prejuízos econômicos causados por essas parasitoses (CASTRO et al, 2004).

O uso de plantas medicinais sob a forma de extratos fitoterápicos com atividade moluscida podem representar uma alternativa econômica, além de evitar a poluição do meio ambiente, por serem biodegradáveis (PILE et al, 2001;

GASPAROTTO JR. et al, 2005). Do ponto de vista terapêutico, a fitoterapia e a homeopatia são consideradas as bases no controle de doenças de produção animal ecológica, sendo vantajosa pelo melhor retorno econômico, pelo menor desembolso com a aquisição de produtos químicos industrializados, e por não eliminar resíduos tóxicos contaminantes (ARAÚJO FILHO, 2000).

Atualmente, é elevada a busca por fontes naturais de medicamentos, frente aos efeitos colaterais causados pelos fármacos sintéticos. Em muitos casos, os produtos de origem vegetal são a única fonte de medicamentos, especialmente nos lugares isolados e distantes. Com este fenômeno, diversas plantas têm sido descritas com propriedades antihelmínticas (FALBO et al, 2008).

O uso de plantas medicinais e compostos monoterpênicos no controle parasitário tem se mostrado bastante promissor (BRAUM e BARROS, 2008). Aproximadamente 25% das drogas prescritas mundialmente provêm de plantas (ARAÚJO et al, 2009). Das 252 drogas consideradas básicas e essenciais, 11% são exclusivamente originárias de plantas; como exemplo a digoxina, potencial agente cardiotônico, extraído da *Digitalis* ssp. da família Scrophulariaceae. Ressalta-se que os óleos essenciais, extraídos de plantas estão sujeitos a variação do clima, altitude, solo, luminosidade; essas variações influenciam diretamente nos produtos do metabolismo secundário dos mesmos (FALCÃO et al, 2009).

É crescente mundialmente o número de pesquisas com plantas que apresenta atividade contra vírus, bactérias, fungos e parasitos. Na medicina veterinária onde as pesquisas por plantas medicinais objetivam a redução de problemas sanitários no controle de várias doenças que comprometem a produtividade dos animais (ARAÚJO et al, 2009).

Apesar de o Brasil possuir aproximadamente 55.000 espécies de plantas e ser considerado o País com a maior biodiversidade no mundo, são poucas as informações conhecidas sobre a composição química de 99,6% das plantas da flora brasileira (AGNOLIN, 2009).

O uso de extratos de plantas como inseticidas no controle do inseto *Plutella xylostella* (traça - das - crucíferas) tem sido uma alternativa promissora (DEQUECH, 2009). Diversos resultados de estudos tem sido produtivos referentes ao emprego de metabólitos secundários de plantas quando submetidos a teste de atividade

inseticida e larvicida. Vários estudos comprovam os efeitos inseticidas e antihelmínticos de plantas da família Meliaceae. Entre os diversos compostos testados citam-se a repelência induzida pelo óleo essencial da citronela (OLIVO et al, 2008). Estudos atuais com óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Cymbopogon citrates* sugerem sua aplicação como larvicida contra *A. aegypti* (CAVALCANTI et al, 2004).

Segundo SILVA e colaboradores (2008), os programas de controle que incluem o uso de moluscidas estão voltados para o combate a moluscos transmissores da esquistossomose e da fasciolose. Os insucessos verificados nas aplicações de moluscidas sugerem não somente a necessidade de se encontrar novos compostos ativos, como de ampliar o conhecimento sobre os caramujos, destacando parâmetros relevantes como a forma e o momento mais adequado para a aplicação das drogas são relevantes (PINOTTI, 1960).

A OMS (1983) tem reconhecido algumas plantas com atividade moluscida, sendo Cuba, um dos principais países que apresentam estudos do gênero, entretanto, a evolução desses estudos são danosos e, portanto escassos (PEREZ et al, 1998).

De acordo com SILVA e colaboradores (2008), o interesse pelo uso destes compostos no controle da esquistossomose data da década de 1930, quando foi sugerido o plantio de *Balanites aegyptiaca* L. (Balanitaceae), uma árvore típica do deserto africano, nas margens dos focos de transmissão, no Sudão. Seus frutos, ao caírem das árvores, inibiam a densidade populacional de caramujos (ARCHIBALD, 1933). No Brasil, os primeiros estudos sobre moluscidas de origem vegetal demonstraram a atividade de extratos aquosos de caules de *Serjania* ssp. (cipó-timbó) e de frutos de *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae) (saboneteira, sabão) em *Biomphalaria glabrata*, cuja ação foi atribuída às saponinas presentes nestes vegetais.

A *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (Coroa-de-Cristo) trata-se de uma das plantas promissoras para uso como moluscidas fitoterápicos. Segundo PILE e colaboradores (2001), quando aplicada em baixa concentração sob a forma de aspersão, registrou-se a diminuição da taxa de infecção de animais traçadores, indicando a possibilidade do uso do látex em programas de controles estratégicos.

Outros autores registraram a ação letal do látex da planta, em baixas concentrações, sobre as espécies *B. glabrata*, *B. tenagophila*, *B. straminea*, *B. pfeifferi*, *L. columella* e *Bulinus sp.*, como variação mínima do efeito moluscicida, além de apresentar pouca ou nenhuma toxidez nas concentrações utilizadas contra diversos animais (VASCONCELOS et al, 1986; MENDES et al, 1992; VASCONCELOS, 1996; VASCONCELOS, 2000; PILE et al, 2001). A utilização de resina de pina (*Colofonia*) também apresentou resultados satisfatórios como potenciais moluscicidas quando testados com *B. havanensis* (JIMÉNEZ, et al, 2008).

Considerando a importância da descoberta de novas substâncias que apresentem potencial atividade moluscicida, várias espécies vegetais regionais devem ser testadas. Indica-se a utilização de extratos de folhas, galhos ou frutos como matéria prima para obtenção de substâncias a serem empregadas no controle de moluscos.

2.4.1. *Melia azedarach var azedarach*

Atualmente diversos testes e ensaios tem sido realizados utilizando extratos fitoterápicos de *Melia azedarach var azedarach*, planta natural do sul da Ásia, popularmente conhecida como cinamomo, santa-bárbara ou paraíso (PROCÓPIO et al, 2003; FALBO et al, 2008).

O cinamomo trata-se de uma árvore com altura superior a 10 metros, com folhas alternadas, longo-pecioladas, glabras, bipinadas, com folíolos ovais ou lanceolados e agudos (ARAÚJO et al, 2009). Também mencionado como um lírio, apresenta flores pequenas, em grandes panículas eretas e multifloras, cheirosas, lilases na cor e de anteras amarelas; cresce rapidamente, quer por semente ou por estaca (ARAÚJO et al, 2009). Atualmente, é amplamente distribuída em quase todos os países tropicais e subtropicais (FALBO et al, 2008). No Brasil, possui um cultivo amplo, principalmente na região Sul do país (DANTAS et al, 2000).

O Cinamomo apresenta como principais indicações a utilização dos extratos como drogas inseticidas e como antihelmínticos (PROCÓPIO et al, 2003). Extratos de folhas e sementes desta planta contêm cerca de quatro compostos ativos: azadiractina, salanina, meliantrol e nimbim (FALBO et al, 2008); portanto,

apresentam elevada concentração de limonóides, tetranotriter-penóides, com um triterpeno precursor (ARAÚJO et al, 2009).

SEFFRIN e colaboradores (2008) relataram à ação de extratos aquosos de frutos verdes, pecíolos com caule, folíolos e de casca de cinamomo concentrados a 10% (p/v) no controle de insetos-pragas adultos da espécie *Diabrotica speciosa*, pertencentes à família *Chrysomelidae*, em cultivos de pepino (*Cucumis sativus*) e de feijão-de-vagem (*Phaseolus vulgaris*). Em laboratório, DEQUECH e colaboradores (2009), avaliaram o efeito de extratos desta planta na oviposição e na mortalidade de *Plutella xylostella* (L.) (*Lepidoptera*: Yponomeutidae), conhecida como a traça-das-crucíferas demonstrando potencial ação do cinamomo sobre uma das principais espécies de inseto-praga de plantas da família *Brassicaceae*.

Para o controle do bicudo do algodoeiro, *Anthonomus grandis*, e de gafanhotos migratórios, *Schistocerca cancellata*, comprovou-se o potencial dos extratos do cinamomo, demonstrando resultados satisfatórios de mortalidade ou repelência a partir da utilização de extratos de folhas e frutos frescos ou secos. Entretanto, o extrato de frutos de cinamomo foi apresentado como tóxico para animais de sangue quente, apesar do produto extraído das folhas demonstrar uma toxicidade bastante reduzida (ROEL, 2001).

Testes *in vitro* realizados com extratos ricos em taninos ou com taninos puros de *Melia azedarach* têm identificado diversas atividades biológicas dessa classe de substâncias, tais como ação bactericida e fungicida, antiviral, moluscicida, inibição de enzimas e ação antitumoral (ARAÚJO et al, 2009). Bioensaios em laboratórios utilizando o extrato alcoólico de *Melia azedarach* L. foram realizados sobre o principal vetor da Fasciolose em Cuba, *L. cubensis*, revelando um grande potencial moluscicida desta planta (PEREZ et al, 1998).

2.4.2. *Azadirachta indica* Azedarach Juss

A *Azadirachta indica* Azedarach Juss, popularmente conhecida como Nim, trata-se de uma planta pertencente à família Meliaceae, e que apresenta compostos limonóides em sua composição química (DEQUECH et al, 2008; PINTO e LANÇAS, 2010). Originária do continente Asiático (DEQUECH et al, 2008), é encontrada na

Índia e em regiões tropicais e subtropicais do mundo, como Austrália, África, Ilhas do Pacífico e Américas (PINTO e LANÇAS, 2010). Seu uso tem sido difundido mundialmente no controle de inseto (DEQUECH et al, 2008). Na Índia, o Nim é considerado uma planta medicinal, usada há séculos, com propriedades bactericidas, fungicidas, nematocidas, antiinflamatória, antihiperlipidêmica, repelente de insetos, devido aos diversos terpenóides distribuídos nas partes da planta (PINTO e LANÇAS, 2010).

SALLES e RECH (1999) demonstraram em experimentos laboratoriais, que extratos de Nim e Cinamomo apresentam ação inseticida, causando uma redução da ovoposição, do desenvolvimento larval e pupal de *Anastrepha fraterculus* (mosca-das-frutas). Extratos aquosos de Nim nas concentrações 2,5 e 5% são promissores para o controle de *Mononychellus tanajoa* (ácaro verde da mandioca), apresentando ação letal na fase embrionária, nos estágios imaturos ativos e nas fêmeas (GONÇALVES et al, 2001).

A ação de extratos aquosos de frutos verdes, pecíolos com caule, folíolos e da casca da planta a 10% (produto comercial de óleo de Nim emulsionado) foi avaliada no controle de insetos-pragas adultos da espécie *Diabrotica speciosa* em cultivos de pepino (*Cucumis sativus*) e de feijão-de-vagem (*Phaseolus vulgaris*) em estufa plástica, demonstrando-se promissores no controle destes insetos (SEFFRIN et al, 2008). De acordo com DEQUECH e colaboradores (2008), extratos aquosos de ramos e folhas de Nim, concentrados a 10% são eficientes no controle de larvas de *M. ochroloma*, ocasionando mortalidade superior a 80% a partir do terceiro dia de exposição dos insetos aos ramos e do quarto dia de exposição usando-se extratos das folhas. Extratos aquosos oriundos das folhas novas de Nim demonstraram-se como potenciais drogas atuantes no controle de lagartos da espécie *S. frugiperda*.

Segundo SARDINHA e colaboradores (2006), o Nim, se utilizado de forma preventiva, pode ser uma alternativa ao controle de insetos adultos de *Callosobruchus maculatus Fabricius* (caruncho-do-feijão), sendo letal o uso de suas folhas secas sob a forma de pó na concentração de 0,15 gramas.

FERREIRA e colaboradores (2009), mediante análises *in vitro*, observaram que na concentração de 4% o extrato de *Azadirachta* inibe o crescimento micelial de

alguns fungos, sendo portanto, um extrato potencial para o controle da fusariose de maracujazeiro amarelo.

Até o momento, na literatura pesquisada não foram encontradas a aplicação do Nim como possível droga moluscicida.

2.4.3. *Cymbopogon winterianus* Jowitt

Cymbopogon winterianus Jowitt, popularmente conhecido como citronela, tem sido objeto de estudos por diversos pesquisadores para diferentes fins (ROCHA et al, 2000b; BRAUM e BARROS, 2008; OLIVO et al, 2008; AGNOLIN, 2009). Considerada uma planta perene, pertencente à família *Poaceae*, altamente cultivada em regiões tropicais devido a suas propriedades aromáticas. No Brasil, seu óleo apresenta um relevante espaço no mercado de produtos naturais (ROCHA et al, 2000b).

Além de ser solúvel em solvente orgânico, o óleo essencial da citronela também pode ser extraído por álcool. Nesse processo, no entanto, outras substâncias presentes na folha, como clorofila e pigmentos, também são retiradas, diferentemente da extração a vapor na qual se obtém óleo puro (AGNOLIN, 2009).

BRAUM e BARROS (2008) avaliaram o efeito larvicida *in vitro* sobre nematóides do gênero *Contraecum* de dois compostos monoterpênicos: o geraniol e o citronela, descrevendo o potencial larvicida da citronela. Estas substâncias também são muito utilizadas pelas indústrias de cosméticos, perfumarias e medicamentos, além de serem utilizados na produção de velas e incensos com efeitos repelentes a algumas espécies de mosquitos do gênero *Aedes*, *Coquillettidia pertubans* e *Anopheles quadrimaculatus* (ROCHA et al, 2000b; AGNOLIN, 2009).

OLIVO e colaboradores (2008) comprovaram a eficácia do óleo de citronela como inseticida natural. Já FALCÃO e colaboradores (2009), comprovaram a ação antimicrobiana do óleo essencial de citronela frente aos microorganismos: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger wild*.

Para ALBUQUERQUE MELO e colaboradores (2009), o óleo de citronela demonstrou potencial ação fungicida, na inibição do crescimento de *Colletotrichum gossypii* var. *Cephaqlosporoides*, prevenindo a ramulose no algodoeiro.

AGNOLIN (2009) avaliou *in vivo* diferentes formulações de óleo de citronela em ectoparasitas de bovinos, por meio de banho fitoterápico. As soluções constituídas por 3 e 4% de óleo de citronela apresentaram ação parcial no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (carrapatos), de dípteros das espécies *Stomoxys calcitrans* (mosca-dos-estábulo) e *Musca Domestica* (mosca doméstica), não havendo evidências da influência dessas formulações sobre a *Haematobia irritans* (mosca-dos-chifres).

Até o momento, na literatura pesquisada, não foram encontrados dados referentes à ação moluscicida de extratos de citronela frente a moluscos.

CAPÍTULO 1

Inquérito epidemiológico, levantamento malacológico e análise da infecção por *Schistosoma mansoni* em moluscos do gênero *Biomphalaria*, no distrito de Anutiba - Alegre, ES, Brasil.

3. Cap. 1 – Inquérito epidemiológico, levantamento malacológico e análise da infecção por *Schistosoma mansoni* em moluscos do gênero *Biomphalaria*, no distrito de Anutiba - Alegre, ES, Brasil.

3.1. RESUMO

Considerada uma doença que afeta cerca de 250 milhões de indivíduos distribuídos em 76 países, a esquistossomose apresenta como hospedeiro intermediário moluscos do gênero *Biomphalaria*. Foi aplicado um questionário, denominado de Sm1, no distrito de Anutiba do município de Alegre – ES, destinado a caracterizar o perfil epidemiológico da região, seguido da realização do levantamento malacológico e análise da taxa de infecção dos moluscos coletados pelo parasita *Schistosoma mansoni*, no córrego boqueirão e em seus três principais afluentes. Foi verificada ausência de saneamento básico próximo aos pontos analisados, e, as análises morfológicas e fisiológicas evidenciaram que os moluscos coletados são da espécie *Biomphalaria tenagophila*, cuja taxa de infecção demonstrou-se elevada em determinados pontos. Resultados demonstraram a presença de condições ideais para a manutenção do ciclo evolutivo do parasito *S. mansoni*, que é dependente de água contaminada com fezes de indivíduos infectados e a presença dos moluscos do gênero *Biomphalaria*, hospedeiros invertebrados para o parasito.

Palavras - chave: Esquistossomose; levantamento malacológico; *Biomphalaria tenagophila*; *Schistosoma mansoni*.

Epidemiological investigation, malacological assessment and analysis of mollusk infection by *Schistosoma mansoni* in snails of the gender *Biomphalaria* in the District of Anutiba - Alegre, ES, Brazil.

3.2. ABSTRACT

Considered a disease that affects approximately 250 million people in 76 countries, schistosomiasis presents as intermediate hosts snails of the gender *Biomphalaria* sp. A survey (SM1) was performed in the town of Anutiba in Alegre county - ES in order to define the epidemiological profile of the region. The survey was followed by malacological assessment and analysis of the rate of infection of the collected mollusks by the parasite *Schistosoma mansoni*, in the main water stream called "boqueirão" and its three main tributaries. The absence of sanitation was verified close to the analyzed points. The morphological and physiological analysis showed that the collected snails were from the specie *Biomphalaria tenagophila*, whose infection rate has shown to be high at certain points. Results demonstrate the presence of ideal conditions for maintaining the life cycle of the parasite *S. mansoni*, which is dependent of contaminated water with feces from infected individuals and the presence of molluscs of the gender *Biomphalaria*, which is the invertebrate host for the parasite.

Keywords: Schistosomiasis; Malacological assessment; *Biomphalaria tenagophila*; *Schistosoma mansoni*.

3.3. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a esquistossomose é uma doença que afeta cerca de 250 milhões de indivíduos, distribuídos em 76 países, na África, Ásia e América. Entre os indivíduos infectados, 10% apresentam quadro severo da doença e mais de 100 milhões de pessoas apresentam alguma manifestação clínica, o que a caracteriza como um sério problema de saúde pública, sendo considerada a segunda endemia parasitária do mundo, depois da malária (ENGELS et al., 2002).

Atualmente existem seis espécies de *Schistosoma* que podem infectar humanos: *S. mansoni*, *S. hematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum*, *S. mekongi*, e *S. malayensis* (EL-SAYED et al., 2004). Entre elas, somente o *S. mansoni* é encontrado no continente Americano (ALMEIDA-MACHADO, 1997).

O ciclo biológico deste parasito apresenta um complexo plano de desenvolvimento envolvendo a troca de um ambiente aquático para outro no hospedeiro intermediário invertebrado, culminando com um habitat no hospedeiro vertebrado definitivo (WILSON, 1980; ROLLINSON e SOUTHGATE, 1987; JANNOTTI-PASSOS et al., 2006).

Entre os caramujos do gênero *Biomphalaria*, dez espécies e uma subespécie são encontradas no Brasil (COURA e AMARAL, 2004). Algumas espécies são amplamente distribuídas, enquanto outras são restritas a regiões específicas (CAMPOS, 2001; COURA e AMARAL, 2004; BORDA e REA, 2007). Dentre esses moluscos, três são de importância médica, por serem hospedeiros intermediários para *S. mansoni*: *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) e *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) (SOUZA et al., 1998). Duas outras espécies, *Biomphalaria amazonica* (Paraense, 1966) e *Biomphalaria peregrina* (Orbigny, 1835), também encontradas no Brasil, podem ser infectadas com *S. mansoni* apenas em condições experimentais (CORRÊA e PARAENSE, 1971; PARAENSE, 1973).

O Brasil é considerado um foco endêmico para a esquistossomose mansônica, com cerca de 7 milhões de indivíduos infectados e aproximadamente 35 milhões expostos ao risco, sendo que sua prevalência a caracteriza como um

problema de saúde pública (KATZ E PEIXOTO, 2000). Sua distribuição ocorre em vasta área do território nacional, nos estados do Maranhão, Pará, Piauí, Goiás, Espírito Santo, Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Pernambuco e norte do Paraná (COURA e AMARAL, 2004). Focos da doença foram descritos em Santa Catarina e no Rio Grande do Sul (MASSARA, et al, 2008).

O registro de ocorrência, bem como a correta identificação de planorbídeos do gênero *Biomphalaria* é de grande relevância para a saúde pública, uma vez que o grupo reúne as espécies de caramujos que atuam como hospedeiros intermediários para *S. mansoni* (CORREA et al, 1970; PARAENSE, 1975).

A identificação específica do gênero *Biomphalaria* é baseada na morfologia comparativa entre as conchas, na anatomia dos órgãos do aparelho genital e na presença da crista renal (TIBIRIÇÁ et al, 2009). No entanto, a alta variabilidade morfológica e genética, o tamanho reduzido de algumas espécies e a similaridade interespecífica dificultam a identificação correta das diferentes espécies (CALDEIRA et al, 1998). Estudos moleculares vêm sendo utilizados como ferramenta adicional à identificação morfológica e, metodologias já estabelecidas, principalmente associadas à técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e suas variações, permitem distinguir as diferentes espécies através de perfis específicos e distintos (VIDIGAL et al, 2000).

De acordo com a Secretaria Municipal de Saúde do município de Alegre, localizado na Mesorregião Sul do Estado do Espírito Santo, inúmeros moradores do distrito de Anutiba, reclamaram da presença de moluscos, principalmente as margens do córrego Lambarzinho e seus principais afluentes, o córrego do Óleo e córrego das Pedras. Ainda neste distrito, dados parasitológicos fornecidos por esta mesma Secretaria Municipal da Saúde indicam uma alta incidência de esquistossomose mansônica na população.

Motivados por esses dados e por saber que o dimensionamento das áreas colonizadas por moluscos de importância médica, bem como os detalhes inerentes à sua biogeografia são bastante úteis para o controle e vigilância epidemiológica o objetivo desse estudo foi realizar o inquérito epidemiológico, o levantamento malacológico e a análise da infecção por *Schistosoma mansoni* em moluscos do gênero *Biomphalaria*, no distrito de Anutiba - Alegre, ES, Brasil.

3.4. Material e Métodos

Levantamento malacológico

O levantamento malacológico foi realizado no distrito de Anutiba no córrego Boqueirão e nos seus três principais afluentes, o córrego do Óleo, das Pedras e Capoeirinha, entre os meses de julho e dezembro de 2008. Todo o levantamento de campo foi realizado pelo mesmo grupo. A aplicação do questionário, denominado de Sm1, foi realizada com o auxílio de agentes comunitários de saúde, após treinamento prévio.

Com relação aos pontos de coleta, foi avaliada a presença ou não de moluscos com concha discoidal em espiral plana (planispiral), características do gênero *Biomphalaria*, onde foi adotada como parâmetro de alta incidência, a presença de mais de 50 caramujos por ponto; média incidência, entre 10 e 50 caramujos por ponto; baixa incidência, a presença de menos de 10 caramujos por ponto. Todos os caramujos *Biomphalaria sp* acima de 2 mm de diâmetro foram coletados e classificados.

Classificação morfológica dos planorbídeos

A classificação foi realizada de acordo com metodologia descrita por PARAENSE (1975), tendo como parâmetros as características morfológicas das conchas, do tubo renal e anatomia dos órgãos reprodutivos. Todos os moluscos foram avaliados tendo como parâmetro inicial as características da concha. Após essa análise, os moluscos que se enquadraram como do gênero *Biomphalaria* foram separados, sendo um molusco de cada ponto de coleta selecionado aleatoriamente e submetido a classificação. As análises foram realizadas no laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Parasitos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo.

Análise da infecção dos moluscos pelo parasito *Schistosoma mansoni*

Para a análise de infecção, todos os moluscos classificados como hospedeiros intermediários para a esquistossomose foram colocados individualmente em recipiente de vidro com capacidade aproximada de 25 mL, contendo 3 mL de água dechlorada a 28°C e expostos por 40-60 minutos a luz artificial (lâmpada de 60 Watts) a uma distância de 15-20 cm. Em seguida, o material foi avaliado em microscópio estereoscópio para a pesquisa da forma larvária infectante, cercária. Posteriormente, fez-se o cálculo da taxa de infecção (Taxa de infecção= número de moluscos contaminados x 100/ total de moluscos examinados).

Análise dos fatores favoráveis ao desenvolvimento do ciclo da esquistossomose mansônica em Anutiba

O nível de fezes humanas foi determinado de acordo com o odor do local, visualização de material excretado na água e informações obtidas a respeito do destino do esgoto das residências. A presença de peixes foi avaliada por observação direta e com o auxílio de moradores que residem próximo aos locais de coleta. A densidade da vegetação nos pontos de coleta foi avaliada em quatro categorias: ausência, baixa, média e alta densidade da vegetação. Esses parâmetros tiveram como base estudos realizados por KLOOS e colaboradores (2004).

Com relação ao questionário *Sm1*, as perguntas efetuadas aos indivíduos que residem nas localidades pesquisadas.

3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Levantamento malacológico do gênero *Biomphalaria* em córregos do distrito de Anutiba/ES.

Foram realizadas avaliações em 84 pontos no córrego boqueirão e seus afluentes: córrego do óleo, das pedras e capoeirinha, no distrito de Anutiba, pertencente ao município de Alegre, situado na região sul do estado do Espírito Santo (Figura 1). Ao longo do percurso, foram evidenciados que 19,05 % dos pontos apresentaram moluscos com concha discoidal em espiral plana e lados aproximadamente paralelos, características do gênero *Biomphalaria* (TIBIRIÇÁ et al, 2009). De acordo com PARAENSE (1975), as análises morfológicas e fisiológicas, evidenciaram que os moluscos coletados são da espécie *B. tenagophila* (Orbigny, 1835), caracterizada como uma das espécies de molusco hospedeiro intermediário para *S. mansoni* (CORRÊA, 1979) conforme demonstrado na Figura 1. Todos os pontos positivos foram georreferenciados.

Estudo realizado por ARAÚJO e colaboradores (2007), demonstrou que a utilização de recursos de análise espacial é uma importante ferramenta para a avaliação de áreas malacológicas, permitindo o levantamento de novas informações e a reestruturação de eventos, o que sugere a importância do uso do geoprocessamento na área da saúde.

Entre os períodos de 1980 a 2003 ocorreram 14.463 óbitos por esquistossomose no Brasil, sendo registrada uma redução não uniforme de 62,9% do coeficiente de mortalidade. Tal redução pode estar relacionada à eficácia das medidas de controle da doença no país, sobretudo às estratégias de controle da morbidade. No entanto, o surgimento de novas áreas com potencial para transmissão da doença continua em expansão (FERREIRA E SILVA, 2007),

SILVA e colaboradores (1994) relataram uma alta frequência de *B. tenagophila* no Lago Soledade (MG), sendo que 0,2% apresentaram-se positivos para *S. mansoni*. COURA-FILHO e colaboradores (1995) em estudo realizado em Ravena (MG) constataram a presença de moluscos *B. glabrata* e *B. tenagophila*, em respectivamente, 42,40% e 57,59% dos pontos de coleta, sendo que os espécimes

de *B. glabrata* apresentaram taxas variáveis de infecção por *S. mansoni*. Na região de Taquaraçu de Minas (MG) COURA-FILHO (1998) relatou a presença das três principais espécies hospedeiras de *S. mansoni*, sendo que somente *B. glabrata* apresentava-se infectada. Em levantamento malacológico realizado na região de Mariana (MG), 1,18% dos planorbídeos *B. glabrata* coletados estavam infectados com *S. mansoni* (SOUZA et al., 2006). Em Jaboticatubas (MG), foi observado a presença de *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*, destacando a importância dos moluscos na manutenção do ciclo de vida do parasito com *S. mansoni*. MASSARA et al. (2004). Em determinado trabalho, VASCONCELOS e colaboradores (2009) identificaram na região de Sabará (MG) moluscos pertencentes as três principais espécies hospedeiras, sendo que a maioria, 49,52%, pertence à espécie *B. tenagophila*.

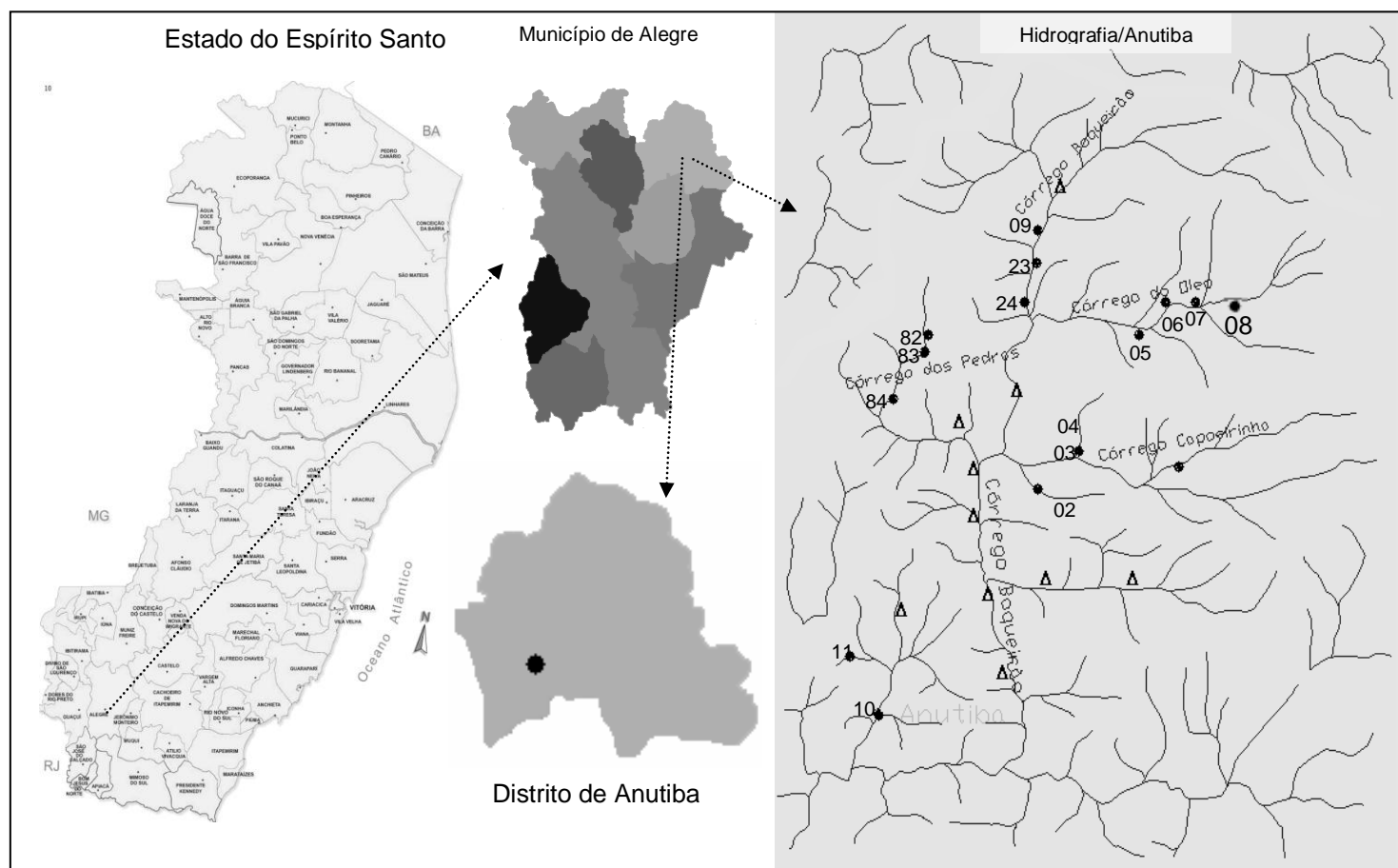


Figura 1. Marcação dos pontos de coleta de moluscos *Biomphalaria tenagophila* no Córrego Boqueirão e afluentes no distrito de Anutiba, município de Alegre/ES. (●): pontos onde foram encontrados os moluscos da espécie *B. tenagophila*; (Δ): pontos onde não foram encontrados os moluscos da espécie *B. tenagophila*.

No estado do Espírito Santo, entre os anos de 1999-2002, o número de casos de Esquistossomose variou de 3388 a 5292 (SESA, 2004). Dos 78 municípios do estado, 20 são considerados endêmicos para esquistossomose, 19 municípios são considerados focais ou vulneráveis e 39 indenes (RODRIGUES e LOUZADA, 2003). Apesar de o estudo ter categorizado o município de Alegre como área focal, o distrito de Anutiba faz divisa com o município de Muniz Freire, região considerada endêmica, sendo ambos banhados pela bacia hidrográfica do rio Itapemirim.

Trabalho realizado por CORREA e colaboradores (1970), evidenciou que a dispersão de planorbídeos pode ser ocasionada por regimes de enchentes e a migração de peixes. Assim, acredita-se que essa dinâmica dos cursos d'água da região, e a presença de peixes, avaliada durante os trabalhos de campo, possa contribuir para a dispersão dos moluscos, o que pode acarretar a contaminação da população que vive próxima às margens desses córregos, e mesmo as que esporadicamente utilizam esses locais para banho e pesca, uma vez que foram encontrados *B. tenagophila* contaminados por *S. mansoni*.

Nas localidades avaliadas deste estudo pode-se observar que a ocorrência de moluscos da espécie *B. tenagophila* também poderiam estar associadas à presença de vegetação aquática e semi-aquática, como pôde ser observado na Tabela 1.

Neste trabalho de um total de 784 caramujos coletados, 61 se mostraram contaminados com o parasito, caracterizando uma TI de aproximadamente 7,7% (Tabela 2). Segundo ARAUJO e colaboradores (2007), a existência de moluscos positivos para infecção com *S. mansoni* consiste em um fator de alto risco para esquistossomose.

COIMBRA JR (1981), descreveu a presença de *B. tenagophila* em valas de irrigação, e associou a ocorrência deste molusco à presença de vegetação aquática e semi-aquática, composta por gramíneas e ciperáceas.

Tabela 1. Distribuição de moluscos *Biomphalaria tenagophila* no Córrego Boqueirão e afluentes no distrito de Anutiba, município de Alegre/ES e características ambientais.

Localidade	Pontos	Coordenadas Geográficas		Moluscos		Meio Ambiente		
		S	O	<i>B. tenagophila</i>	Nº de moluscos coletados	Dejetos humanos	Presença de peixes	Densidade da vegetação
Capoeirinha	01	20° 35' 31.2"	41° 26' 17.1"	+++++	85	+++	++	+++++
	02	20° 35' 37.7"	41° 26' 15.4"	+++	38	+++	+++	+++++
	03	20° 35' 22.9"	41° 26' 05.8"	+++	28	+++	+++	+++++
	04	20° 35' 22.1"	41° 26' 05.5"	+++++	96	+++	+++	+++++
Óleo	05	20° 34' 45.0"	41° 25' 40.7"	+++	32	+	+	+++
	06	20° 34' 44.8"	41° 25' 40.44"	+++	28	+	+	+++
	07	20° 34' 44.6"	41° 25' 32.7"	+++++	72	+	++	+++
	08	20° 34' 52.5"	41° 25' 48.3"	+++++	67	+	+	+++
Boqueirão	09	20° 34' 27.1"	41° 26' 16.9"	+++	32	+++++	++	+++++
	10	20° 36' 26.5"	41° 27' 03.7"	+	8	+++++	+	+++
	11	20° 36' 11.4"	41° 27' 10.6"	+	6	+++++	+	+++
	23	20° 34' 34.8"	41° 26' 17.5"	+++	39	+++++	+++	+++
Pedras	24	20° 34' 45.1"	41° 26' 20.1"	+++	45	+++++	+++	+++
	82	20° 34' 51.8"	41° 26' 47.8"	+++++	97	-	+++	+++
	83	20° 34' 56.0"	41° 26' 48.3"	+++++	52	-	+++	++
	84	20° 34' 57.3"	41° 26' 49.2"	+++++	59	+	+++	++

Moluscos: +++++ = Alta incidência (> 50 caramujos) // +++ = Média incidência (10 =Caramujos =50)

// + = Baixa Incidência (< 10 Caramujos) // = –Ausência.

Meio Ambiente: +++++ = Alta incidência //+++ = Média incidência// + = Baixa Incidência // = –Ausência. **Anutiba:** Distrito do município de Alegre/ES. **S:** latitude sul; **O:** latitude oeste.

Tabela 2: Moluscos da espécie *B. tenagophila* sadios e infectados com *S. mansoni*, coletados no distrito de Anutiba, município de Alegre/ES.

Anutiba (córregos)	Total de moluscos coletados	Moluscos sadios	Moluscos infectados**	Taxa de Infecção por localidade (%)
Capoeirinha	247	230	17	6,8
Óleo	199	173	26	13
Boqueirão	130	127	3	2,3
Pedras	208	193	15	7,2
Total	784	723	61	7,7

** Taxa média de infecção

Caramujos vetores, habitando locais desprovidos de saneamento podem ser infectados por parasitos presentes em dejetos lançados, formando focos peridomiciliares de esquistossomose (ARAUJO et al, 2007). Nesse estudo foi constatada a presença de dejetos humanos ao longo de todo o percurso avaliado. De acordo com o questionário *Sm1* (Figura 2), esse fato, muito provavelmente, está relacionado a ausência de esgoto tratado ou fossa séptica nas residências das famílias locais, uma vez que, das 38 famílias entrevistadas, 29 (77%) declararam não possuir os mesmos, sendo que 20 (54%) costumam fazer uso dos cursos de água para lazer.

Assim, esses três dados obtidos, estão em concordância com a resposta da pergunta de número 3 (Tabela 3), onde, 18 das famílias entrevistadas (49%), declararam que pelo menos um de seus integrantes já foi contaminado pelo parasito.

No Brasil, a espécie *B. tenagophila* é segunda mais importante para a transmissão do parasito *S. mansoni*, (PARAENSE, 1975 ; CORRÊA, 1979), principalmente nas regiões Sul e em parte da região Sudeste (TELES, 2005; VASCONCELOS et al., 2009). Essa espécie demonstra considerável capacidade de sobrevivência em ambientes poluídos (SOUZA et al., 2007), o que certamente é um dos fatores indispensáveis para a preservação dos riscos decorrentes da transmissão ambiental de *S. mansoni*. TELES (1989), assinalou o encontro desses planorbides em uma área onde o nível de poluição foi considerado um dos mais elevados do estado de São Paulo.

A OMS (2002) e outras agências de saúde tem constantemente anunciado a inadequada atenção dirigida à esquistossomose humana. Esta moléstia parasitária continua avançando através de novas áreas endêmicas, impulsionadas por fatores sociais, econômicos e a má organização nos projetos de irrigação e ocupação de terras nos países em desenvolvimento. Dentro deste contexto, dados preliminares da Secretaria Municipal de Saúde de Alegre/ES (dados não apresentados) vêm demonstrando uma alta taxa de incidência desta parasitose na população, o que tem levado a priorização de esforços para o combate e tratamento da doença.

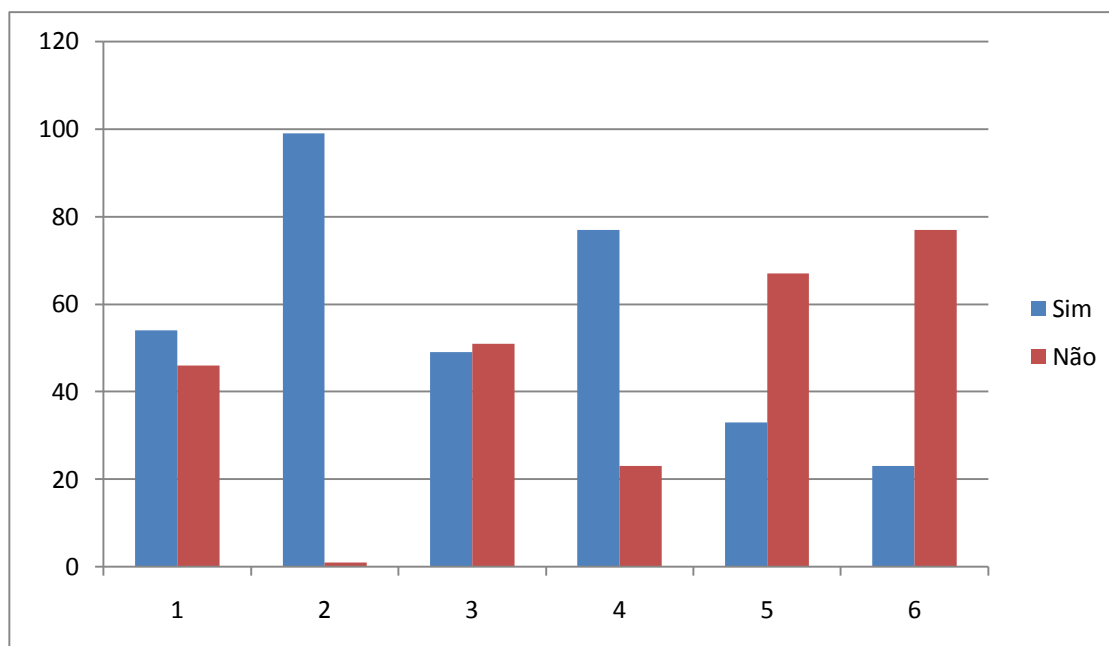


Figura 2. Respostas ao questionário Sm1, referente a comunidade que reside nas margens do Córrego Lambarizinho e afluentes (Córrego do Óleo e Córrego das Pedras) no distrito de Anutiba, município de Alegre/ES. Perguntas: **1.** Alguém de sua família tem costume de nadar em rio, açude, cachoeira, ou outro local; **2.** Já ouviu falar na doença Xistose (*esquistossomose ou barriga d'água ou mal do caramujo*); **3.** Alguém de sua família já teve Xistose; **4.** Você já viu ou ouviu falar de algum córrego, rio, açude, cachoeira, ou outro local onde existam caramujos; **5.** Alguém de sua família trabalha no cultivo de arroz, ou em alguma atividade que tenha contato direto com água; **6.** Sua casa possui: esgoto tratado.

* **Número de entrevistados: 152 pessoas entre 18 e 65 anos**

Em relação à pergunta 06 do questionário, todos os entrevistados declararam não apresentarem esgoto tratado, sendo que 23 % apresentam fossa asséptica em suas residências e os demais não apresentam quaisquer sistema de tratamento do esgoto.

3.6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo demonstram a presença de condições ideais para a manutenção do ciclo evolutivo do parasito *S. mansoni*, dependente de água contaminada com fezes de indivíduos infectados e da presença dos moluscos do gênero *Biomphalaria* infectados para o parasito no Distrito de Anutiba, município de Alegre, Espírito Santo.

3.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, K.C.G.M.; RESENDES, A.P.C.; SOUZA-SANTOS, R.; SILVEIRA JÚNIOR, J.C.; BARBOSA, C.S. Análise espacial dos focos de *Biomphalaria glabrata* e de casos humanos de esquistossomose mansônica em Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil, no ano 2000. **Caderno de Saúde Pública**. v. 23, p. 409-417, 2007.

BORDA, C.E.; REA, M.J.F. *Biomphalaria tenagophila* potencial vector of *Schistosoma mansoni* in the Paraná River basin (Argentina and Paraguay). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 102, p. 191-195, 2007.

CALDEIRA, R.L.; VIDIGAL, T.H.D.A.; PAULINELLI, S.T.; SIMPSON, A.J.G.; CARVALHO, O.S. Molecular identification of similar species of the genus *Biomphalaria* (Mollusca: Planorbidae) determined by a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.93, p. 219-225, 1998.

CAMPOS, Y.R. Comparação das técnicas SSR-PCR ancorado, AP-PCR e Isoenzimas no estudo da variabilidade genética de *Biomphalaria glabrata*. 85f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2001.

COIMBRA JR, C.E.A. Suscetibilidade à infecção pelo *Schistosoma mansoni*, de *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila* do Distrito Federal, Brasil. **Revista de Saúde Pública**. v. 15, In press, 1981.

CORRÊA, R.R.; MURGEL, J.M.T.; PIZA, J.T.; RAMOS, A.S.; DIAS, L.C.S.; MORAIS, L.V.C.; ROSÁRIO, F.F. Dispersão de *Biomphalaria straminea*, hospedeira intermediária do *Schistosoma mansoni*, através da distribuição de peixes. **Revista de Saúde Pública**. v. 4, p. 117-127, 1970.

CORRÊA, L.R.; PARAENSE, W.L. Susceptibility of *Biomphalaria amazonica* to infection with two strains of *Schistosoma mansoni*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**. v.13, p. 387–390, 1971.

CORRÊA, M.C.R. Suscetibilidade de linhagens de *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria glabrata* a duas cepas de *Schistosoma mansoni* (LE — Belo Horizonte, MG e SJ — São José dos Campos, SP). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 21, p. 72-76, 1979.

COURA-FILHO, P.; FARAH, M. W. C.; REZENDE, D. F.; LAMARTINE, S. S.; CARVALHO, O. S.; KATZ, N. Determinantes Ambientais e Sociais da Esquistossomose Mansoni em Ravena, Minas Gerais, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**. v. 11, p. 254-265, 1995.

COURA-FILHO, P. Participação popular no controle da esquistossomose através do Sistema Único de Saúde (SUS), em Taquaraçu de Minas, (Minas Gerais, Brasil), entre 1985-1995: construção de um modelo alternativo. **Caderno de Saúde Pública**. v. 14, p. 111-122, 1998.

COURA, J.R.; AMARAL, R.S. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic áreas. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 99, p. 13-19, 2004.

EL-SAYED, N.M.A.; BARTHOLOMEU, D.; IVENS, A.; JOHNSTON, D.A.; LOVERDE, P.T. Advances in *Schistosoma* genomics. **Trends Parasitology**. v.20, p. 154-157, 2004.

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

FERREIRA, I.L.M.; SILVA, T.P.T. Mortalidade por esquistossomose no Brasil: 1980 - 2003. **Revista de Patologia Tropical**. v. 36, p. 67-74, 2007.

JANNOTTI-PASSOS, L.K.; MAGALHÃES, K.G.; CARVALHO, O.S.; VIDIGAL, T.H.D.A. Multiplex-PCR for both identification of Brazilian *Biomphalaria* species (Gastropoda Planorbidae) and diagnosis of infection by *Schistosoma mansoni* (Trematoda: Schistosomiasis). **Journal of Parasitology**. v. 92, p. 426–429, 2006.

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

KLOOS H.; PASSOS, L.K.J.; LOVERDE, P.; CORREA OLIVEIRA, R.; GAZZINELLI, A. Distribution and *Schistosoma mansoni* infection of *Biomphalaria glabrata* in different habitats in a rural area in the Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil: environmental and epidemiological aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 99, p. 673-681, 2004.

MASSARA, C.L.; PEIXOTO, S.V.; BARROS, H.D.A.S.; CARVALHO, S.; SCHALL, V. Factors associated with schistosomiasis mansoni in a population from the municipality of Jaboticatubas, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 99, p. 127-134, 2004.

MASSARA, C.L.; AMARAL, G.L.; CALDEIRA, R.L.; DRUMMOND, S.C.; ENK, M.J.; CARVALHO, O.S. Esquistossomose em área de ecoturismo do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**. v. 24, 2008.

PARAENSE, W.L. Susceptibility of *Biomphalaria peregrina* from Brazil and Ecuador to two strains of *Schistosoma mansoni*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 15, p. 127-130, 1973.

PARAENSE, W.L. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. **Arquivo Museu Nacional Rio de Janeiro**. v. 55, p. 105-128, 1975.

RODRIGUES, A. L.; LOUZADA, M. C. Boletim Epidemiológico: A Experiência no Controle da Esquistossomose no Estado do Espírito Santo (2000 a 2002). **Secretaria Estadual de Saúde do Espírito Santo**. v. 3, p. 3-4, 2003.

ROLLINSON, D.; SOUTHGATE, V.R. The genus Schistosoma: a taxonomic appraisal. **Academic Press**. p. 1-49, 1987.

SESA - Secretaria Estadual de Saúde do Espírito Santo, 2004. Acessado em www.saude.es.gov.br, em 11 de janeiro de 2010.

SILVA, R.E.; MELO, A.L.; PEREIRA, L.H.; FREDERICO, L.F. Levantamento malacológico da Bacia hidrográfica do lago Soledade, Ouro Branco (Minas Gerais, Brasil). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 36, ed.5, p. 437-444, 1994.

SOUZA, C.P.; LIMA, L.C.; JANNOTTI-PASSOS, L.K.; FERREIRA, S.S.; GUIMARÃES, C.T.; VIEIRA, L.B.F.; JUNIOR, R.M. Moluscos límnicos da microrregião de Belo Horizonte, MG, com ênfase nos vetores de parasitoses. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 31, p. 449-456, 1998.

SOUZA, M. A. A.; SOUZA, L. A.; COELHO-MACHADO, G. L. L.; MELO, A. L. Levantamento malacológico e mapeamento das áreas de risco para transmissão da esquistossomose mansoni no Município de Mariana, Minas Gerais, Brasil. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. v. 5, p. 132-139, 2006.

SOUZA, D.; FALCÃO, A. C. M. G.; GARGIONI, C.; KANAMURA, H. Y.; CIARAVOLO, R. M. C.; EDUARDO, M. B. P. **Vigilância Epidemiológica e Controle da Esquistossomose: Normas e Instruções**. São Paulo, 2007. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br>. Acesso em: 22 abr. 2010.

TELES, H.M.S. Distribuição de *Biomphalaria tenagophila* e *B. occidentalis* no Estado de São Paulo (Brasil). **Revista de Saúde Pública**. v. 23, p. 244-253, 1989.

TELES, H.M.S. Distribuição geográfica das espécies dos caramujos transmissores de *Schistosoma mansoni* no Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, p. 426-432, 2005.

TIBIRIÇÁ, S.H.C.; BESSA, E.C.A.; COIMBRA, E.S.; PINHEIRO, I.O.; EZEQUIEL, O.S. Avaliação biométrica de *Biomphalaria* ssp. (preston , 1910) no município de Juiz de Fora, MG. **Revista de Patologia Tropical**. v.38, p. 52-62, 2009.

VASCONCELOS, C.H.; CARDOSO, P.C.M.; QUIRINO,W.C.; MASSARA, C.L.; AMARAL, G.L.; CORDEIRO, R.; CARVALHO, O.S. Avaliação de medidas de controle da esquistossomose mansoni no Município de Sabará, Minas Gerais, Brasil, 1980-2007. **Caderno de Saúde Pública**. v. 25, n.5, 2009.

VIDIGAL, T.H.D.A.; KISSINGER, J.C.; CALDEIRA, R.L.; PIRES, E.C.R.; MONTEIRO, E.; SIMPSON, A.J.G.; CARVALHO, O.S. Phylogenetic relationships among Brazilian *Biomphalaria* species (Mollusca: Planorbidae) based upon analysis of ribosomal ITS2 sequences. **Parasitology**. v. 121, p. 611-620, 2000.

WILSON, R.A. Introdução à Parasitologia. Tradução: Cláudio Santos Ferreira e Annete Silva Foronda. EPU. Ed. Universidade São Paulo, 1980.

CAPÍTULO 2

Levantamento malacológico e Identificação molecular de moluscos do gênero *Biomphalaria*, hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*, na região Sul do Espírito Santo, Brasil.

4. Cap. 2. Levantamento malacológico e Identificação molecular de moluscos do gênero *Biomphalaria*, hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*, na região Sul do Espírito Santo, Brasil.

4.1. RESUMO

Moluscos das espécies *Biomphalaria glabrata*, *B.tenagophila* e *B.straminea* possuem grande importância médica, por serem hospedeiros intermediários do parasito *Schistosoma mansoni*. Neste estudo foi avaliada a presença dessas espécies em 14 municípios situados na mesorregião Sul do Espírito Santo, pertencentes às Bacias hidrográficas dos rios Itapemirim, Itabapoana e Benevente. Os moluscos coletados foram submetidos a análises morfológicas e moleculares. Para os 14 municípios estudados observou-se que nos pontos de coletas georreferenciados todos os moluscos coletados foram classificados como *Biomphalaria tenagophila*.

Palavras-chave: Carta malacológica; Esquistossomose; *Biomphalaria*.

Malacological assessment and molecular identification of mollusks of the gender *Biomphalaria* sp. intermediary host of *Schistosoma mansoni* in southern Espírito Santo, Brazil.

4.2. ABSTRACT

Mollusks of the species of *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* and *B. straminea* have great medical importance because they are intermediate hosts of the parasite *Schistosoma mansoni*. In this study was evaluated the presence of these species in 14 municipalities located in Espírito Santo Southern South's, belongings on the river catchment Itapemirim, Itabapoana and Benevente. The snails collected were subjected to morphological and molecular analysis. For the 14 cities studied showed that the point of collecting georeferenced all mollusks were classified as *B. tenagophila*.

Keywords: Letter malacological; Schistosomiasis, *Biomphalaria*.

4.3. INTRODUÇÃO

A esquistossomose mansônica foi introduzida em São Paulo, assim como em outros estados do Sudeste e do Sul, devido à migração de indivíduos originários das zonas endêmicas do Nordeste, notadamente da Bahia, Pernambuco, Alagoas e Sergipe, assim como da porção setentrional do estado de Minas Gerais. Esta corrente migratória se intensificou com o surto de industrialização verificado a partir do final da década de 1940, justamente quando a esquistossomose passa a ser reconhecida como problema de saúde pública nos estados de São Paulo, Paraná e Rio de Janeiro (SILVA, 1985). Existem seis espécies de *Schistosoma* que podem infectar o ser humano: *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma hematobium*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma intercalatum*, *Schistosoma mekongi*, e *Schistosoma malayensis*. Porém apenas uma é encontrada no Brasil, o *S. mansoni* (COURA E AMARAL, 2004).

A ocorrência deste parasito está intimamente relacionada a precárias condições sócio-ambientais e apresenta-se com maior prevalência em humanos na região Nordeste (ARAÚJO FILHO, 2000), tendo como área endêmica a região que se estende do Maranhão ao Espírito Santo (COURA e AMARAL, 2004) e o estado de Minas Gerais (SOUZA et al, 1987). Também existem focos em áreas isoladas, no Distrito Federal e nos estados do Pará, Piauí, Goiás, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Além disso, há casos oriundos de áreas endêmicas em quase todo o território nacional, principalmente nos estados que são considerados pontos para a migração como Rondônia (COURA e AMARAL, 2004).

Com relação ao hospedeiro intermediário, dentro do gênero *Biomphalaria*, três espécies são caracterizadas como de importância médica, os moluscos das espécies *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea*, todos encontrados em território brasileiro (CARVALHO et al, 2001). *B. pergerina* e *B. amazonica* são considerados hospedeiros em potencial, podendo ser infectados experimentalmente (CAMPOS, 2001; BORDA e REA, 2007).

O conhecimento sobre a epidemiologia dos parasitos e suas interações com os hospedeiros em um determinado ambiente são os requerimentos mais importantes no estabelecimento de um sistema de controle efetivo (MOTA et al,

2003). A atualização com relação a distribuição geográfica das espécies de moluscos transmissores do parasito *S. mansoni* é de grande importância para a eficiência dos programas de controle e vigilância epidemiológica para a esquistossomose (TELES, 2005).

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a presença de moluscos do gênero *Biomphalaria*, hospedeiros intermediários para a esquistossomose mansônica em municípios pertencente a Mesorregião Sul do Espírito Santo, além de avaliar a porcentagem de caramujos infectados por *S. mansoni*.

4.4. MATERIAL E MÉTODOS

ANÁLISE MALACOLÓGICA

Neste estudo foi investigado a presença de moluscos do gênero *Biomphalaria* em 14 municípios situados na mesorregião Sul do Espírito Santo pertencentes às bacias hidrográficas dos rios Itapemirim, Itabapoana e Benevente. O levantamento malacológico ocorreu entre o período de março de 2007 a novembro de 2009, onde foram avaliados canais hídricos, lagoas, açudes e vales de irrigação. Os trabalhos de campo foram realizados sempre pela mesma equipe de trabalho.

Os trabalhos de campo foram conduzidos para avaliar a presença de moluscos com concha discoidal em espiral plana (planispiral), com giros delimitados pelas suturas, estreitos no centro e alargando-se gradativamente até a abertura da concha (perístoma), características do gênero *Biomphalaria*. Todos os moluscos com as características citadas, maiores de 5 mm de comprimento, foram coletados. Foi realizado o georreferenciamento dos locais de coleta, para cada município, para a confecção de uma carta malacológica da região.

Para a realização da carta malacológica utilizou-se o mapa do estado do Espírito Santo disponibilizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, que foi convertido do formato SHAPE para o formato DWG pelo programa ARCGIS V. 9.2, afim da visualização no software do AUTOCAD 2007. Com o uso do aparelho de GPS os pontos marcados foram obtidos pelo programa MAPSOURCE e exportados no formato DXF para também serem exportados ao programa AUTOCAD 2007. No programa AUTOCAD 2007, os pontos foram sobrepostos sobre o mapa com o mesmo DATUM horizontal, South América '69 (SAD 69).

Com relação aos pontos georreferenciados, foi avaliada a presença de fezes humanas de acordo com o odor do local, visualização de material excretado na água e informações obtidas a respeito do destino do esgoto das residências. A presença de peixes foi avaliada por observação direta e com o auxílio de moradores que residem próximo aos locais. A densidade da vegetação também foi avaliada em ausência, baixa, média e alta densidade da vegetação. Essas análises tiveram como base estudos realizados por KLOOS e colaboradores, 2004.

As coletas foram realizadas com o auxílio de peneiras de alumínio de 15 a 25cm de diâmetro e pinças de madeira. Os moluscos coletados foram armazenados em tubos de polietileno contendo água do próprio ambiente, devidamente identificados e transportados até o Laboratório de Malacologia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo.

No laboratório, os moluscos foram transferidos para aquários de vidro de 30x40x30 cm, contendo água potável decolorada e pequenas pedras (seixo) devidamente esterilizadas a temperatura de 200°C por 2 horas. Os aquários foram mantidos sob aeração diária de 12 horas e os moluscos alimentados com alface.

CLASSIFICAÇÃO DOS MOLUSCOS

Para confirmar se os moluscos coletados eram pertencentes ao gênero *Biomphalaria* e qual a sua espécie, um exemplar de cada localidade, foi submetido à caracterização molecular, como descrito por CALDEIRA e colaboradores (2004), com o auxílio da técnica de PCR-RFLP, baseado na amplificação específica de determinada sequência de DNA pela Reação em cadeia da polimerase (PCR) e posterior digestão do fragmento obtido com enzimas de restrição - RFLP – Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição, resumida em seguida: moluscos previamente anestesiados em fenobarbital por 45 minutos tiveram suas conchas retiradas. Aproximadamente 100mg de massa corporal foram trituradas em nitrogênio líquido e submetidas a extração de DNA com o auxílio do KIT Illustra™ Tissue & Cells GenomicPrep, de acordo com informações do fabricante. 200 ng do DNA genômico obtido foram utilizados para a reação da PCR na presença dos oligos iniciadores: *ETTS2* (5'-TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAA-3') e *ETTS1* (5'-TGCTTAAGTTCAGCGGGT-3') na concentração de 10 µM/cada, em um volume final de 50 µL de reação contendo: tampão 10 X, 50 mM de MgCl₂, 10 mM de dNTPs, 1 unidade de Taq DNA polimerase (500U) e água ultra pura. A mistura reacional foi submetida a 40 ciclos de amplificação constando de 93°C por 45 segundos, 54°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos. Como etapa final, a mistura foi submetida a 72°C pelo período de cinco minutos. Os oligos iniciadores *ETTS2* e *ETTS1* direcionam a amplificação de um fragmento de aproximadamente 1300 pares de

bases (pb), característico para moluscos do gênero *Biomphalaria*. Para a diferenciação dos moluscos do gênero *Biomphalaria*, nas suas respectivas espécies, uma alíquota de 15 µL de cada reação de amplificação que se mostrou positiva, foi submetida a digestão em presença da enzima de restrição *DdeI*, de acordo com informações do fabricante (Biomex). Esta enzima possibilita a diferenciação das espécies de *Biomphalaria* pelo perfil de restrição gerado com fragmentos de 850 e 550 pb, conforme descrito por Vidigal e colaboradores (2001).

4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização de coleções hídricas a fim de avaliar a presença de moluscos, hospedeiros intermediários para o parasito *S. mansoni*, é parte integrante do reconhecimento de áreas propícias para a disseminação da doença (LIMA et al, 2009). Assim, esse trabalho determinou a presença de moluscos da espécie *B. tenagophila* em todos os municípios estudados (Tabela 1).

Vale ressaltar que neste estudo pôde-se verificar que dentre os 14 municípios avaliados houve maior concentração de moluscos do gênero *Biomphalaria* no município de Alegre. Este fato pode estar associado aos estudos de RODRIGUES E LOUZADA (2003), em que evidenciou Muniz Freire como região endêmica para esquistossomose mansônica, e, considerando que o município de Alegre apresenta divisa com o município de Muniz Freire (Tabela 1).

O geoprocessamento tem sido utilizado nos últimos anos para mapear áreas que apresentam parasitoses de relevância epidemiológica, como doença de chagas, malária, leishmaniose, esquistossomose e fasciolose. A técnica permite também demarcar os fatores ambientais que predispõem a prevalência dessas doenças parasitárias (FUENTES, 2004). Baseando-se neste fato, o uso do aparelho de GPS, neste estudo, nos permitiu a demarcação dos pontos onde foram encontrados os moluscos, o que é de grande relevância, uma vez que essas análises espaciais permitem a idealização de cartas malacológicas de grande importância na área de saúde (ARAUJO et al, 2007).

Assim, os locais georreferenciados serviram como base para a idealização da primeira carta malacológica em municípios da do Sul do Estado do Espírito Santo (Figura 1), tendo como base a presença de moluscos da espécie *B. tenagophila*.

Tabela 1. Distribuição de moluscos *Biomphalaria tenagophila* em 14 municípios da mesorregião sul do estado do Espírito Santo e características ambientais.

Municípios	Bacia Hidrográfica	Pontos	Local da Coleta	Coordenadas geográficas			IPV*	Temperatura		Molusco <i>B. tenagophila</i>	Vegetação	Peixes	Dejetos Humanos
				L	O	A (m)		Mínima*	Máxima*				
Marataízes	Itapemirim	01	Açude	21° 03' 31.7"	40° 50' 59.9"	14	70,166	21,17	26,5	+	+	+	-
		02	Lagoa do Siri	21° 06' 23.0"	40° 51' 11.0"	5				+	+	+	+
		03	Lagoa do Cedro	21° 07' 53.8"	40° 52' 14.4"	4				++	+	+	+
Presidente Kennedy	Itapemirim Itabapoana	04	Lagoa	21° 11' 22.6"	40° 55' 39.2"	7	87,05	19,18	29,66	+	+	+	-
		05	Brejo e correjo	21° 10' 57.5"	40° 56' 37.6"	5				+	+	+	-
		06	Brejo	21° 10' 53.4"	40° 56' 32.8"	6				+	+	+	-
Vila do Itapemirim	Itapemirim	07	Corrego	21° 01' 22.8"	40° 54' 36.1"	19	88,95	20,04	29,84	+	+	+	-
		08	Corrego -	21° 01' 22.7"	40° 54' 36.2"	20				+	+	+	-
Piúma	Itapemirim	09	Rio Benevente	21° 51' 11.1"	40° 45' 07.3"	7	92,26	19,73	29,75	+	+	+	-
Atilio Vivacqua	Itapemirim	10	Córrego	20° 55' 58.3"	41° 10' 46.1"	62	88,66	18,35	29,24	-	++	++	-
		11	Córrego	20° 55' 26.3"	41° 11' 06.6"	62				+	++	+	+
Cachoeiro do Itapemirim	Itapemirim	12	Açude	20° 53' 06.6"	41° 16' 21.5"	213	88,55	19,54	30,05	+++	+	+	-
Muqui	Itapemirim Itabapoana	13	Corrego	20° 53' 53.3"	41° 16' 36.6"	214	88,66	18,35	29,24	+++	+	+	+
Guacui	Itapemirim	14	Corrego	20° 46' 30.4"	41° 40' 00.5"	588	102	16,06	27,66	++++	+	+	+
Muniz Freire	Itapemirim	15	Córrego	20° 27' 39.9"	41° 25' 04.0"	539	100,07	14,28	26,8	++++	+	+	+
Mimoso do Sul	Itapemirim	16	Rio Itabapoana	20° 03' 50.7"	41° 21' 46.9"	61	88,66	18,35	29,24	++++	+++	+	+
	Itabapoana	17	Rio	20° 03' 37.4"	41° 21' 35.2"	66				+++	+++	+	+
Vargem Alta	Itapemirim	18	Rio	20° 40' 25.3"	41° 00' 34.8"	612	90,87	18,30	29,28	++	++	+	-
Castelo	Itapemirim	19	Rio Itapemirim	20° 45' 08.9"	41° 11' 14.3"	74	96,41	14,74	27,21	+++	+++	+	+
Jeronimo Monteiro	Itapemirim	20	Corrego	20° 47' 43.5"	41° 24' 15.6"	122	96,75	16,15	27,87	+++	+++	+	+
Alegre	Itapemirim	21	Corrego	20° 46' 06.1"	41° 26' 17.2"	121	96,758 3	16,1583	27,875	+++++	++++	+	-
Alegre	Itapemirim	22	Baias EAFA	20° 45' 4.5"	41° 27' 19.6"	125				-	-	-	-

Moluscos: +++++ = Alta incidência (> 50 caramujos) // +++ = Média incidência (10 = Caramujos = 50) // + = Baixa Incidência (< 10 Caramujos) // - = Ausência.

Meio Ambiente: +++++ = Alta incidência // +++ = Média incidência // + = Baixa Incidência // - = Ausência. **L:** latitude sul; **O:** latitude oeste; **A:** Altura relativa ao nível do mar; **IPV:** Índice Pluviométrico Médio.

* Dados obtidos da média anual do período de 1961 a 1990 adaptado do site: www.tempoagora.com.br

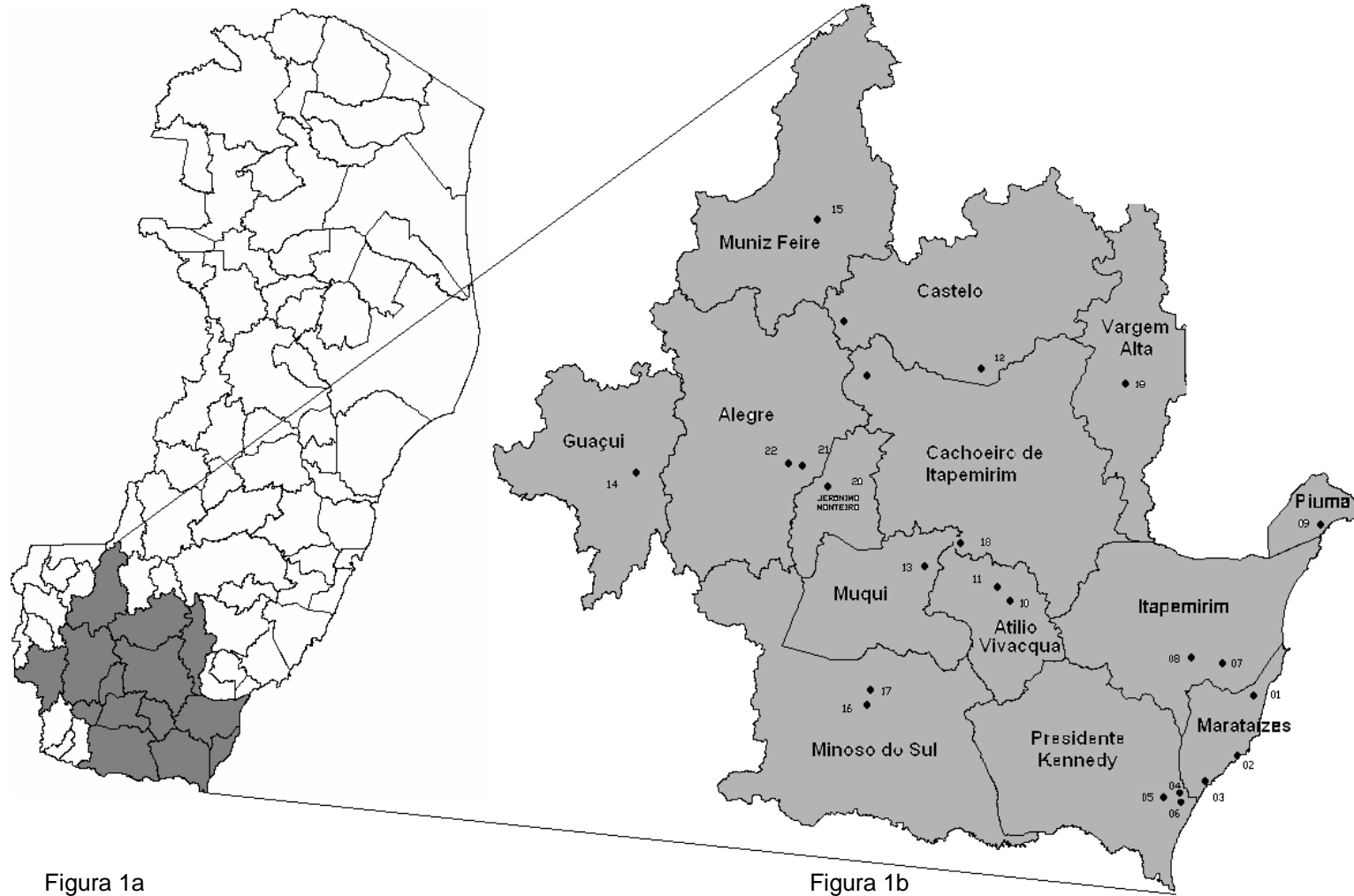


Figura 1a: Mapa do estado do Espírito Santo. Figura 1 b: Carta malacológica para moluscos do gênero *Biomphalaria* na Mesorregião Sul do estado do Espírito Santo. Presença de *B. tenagophila*: **1, 2 e 3.** Marataízes; **4, 5 e 6.** Presidente Kennedy; **7 e 8.** Vila do Itapemirim; **9.** Piúma; **11.** Atilio Vivacqua; **12.** Cachoeiro do Itapemirim; **13.** Muqui; **14.** Guaçuí; **15.** Muniz Freire; **16 e 17.** Mimoso do Sul; **18.** Castelo; **19.** Vargem Alta; **20.** Jerônimo Monteiro; **21.** Alegre.

GRISOLIA & FREITAS (1985), em estudos realizados no município de Belo Horizonte constataram que dentre as características físicas, químicas e climatológicas, consideradas como importantes condicionadores de hábitat de moluscos de água doce, destacam-se a temperatura, chuvas, salinidade, disponibilidade de sais dissolvidos, pH, nutrientes e poluição. Sendo que, de acordo com OLAZARRI (1981), o regime pluviométrico e a temperatura são considerados um dos principais fatores reguladores da vida e dos processos vitais de planorbídeos vetores de doenças.

No presente estudo tornou-se evidente a importância do regime de chuvas, onde foi observada uma maior incidência de moluscos em municípios cujo índice pluviométrico apresentou-se mais elevado (Tabela 1). Dados apresentados por CORREIA e colaboradores (1986) descreveram a relevância dos fatores meteorológicos como peças fundamentais para a reprodução e desenvolvimento dos moluscos, e, por conseguinte a facilidade em suas coletas, o que também corrobora com nossa inferência.

De acordo com TIBIRIÇA e colaboradores (2009), as análises biométricas são fundamentais para a Identificação morfológica de moluscos coletados. Seguindo essa linha, no momento da coleta, os moluscos foram previamente classificados como sendo pertencentes ao gênero *Biomphalaria*, baseados nas características da forma, tamanho médio e coloração das conchas, conforme descrito por Paraense (1975). Entretanto, a classificação baseada nesses aspectos morfológicos pode conduzir a falsos resultados, principalmente pela grande variabilidade destas características, as quais podem sofrer influência do ambiente e pela semelhança entre algumas espécies (VIDIGAL et al., 1998).

Uma estratégia que vem sendo amplamente utilizada é o estudo das regiões dos transcritos espaçadores internos (ITS1 e ITS2) pertencentes à região de DNA nuclear ribossomal (rDNA). Trata-se de uma região cistrônica a qual apresenta sequências referentes à 18S, ITS1, 5.8S, ITS2, e 28S, e demonstra elevado nível de divergência em relação às sequências flangeadoras, sendo assim utilizadas para diferenciar espécies afins (CHENG et al., 2006). Dessa forma, para validar nossa proposição e confirmar qual (ou quais) espécie(s) de *Biomphalaria* havia(m) sido

coletada(s), foi utilizada a técnica de PCR-RFLP, para a região ETTS1, como descrito por CALDEIRA e colaboradores em 2004.

A análise da reação, feita com um exemplar coletado em cada região, evidenciou a amplificação de um fragmento de aproximadamente 1300 pares de bases, característico para dez espécies e uma subespécie de moluscos do gênero *Biomphalaria* (Figura 2), que após digestão com a enzima *DdeI* gerou dois fragmentos com respectivamente 850 e 550 pb, confirmando que os moluscos coletados em todos os 14 municípios são da espécie *B. tenagophila* (Figura 3).

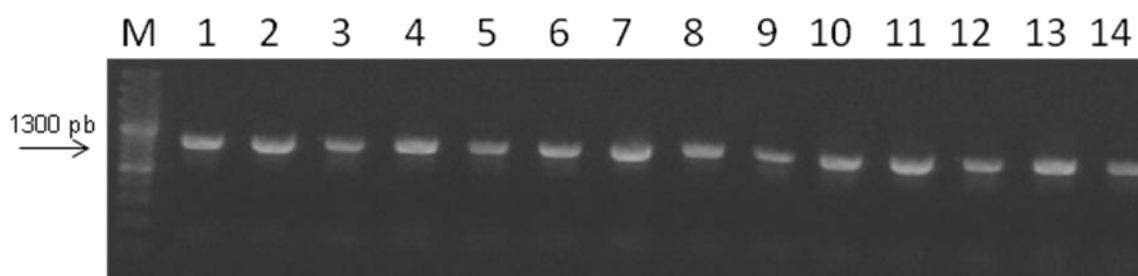


Figura 2: Gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo (05 mg/mL) referente a amplificação do fragmento de aproximadamente 1300 pares de bases da primeira região interna do DNAr de *Biomphalaria ssp.*, coletados em diferentes municípios da Mesoregião Sul Espírito-Santense. M: Marcador de peso molecular 100 pares de bases (pb). As colunas 1 - 14 representam respectivamente os municípios onde ocorreram as coletas. 1: Alegre; 2: Atílio Vivácqua; 3: Cachoeiro de Itapemirim; 4: Castelo; 5: Itapemirim; 6: Guaçuí; 7: Jerônimo Monteiro; 8: Marataízes; 9: Mimoso do Sul; 10: Muniz Freire; 11: Muqui; 12: Presidente Kennedy; 13: Piúma; 14: Vargem Alta.

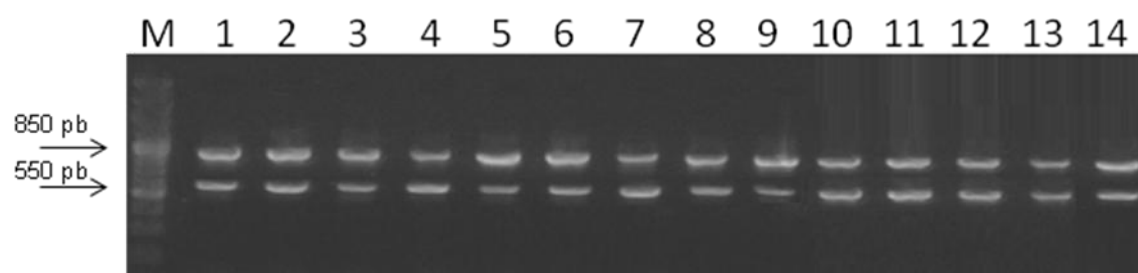


Figura 3: Gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo (05 mg/mL) referente ao perfis de restrição de aproximadamente 850 e 550 pares de bases (pb) (PCR-RFLP) característico para *Biomphalaria tenagophila*, obtido da digestão do fragmento de 1300 pb (produto amplificado da primeira região interna do DNAr), utilizando a enzima *DdeI*. M: Marcador de peso molecular 100 pb. 1 - 14: municípios da Mesoregião Sul Espírito-Santense, onde ocorreram as coletas. 1: Alegre; 2: Atílio Vivácqua; 3: Cachoeiro de Itapemirim; 4: Castelo; 5: Itapemirim; 6: Guaçuí; 7: Jerônimo Monteiro; 8: Marataízes; 9: Mimoso do Sul; 10: Muniz Freire; 11: Muqui; 12: Presidente Kennedy; 13: Piúma; 14: Vargem Alta.

Outro trabalho realizado por CALDEIRA e colaboradores em 2001, demonstrou que a utilização da técnica de PCR com o auxílio de óligos iniciadores ancorados à regiões microssatélites - SSR-PCR possibilitou distinguir as espécies *Biomphalaria kuhniana*, *Biomphalaria straminea*, *Biomphalaria intermedia*, espécies estas que, devido à grande semelhança morfológica, foram agrupadas em um complexo determinado *B. straminea* (PARAENSE, 1988). VIDIGAL e colaboradores (2002a) através do estudo do gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI) utilizando a técnica PCR-RFLP obtiveram perfis de restrição que permitiram a identificação de moluscos *B. glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*. VIDIGAL e colaboradores (2002b) utilizando a metodologia de Multiplex-PCR para o estudo da região ITS2 obtiveram perfis diferentes que permitiram distinção entre *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*. Esses dados demonstram a importância dessas técnicas como uma ferramenta adicional para a diferenciação e classificação de moluscos do gênero *Biomphalaria*.

Vários ambientes aquáticos podem servir de criadouros para planorbídeos hospedeiros intermediários para *S. mansoni*, desde lagos artificiais, canais de irrigação, lagoas de criação de peixes e açudes (MILWARD DE ANDRADE e TORGA, 1981), o que demonstra a capacidade de disseminação e perpetuação dessas espécies no meio ambiente.

No presente estudo, como pode ser observado na Figura 1b moluscos da espécie *B. tenagophila* foram encontrados em locais diversos, (canais hídricos, lagoas, açudes e vales de irrigação), na maioria das vezes enterrados na areia ou próximos à vegetações aquáticas rasteiras. Isso demonstra a ampla distribuição, dessa espécie, nas áreas avaliadas. Os moluscos também foram encontrados em caixas d'água em estações de captação/tratamento de água e bebedouros de animais domésticos (gado). Nestes casos, os moluscos estavam aderidos às caixas ou enterrados na 1ª estação de filtragem. Tal fato foi observado nos municípios de Alegre e Marataízes.

CORRÊA e colaboradores em 1970, determinaram que um importante agente dispersor de planorbídeos são as enchentes e as atividades migratórias de peixes. Essas condições são pertinentes ao nosso estudo e podem também estar contribuindo com a dispersão dos moluscos, uma vez que a mesorregião Sul do

Espírito Santo possui inúmeras bacias hidrográficas e períodos chuvosos intensos, sendo, sempre, acometida por enchentes. Porém, um fato de extrema relevância e preocupação, é a presença de moluscos em locais que não possuem contato direto com os cursos d'água, não estando sujeito ao acometimento por enchentes ou ação migratória de peixes, que são as caixas d'água nos pontos de captação/tratamento e os bebedouros de animais. Apesar de não terem sido avaliados, muito provavelmente, a água destinada a esses pontos de captação está contaminada com os planorbídeos, e os mesmos estão vindo diretamente pela tubulação. Vale ressaltar que em algumas regiões avaliadas (dados não apresentados), a mesma água que é captada para o abastecimento dos animais, é utilizada para consumo humano.

A espécie *B. tenagophila* é a segunda mais importante na transmissão de *S. mansoni* no Brasil (PARAENSE, 1975; CORRÊA, 1979), sendo importante hospedeiro na região Sul (PARAENSE, 1984) e em parte da região Sudeste (PARAENSE, 1989; TELES et al., 1991, PASSOS et al., 1998; TELES, 2005; SOUZA et al., 2001; VASCONCELOS et al., 2009). O Estado de São Paulo apresenta uma grande área colonizada por *B. tenagophila*, no entanto, outras espécies tais como *B. occidentalis* e *B. straminea* já foram descritas (TELES, 1996). KATZ E CARVALHO (1983) registraram os primeiros casos de esquistossomose autóctone na região de Itajubá (Minas Gerais). E, CARVALHO e colaboradores (1985), descreveram o primeiro encontro de *B. tenagophila* naturalmente infectada nesta região. Sendo assim, Itajubá até então considerada como indene revelou-se um foco em potencial para transmissão da doença.

Durante as avaliações, foi observada a presença de dejetos humanos em vários pontos analisados, sendo que, no de número 03 (Figura 1b), pertencente ao município de Marataízes (centro turístico da região), foi observado uma maior quantidade de dejetos humanos. Aliado a esse fato, em outra região de importância turística, que faz divisa com o município de Marataízes, o município de Piúma, foi constatado um caso autóctone no de esquistossomose no ano de 2009 (SERVIÇO DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DA PMP, 2010- Comunicação pessoal).

A região Sul do Estado do Espírito Santo não apresenta, atualmente, elevado número de casos notificados (SUS), todavia, possui alto potencial para desenvolver

a parasitose, uma vez que faz divisa com municípios dos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais que apresentam a parasitose e por possuir uma vasta rede hidrográfica, com duas bacias de grande relevância, a do rio Itabapoana que banha os Estados do Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro e a do rio Itapemirim, que banha os Estado de Minas Gerais e Estado do Espírito Santo.

Aliados a esses fatores ambientais e geográficos, a existência de comunidades de baixo nível sócio-econômico vivendo em densidade suficiente para poluir as coleções aquáticas de onde se servem para fins domésticos e profissionais, como pode ser observado durante o trabalho, pode contribuir para o aparecimento e manutenção da doença. No que tange às medidas preventivas, seria fundamental um esforço na ampliação da cobertura de diagnóstico, tratamento e investigação de casos humanos e o incremento dos trabalhos para o conhecimento detalhado das áreas ocupadas pelos hospedeiros intermediários de *S. mansoni*, associando-se às áreas com maior concentração de moluscos procedentes de estados endêmicos, ficando facilitados os trabalhos de vigilância epidemiológica da endemia.

Assim, este é o primeiro estudo que relata a presença de moluscos da espécie *B. tenagophila* em municípios do sul do Estado do Espírito Santo.

4.6. CONCLUSÕES

Este estudo confirma a presença de moluscos da espécie *B. tenagophila* na região do sul do estado do Espírito Santo, e que a mesma possui condições ambientais favoráveis para a manutenção e dispersão dos moluscos.

4.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, K.C.G.M.; RESENDES, A.P.C.; SOUZA-SANTOS, R.; SILVEIRA JÚNIOR, J.C.; BARBOSA, C.S. Análise espacial dos focos de *Biomphalaria glabrata* e de casos humanos de esquistossomose mansônica em Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil, no ano 2000. **Caderno de Saúde Pública**. v. 23, p. 409-417, 2007.

ARAÚJO FILHO, R. Introdução à pecuária ecológica: a arte de criar animais sem drogas ou venenos. **São José**. Porto Alegre, p. 136, 2000.

BORDA, C.E.; REA, M.J.F. *Biomphalaria tenagophila* potencial vector of *Schistosoma mansoni* in the Paraná River basin (Argentina and Paraguay). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 102, p. 191-195, 2007.

CALDEIRA, R.L.; VIDIGAL, T.H.D.A.; SIMPSON, A.J.G.; CARVALHO, O.S. Genetic variability in Brazilian populations of *Biomphalaria straminea* complex detected by simple sequence repeat anchored polymerase chain reaction amplification (SSR-PCR). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 535-544, 2001.

CALDEIRA, R.L.; JANNOTTI-PASSOS, L.K.; LIRA, P.M.; CARVALHO, O.S. Diagnostic of *Biomphalaria* snails and *Schistosoma mansoni*: DNA obtained from traces of shell organic materials. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 499–502, 2004.

CAMPOS, Y.R. Comparação das técnicas SSR-PCR ancorado, AP-PCR e Isoenzimas no estudo da variabilidade genética de *Biomphalaria glabrata*. 85f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2001.

CARVALHO, O.S.; SOUZA, C.P.; KATZ, N. Primeiro encontro de *Biomphalaria tenagophila* (d'orbigny, 1835) naturalmente infectada, com *Schistosoma mansoni*, em itajubá, sul do estado de Minas Gerais, Brasil. **Revista de Saúde Pública.** v. 19, p.88-91, 1985.

CARVALHO, O.S.; CALDEIRA, R.L.; SIMPSON, A.J.G.; VIDIGAL, T.H.D.A. Genetic variability and molecular identification of Brazilian *Biomphalaria* species (Mollusca: Planorbidae). **Parasitology.** v. 123, p. 197- 209, 2001.

CHENG, H.; XIA, D.; WU, T.; MENG, X.; JI, H.; DONG, Z. Study on Sequences of Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacers of Clams Belonging to the Veneridae Family (Mollusca: Bivalvia). **Acta Genetica Sinica.** v. 33, p. 702-710, 2006.

CORRÊA, R.R.; MURGEL, J.M.T.; PIZA, J.T.; RAMOS, A.S.; DIAS, L.C.S.; MORAIS, L.V.C.; ROSÁRIO, F.F. Dispersão de *Biomphalaria straminea*, hospedeira intermediária do *Schistosoma mansoni*, através da distribuição de peixes. **Revista de Saúde Pública.** v. 4, p. 117-127, 1970.

CORRÊA, M.C.R. Suscetibilidade de linhagens de *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria glabrata* a duas cepas de *Schistosoma mansoni* (LE — Belo Horizonte, MG e SJ — São José dos Campos, SP). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.** v. 21, p. 72-76, 1979.

COURA, J.R.; AMARAL, R.S. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic áreas. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz.** v. 99, p. 13-19, 2004.

FUENTES, M. V. Proposal of a geographic information system for modeling zoonotic fasciolosis transmission in the Andes. **Parasitologia Latinoamericana.** v. 59, p. 51-55, 2004.

GRISOLIA, M.L.M.; FREITAS, J.R. Características físicas e químicas do habitat da *Biomphalaria tenagophila* (Mollusca, Planorbidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 80, p. 237 - 244, 1985.

KATZ, N.; CARVALHO, O.S. Introdução recente da esquistossomose mansoni no sul do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 78, p. 281-284, 1983.

KLOOS H.; PASSOS, L.K.J.; LOVERDE, P.; CORREA OLIVEIRA, R.; GAZZINELLI, A. Distribution and *Schistosoma mansoni* infection of *Biomphalaria glabrata* in different habitats in a rural area in the Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil: environmental and epidemiological aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 99, p. 673-681, 2004.

LIMA, W.S.; SOARES, L.R.M.; BARÇANTE, T.A.; GUIMARAES, M.P.; BARÇANTE, J.M.P. Occurrence of *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) infection in Brazilian cattle of Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 18, p. 27-30, 2009.

MILWARD-DE-ANDRADE, R.; TORGA, L. F. Ação inibidora do termofosfato magnésiano sobre a fecundidade de planorbídeos e seu possível significado no controle da esquistossomose mansoni. **Revista de Saúde Pública de São Paulo**. v. 15, p. 59 – 71, 1981.

MOTA, M.A.; CAMPOS, A.K.; ARAÚJO, J.V. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 23, p. 93-100, 2003.

OLAZARRI, J. *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835) (Moll., Gastr.) en Zona de Salto Grande. I- Ambientes de cria. **Comunicaciones de la Sociedad Malacologica del Uruguay**. v. 5, p. 321- 343, 1981.

PARAENSE, W.L. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. **Arquivo Museu Nacional Rio de Janeiro**. v. 55, p. 105-128, 1975.

PARAENSE, W.L. *Biomphalaria tenagophila guaibensis* ssp.n. from Southern Brazil and Uruguay (Pulmonata: Planorbidae). I. Morphology. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 79, n. 4, p. 465-469, 1984.

PARAENSE, W.L. *Biomphalaria kuhniana* (Clessin, 1883), planorbid mollusc from South America. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 83, p. 1-12, 1988.

PARAENSE, W.L. *Biomphalaria kuhniana* (Clessin, 1883), planorbid mollusc from South America. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 83, p. 1-12, 1989.

PASSOS, A.D.C. Controle da Esquistossomose: Diretrizes Técnicas, Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, Brasília, p. 70, 1998.

RODRIGUES, A. L.; LOUZADA, M. C. Boletim Epidemiológico: A Experiência no Controle da Esquistossomose no Estado do Espírito Santo (2000 a 2002). **Secretaria Estadual de Saúde do Espírito Santo**. v. 3, p. 3-4, 2003.

SILVA, L.J. Crescimento urbano e doença: a esquistossomose no município de São Paulo (Brasil). **Revista de Saúde Pública**. v. 19, p. 1-7, 1985.

SOUZA, C.P.; ARAÚJO, N.; CARVALHO, O.S.; FREITAS, J.R. Potencialidade de *Biomphalaria tenagophila* do lago da Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, como hospedeiro do *Schistosoma mansoni*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 81, p. 67-70, 1987.

SOUZA, C.P.; CALDEIRA, R.L.; DRUMMOND, S.C.; MELO, A.L.; GUIMARÃES, C.T.; SOARES, D.M.; CARVALHO, O.S. Geographical distribution of *Biomphalaria* snails in the state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 96, p. 293-302, 2001.

TELES, H.M.S.; PEREIRA, P.A.C.; RICHINITTI, L.M.Z. Distribuição de *Biomphalaria* (Gastropoda, Planorbidae) nos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, Brasil. **Revista de Saúde Pública**. v. 25: 350-352, 1991.

TELES, H.M.S. Distribuição de *Biomphalaria straminea* ao Sul da Região Neotropical. **Revista de Saúde Pública**. v. 30, p. 341-349, 1996.

TELES, H.M.S. Distribuição geográfica das espécies dos caramujos transmissores de *Schistosoma mansoni* no Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, p. 426-432, 2005.

TIBIRIÇÁ, S.H.C.; BESSA, E.C.A.; COIMBRA, E.S.; PINHEIRO, I.O.; EZEQUIEL, O.S. Avaliação biométrica de *Biomphalaria* ssp. (preston , 1910) no município de Juiz de Fora, MG. **Revista de Patologia Tropical**. v.38, p. 52-62, 2009.

VASCONCELOS, C.H.; CARDOSO, P.C.M.; QUIRINO,W.C.; MASSARA, C.L.; AMARAL, G.L.; CORDEIRO, R.; CARVALHO, O.S. Avaliação de medidas de controle da esquistossomose mansoni no Município de Sabará, Minas Gerais, Brasil, 1980-2007. **Caderno de Saúde Pública**. v. 25, n.5, 2009.

VIDIGAL, T.H.D.A., SPATZ, L., NUNES, N.D., SIMPSON, A.J.G., CARVALHO, O.S., DIAS NETO, E. *Biomphalaria* ssp: identification of the intermediate snail hosts of *Schistosoma mansoni* by polymerase chain reaction amplification and restriction enzyme digestion of the ribosomal RNA gene intergenic spacer. **Exp. Parasitol.** V. 89, p. 180–187, 1998.

VIDIGAL, T.H.; CALDEIRA, R.L.; SIMPSON, A.J.; CARVALHO, O.S. Identification of *Biomphalaria havanensis* and *Biomphalaria obstructa* populations from Cuba using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of the ribosomal RNA intergenic spacer. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 96, p. 661-665, 2001.

VIDIGAL, T.H.D.A.; MAGALHÃES, K.G.; KISSINGER, J.C.; CALDEIRA, R.L.; SIMPSON, A.J.G.; CARVALHO, O.S. A Multiplex-PCR approach to identification of the Brazilian intermediate hosts of *Schistosoma mansoni*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 97, p. 95-97, 2002a.

VIDIGAL, T.H.D.A.; MONTRESOR, L.C.; SIMPSON, A.J.G.; CARVALHO, O.S. Polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of cytochrome oxidase subunit I used for differentiation of Brazilian *Biomphalaria* species intermediate host of *Schistosoma mansoni*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 97, p. 47-52, 2002b.

CAPÍTULO 3

Levantamento malacológico e Identificação molecular de moluscos do gênero *Lymnaea*, hospedeiro intermediário da *Fasciola hepática*, na região Sul do Espírito Santo, Brasil.

5. Cap. 3. Levantamento malacológico e Identificação molecular de moluscos do gênero *Lymnaea*, hospedeiro intermediário da *Fasciola hepatica*, na região Sul do Espírito Santo, Brasil.

5.1. RESUMO

O gênero *Lymnaea* é formado por moluscos pulmonados, hospedeiros intermediários da *Fasciola hepatica*. Neste trabalho foi avaliada a presença de moluscos do gênero *Lymnaea*, em 14 municípios situados na mesorregião Sul do Espírito Santo pertencentes às Bacias hidrográficas do rio Itapemirim, rio Itabapoana e rio Benevente. Os moluscos coletados foram submetidos a análises morfológicas e moleculares. Para os 14 municípios estudados, observou-se que nos pontos de coletas georreferenciados, todos os moluscos coletados do gênero *Lymnaea*, foram identificados como da espécie *L. columella*, hospedeiros intermediários para o parasito *Fasciola hepatica*.

Palavras-chave: Carta malacológica; Fasciolose; *Lymnaea*.

Malacological assessment and molecular identification of snails of the gender *Lymnaea*, intermediate host of *Fasciola hepatica*, in southern Espírito Santo, Brazil.

5.2. ABSTRACT

The gender *Lymnaea* consists of pulmonate molluscs, intermediate hosts of *Fasciola hepatica*. In this study the presence was evaluated of mollusks of the genus *Lymnaea*. In 14 cities located in Southern southern Espírito Santo belongs to Itapemirim River catchment, river Itabapoana and river Benevente. The snails collected were submitted to morphological and molecular analysis. For the 14 cities studied, were observed that the point of collecting georeferenced all molluscs collected from the gender *Lymnaea* were identified as *L. columella*.

Keywords: Letter malacological; fascioliasis, *Lymnaea*.

5.3. INTRODUÇÃO

Dentre as enfermidades que afetam os animais domésticos de importância econômica, a fasciolose hepática é uma das parasitoses mais relevantes e frequentes (MULLER et al, 1998; PEREZ et al, 1998). Embora a fasciolose resulte em uma doença subclínica no rebanho bovino, as consequências econômicas são significativas devido principalmente às perdas associadas com a condenação de fígados, perda de peso, letargia, interferência na fertilidade, redução da produção de carne e leite, altos custos com tratamentos antihelmínticos e morte dos animais (SERRA-FREIRE, 1995; GORMAN et al, 1998; ECHEVARRIA, 2004; LIMA et al, 2009).

O trematódeo *Fasciola hepatica*, agente causal da fasciolose, é um parasito que acomete ductos biliares de bovinos e ovinos, podendo parasitar eqüídeos, caprinos, bubalinos, dentre outros mamíferos (QUEIROZ et al, 2002, SOUZA et al, 2002; CORAL et al, 2007; FARIA et al, 2008; MATTOS et al, 2009). Popularmente, conhecido como baratinha do fígado ou saguaipé, é um verme achatado, de corpo foliáceo e digenético, necessitando de um hospedeiro intermediário, um molusco do gênero *Lymnaea*, para completar seu desenvolvimento (TOSTES et al, 2004; RUBEL et al, 2005; OLIVEIRA e SPÓSITO FILHA, 2009).

Diversas são as espécies de *Lymnaea* com potencial para a disseminação da fasciolose pelo mundo, como: *Bulinis tropicus* (Lemaire, 1936), *Physa cubensis* (Pfeiffer, 1839); *Lymnaea peregra* (Muller, 1774); *L. truncatula* (Muller, 1774); *L. auriculata* (Linnaeus, 1758); *L. corvus* (Gmelin, 1786); *L. glaba* (Muller, 1774); *L. palustris* (Muller, 1774); *L. stagnalis* (Linnaeus, 1758) e *L. turricula* (Held, 1837).

No Brasil, foram registradas quatro espécies pertencentes ao gênero *Lymnaea*, sendo estas: *L. columella* (GONZALES et al. 1974); *L. viatrix* (Rey, 1957); *L. cubensis* (REZENDE et al. 1973) e *L. rupestris* (PARAENSE et al., 1982), sendo que dentre estas, somente as três primeiras foram caracterizadas como hospedeiros intermediários de *F. hepatica* (GOMES et al, 2002; OLIVEIRA & SPÓSITO FILHA, 2009). A espécie *L. columella*, considerada de maior interesse epidemiológico no Brasil devido a sua ampla distribuição geográfica, é encontrada nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais,

Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Amazonas e Bahia (SOUZA et al, 2002; PREPELITCHI et al, 2003).

FRAGA (2008) a partir de dados do Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo (IDAF) constatou o aumento gradativo da condenação de fígados bovinos, devido a infecção pelo parasito *F. hepatica*, entre os anos de 2005 a 2007. Assim, o presente estudo teve como objetivo, avaliar a presença e identificar as espécies morfológicamente e molecularmente de moluscos do gênero *Lymnaea*, hospedeiros intermediários para o parasito *F. hepatica*, na Mesorregião Sul do Estado do Espírito Santo.

5.4. MATERIAL E MÉTODOS

ANÁLISE MALACOLÓGICA

Neste estudo foi investigada a presença de moluscos do gênero *Lymnaea* em 14 municípios situados na Mesorregião Sul do Espírito Santo pertencentes às Bacias hidrográficas dos rios Itapemirim, Itabapoana e Benevente. O levantamento malacológico ocorreu entre o período de março de 2007 a novembro de 2009, onde foram avaliados canais hídricos, lagoas, açudes e vales de irrigação. Os trabalhos de campo foram realizados sempre pela mesma equipe de trabalho.

Os trabalhos de campo foram conduzidos para avaliar a presença de moluscos com conchas cônicas, hélices enroladas, ausentes de opérculos e com aberturas voltadas para o lado direito, com olhos nas bases dos tentáculos achatados ou triangulares e diâmetro entre 8 a 17 mm de comprimento, característicos do gênero *Lymnaea*. Para cada localidade, foram coletados 20 moluscos com tamanhos entre 10 a 12 mm de diâmetro, apresentando as características descritas acima. Estes moluscos foram destinados a classificação morfológica e molecular. Os locais de coleta de moluscos foram georreferenciados e as informações obtidas, destinadas para a confecção da carta malacológica da região.

Para a realização da carta malacológica utilizou-se o mapa do estado do Espírito Santo disponibilizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, que foi convertido do formato SHAPE para o formato DWG pelo programa ARCGIS V. 9.2, afim da visualização no software do AUTOCAD 2007. Com o uso do aparelho de geoprocessamento os pontos marcados foram obtidos pelo programa MAPSOURCE e exportados no formato DXF para também serem exportados ao programa AUTOCAD 2007. No programa AUTOCAD 2007, os pontos foram sobrepostos sobre o mapa com o mesmo DATUM horizontal, South América '69 (SAD 69).

Com relação aos pontos georreferenciados, foi verificada a presença ou ausência de fezes de animais domésticos. A presença de peixes foi avaliada por observação direta e com o auxílio de moradores que residem próximo aos locais. A

densidade da vegetação também foi avaliada em ausência, baixa, média e alta densidade da vegetação. Essas análises tiveram como base os estudos realizados por KLOOS e colaboradores, 2004.

As coletas foram realizadas com o auxílio de peneiras de alumínio de 15 a 25 cm de diâmetro e pinças de madeira. Os moluscos coletados foram armazenados em tubos de polietileno contendo água do próprio ambiente, identificados e transportados até o Laboratório de Malacologia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo. No laboratório, os animais foram transferidos para aquários de vidro de 30x40x30 cm, contendo água potável declorada e pequenas pedras (seixo), esterilizadas a temperatura de 200°C por 2 horas. Os aquários foram mantidos sob aeração diária de 12 horas e os moluscos alimentados com alface.

CLASSIFICAÇÃO DOS MOLUSCOS

Para confirmar se os moluscos coletados eram pertencentes ao gênero *Lymnaea* e qual a sua espécie, um exemplar de cada localidade, foi submetido à caracterização molecular, como descrito por CARVALHO e colaboradores (2004), com o auxílio da técnica de PCR-RFLP, baseado na amplificação específica de determinada sequência de DNA pela Reação em cadeia da polimerase (PCR) e posterior digestão do fragmento obtido com enzimas de restrição - RFLP – Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição, resumida em seguida: Moluscos, previamente anestesiados em fenobarbital por 45 minutos, tiveram suas conchas retiradas. Aproximadamente 100 mg da massa corporal foram trituradas em nitrogênio líquido e utilizadas para extração de DNA com o auxílio do KIT Illustra™ Tissue & Cells GenomicPrep, de acordo com as especificações do fabricante. As reações de amplificação foram conduzidas em um volume de reação de 50 µL, contendo 200 ng do DNA genômico como molde, 10µM de cada oligonucleotídeo iniciador ITS1r- 5'-ACGAGCGAGTGATCCACCGC-3' (VIDIGAL et al., 2004) e *ETTS2* 5'-TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAA-3' (KANE & ROLLINSON 1994), 50 mM de MgCl₂, 10 mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 1U de Taq DNA polimerase (500U), tampão 10X e água ultra pura. A mistura reacional foi

submetida a 40 ciclos de amplificação, com uma etapa inicial de desnaturação à 93°C por 45 segundos, seguida por 54°C por 1 minuto para a ligação dos oligonucleotídeos iniciadores e 72°C por 2 minutos para a extensão. Para a diferenciação dos moluscos do gênero *Lymnaea*, uma alíquota de 15 µL de cada reação positiva, foi submetida a digestão na presença da enzima de restrição *DdeI*, de acordo com informações do fabricante (Biomex).

5.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo verificou-se a presença de moluscos da espécie *Lymnaea columella*, hospedeiros intermediários para a fasciolose hepática, em 14 municípios, banhados pelas bacias hidrográficas dos rios Itapemirim, Itabapoana e Benevente (Tabela 1). O reconhecimento de coleções hídricas a fim de verificar a presença de hospedeiros intermediários é relevante para caracterizar uma área propícia ao desenvolvimento dos mesmos e disseminação de doenças (LIMA et al, 2009).

De acordo com FUENTES (2004), o georreferenciamento tem sido utilizado para mapear áreas que apresentam parasitoses de relevância epidemiológica, como doença de Chagas, malária, leishmaniose, esquistossomose e fasciolose. Através desta tecnologia, é possível delinear fatores que auxiliam na predisposição da prevalência dessas doenças parasitárias. Assim, neste estudo, o uso do aparelho de GPS foi de fundamental importância, pois a demarcação de pontos positivos para os moluscos da espécie *L. columella*, contendo os parâmetros de latitude, longitude e altitude, possibilitou a confecção de carta malacológica da região avaliada, como pode ser observado na Figura 1. Ressalta-se que conforme estudo realizado por FUENTES (2004) foi demonstrado que fatores ambientais tais como altitude e temperatura, influenciam na transmissão da fasciolose e, são fundamentais para definição de parâmetros entre a prevalência e a disseminação da doença, a fim de caracterizar áreas endêmicas desta parasitose.

Tabela 1. Distribuição de moluscos *Lymnaea columella* em 14 municípios da mesorregião sul do estado do Espírito Santo e respectivas características ambientais.

Municípios	Bacia Hidrográfica	Pontos	Local da Coleta	Coordenadas geográficas			IPV	Temperatura (máxima/ mínima)		Molusco <i>L. columella</i>	Vegetação	Peixes	Dejetos Animais
				L	O	A (m)		Mínima	Máxima				
Marataízes	Itapemirim	01	Açude	21° 03' 31.7"	40° 50' 59.9"	14	70,166	21,17	26,5	-	+	+	+
		02	Lagoa do Siri	21° 06' 23.0"	40° 51' 11.0"	5				++++	+	+	+
		03	Lagoa do Cedro (tratamento água do SAAE)	21° 07' 53.8"	40° 52' 14.4"	4				+	+	+	+
Presidente Kennedy	Itapemirim Itabapoana	04	Lagoa	21° 11' 22.6"	40° 55' 39.2"	7	87,05	19,18	29,66	-	+	+	+
		05	Brejo	21° 10' 57.5"	40° 56' 37.6"	5				+++	+	+	+
		06	Córrego	21° 10' 53.4"	40° 56' 32.8"	6				++++	+	+	+
Vila do Itapemirim	Itapemirim	07	Córrego Grauna	21° 01' 22.8"	40° 54' 36.1"	19	88,95	20,04	29,84	++	+	+	+
		08	Varzea de irrigação	21° 01' 22.7"	40° 54' 36.2"	20				+	+	+	+
Piúma	Itapemirim	09	Rio Benevente	21° 51' 11.1"	40° 45' 07.3"	7	92,26	19,73	29,75	++	+	+	+
Atilio Vivacqua	Itapemirim	10	Córrego com elevada correnteza	20° 55' 58.3"	41° 10' 46.1"	62	88,66	18,35	29,24	-	+	+	+
		11	Córrego com leve correnteza	20° 55' 26.3"	41° 11' 06.6"	62				+++	+	+	+
Cachoeiro	Itapemirim	12	Açude	20° 53' 06.6"	41° 16' 21.5"	213	88,55	19,54	30,05	+++	++	++++	++++
Muqui	Itapemirim	13	Corrego Realeza (São Gabriel da Palha)	20° 53' 53.3"	41° 16' 36.6"	214	88,66	18,35	29,24	++++	+++	+++	++++
	Itabapoana												
Guacui	Itapemirim	14	Corrego	20° 46' 30.4"	41° 40' 00.5"	588	102	16,06	27,66	++++	+++	++	++++
Muniz Freire	Itapemirim	15	Córrego	20° 27' 39.9"	41° 25' 04.0"	539	100,07	14,28	26,8	++++	+++	+++ +	++++
Mimoso do Sul	Itapemirim Itabapoana	16	Rio Itabapoana	20° 03' 50.7"	41° 21' 46.9"	61	88,66	18,35	29,24	++++	+++	++	++
		17	Rio	20° 03' 37.4"	41° 21' 35.2"	66				+++	+++	+++	++
Vargem Alta	Itapemirim	18	Rio	20° 40' 25.3"	41° 00' 34.8"	612	90,87	18,30	29,28	+++			+
Castelo	Itapemirim	19	Rio Itapemirim	20° 45' 08.9"	41° 11' 14.3"	74	96,41	14,74	27,21	+++	+++	+++	+++
Jerônimo Monteiro	Itapemirim	20	Córrego	20° 47' 43.5"	41° 24' 15.6"	122	96,75	16,15	27,87	+++	+++	+++	++++
Alegre	Itapemirim	21	Córrego	20° 46' 06.1"	41° 26' 17.2"	121	96,7583	16,1583	27,875	++++	++++	++	++++
Alegre	Itapemirim	22	Baias EAFA	20° 45' 54.5"	41° 27' 19.6"	125				++++	-	-	++++

Moluscos: +++++ = Alta incidência (> 50 caramujos) // +++ = Média incidência (10 =Caramujos =50) // + = Baixa Incidência (< 10 Caramujos) // = -Ausência.

Meio Ambiente: +++++ = Alta incidência //+++ = Média incidência// + = Baixa Incidência // = -Ausência. **L:** latitude sul; **O:** latitude oeste; **A:** Altura relativa ao nível do mar; **IPV:** Índice Pluviométrico Médio.

* Dados obtidos da média anual do período de 1961 a 1990 adaptado do site: www.tempoagora.com.br

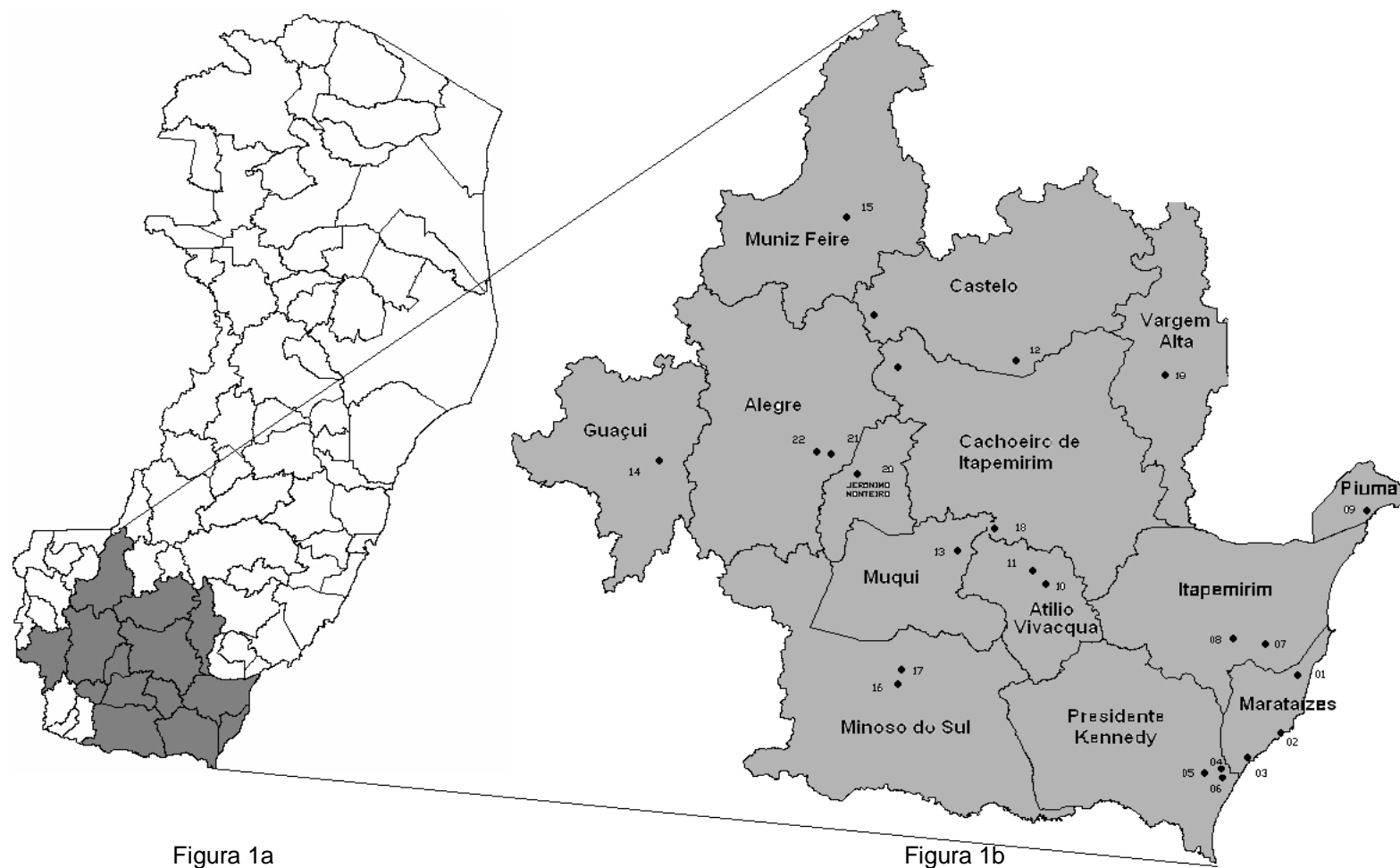


Figura 1a: Mapa do estado do Espírito Santo. Figura 1 b: Carta malacológica para moluscos do gênero *Lymnaea* na Mesorregião Sul do estado do Espírito Santo. Presença de *L. columella*: **2 e 3.** Marataízes; **5 e 6.** Presidente Kennedy; **7 e 8.** Vila do Itapemirim; **9.** Piúma; **11.** Atílio **Vivacqua**; **12.** Cachoeiro do Itapemirim; **13.** Muqui; **14.** Guaçuí; **15.** Muniz Freire; **16 e 17.** Mimoso do Sul; **18.** Castelo; **19.** Vargem Alta; **20.** Jerônimo Monteiro; **e, 21 e 22.** Alegre.

PARAENSE (1983) observou populações de moluscos da espécie *L. viatrix* em regiões elevadas de Belo Horizonte - Brasil, bem como *L. columella* em regiões próximas a Cordilheira do Andes - Equador. Esses dados demonstram que mesmo em altitudes elevadas, existem condições de sobrevivência para moluscos do gênero *Lymnaea*. Os resultados obtidos neste estudo corroboram com esses achados, pois evidenciam a presença de *L. columella* em altitudes elevadas, como no município de Guaçuí (588m), pertencentes à região da Serra do Caparaó e o município de Vargem Alta (612m), pertencente à região serrana do Estado do Espírito Santo.

Nos municípios analisados, foi observado esta dispersão do hospedeiro intermediário da fasciolose em diferentes condições climáticas, sendo encontrado moluscos da espécie *L. columella* em todas as áreas analisadas, tanto em municípios com temperaturas médias baixas como Muniz Freire (Temperatura média máxima de 26,8 °C e temperatura média mínima de 14,28 °C), como em municípios com elevadas temperaturas médias, como Cachoeiro do Itapemirim (Temperatura média máxima 30,05°C e temperatura média mínima de 19,54 °C). Tais descrições revelam que mesmo em diferentes temperaturas, nota-se a presença do molusco, e, portanto, estes resultados estão em concordância com os estudos de MAS-COMA e colaboradores (1999), onde foi avaliada a capacidade desta espécie colonizar com êxito condições extremas de altitudes e temperaturas, criando sabidamente estratégias de adaptação, as quais permitem a manutenção do ciclo do parasito.

Embora o estudo tenha sido realizado em uma área caracterizada como regional, trabalhos têm demonstrado que na América do Sul, os países Bolívia, Chile e Peru são caracterizados como áreas hiper-endêmicas para fasciolose hepática (ALCAINO, 1990; APT et al, 1993), sendo que Equador, Colômbia e Venezuela apresentam focos da doença (ALCAINO et al., 1993).

De acordo com OLIVEIRA e SPÓSITO FILHA (2009), a população de moluscos do gênero *Lymnaea* aumenta durante as estações chuvosas e diminui com temperaturas baixas nos períodos de seca; contudo os moluscos são capazes de sobreviver na lama seca durante vários meses, resistindo às baixas temperaturas. MENDES (2006) descreveu que os ovos de fasciola eclodem em áreas úmidas ou alagadiças com temperatura acima de 10°C. Estes dados permitem

correlacionar a elevada freqüência de casos de fasciolose na região do sul do estado à ocorrência de temperaturas adequadas a distribuição da doença, uma vez que a temperatura média da região apresenta-se em torno de 20 a 30° C.

Em estudo realizado por LIMA e colaboradores (2009), foi correlacionado o aumento da prevalência da infecção natural por *F. hepatica* em 13 municípios de Minas Gerais com a ocorrência de áreas alagadas e a presença de moluscos infectados, indicando que tal fato favoreceu a dispersão dos mesmos. Esses achados corroboram como nosso estudo, uma vez que os municípios avaliados apresentam elevado índice pluviométrico (Tabela 1), o que ocasiona freqüentes inundações no período do verão, o que possivelmente facilitou a dispersão dos moluscos, que foram encontrados aderidos à vegetação e em períodos chuvosos aderidos as encostas de áreas alagadas, em águas pouco correntes.

OLIVEIRA (2008) descreveu, que moluscos da espécie *L. columella* encontrados em municípios no Estado de Minas Gerais, normalmente estavam associados a plantas aquáticas (*Heterenthera reniformes*) e gramíneas (*Brachiara decumbens*) crescentes as margens de reservatórios e de riachos com pouco volume d'água, em áreas de curvas e formação de remansos com água corrente lenta, logo abaixo das plantas aquáticas, aderido em suas hastes e folhas ou enterrados na terra fina. Vale ressaltar que ABILIO e WATANABE (1998) registraram a ocorrência de *L. columella* associado à macrófitas aquáticas no estado da Paraíba, confirmando a aderência dos moluscos a plantas aquáticas.

Considerando tais descrições, ressalta-se que algumas características geográficas da Mesorregião Sul Espírito-Santense, tais como: clima favorável, presença de áreas alagadas e vegetação abundante, estariam influenciando diretamente na dispersão de hospedeiros intermediários, facilitando o desenvolvimento do ciclo do parasito.

Durante o trabalho malacológico, os moluscos foram classificados tendo como base algumas características morfológicas, como forma, tamanho e coloração das conchas, conforme descrito por PARAENSE (1983). Essas análises nos direcionaram para a espécie *L. columella*.

Nos últimos anos, diversas técnicas de Biologia Molecular vêm sendo utilizadas para a identificação de moluscos do gênero *Lymnaea*, permitindo

estabelecer o perfil genético característico de cada espécie (VARGAS et al, 2003; PAZ-SILVA et al, 2004). A técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem sido aplicada com sucesso para a identificação de diversos organismos, por se tratar de um método molecular simples, eficiente e rápido, contribuindo com diversos estudos morfológicos para a correta identificação de moluscos, sendo que análises sequenciais do DNA nuclear ribossomal (rDNA) tem contribuído significativamente para a diferenciação entre moluscos do gênero *Lymnaea* (VIDIGAL et al., 2000, CALDEIRA et al., 2000, CARVALHO et al., 2001).

Os oligos iniciadores utilizados na PCR para a região ITS1: ITS1r e ETTS2 se ligam, respectivamente na porção final e conservada do gene ribossomal 5.8S e 18S, respectivamente, e direcionam a amplificação de um fragmento de aproximadamente 600 pares de bases (pb), perfil característico de moluscos do gênero *Lymnaea*. Esta região apresenta sítios de restrições específicos para as enzimas AluI, MspI, HpaII, RsaI and DdeI, e revelou padrões específicos para as espécies *L. columella* e *L. diaphana*, ressaltando-se que no caso da espécie *L. viatrix* não foi observado um padrão de restrição característico com as enzimas (CARVALHO et al, 2004). Após análise pela PCR, foi observado um fragmento de aproximadamente 600 pb para todas as amostras analisadas dos 14 municípios, (Figura 2). Em seguida, o fragmento foi tratado com a enzima de restrição *DdeI*, revelando um padrão de restrição característico para a espécie *L. columella*, com fragmentos de aproximadamente 400 e 250 pb (Figura 3).

Assim, esses dados, confirmam a presença de moluscos da espécie *L. columella* nos municípios avaliados. Além disto, a posição geográfica da área analisada apresenta duas das três bacias hidrográficas mais relevantes do estado, que conforme critérios de vizinhança estabelecem relações com estados considerados endêmicos para a fasciolose hepática (SERRA-FREIRE, 1995; GOMES et al, 2002; PILE et al, 2001), propiciando a disseminação desta parasitose. A bacia do rio Itabapoana, que banha o Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro, e, a do rio Itapemirim, que banha Minas Gerais e a região do sul do estado do Espírito Santo, tornam a região favorável à dispersão do molusco para todo o território sul capixaba.

Assim, este é o primeiro registro da presença de moluscos da espécie *L. columella* em municípios do sul do estado do Espírito Santo, proporcionando uma carta malacológica local (Figura 1 b).

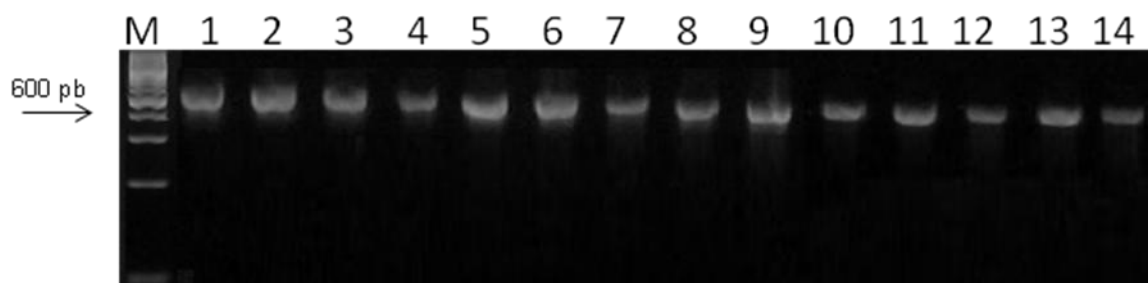


Figura 2: Gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo (05 mg/mL) referente a amplificação do fragmento de aproximadamente 600 pares de bases da primeira região interna ribossomal do DNA- ITS1 de *Lymnaea ssp.*, coletados em diferentes municípios da Mesoregião Sul Espírito-Santense. M: Marcador de peso molecular 100 pares de bases (pb). As colunas 1 - 14 representam respectivamente os municípios onde ocorreram as coletas. 1: Alegre; 2: Atilio Vivácqua; 3: Cachoeiro de Itapemirim; 4: Castelo; 5: Itapemirim; 6: Guaçuí; 7: Jerônimo Monteiro; 8: Marataízes; 9: Mimoso do Sul; 10: Muniz Freire; 11: Muqui; 12: Presidente Kennedy; 13: Piúma; 14: Vargem Alta.

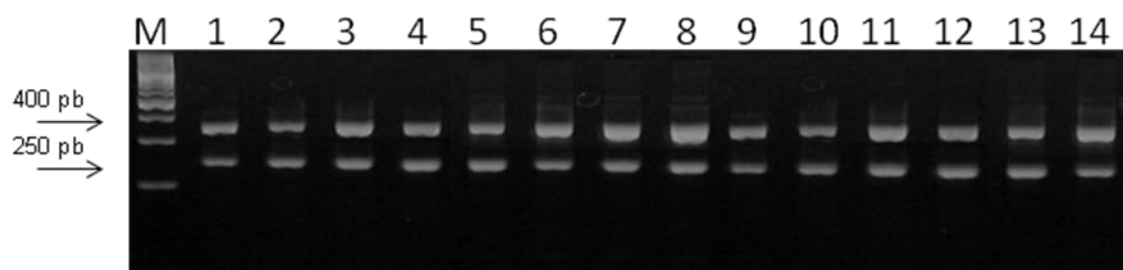


Figura 3: Gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo (05 mg/mL) referente ao perfis de restrição de aproximadamente 400 e 250 pares de bases (pb) (PCR-RFLP) da região ribossomal ITS 1, característico para *Lymnaea columella*, obtido da digestão do fragmento de 600 pb (produto amplificado da primeira região interna do DNAr), utilizando a enzima *DdeI*. M: Marcador de peso molecular 100 pb. 1 - 14: municípios da Mesoregião Sul Espírito-Santense, onde ocorreram as coletas. 1: Alegre; 2: Atilio Vivácqua; 3: Cachoeiro de Itapemirim; 4: Castelo; 5: Itapemirim; 6: Guaçuí; 7: Jerônimo Monteiro; 8: Marataízes; 9: Mimoso do Sul; 10: Muniz Freire; 11: Muqui; 12: Presidente Kennedy; 13: Piúma; 14: Vargem Alta.

5.6. CONCLUSÕES

A região analisada demonstra que a área apresenta moluscos da espécie *Lymnaea columella*, sendo propícia ao desenvolvimento do ciclo da fasciolose hepática, por possuir os fatores climáticos e pluviométricos favoráveis a reprodução e dispersão dos moluscos desta espécie.

5.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABÍLIO, F.J.P.; WATANABE, T. Ocorrência de *Lymnaea columella* (Gastropoda: Lymnaeidae), hospedeiro intermediário da *Fasciola hepatica*, para o Estado da Paraíba, Brasil. **Revista de Saúde Pública**. v. 32, p. 185-186, 1998.

ALCAÍNO, H. Epidemiology of fascioliasis in Chile. In: R. EHRLICH, R.; NIETO, A.; YARZABÁL, L. **Basic Research in Helminthiasis**. Ediciones Logos - Montevideo, p. 11-30, 1990.

ALCAÍNO, H.; VEJA, F.; GORMAN, T. Epidemiología de la fasciolosis hepática en la VII región Chile. **Parasitología al Día**. v. 17, p. 99–106, 1993.

APT, W.; AGUILERA, X.; VEJA, F.; ALCAÍNO, H.; ZULANTAY, I.; APT, P.; GONZÁLEZ, V.; RETAMAL, C.; RODRÍGUEZ, J.; SANDOVAL, J.P. Prevalência de fascioliasis en humanos, caballos, cerdos y conejos silvestres, en tres provincias de Chile. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**. v. 115, p.5, 1993.

CALDEIRA, R.L.; VIDIGAL, T.H.D.A.; MATINELLA, L.; SIMPSON, A.J.G.; CARVALHO, O.S. Identification of Planorbids from Venezuela by Polymerase Chain Reaction Amplification and Restriction Fragment Length Polymorphism of Internal Transcriber Spacer of the RNA Ribosomal Gene. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p.171-177, 2000.

CARVALHO, O.S.; CALDEIRA, R.L.; SIMPSON, A.J.G.; VIDIGAL, T.H.D.A. Genetic variability and molecular identification of Brazilian *Biomphalaria* species (Mollusca: Planorbidae). **Parasitology**. v. 123, p. 197- 209, 2001.

CARVALHO, S.M.; CARDOSO, P.C.M.; LIRA, P.M. The use of the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism technique associated with the classical morphology for characterization of *Lymnaea columella*, *L. viatrix*, and *L. diaphana* (Mollusca: Lymnaeidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 99, p. 503-507, 2004.

CORAL, R.P.; MASTALIR, E.T.; MASTALIR, F.P. Retirada de *Fasciola hepatica* da via biliar principal por coledocoscopia. **Revista Col. Bras. Cir.** v. 34, p. 69-71, 2007.

ECHEVARRIA, F. Fasciolose. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.** v. 13, s. 1, 2004.

FARIA, R.N.; CURY, M.C.; LIMA, W.S. Concordância entre duas técnicas corpoparasitológicas para o diagnóstico de *Fasciola hepatica* em bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.** v.60, p.1023-1025, 2008.

FRAGA, J.C.L. Incidência de fasciolose hepática em bovinos abatidos no sul do estado do Espírito Santo. Monografia de pós-graduação - Instituto Qualittas, 2008.

FUENTES, M. V. Proposal of a geographic information system for modeling zoonotic fasciolosis transmission in the Andes. **Parasitologia Latinoamericana.** v. 59, p. 51-55, 2004.

GOMES, F.F.; OLIVEIRA, F.C.R.; PILE, E.A.; LOPES, C.W.G. Estabelecimento de foco de fasciolose hepática em propriedade do município de Campos dos Goytacazes no estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.** v. 11, p. 53-56, 2002.

GONZALES, J.C.; SANCHEZ, V.M.; THOMÉ, J.W.; GONÇALVES, P.C.; OLIVEIRA, C.M.B. *Lymnaea columella* Hospedeiro Intermediário de *Fasciola hepatica* (Lin. 1758) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS.** v. 2, p. 37-40, 1974.

GORMAN, T.; SANCHEZ, R.; FREDES, F.; ALCAINO, H. Inmunodiagnostico de fasciolosis bovina mediante elisa y western blot. **Parasitologia al dia.** v. 22, p.1-2, 1998.

KANE, R.A.; ROLLINSON, D. Repetitive sequences in the ribosomal DNA internal transcribed spacer of *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma intercalatum* and *Schistosoma mattheii*. **Molecular Biology Parasitology**. v. 63, p. 153-156, 1994.

KLOOS H.; PASSOS, L.K.J.; LOVERDE, P.; CORREA OLIVEIRA, R.; GAZZINELLI, A. Distribution and *Schistosoma mansoni* infection of *Biomphalaria glabrata* in different habitats in a rural area in the Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil: environmental and epidemiological aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 99, p. 673-681, 2004.

LIMA, W.S.; SOARES, L.R.M.; BARÇANTE, T.A.; GUIMARAES, M.P.; BARÇANTE, J.M.P. Occurrence of *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) infection in Brazilian cattle of Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 18, p. 27-30, 2009.

MAS-COMA, M.S.; ESTEBAN, J.G.; BARGUES, M.D. Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. **Bull WHO**. v. 77, p. 340-346, 1999.

MATTOS, M.J.T.; CUNHA, F.O.V.; MARQUES, S.M.T. Comparação de duas técnicas parasitológicas na identificação de ovos de *Fasciola hepatica*. **Revista da FZVA**. v. 16, p. 105-112, 2009.

MENDES, E.A. Comportamento e desenvolvimento de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) de bovinos naturalmente infectados em sagüi (*Callithrix penicillata*) e gerbil (*Meriones unguiculatus*). Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Programa de Pós-graduação em Parasitologia Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

MÜLLER, G.; LARA, S.I.M.; SILVEIRA, J.P. Acompanhamento laboratorial do ciclo biológico de *Lymnaea viatrix*, hospedeiro intermediário de *Fasciola hepatica*. **Revista Brasileira de Agrociência**. v. 4, p. 172-176, 1998.

OLIVEIRA, S.M.; SPÓSITO FILHA, E. DIVULGAÇÃO TÉCNICA: FASCIIOLOSE HEPÁTICA. **Biológico**. v. 71, p. 5-7, 2009.

PARAENSE, W.L.; CORRÊA, L.R. Unsusceptibility of *Biomphalaria occidentalis* to infection with a strain of *Schistosoma mansoni*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 77, p. 55–58, 1982.

PARAENSE, W.L. *Lymnaea columella* in northern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 78, p. 477–482, 1983.

PAZ - SILVA, A.; HILLYER, G.V.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; RODRÍGUES-MEDINA, J.R.; ARIAS, M. MORRONDO, P.; DÍEZ – BAÑOS, P. Isolation, Identification and expression of a *Fasciola hepática* cDNA encoding a 2,9 – Kda recombinant protein for the diagnosis of ovine fasciolosis. **Parasitology Research**.2004.

PEREZ, M.P.; FERNANDEZ, L.D.; GUIRADO, O.A.G.; CAPOTE, R.V.; AGUILAR, G.G. Actividad molusquicida del Paraiso (*Melia azedarach* L.) (Meliaceae) sobre *Lymnaea cubensis*, molusco vector de Fasciolosis. **Revista de Saúde Pública**. v. 32, p. 262-266, 1998.

PREPELITCHI, L.; KLEIMAN, F.; PIETROKOVSKY, S.M.; MORIENA, R.A.; RACIOPPI, O.; ALVAREZ, J.; WISNIVESKY-COLLI, C. First Report of *Lymnaea columella* Say, 1817 (Pulmonata: Lymnaeidae) Naturally Infected with *Fasciola hepática* (Linnaeus,1758) (Trematoda: Digenea) in Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 98, p. 889-891, 2003.

PILE, E.; SANTOS, J.A.A.; PASTORELLO, T.; VASCONCELLOS, M. *Fasciola hepática* em búfalos (*Bubalus bubalis*) no município de Maricá, Rio de Janeiro, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 38, p 42-43, 2001.

QUEIROZ, V.S.; LUZ, E.; LEITE, L.C.; CÍRIO, S.M. *Fasciola hepatica* (Trematoda, Fasciolidae): estudo epidemiológico nos municípios de Bocaiúva do Sul e Tunas do Paraná (Brasil). **Acta Biology Parasitology**. v. 31, p. 99-111, 2002.

REZENDE, H.E.B.; ARAÚJO, J.L.B.; GOMES, P.A.C.; NUERNBERG, S.; PIMENTEL NETO, M.; OLIVEIRA, G.P.; MELLO, R.P. Notas sobre duas espécies de *Lymnaea* Lamark, 1799, hospedeiros inter-mediários de *Fasciola hepatica* L, no Estado do Rio de Janeiro (Mollusca, Gastropoda, Basommatophora, Lymnaeidae). **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**. v. 3, p. 21-23, 1973.

RUBEL, D.; PREPELITCHI, L.; KLEIMAN, F.; CARNEVALE, S.; WISNIVESKY-COLLI, C. Estudio del foco en un caso de fasciolosis humana en Neuquen. **MEDICINA**. v. 65, p. 207-212, 2005.

SERRA-FREIRE, N.M.; BORDIN, E.L.; LESSA, C.S.S. et al. Reinvestigação sobre a distribuição da *Fasciola hepatica* no Brasil. **A Hora Veterinária**. v. 1, p.19-21, 1995.

SOUZA, C.P.; MAGALHÃES, K.G.; PASSOS, L.K.J.; SANTOS, G.C.P.; RIBEIRO, F.; KATZ, N. Aspects of the Maintenance of the Life Cycle of *Fasciola hepatica* in *Lymnaea columella* in Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 97, p. 407-410, 2002.

TOSTES, R.A.; SANTARÉM, V.A.; ALBERTI, H. Casos Autóctones de *Fasciola hepatica* na Região de Presidente Prudente, São Paulo, Brasil. **Revista Ciência Rural**. v. 34, p. 961-962, 2004.

VARGAS, D; VEJA, M.; GONZÁLEZ, C.G. Aproximación a una caracterización molecular de *Fasciola hepatica* por la técnica RAPDs – PCR. **Parasitologia Latinoamericana**. v. 58, p. 11- 16, 2003.

VIDIGAL, T.H.D.A.; KISSINGER, J.C.; CALDEIRA, R.L.; PIRES, E.C.R.; MONTEIRO, E.; SIMPSON, A.J.G.; CARVALHO, O.S. Phylogenetic relationships among Brazilian *Biomphalaria* species (Mollusca: Planorbidae) based upon analysis of ribosomal ITS2 sequences. **Parasitology**. v. 121, p. 611-620, 2000.

VIDIGAL, T.H.D.A.; MAGALHÃES, K.G.; CARVALHO, O.S. Polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis of the ITS2 region for differentiation of Brazilian *Biomphalaria* intermediate hosts of *Schistosoma mansoni*. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 37, p. 351 - 353, 2004.

CAPÍTULO 4

Análise da eficácia de extratos fitoterápicos compostos de *Melia azedarach* var *azedarach*, *Azadirachta indica* *Azedarach* Juss, e *Cymbopogon winterianus* como agentes moluscidas para moluscos da espécie *Lymnaea columella*.

6. Cap. 4. Análise da eficácia de extratos fitoterápicos compostos de *Melia azedarach* var *azedarach*, *Azadirachta indica* *Azedarach* Juss, e *Cymbopogon winterianus* como agentes moluscicidas para moluscos da espécie *Lymnaea columella*.

6.1. RESUMO

A preocupação com o desenvolvimento de resistência dos caramujos a substâncias moluscicidas e sua baixa seletividade ocasionam a busca de substâncias biodegradáveis de origem vegetal. Objetivou-se com este estudo analisar a eficácia de extratos fitoterápicos compostos de *Melia azedarach* var *azedarach*, *Azadirachta indica* A. Juss, e *Cymbopogon winterianus* como agentes moluscicidas. Foram testados extratos hidroalcoólicos, em acetato de etila e hexânicos extraídos de caules e folhas dos vegetais cinamomo, nim e citronela como possíveis agentes moluscicidas para a espécie *L. columella*, hospedeiro intermediário da fasciolose hepática. Os extratos de nim, cinamomo e citronela demonstraram-se eficazes em baixas concentrações, no controle dos moluscos analisados, diluídos em etanol, acetato de etila e hexano, e, inibiram a ovoposição dos moluscos apresentando como doses ideais pelo vigente estudo as concentrações de 50 µg/ml para os extratos obtidos de nim, cinamomo e citronela diluídos em etanol e acetato de etila e nas concentrações de 100 µg/ml para os extratos obtidos de nim, cinamomo e citronela diluídos em hexano. Todos os extratos impediram a reprodução, e, por conseguinte, a disseminação da fasciolose hepática.

Palavras-chave: moluscicidas, nim, citronela, cinamomo, *Lymnaea columella*.

Analysis of the effectiveness of herbal compound extracts of *Melia azedarach* var *azedarach*, *Azadirachta indica* *Azedarach* Juss, and *Cymbopogon winterianus* as molluscicides agents for mollusks of the specie *Lymnaea columella*.

6.2. ABSTRACT

The concern about the development of tolerance by snails to molluscicides and the low selectivity of these substances show more research on vegetable biodegradable molluscicides is required. The objective of this study was to analyze the effectiveness of herbal compound extracts of *Melia azedarach* var *azedarach*, *Azadirachta indica* A. Juss, and *Cymbopogon winterianus* as potential molluscicides. Alcoholic, ethyl acetate and hexane extracts, extracted from stems and leaves of plants chinaberry, neem and citronella were tested as potential molluscicides drugs against *Lymnaea columella*, which is the intermediate host of fasciolosis liver. The low concentration extracts from neem, citronella and chinaberry, diluted in ethanol, ethyl acetate and hexane, were shown to be effective in controlling snails and inhibited the oviposition of shellfish, preventing its reproduction, and therefore the spread of these parasitic diseases.

Keywords: molluscicides, neem, citronella, chinaberry, *Lymnaea columella*.

6.3. INTRODUÇÃO

Drogas moluscidas acarretam prejuízos ao ambiente, e a recolonização das áreas afetadas tornam o processo de aplicação dispendioso e operacionalmente difícil de ser realizado. A preocupação com o desenvolvimento de resistência dos caramujos ao uso destas substâncias e a baixa seletividade que apresentam eleva a procura por substâncias facilmente biodegradáveis, aumentando o interesse pelo uso de moluscidas de origem vegetal. Além disto, o uso de plantas medicinais sob a forma de extratos fitoterápicos com atividade moluscida podem representar uma alternativa economicamente viável (PILE et al, 2001a; GASPAROTTO JR. et al, 2005; SILVA et al, 2008).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) tem reconhecido algumas plantas com atividade moluscida. A *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (Coroa-de-Cristo) é uma das plantas promissoras para uso como moluscidas fitoterápicos. PILE e colaboradores (2001b), testaram sua aplicação em baixa concentração sob a forma de aspersão e registraram a diminuição da taxa de infecção de animais traçadores. Além disto, outros autores registraram a ação letal do látex da planta, em baixas concentrações, sobre as espécies *B. glabrata*, *B. tenagophila*, *B. straminea*, *B. pfeifferi*, *L. columella* e *Bulinus sp*, como variação mínima do efeito moluscida, além de apresentar pouca ou nenhuma toxidez nas concentrações utilizadas contra diversos animais (VASCONCELOS et al, 1986; MENDES et al, 1992; VASCONCELOS, 1996; VASCONCELOS, 2000; PILE et al, 2001b). A utilização de resina de pina (*Colofonia*) também apresentou resultados satisfatórios como potenciais moluscidas quando testados com *B. havanensis* (JIMÉNEZ, et al, 2008).

Apesar de o Brasil possuir aproximadamente 55.000 espécies de plantas e ser considerado o País com a maior biodiversidade no mundo, são poucas as informações conhecidas sobre a composição química de 99,6% das plantas da flora brasileira (AGNOLIN, 2009).

Considerando a importância da descoberta de novas substâncias que apresentem potencial atividade moluscida, várias espécies vegetais regionais devem ser testadas, sendo que a região do Sul do estado do Espírito Santo, por ser uma área integrante da Mata Atlântica Brasileira, apresenta diversas plantas de

interesse médico e dentre elas destacam-se a *Melia azedarach var azedarach*, a *Cymbopogon winterianus Jowitt* e, a *Cymbopogon winterianus*.

Extratos fitoterápicos de *Melia azedarach var azedarach*, popularmente conhecida como cinamomo, , tem sido objeto de estudo para diversas finalidades, como ação bactericida, fungicida, antiviral, inibição enzimática, ação antitumoral, e, destacando-se principalmente como agente inseticida e antihelmíntico. Extratos de folhas e sementes desta planta contêm cerca de quatro compostos ativos: azadiractina, salanina, meliantról e nimbim (FALBO et al, 2008), apresentando elevada concentração de limonóides e tetranotriterpenóides (ARAÚJO et al, 2009).

A *Azadirachta indica* A. Juss, popularmente conhecida como Nim, trata-se de uma planta pertencente à família Meliaceae, e que apresenta compostos limonóides em sua composição química (DEQUECH et al, 2008; PINTO e LANÇAS, 2010). Seu uso tem sido difundido mundialmente no controle de insetos (DEQUECH et al, 2008). Na Índia, Nim é considerada uma planta medicinal, usada há séculos, com propriedades bactericidas, fungicidas, nematicidas, anti-inflamatória, anti-hiperglicêmica e repelente de insetos, devido aos diversos terpenóides distribuídos nas partes da planta (PINTO e LANÇAS, 2010).

Cymbopogon winterianus Jowitt, popularmente conhecida como citronela demonstra-se eficaz na forma de óleo, como inseticida natural, antimicrobiano frente aos microorganismos: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger wild*; e, com potencial ação fungicida (ROCHA et al, 2000b; BRAUM e BARROS, 2008; OLIVO et al, 2008; ALBUQUERQUE MELO et al, 2009; AGNOLIN, 2009; FALCÃO et al, 2009).

Considerando que até o momento, na literatura pesquisada não foram encontradas a aplicação de cinamomo, nim e de citronela como possíveis drogas moluscidas, e, considerando a elevada aplicabilidade destes vegetais pela variedade de substâncias ativas nos mesmos, bem como, a ampla distribuição destes vegetais e o aumento da disseminação da doença parasitária fasciolose na região do sul do estado do Espírito Santo, e, no Brasil, objetivou-se com este estudo analisar a eficácia de extratos fitoterápicos compostos de *Melia azedarach var azedarach*, *Azadirachta indica* A. Juss, e *Cymbopogon winterianus* como agentes moluscidas.

6.4. MATERIAL E MÉTODOS

PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS

Partes aéreas (Folhas e Caule) das espécies vegetais *Melia azedarach* var *azedarach* (cinamomo), *Azadirachta indica* A. Juss (nim) e *Cymbopogon winterianus* (citronela), cultivadas no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, *Campus Alegre*, foram coletadas “in natura” e secas em estufa de circulação de ar (40°C) até atingirem peso constante. Em seguida o material foi triturado em moinho e armazenado em dessecador até o momento do uso.

A obtenção dos extratos foi realizada de acordo com SILVA e colaboradores (2008) como segue: 30 g de cada material foi submetido à extração com 100 mL de etanol, 100 mL de acetato de etila e 100 mL de hexano em sequência, de acordo com o procedimento descrito. A 30 g do material seco e triturado foram adicionados 100 mL de etanol (PA), e deixado sob agitação constante à temperatura ambiente por 12 horas. Em seguida o extrato foi filtrado, calculado o volume final, e armazenado em frasco âmbar a 4°C. O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção de extrato a partir dos solventes, acetato de etila (PA) e hexano (PA), utilizando como material de partida, o produto sólido retido na filtração anterior. Os extratos foram concentrados em evaporador rotativo até completa eliminação do solvente. O peso do extrato bruto foi determinado, sendo os mesmos acondicionados em frascos âmbar e armazenados em dessecador, até o momento do uso.

TESTES MOLUSCICIDAS

Caramujos da espécie *L. columella*, utilizados nos testes de atividade moluscicida, e ovoposição, foram provenientes de recrias dos moluscos coletados no município de Alegre, região Sul do Estado do Espírito Santo, e mantidos no Laboratório de Malacologia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo – CCA/UFES.

O procedimento descrito abaixo foi realizado em duplicata em três experimentos independentes.

Para os testes, seis moluscos com aproximadamente o mesmo tamanho (8 mm) foram acondicionados individualmente em recipiente de plástico, contendo 2,0 mL de água potável declorada, acrescido de cada extrato (hidroalcoólico, acetato de etila e hexânico), separadamente, diluído em dimetilsulfóxido (DMSO), nas concentrações finais de extrato bruto de 20, 25, 50 e 100 µg/mL. Em seguida, foram monitoradas a motilidade e a viabilidade dos moluscos, no período de duas, seis, doze e vinte e quatro horas, conforme recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2003). Para cada experimento foi feito um controle negativo, constando de cinco moluscos imersos em solução contendo DMSO, na concentração de 20 µg/mL de DMSO puro.

TESTES DE AVALIAÇÃO DE OVOPOSIÇÃO DOS MOLUSCOS EXPOSTOS AOS EXTRATOS MOLUSCICIDAS

O procedimento descrito abaixo foi realizado em duplicata em três experimentos independentes.

Cinco moluscos apresentando tamanhos similares (8 – 10mm) foram acondicionados individualmente em recipiente plástico, contendo 2,0 mL de água potável declorada, acrescido de cada extrato (hidroalcoólico, acetato de etila e hexânico), separadamente, diluídos em DMSO, para as concentrações finais de 20 µg/mL. Os moluscos foram mantidos nestas soluções por um período de 24 horas, sendo em seguida transferidos para recipientes de vidro (aquários com capacidade para um litro), contendo aproximadamente 500 mL de água declorada, para monitoramento da ovoposição, conforme recomendações da OMS (2003), e de acordo com o esquema descrito abaixo: Os moluscos foram divididos em dez grupos, de acordo com a exposição aos extratos. Cada grupo contendo cinco moluscos, sendo: Grupo I - moluscos expostos ao extrato etílico de cinamomo; Grupo II - moluscos expostos ao extrato em acetato de etila de cinamomo; Grupo III - moluscos expostos ao extrato hexânico de cinamomo; Grupo IV - moluscos expostos ao extrato etílico de citronela; Grupo V - moluscos expostos ao extrato em

acetato de etila de citronela; Grupo VI - moluscos expostos ao extrato hexânico de citronela; Grupo VII - moluscos expostos ao extrato etílico de nim; Grupo VIII - moluscos expostos ao extrato em acetato de etila de nim; Grupo IX - moluscos expostos ao extrato hexânico de nim; Grupo X - moluscos expostos a solução aquosa de DMSO (20 µg/mL).

Os moluscos foram mantidos a temperatura ambiente, sob aeração de 12 horas por dia, sendo alimentados com frações diárias de alface desidratada. Foram adicionados aos aquários substratos de isopor, para estimular a ocorrência de ovoposição. Os animais permaneceram no aquário sob tais condições pelo período de 14 dias. No 15^o dia foi realizada a contagem de ovos presentes nos substratos de isopor. Realizou-se o mesmo procedimento com o controle negativo.

6.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização dos extratos hidroalcoólicos, acetato de etila e hexânico, a partir de partes aéreas de nim, cinamomo e citronela, como possíveis agentes moluscidas, se mostraram efetivas nos testes realizados *in vitro*, nas concentrações de 100, 50 e 25 $\mu\text{g/mL}$, como pode ser observado nas tabelas 1, 2 e 3, respectivamente.

A Organização Mundial da Saúde especifica metodologias para testes com moluscidas diversos e recomenda a procura de plantas e produtos vegetais dotados de propriedades moluscidas que possam ser utilizados sem afetar o equilíbrio do meio ambiente (OMS, 1965). Essa metodologia considera que o extrato pode ser classificado como inativo, se levar de 0 a 30% de mortalidade, parcialmente ativo se levar de 40 a 60% de mortalidade e ativo se levar de 70 a 100% de mortalidade aos caramujos, em um período de 24 horas. Entretanto, de acordo com a publicação de 1983 (OMS, 1983), a planta moluscida só deve ser considerada ativa quando obtiver 90% de mortalidade nas concentrações de 20 $\mu\text{g/mL}$ para princípio ativo isolado e 100 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato bruto.

A niclosamida é o moluscida comercialmente disponível recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e provou ser mais efetivo e menos prejudicial ao meio ambiente e à saúde humana do que outros moluscidas inorgânicos ou sintéticos, porém o alto custo de sua aplicação em áreas extensas torna proibitivo o seu uso na maioria dos países em desenvolvimento. Assim, a busca por moluscidas naturais visa um novo destaque com a obtenção de um produto alternativo mais econômico, barato, biodegradável, seguro e disponível localmente para controle das populações de caramujos (CLARK et al., 1997; OLIVEIRA-FILHO; PAUMGARTTEN, 2000).

Conforme observado na Tabela 1, para os extratos etanólico e acetato de etila confeccionados a base de nim, a dose letal 100 (DL100), foi obtida na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ em apenas 2 horas de exposição dos moluscos. A concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ demonstrou dose letal de 50% (DL50), em um período de exposição de 12 horas para o extrato hidroalcoólico, e 6 horas para o extrato acetato de etila, não acarretando a morte de mais nenhum molusco no período de 24 horas. Para esses

extratos não foi observada DL90, nas concentrações testadas. Quando comparados aos resultados obtidos com o extrato hexânico, podemos notar que a DL100, DL90 e DL50, foram alcançadas nas concentrações de 100 µg/mL em 6 horas, 50 µg/mL em 12 horas e 25 µg/mL em 24 horas. Esses dados revelam que o extrato hexânico, propiciou a obtenção de DL100 e DL50, porém em tempos superiores aos obtidos na presença dos outros extratos.

Dos compostos ativos isolados do nim destacam-se a salanina, azadiractina, meliantról, azadirona, gedunina, nimbolina, entre outros, sendo que a azadiractina é considerada um dos compostos mais potentes (MARTINEZ, 2002). Foi isolada pela primeira vez por BUTTERWORTH e MORGAN (1968), e está intimamente associada à ação supressora de apetite e inibidora de crescimento em insetos, além de repelência, interferência na metamorfose, esterilidade e anormalidades anatômicas (MARTINEZ e EMDEN, 2001), sendo encontrada nas sementes, e em menor quantidade na casca e nas folhas (MORDUE e NISBET, 2000).

Um dado de extrema relevância é que produtos derivados do nim têm vantagem de ser praticamente não tóxicos ao homem e ser rapidamente degradados no solo e nas plantas (ISMAN, 2006). Esses compostos apresentam elevado potencial no controle de pragas, e, toxicidade extremamente baixa aos vertebrados, sendo praticamente inócuos, causando baixo impacto ao ambiente. O plantio do nim está crescendo rapidamente no Brasil, com o objetivo de exploração da madeira e também para a produção de folhas e frutos, de onde poderá ser retirada a matéria prima para produtos de uso médico e veterinário (MARTINEZ, 2002).

Tabela 1. Avaliação dos efeitos de mortalidade dos moluscos da espécie *L. columella* expostos aos extratos de nim obtidos em etanol, acetato de etila e hexano diluídos em DMSO.

Extrato de nim	Concentração (µg/ml)	Tempo de exposição (horas) - taxa de mortalidade - % -				Taxa de Mortalidade*
		2h	6h	12h	24h	48h
Etanólico	100	100	—	—	—	100
	50	100	0	—	—	100
	25	—	—	50	—	50
	20	—	—	—	—	0
Acetato de etila	100	100	—	—	—	100
	50	100	—	—	—	100
	25	—	50	—	—	—
	20	—	—	—	—	—
Hexânico	100	—	100	—	—	100
	50	—	—	90	100	100
	25	—	—	—	50	50
	20	—	—	—	—	—

— = (não observado) // *= após 24hs de imersão em água potável // **=taxa de mortalidade média referente a 36 moluscos

Conforme observado na tabela 2, para o extrato etanólico elaborado a base de cinamomo, a DL100, foi obtida nas concentrações de 100 µg/mL e 50 µg/mL em apenas 2 horas de exposição dos moluscos. A concentração de 25 µg/mL demonstrou-se como DL50, em um período de exposição de 12 horas, sendo letal para os demais moluscos no período de 24 horas. No caso do extrato de acetato de etila a base do cinamomo, também obteve-se a dose letal 100 (DL100), na concentração de 50 µg/mL em apenas 2 horas de exposição dos moluscos, assim como, a concentração de 25 µg/mL demonstrou DL50 em um período de exposição de 12 horas. Entretanto, diferente do extrato etanólico, apresentou-se letal para os demais moluscos no período de 24 horas. Para ambos os extratos não foi observada DL90, nas concentrações testadas. Em relação aos resultados obtidos com o extrato hexânico a base de cinamomo, pôde-se observar que a DL100, foi alcançada nas concentrações de 100 µg/mL em 6 horas e na concentração de 50 µg/mL em 12 horas, e, a DL50, foi obtida na concentração de 25 µg/mL no período de 24 horas.

Tabela 2. Avaliação do efeito de mortalidade dos moluscos da espécie *L. columella* expostos aos extratos de cinamomo obtidos em etanol, acetato de etila e hexano diluídos em DMSO.

Extrato de cinamomo	Concentração (µg/ml)	Tempo de exposição (horas) / taxa de mortalidade (%)				Taxa de Mortalidade*
		2	6h	12	24	48h
Etanólico	100	100	—	—	—	100
	50	100	—	—	—	100
	25	—	10	50	100	100
	20	—	—	—	—	—
Acetato de etila	100	100	—	—	—	100
	50	100	—	—	—	100
	25	—	50	—	—	50
	20	—	—	—	—	—
Hexânico	100	—	100	—	—	100
	50	—	—	100	—	100
	25	—	—	—	60	60
	20	—	—	—	—	—

— = (não observado) //

*= após 24hs de imersão em água potável // **=taxa de mortalidade média referente a 36 moluscos

Esses dados demonstram que, assim como no extrato hexânico cuja base fitoterápica utilizada foi o nim, a obtenção de DL100 e DL50 para o extrato hexânico a base de cinamomo, ocorreu em períodos inferiores aos dos extratos etanólico e acetato de etila, como observado nas Tabelas 1 e 2.

Testes *in vitro* realizados com extratos ricos em taninos ou com taninos puros de *Melia azedarach* têm identificado diversas atividades biológicas dessa classe de substâncias (ARAÚJO et al, 2009). Bioensaios em laboratórios utilizando o extrato alcoólico de cinamomo foi testado sobre o principal vetor da fasciolose em Cuba, o molusco da espécie *L. cubensis*, demonstrando a possível utilização desta planta como agente moluscicida (PEREZ et al, 1998). Assim, nossos resultados estão de acordo com os obtidos neste estudo, reforçando a possível uso dessa planta na produção de um agente moluscicida, para moluscos o gênero *Lymnaea*.

Com relação aos testes realizados a partir de extratos de partes aéreas de citronela, como observado na tabela 3, o etanólico apresentou DL100 na concentração de 50 µg/mL em apenas 2 horas de exposição dos moluscos. Na concentração de 25 µg/mL foi obtida a DL50, em um período de exposição de 12 horas, e a DL 100 no período de 24 horas. Para o extrato acetato de etila a DL100 também foi obtida no período de 2 horas de exposição dos moluscos a 50 µg/mL. Entretanto não foi observado a DL50, para esse extrato, na concentração de 25

$\mu\text{g/mL}$, durante os períodos de análise. Sendo que a DL100 ocorreu no período de seis horas de exposição ao extrato. Ressalta-se, que assim como os demais extratos obtidos em etanol e acetato de etila, não foram observadas DL90, nas concentrações testadas.

No caso do extrato hexânico a base de citronela os resultados foram semelhantes aos obtidos pelo extrato hexânico a base de cinamomo (Tabela 2), cuja DL100 foi alcançada na concentração de $100 \mu\text{g/mL}$ no período de 6 horas e na concentração de $50 \mu\text{g/mL}$ em um período de 12 horas. A DL50 foi obtida na concentração de $25 \mu\text{g/mL}$ em 24 horas de exposição (tabela 3). Esses dados evidenciam uma relação dose/resposta, para o extrato hexânico de citronela.

Tabela 3. Avaliação dos efeitos de mortalidade dos moluscos da espécie *L. columella* expostos aos extratos de citronela obtidos em etanol, acetato de etila e hexano diluídos em DMSO.

Extrato de citronela	Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Tempo de exposição (horas) / taxa de mortalidade (%)**				Taxa de Mortalidade*
		2	6	12	24	48h
Etanólico	100	100	—	—	—	100
	50	100	—	—	—	100
	25	—	—	60	100	100
	20	—	—	—	—	—
Acetato de etila	100	100	—	—	—	100
	50	100	—	—	—	100
	25	—	100	—	—	100
	20	—	—	—	—	—
Hexânico	100	—	100	—	—	100
	50	—	—	100	—	100
	25	—	—	—	50	50
	20	—	—	—	—	0

— = (não observado) //

*= após 24hs de imersão em água potável // **=taxa de mortalidade média referente a 36 moluscos

Segundo MCCULLOUGH e colaboradores (1980), o envenenamento por moluscicida pode provocar a ruptura do equilíbrio osmótico do molusco, que está sob controle neuro-hormonal. Conseqüentemente pode ser observada a retração da massa cefalopodal para dentro da concha com a liberação de hemolinfa ou a projeção anormal dessa massa, para fora da concha. Em conformidade com o autor, a maioria dos moluscos mortos, após exposição aos diferentes extratos, tiveram retração corporoal (dados não apresentados), o que evidencia a possível ruptura do equilíbrio osmótico.

Após as análises de letalidade total (DL100), pode-se constatar que todos os extratos testados demonstraram eficácia, estando de acordo com os parâmetros preconizados pela OMS (1983), levando em consideração concentração e tempo de exposição. Embora esse fato tenha sido observado, destacaram-se como os extratos mais promissores, os apresentados na Tabela 4. Os mesmos foram escolhidos, tendo como parâmetros a menor concentração que leva a DL100, no menor período de exposição.

Tabela 4. Doses Letais ideais dos extratos de nim, cinamomo e citronela no controle de moluscos da espécie *L. columella*.

Extrato	Diluentes	DL 100 ($\mu\text{g/ml}$)	Período de exposição (horas)
Nim	Etanólico	50	2
	Acetato de etila	50	2
	Hexânico	100	6
		50	24
Cinamomo	Etanólico	50	2
		25	24
	Acetato de etila	50	2
	Hexânico	100	6
		50	12
		50	2
Citronela	Etanólico	50	2
		25	24
	Acetato de etila	50	2
		25	6
	Hexânico	100	6
		50	12

Uma importante característica para avaliar a eficácia de um agente moluscicida seria a sua capacidade de impedir ou matar as desovas de moluscos (TANG et al., 1995). Assim, foi avaliado a ovoposição em presença dos diferentes extratos, na maior concentração não letal para os moluscos. Como observado na tabela 5, todos os extratos interferiram com o processo de ovoposição, não sendo observada desova dentro do período de 15 dias após a exposição. Com relação ao controle negativo, após 7 dias de tratamento, 50% dos moluscos haviam realizado ovoposição, sendo que no período de 15 dias foi observada a postura de 90% dos moluscos.

Tabela 5. Avaliação da ovoposição de moluscos da espécie *L. columella* expostos aos extratos de nim, cinamomo e citronela, obtidos em etanol, acetato de etila e hexano.

Extrato	Diluentes	Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Tempo de exposição (horas) / taxa de ovoposição (%)**		
			24 h	07 ^o dia	15 ^o dia
Nim	Etanol	20 $\mu\text{g/ml}$	24 h	07 ^o dia	15 ^o dia
	Ac. Etila		—	—	—
	Hexano		—	—	—
Cinamomo	Etanol		—	—	—
	Ac. Etila		—	—	—
	Hexano		—	—	—
Citronela	Etanol		—	—	—
	Ac. Etila		—	—	—
	Hexano		—	—	—
Controle Negativo	Água + DMSO	1 $\mu\text{g/mL}$	—	50*	90*

— = (não observado) //

**=taxa de ovoposição média referente a 12 moluscos

Assim, a eficácia da atividade ovicida, aliada a baixa toxicidade, a facilidade do preparo, além da presença abundante do vegetais na região do Sul do estado do Espírito Santo, fatores considerados essenciais na escolha de um moluscicida ideal, pode-se concluir que os extratos a base de nim, cinamomo e citronela são potentes agentes moluscicidas da espécie *L. columella*, e, portanto, podem ser futuramente utilizados para o controle do hospedeiro intermediário da *Fasciola hepatica*, afim de minimizar as perdas econômicas ocorrentes em regiões endêmicas para fasciolose.

6.6. CONCLUSÕES

A diversidade vegetal demonstra-se promissora na área biomédica, principalmente no controle de doenças parasitárias. O estudo demonstrou que todos os extratos de nim, cinamomo e citronela demonstraram-se eficazes como agentes moluscicidas ao serem empregados no controle de moluscos da espécie *L. columella*.

6.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNOLIN, C.A. Óleo de citronela no controle de ectoparasitas de bovinos. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

ALBUQUERQUE MELO, R.M.C.; ALBUQUERQUE MELO FILHO, P.; SARAIVA CÂMARA, M.P.; GOMES DA CAMARA, C.A.; SANTOS, R.C. Prospecção de óleos vegetais para controle da ramulose do algodoeiro. In: VII Congresso Brasileiro do Algodão. Sustentabilidade da cotonicultura Brasileira e Expansão dos Mercados, Anais... Campina Grande: Embrapa Algodão, p. 1021-1027, 2009.

ARAÚJO, S.A.C.; TEIXEIRA, M.F.S.; DANTAS, T.V.M.; MELO, V.S.P.; LIMA, F.E.S.; RICARTE, A.R.F.; COSTA, E.C.; MIRANDA, A.M. Usos potenciais de *Melia azedarach* L. (meliaceae): um levantamento. **Arquivos do Instituto de Biologia**. v. 76, n.1, p.141-148, 2009.

BRAUM, D.T.; BARROS, L.A. Avaliação *in vitro* da resistência de larvas nematóides com potencial zoonótico ao extrato de citronela. In: XVI Seminário de Iniciação Científica da Universidade Federal de Mato Grosso, **Anais...** Cuiabá. Caderno de Resumos, 2008, p. 32.

BUTTERWORTH, J.H.; MORGAN, E.D. Isolation of a substance that supresses feeding in locusts. **Journal of the Chemical Society**. v.35, p.23-24, 1968.

CLARK, T.E.; APPLETON, C.C.; DREWES, S.E. A semi-quantitative approach to the selection of appropriate candidate plant molluscicides – A South African application. **Journal Ethnopharmacology**. v. 56, p. 1-13, 1997.

DANTAS, D. A.; MAGANHA, M.; BERETTA, T. E.; NOZU, P.; PEREIRA, G. S.; MATIAS, R.; SOLON, S.; RESENDE, U.; KOLLER, W. W.; GOMES, A. Estudo fitoquímico dos frutos de *Melia azedarach* L. (Cinamomo, Meliaceae). In:

ENCONTRO DE PESQUISA E INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIDERP. Campo Grande. *Anais...* Campo Grande: UNIDERP, p. 119-120, 2000.

DEQUECH, S.T.B.; SAUSEN, C.D.; LIMA, C.G.; EGEWARTHII, R. Efeito de extratos de plantas com atividade inseticida no controle de *Microtheca ochroloma* Stal (Col.: Chrysomelidae), em laboratório. **Revista Biotemas**. v. 21. ed. 1, 2008.

DEQUECH, S.T.B.; EGEWARTHII, R.; SAUSEN, C.D.; STURZA, V.S.; RIBEIRO, L.P. Ação de extratos de plantas na oviposição e na mortalidade da traça-das-crucíferas. **Revista Ciência Rural**. v. 39, n.2, p. 551-554, 2009.

FALBO, M.K.; SANDINI, I.E.; ISHIYM H.M.; FÁVARO, J.L.; SANTOS, C.E.; BASTOS, S.; RODIGHERI, D.; GUZZO, D. Atividade anti-helmíntica do fruto da *Melia azedarach* em cordeiros naturalmente infectados com nematódeos gastrintestinais. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 29, p. 881-886, 2008.

FALCÃO, M.A.; PEREIRA, M.A.A.; MILÃO, D. Avaliação da atividade antimicrobiana dos Óleos essenciais de *Cymbopogum winterianus* e *Cymbopogum citratus* pelo método de Bioautografia indireta. **X Salão de Iniciação Científica da PUCRS**, 2009.

FERREIRA, R.; RODRIGUES, A.; CATARINO, A.; MORAES, F. Utilização dos Resíduos Orgânicos de Nim e Citronela no Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *passiflorae* em Maracujazeiro Amarelo. **Revista Brasileira de Agroecologia**. v. 4, p. 893-896, 2009.

GASPAROTTO JR, A.; BRENZAN, M.A.; PILOTO, I.C.; CORTEZ, D.A.C.; NAKAMURA, C.V.; FILHO, B.P.D.; FILHO, E.R.; FERREIRA, A.G. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade moluscicida do *calophyllum brasiliense* camb (clusiaceae). **Química Nova**. v. 28, p. 575-578, 2005.

ISMAN, M.B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**. v.51, p.45-66, 2006.

JIMÉNEZ, Y.H.; MORALES, R.E.T.; NODA, J.S.; PERERA, A.A.V.; GUTIÉRREZ, A.; TIOMNOVA, O.T.; DÍAZ, A.M. Estudios de laboratorio sobre la acción molusquicida de la resina de pino, colofonia, sobre *Biomphalaria havanensis*. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, V. 60, ed.2, p.187-9, 2008.

MARTINEZ, S.S.; EMDEN, V.H.F. Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) caused by azadirachtin. **Neotropical Entomology**. v. 30, p. 113-125, 2001.

MARTINEZ, S. S. O Nim – *Azadirachta indica* – natureza, usos múltiplos, produção. IAPAR, p. 142, 2002.

MCCULLOUGH, F. S.; GAYRAL, P.; DUNCAN, J.; CHRISTIE, J. D. Molluscicides in schistosomiasis control. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 58, p. 681-689, 1980.

MENDES, N.M.; BAPTISTA, D.F.; VASCONCELLOS, M.C.; SCHALL, V.T. Evaluation of the molluscicidal properties of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (N.E.B.) (Euphorbiaceae) - 1 Experimental test in a lentic habitat. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 87, p. 21-23, 1992.

MORDUE, A.J.; NISBET, A.J. Azadirachtin from the neem tree *Azadirachata indica*: its action against insects. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.29, p.615-632, 2000.

OLIVO, C. J. Óleo de citronela no controle do carrapato de bovinos. **Ciência Rural**. v. 38, p. 406-410, 2008.

OLIVEIRA-FILHO, E.C.; PAUMGARTTEN, F.J.R. Photodegradation of the molluscicidal latex of “Crown of Thorns” (*Euphorbia milii* var. *hislopii*). Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 92, p. 657-659, 1997.

PEREZ, M.P.; FERNANDEZ, L.D.; GUIRADO, O.A.G.; CAPOTE, R.V.; AGUILAR, G.G. Actividad molusquicida del Paraiso (*Melia azedarach* L.) (Meliaceae) sobre *Lymnaea cubensis*, molusco vector de Fasciolosis. **Revista de Saúde Pública**. v. 32, p. 262-266, 1998.

PILE, E.; SANTOS, J.A.A.; PASTORELLO, T.; VASCONCELLOS, M. *Fasciola hepatica* em búfalos (*Bubalus bubalis*) no município de Maricá, Rio de Janeiro, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 38, p 42-43, 2001a.

PILE, E.; SANTOS, J.A.A.; SÃO LUIZ, J.B.; VASCONCELLOS, M.C. Fasciolose bovina: controle com látex da “coroa-de-Cristo” (*Euphorbia splendens* var. *hislopii*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 38, p. 288-289, 2001b.

PINTO, J.S.P.; LANÇAS, F.M. Hidrólise do óleo de *azadirachta indica* em água subcrítica e determinação da composição dos triacilglicerídeos e ácidos graxos por cromatografia gasosa de alta resolução a alta temperatura e cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas. **Revista eletrônica Química Nova**. p. 1-4, 2010.

PROCÓPIO, S.O.; VENDRAMIM, J.D.; JÚNIOR, J.I.; SANTOS, J.B. Bioatividade de diversos pós de origem vegetal em relação a *Sitophilus zeamais* mots. (Coleoptera: Curculionidae). **Ciências agrotécnica**. v. 27, p.1231-1236, 2003.

ROCHA, S.F.R.; MING, L.C.; MARQUES, M.O.M. Influência de cinco temperaturas de secagem no rendimento e composição do óleo essencial de citronela

(*Cymbopogon winterianus* Jowitt). **Revista Brasileira P.L.Med.** v. 3, p. 73-78, 2000b.

RUIZ, A.L.T.G.; MAGALHÃES, E.G.; MAGALHÃES, A.F.; FARIA, A.D.; AMARAL, M.C.E.; SERRANO, D.R ; ZANOTTI-MAGALHÃES, E.M.; MAGALHÃES, L.A. Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (*Cyperaceae*). **Revista Brasileira de Farmacognosia.** V. 15, p. 98-102, 2005.

SÁ – BARRETO, L.C.L.; CARVALHO, E.F.N.B.; CUNHA-FILHO, M.S.S.; FERREIRA, C.P.; XAVIER, H.S. Atividade moluscicidas de extratos e de Aucubina de *Vitex gardneriana* Schauer (*Verbenaceae*) em embriões de *Biomphalaria glabrata*. **Latin American Journal of Pharmacy.** v. 26, p.339-343, 2007.

SALLES, L. A.; RECH, N.L. Efeito de extratos de nim (*Azadiractha indica*) e cinamomo (*Melia azdarach*) sobre *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera:Tephritidae). **Revista Brasileira de Agrociência.** v. 5, p. 225-227, 1999.

SEFFRIN, R.C.A.S.; COSTA, E.C.; DOMINGUES, L.S.; DEQUECH, S.T.B.; SAUSEN, C.D. Atividade inseticida de meliáceas sobre *Diabrotica speciosa* (Col., Chrysomelidae). **Revista Ciência Rural.** v. 38, p. 1805-1809, 2008.

SILVA, N.F.S.; COGO, J.; WIEPIESKI, C.C.P.; LAVERDE, JR. Bioensaio de atividade moluscicida adaptado para a avaliação de extratos de plantas medicinais. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. Unipar.** v. 11, p. 179-181, 2008.

TANG, S.H.; WHITFI ELD, P.J.; PERRETT, S. Activity of the molluscicidal plant *Milletia thonigii* (*Leguminosae*) toward *Biomphalaria glabrata* eggs. **Journal Parasitology.**v. 81, p. 833-835, 1995.

VASCONCELLOS, M. C.; SCHALL, V. T. Latex of “coroa-de-Cristo” (*Euphorbia splendens*): An effective molluscicide. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 81, p. 475-476, 1986.

VASCONCELLOS, M.C. Ação do látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopilii* N.E.B. (Euphorbiaceae) sobre *Lymnaea columella*, hospedeiro intermediário de *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 (Trematoda: Fasciolidae), em laboratório e no campo. 75 f. Dissertação (Mestrado) – **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, 1996.

VASCONCELLOS, M. C. Controle de *Lymnaea columella* (Say, 1817)(Pulmonata:Lymnaeidae), hospedeiro intermediário de *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 (Trematoda: Fasciolidae) com o látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopilii* N.E.B. (Euphorbiaceae) no Vale do Paraíba – SP, 46f, p. 146. Tese (Doutorado) – **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Brasil, 2000.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. Memoranda - molluscicide screening and evaluation. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 33, n. 4, p. 567-581, 1965.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. Reports Of The Scientific Working Group On Plant Molluscicides. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 61, n. 6, p. 927-929, 1983.

7. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos neste estudo demonstram a presença de condições ideais para a manutenção do ciclo evolutivo do parasito *Schistosoma mansoni*, dependente de água contaminada com fezes de indivíduos infectados e da presença dos moluscos do gênero *Biomphalaria*, hospedeiros invertebrados para o parasito em 14 municípios localizados na mesorregião sul do estado do Espírito Santo. Foi relatada a presença de moluscos da espécie *Biomphalaria tenagophila* na região do sul do estado do Espírito Santo, e que a mesma possui condições ambientais favoráveis para a manutenção e dispersão dos moluscos. A região analisada demonstra-se propícia ao desenvolvimento do ciclo da fasciolose hepática, por possuir os fatores climáticos e pluviométricos favoráveis a reprodução e dispersão dos moluscos da espécie *Lymnaea columella*. O estudo demonstrou a eficácia de três novas possíveis drogas a serem utilizados no controle de moluscos causadores de doenças endêmicas em diversas regiões, assim minimizando as perdas econômicas por afetar animais domésticos (fasciolose).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABÍLIO, F.J.P.; WATANABE, T. Ocorrência de *Lymnaea columella* (Gastropoda: Lymnaeidae), hospedeiro intermediário da *Fasciola hepatica*, para o Estado da Paraíba, Brasil. **Revista de Saúde Pública**. v. 32, p. 185-186, 1998.

AGNOLIN, C.A. Óleo de citronela no controle de ectoparasitas de bovinos. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

ALBUQUERQUE MELO, R.M.C.; ALBUQUERQUE MELO FILHO, P.; SARAIVA CÂMARA, M.P.; GOMES DA CAMARA, C.A.; SANTOS, R.C. Prospecção de óleos vegetais para controle da ramulose do algodoeiro. In: VII Congresso Brasileiro do Algodão. Sustentabilidade da cotonicultura Brasileira e Expansão dos Mercados, Anais... Campina Grande: Embrapa Algodão, p. 1021-1027, 2009.

ALCAÍNO, H. Epidemiology of fascioliasis in Chile. In: R. EHRLICH, R.; NIETO, A.; YARZABÁL, L. **Basic Research in Helminthiasis**. Ediciones Logos - Montevideo, p. 11-30, 1990.

ALCAÍNO, H.; VEJA, F.; GORMAN, T. Epidemiología de la fasciolosis hepática en la VII región Chile. **Parasitología al Día**. v. 17, p. 99–106, 1993.

AMARAL, R.S.; PORTO, M.A.S. Evolução e situação atual da esquistossomose no Brasil. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 27, s. III, p. 73 – 90, 1994.

ANTUNES, G.M. Inimigo Oculto. **Revista Cultivar Bovinos**, v.15, revista eletrônica, 2005.

APT, W.; AGUILERA, X.; VEJA, F.; ALCAÍNO, H.; ZULANTAY, I.; APT, P.; GONZÁLEZ, V.; RETAMAL, C.; RODRÍGUEZ, J.; SANDOVAL, J.P. Prevalência de fascioliasis en humanos, caballos, cerdos y conejos silvestres, en tres provincias de Chile. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**. v. 115, p.5, 1993.

ARAÚJO, J.D. A pesquisa em esquistossomose no Brasil. In modernos conhecimentos sobre esquistossomose mansônica. **Biblioteca da Academia Mineira de Medicina**. v. 14, p. 9-18, 1986.

ARAÚJO, S.M.; PILE, E.A.M.; BARROS, J.S.L.; SANTOS, J.A.A.; VASCONCELLOS, M.C. Alterações histológicas em *Lymnaea columella* provocadas pelo látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopilii*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 39, n. 3, p. 157- 159, 2002.

ARAÚJO, J.S.B. Albendazol (Monografia em Farmacologia) – Graduação em Medicina, Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, Brasília, 2005.

ARAÚJO, K.C.G.M.; RESENDES, A.P.C.; SOUZA-SANTOS, R.; SILVEIRA JÚNIOR, J.C.; BARBOSA, C.S. Análise espacial dos focos de *Biomphalaria glabrata* e de casos humanos de esquistossomose mansônica em Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil, no ano 2000. **Caderno de Saúde Pública**. v. 23, p. 409-417, 2007.

ARAÚJO, S.A.C.; TEIXEIRA, M.F.S.; DANTAS, T.V.M.; MELO, V.S.P.; LIMA, F.E.S.; RICARTE, A.R.F.; COSTA, E.C.; MIRANDA, A.M. Usos potenciais de *melia azedarach* L. (meliaceae): um levantamento. **Arquivos do Instituto de Biologia**. v. 76, n.1, p.141-148, 2009.

ARAÚJO FILHO, R. Introdução à pecuária ecológica: a arte de criar animais sem drogas ou venenos. **São José**. Porto Alegre, p. 136, 2000.

ASAHI, H.; STADECKER, M.J. Analysis of egg antigens inducing hepatic lesions in schistosome infection. **Parasitology International**. v. 52, p. 361-367, 2003

BARBOSA, C.S.; SILVA, C.B.; BARBOSA, F.S. Esquistossomose: reprodução e expansão da endemia no Estado de Pernambuco no Brasil. **Revista de Saúde Pública**. v. 30, p. 609-616, 1996.

BARBOSA, C.S.; FAVRE, T.C.; WANDERLEY, T.N.; CALLOU, A.C.; PIERI, O.S. Assessment of schistosomiasis, through school surveys, in the Forest Zone of Pernambuco, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 101, s.1, 2006.

BARROS, J.S.L.; PILE, E.A.M.; VASCONCELLOS, M.C.; SANTOS, J.A.A.; LESSA, C. Infecção experimental de *Physa cubensis* Pfeiffer 1839 e *Lymnaea columella* com miracídios de *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 39. n. 3, p. 121-123, 2002.

BASCH, P.F.; SAMUELSON, J. Cell biology of schistosomose. Ultrastructure and transformation. *Modern Parasite Biology – cellular, imunological and molecular aspects*. p. 91-106, 1990.

BORDA, C.E.; REA, M.J.F. *Biomphalaria tenagophila* potencial vector of *Schistosoma mansoni* in the Paraná River basin (Argentina and Paraguay). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 102, p. 191-195, 2007.

BRAUM, D.T.; BARROS, L.A. Avaliação *in vitro* da resistência de larvas nematóides com potencial zoonótico ao extrato de citronela. In: XVI Seminário de Iniciação Científica da Universidade Federal de Mato Grosso, **Anais...** Cuiabá. Caderno de Resumos, 2008, p. 32.

BUTTERWORTH, J.H.; MORGAN, E.D. Isolation of a substance that supresses feeding in locusts. **Journal of the Chemical Society**. v.35, p.23-24, 1968.

CALDEIRA, R.L.; VIDIGAL, T.H.D.A.; PAULINELLI, S.T.; SIMPSON, A.J.G.; CARVALHO, O.S. Molecular identification of similar species of the genus *Biomphalaria* (Mollusca: Planorbidae) determined by a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.93, p. 219-225, 1998.

CALDEIRA, R.L.; VIDIGAL, T.H.D.A.; MATINELLA, L.; SIMPSON, A.J.G.; CARVALHO, O.S. Identification of Planorbids from Venezuela by Polymerase Chain Reaction Amplification and Restriction Fragment Length Polymorphism of Internal Transcriber Spacer of the RNA Ribosomal Gene. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p.171-177, 2000.

CALDEIRA, R.L.; VIDIGAL, T.H.D.A.; SIMPSON, A.J.G.; CARVALHO, O.S. Genetic variability in Brazilian populations of *Biomphalaria straminea* complex detected by simple sequence repeat anchored polymerase chain reaction amplification (SSR-PCR). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 535-544, 2001.

CALDEIRA, R.L.; JANNOTTI-PASSOS, L.K.; LIRA, P.M.; CARVALHO, O.S. Diagnostic of *Biomphalaria* snails and *Schistosoma mansoni*: DNA obtained from traces of shell organic materials. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 499–502, 2004.

CALDEIRA, R.L.; JANNOTTI-PASSOS, L.K.; CARVALHO, O.S. Molecular epidemiology of Brazilian *Biomphalaria*: A review of the identification of species and the detection of infected snails. **Acta Tropica**. v. 111, p. 1–6, 2009.

CAMPOS, Y.R. Comparação das técnicas SSR-PCR ancorado, AP-PCR e Isoenzimas no estudo da variabilidade genética de *Biomphalaria glabrata*. 85f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2001.

CARVALHO, O.S.; SOUZA, C.P.; KATZ, N. Primeiro encontro de *Biomphalaria tenagophila* (d'orbigny, 1835) naturalmente infectada, com *Schistosoma mansoni*, em Itajubá, sul do estado de Minas Gerais, Brasil. **Revista de Saúde Pública**. v. 19, p.88-91, 1985.

CARVALHO, O.S.; CALDEIRA, R.L.; SIMPSON, A.J.G.; VIDIGAL, T.H.D.A. Genetic variability and molecular identification of Brazilian *Biomphalaria* species (Mollusca: Planorbidae). **Parasitology**. v. 123, p. 197- 209, 2001.

CARVALHO, S.M.; CARDOSO, P.C.M.; LIRA, P.M. The use of the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism technique associated with the classical morphology for characterization of *Lymnaea columella*, *L. viatrix*, and *L. diaphana* (Mollusca: Lymnaeidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 99, p. 503-507, 2004.

CASTRO, A.Z.; VIANA, J.D.C.; PENEDO, A.A.; DONATELE, D.M. Levantamento das Parasitoses Intestinais em Escolares da Rede Pública na Cidade de Cachoeiro de Itapemirim – ES. **NewsLab**. v. 64, p. 140-144, 2004.

CAVALCANTI, E.S.B.; MORAIS, S.M.; LIMA, M.A.A.; SANTANA, E.W.P. Larvicidal Activity of Essential Oils from Brazilian Plants against *Aedes aegypti*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 99, p.541 - 544, 2004.

CLARK, T.E.; APPLETON, C.C.; DREWES, S.E. A semi-quantitative approach to the selection of appropriate candidate plant molluscicides – A South African application. **Journal Ethnopharmacology**. v. 56, p. 1-13, 1997.

CHENG, H.; XIA, D.; WU, T.; MENG, X.; JI, H.; DONG, Z. Study on Sequences of Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacers of Clams Belonging to the Veneridae Family (Mollusca: Bivalvia). **Acta Genetica Sinica**. v. 33, p. 702-710, 2006.

COIMBRA JR, C.E.A. Suscetibilidade à infecção pelo *Schistosoma mansoni*, de *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila* do Distrito Federal, Brasil. **Revista de Saúde Pública**. v. 15, In press, 1981.

CORAL, R.P.; MASTALIR, E.T.; MASTALIR, F.P. Retirada de *Fasciola hepatica* da via biliar principal por coledocoscopia. **Revista Col. Bras. Cir**. v. 34, p. 69-71, 2007.

CORRÊA, R.R.; MURGEL, J.M.T.; PIZA, J.T.; RAMOS, A.S.; DIAS, L.C.S.; MORAIS, L.V.C.; ROSÁRIO, F.F. Dispersão de *Biomphalaria straminea*, hospedeira intermediária do *Schistosoma mansoni*, através da distribuição de peixes. **Revista de Saúde Pública**. v. 4, p. 117-127, 1970.

CORRÊA, L.R.; PARAENSE, W.L. Susceptibility of *Biomphalaria amazonica* to infection with two strains of *Schistosoma mansoni*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**. v.13, p. 387–390, 1971.

CORRÊA, M.C.R. Suscetibilidade de linhagens de *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria glabrata* a duas cepas de *Schistosoma mansoni* (LE — Belo Horizonte, MG e SJ — São José dos Campos, SP). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 21, p. 72-76, 1979.

CORREIA, A.A.; BRANDÃO, D.S.; RIBEIRO, L.B. Diálogos & Ciência – **Revista Eletrônica da Faculdade de Tecnologia e Ciências de Feira de Santana**. v. 6, 2005. Fonte: <http://www.ftc.br/revistafsa>. Acessada em 28 de dezembro de 2009.

COURA-FILHO, P.; FARAH, M. W. C.; REZENDE, D. F.; LAMARTINE, S. S.; CARVALHO, O. S.; KATZ, N. Determinantes Ambientais e Sociais da Esquistossomose Mansoni em Ravena, Minas Gerais, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**. v. 11, p. 254-265, 1995.

COURA-FILHO, P. Participação popular no controle da esquistossomose através do Sistema Único de Saúde (SUS), em Taquaraçu de Minas, (Minas Gerais, Brasil), entre 1985-1995: construção de um modelo alternativo. **Caderno de Saúde Pública**. v. 14, p. 111-122, 1998.

COURA, J.R.; AMARAL, R.S. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic áreas. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 99, p. 13-19, 2004.

CRABTREE, J.E.; WILSON, R.A. *Schistosoma mansoni*: an ultrastructural study of pulmonary migration. **Parasitology**. V.92, p.343-354, 1986.

DANTAS, D. A.; MAGANHA, M.; BERETTA, T. E.; NOZU, P.; PEREIRA, G. S.; MATIAS, R.; SOLON, S.; RESENDE, U.; KOLLER, W. W.; GOMES, A. Estudo fitoquímico dos frutos de *Melia azedarach* L. (Cinamomo, Meliaceae). In: ENCONTRO DE PESQUISA E INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIDERP. Campo Grande. *Anais...* Campo Grande: UNIDERP, p. 119-120, 2000.

DEQUECH, S.T.B.; SAUSEN, C.D.; LIMA, C.G.; EGEWARTHII, R. Efeito de extratos de plantas com atividade inseticida no controle de *Microtheca ochroloma* Stal (Col.: Chrysomelidae), em laboratório. **Revista Biotemas**. v. 21. ed. 1, 2008.

DEQUECH, S.T.B.; EGEWARTHII, R.; SAUSEN, C.D.; STURZA, V.S.; RIBEIRO, L.P. Ação de extratos de plantas na oviposição e na mortalidade da traça-das-crucíferas. **Revista Ciência Rural**. v. 39, n.2, p. 551-554, 2009.

DORSEY, C.H.; COUSIN, C.E.; LEWIS, F.A.; STIREWALT, M.A. Ultrastructure of the *Schistosoma mansoni* cercaria. **Micron**. v. 33, p. 279-323, 2002.

ECHEVARRIA, M.A.F. Fasciolose: Ocorrência, diagnóstico e controle. **Agroquímica Ciba-Geigy**. v. 27, p. 4-9, 1985.

ECHEVARRIA, F. Fasciolose. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 13, suppl. 1,p. 124, 2004.

EL-SAYED, N.M.A.; BARTHOLOMEU, D.; IVENS, A.; JOHNSTON, D.A.; LOVERDE, P.T. Advances in *Schistosoma* genomics. **Trends Parasitology**. v.20, p. 154-157, 2004.

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

FALBO, M.K.; SANDINI, I.E.; ISHIYM H.M.; FÁVARO, J.L.; SANTOS, C.E.; BASTOS, S.; RODIGHIERI, D.; GUZZO, D. Atividade anti-helmíntica do fruto da *Melia azedarach* em cordeiros naturalmente infectados com nematódeos gastrintestinais. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 29, p. 881-886, 2008.

FALCÃO, M.A.; PEREIRA, M.A.A.; MILÃO, D. Avaliação da atividade antimicrobiana dos Óleos essenciais de *Cymbopogum winterianus* e *Cymbopogum citratus* pelo método de Bioautografia indireta. **X Salão de Iniciação Científica da PUCRS**, 2009.

FARIA, R.N.; CURY, M.C.; LIMA, W.S. Concordância entre duas técnicas corpoparasitológicas para o diagnóstico de *Fasciola hepatica* em bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.60, p.1023-1025, 2008.

FARINAZZO, R.J.M.; IGREJA, R.P.; HUGGINS, D.W. Fasciolíase Hepática. In: BATISTA, R.S.; GOMES, A.P.; IGREJA, R.P.; HUGGINS, D.W. **Medicina Tropical. Abordagem atual das Doenças Infeciosas e Parasitárias**. Ed. Cultura Médica, Rio de Janeiro, p.287-290, 2001.

FERNANDEZ, M.A.; PIERI, O. Infection by *Schistosoma mansoni* Sambon 1907 in the first four months of life of *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 96, p. 185-192, 2001.

FERREIRA, M.U.; FERREIRA, C.S.; MONTEIRO, C.A. Tendência secular das parasitoses intestinais na infância na cidade de São Paulo (1984-1996). **Revista de Saúde Pública**. v. 34, p.73-82, 2000.

FERREIRA, I.L.M.; SILVA, T.P.T. Mortalidade por esquistossomose no Brasil: 1980 - 2003. **Revista de Patologia Tropical**. v. 36, p. 67-74, 2007.

FERREIRA, R.; RODRIGUES, A.; CATARINO, A.; MORAES, F. Utilização dos Resíduos Orgânicos de Nim e Citronela no Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *passiflorae* em Maracujazeiro Amarelo. **Revista Brasileira de Agroecologia**. v. 4, p. 893-896, 2009.

FRAGA, J.C.L. Incidência de fasciolose hepática em bovinos abatidos no sul do estado do Espírito Santo. Monografia de pós-graduação - Instituto Qualittas, 2008.

FREITAS, J.R.; RESENDA, E.S.; JUNQUEIRA, D.V.; COSTA, A.M.; PELLEGRINO, J. Criação em massa e ritmo de crescimento da *Biomphalaria glabrata*. **Ciência e Cult.** v. 27, p. 968 - 974, 1975.

FUENTES, M. V. Proposal of a geographic information system for modeling zoonotic fasciolosis transmission in the Andes. **Parasitologia Latinoamericana**. v. 59, p. 51-55, 2004.

GASPAROTTO JR, A.; BRENZAN, M.A.; PILOTO, I.C.; CORTEZ, D.A.C.; NAKAMURA, C.V.; FILHO, B.P.D.; FILHO, E.R.; FERREIRA, A.G. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade moluscicida do *calophyllum brasiliense* camb (clusiaceae). **Química Nova**. v. 28, p. 575-578, 2005.

GOMES, F.F.; OLIVEIRA, F.C.R.; PILE, E.A.; LOPES, C.W.G. Estabelecimento de foco de fasciolose hepática em propriedade do município de Campos dos Goytacazes no estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 11, p. 53-56, 2002.

GONÇALVES, M. E. C.; OLIVEIRA, J. V.; BARROS, R.; TORRES, J.B. Efeito de Extratos Vegetais sobre Estágios Imaturos e Fêmeas Adultas de *Mononychellus tanajoa* (Bondar) (Acari: Tetranychidae). **Neotropical Entomology**. v. 30, p. 305-309, 2001.

GORMAN, T.; SANCHEZ, R.; FREDES, F.; ALCAINO, H. Inmunodiagnostico de fasciolosis bovina mediante elisa y western blot. **Parasitologia dia**. v. 22, p.1-2, 1998.

GRAEFF, A.; PRUNER, E.N.; SPENGLER, M.M. Efeito da Niclosamida no Controle de Girinos de Anuros na Propagação de Pós-Larvas de Carpa Comum (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758 Var. *Specularis*). **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 30, p. 1664 - 1669, 2001.

GRISOLIA, M.L.M.; FREITAS, J.R. Características físicas e químicas do habitat da *Biomphalaria tenagophila* (Mollusca, Planorbidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 80, p. 237 - 244, 1985.

GUIMARÃES, C.T.; SOUZA, M.A.; SOARES, D.M.; SOUZA, C.P. Levantamento malacológico em parques urbanos de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**. v. 13, n.2, p. 313-316, 1997.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE cidades@ [online]. Rio de Janeiro, Brasil; 2006. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/default.php>> Acesso em 02 fevereiro de 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Produção Pecuária Municipal. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 23 Abr. 2009.

JANNOTTI-PASSOS, L.K.; MAGALHÃES, K.G.; CARVALHO, O.S.; VIDIGAL, T.H.D.A. Multiplex-PCR for both identification of Brazilian *Biomphalaria* species (Gastropoda Planorbidae) and diagnosis of infection by *Schistosoma mansoni* (Trematoda: Schistosomiasis). **Journal of Parasitology**. v. 92, p. 426–429, 2006.

JARCHO, S. Theodor Bilharz as ethonographer. **Bull New York Academic Medicine**. v. 44, p.373-374, 1968.

JIMÉNEZ, Y.H.; MORALES, R.E.T.; NODA, J.S.; PERERA, A.A.V.; GUTIÉRREZ, A.; TIOMNOVA, O.T.; DÍAZ, A.M. Estudios de laboratorio sobre la acción molusquicida de la resina de pino, colofonia, sobre *Biomphalaria havanensis*. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, V. 60, ed.2, p.187-9, 2008.

KANE, R.A.; ROLLINSON, D. Repetitive sequences in the ribosomal DNA internal transcribed spacer of *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma intercalatum* and *Schistosoma mattheii*. ***Molecular Biology Parasitology***. v. 63, p. 153-156, 1994.

KATZ, N.; CARVALHO, O.S. Introdução recente da esquistossomose mansoni no sul do Estado de Minas Gerais, Brasil. ***Memórias do Instituto Oswaldo Cruz***, v. 78, p. 281-284, 1983.

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

KLEIMAN, F.; PIETROKOVSKY, S.; PARAENSE, W.L; WISNIVESKY-COLLI, C. Southernmost Finding of *Lymnaea viatrix* Orbigny, 1835 (Pulmonata: Lymnaeidae), Intermediate Host of *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (Trematoda: Digenea), in Urban and Rural Areas of Patagonia, Argentina. ***Memórias do Instituto Oswaldo Cruz***. v. 99, p. 23-24, 2004.

KLOOS H.; PASSOS, L.K.J.; LOVERDE, P.; CORREA OLIVEIRA, R.; GAZZINELLI, A. Distribution and *Schistosoma mansoni* infection of *Biomphalaria glabrata* in different habitats in a rural area in the Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil: environmental and epidemiological aspects. ***Memórias do Instituto Oswaldo Cruz***. v. 99, p. 673-681, 2004.

LIMA, W.S.; SOARES, L.R.M.; BARÇANTE, T.A.; GUIMARAES, M.P.; BARÇANTE, J.M.P. Occurrence of *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) infection in Brazilian cattle

of Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 18, p. 27-30, 2009.

LUDWIG, K.M.; FREI, F.; FILHO, F.A.; RIBEIRO-PAES, J.T. Correlação entre condições de saneamento básico e parasitoses intestinais na população de Assis, Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 32, p. 547-555, 1999.

MAGALHÃES, L.A.; DIAS, L.C.S. Estudo da suscetibilidade da *Biomphalaria glabrata* de Ourinhos (sp), à infecção pelo *schistosoma mansoni* de Belo Horizonte (MG), e de São José dos Campos (SP). **Revista de Saúde Pública de São Paulo**. V. 7, p. 295-297, 1973.

MALEK, E.A. Factors conditioning the habitat of bilharziasis intermediate hosts of the Family Planorbidae. **Bulletin of the World Health Organization**. v. 18, p. 785 – 818, 1958.

MARTINEZ, S.S.; EMDEN, V.H.F. Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) caused by azadirachtin. **Neotropical Entomology**. v. 30, p. 113-125, 2001.

MARTINEZ, S. S. O Nim – *Azadirachta indica* – natureza, usos múltiplos, produção. IAPAR, p. 142, 2002.

MAS-COMA, M.S.; ESTEBAN, J.G.; BARGUES, M.D. Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. **Bull WHO**. v. 77, p. 340-346, 1999.

MASSARA, C.L.; PEIXOTO, S.V.; BARROS, H.D.A.S.; CARVALHO, S.; SCHALL, V. Factors associated with shistosomiasis mansoni in a population from the municipality of Jaboticatubas, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 99, p. 127-134, 2004.

MASSARA, C.L.; AMARAL, G.L.; CALDEIRA, R.L.; DRUMMOND, S.C.; ENK, M.J.; CARVALHO, O.S. Esquistossomose em área de ecoturismo do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**. v. 24, 2008.

MATTOS, M.J.T.; UENO, H. Manutenção de *Lymnaea viatrix* Orbigny 1835 em Condições Laboratoriais. **Hora Veterinária**. v. 5, p. 48-50, 1985.

MATTOS, M.J.T.; CUNHA, F.O.V.; MARQUES, S.M.T. Comparação de duas técnicas parasitológicas na identificação de ovos de *Fasciola hepatica*. **Revista da FZVA**. v. 16, p. 105-112, 2009.

MCCULLOUGH, F. S.; GAYRAL, P.; DUNCAN, J.; CHRISTIE, J. D. Molluscicides in schistosomiasis control. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 58, p. 681-689, 1980.

MENDES, N.M.; BAPTISTA, D.F.; VASCONCELLOS, M.C.; SCHALL, V.T. Evaluation of the molluscicidal properties of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (N.E.B.) (Euphorbiaceae) - 1 Experimental test in a lentic habitat. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 87, p. 21-23, 1992.

MENDES, E.A. Comportamento e desenvolvimento de *Fasciola hepatica* (Linneus, 1758) de bovinos naturalmente infectados em sagüi (*Callithrix penicillata*) e gerbil (*Meriones unguiculatus*). Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Programa de Pós-graduação em Parasitologia Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

MENTZ, M.B.; WIES, J.M.; GONÇALVES, P.C. Viabilidade de ovos de *Fasciola hepatica* de bovinos em sistema de biodigestão anaeróbia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 56, p. 550-553, 2004.

MILWARD DE ANDRADE, R. Alguns dados hidroquímicos de criadouros de planorbídeos no Distrito Federal (Brasil). **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**. v. 7, p. 103 – 130, 1954.

MILWARD-DE-ANDRADE, R.; TORGA, L. F. Ação inibidora do termofosfato magnésiano sobre a fecundidade de planorbídeos e seu possível significado no controle da esquistossomose mansoni. **Revista de Saúde Pública de São Paulo**. v. 15, p. 59 – 71, 1981.

MONTEIRO, C.A.; CHIEFFI, P.P.; BENICIO, M.H.D.; DIAS, R.M.S.; TORRES, D.M.A.G.V.; MANGINI, A.C.S. Estudo das condições de saúde das crianças do município de São Paulo (Brasil), 1984/1985. **Revista de Saúde Pública**. v. 22, p. 08-15, 1988.

MONTEIRO, W.; KAWANO, T. Crescimento de órgãos do aparelho reprodutor durante o desenvolvimento de *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny) (Mollusca, Planorbidae). **Revista Brasileira de Biologia**. v. 58, p. 693-705, 1998.

MORDUE, A.J.; NISBET, A.J. Azadirachtin from the neem tree *Azadirachata indica*: its action against insects. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.29, p.615-632, 2000.

MOTA, M.A.; CAMPOS, A.K.; ARAÚJO, J.V. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 23, p. 93-100, 2003.

MÜLLER, G.; LARA, S.I.M.; SILVEIRA, J.P. Acompanhamento laboratorial do ciclo biológico de *Lymnaea viatrix*, hospedeiro intermediário de *Fasciola hepatica*. **Revista Brasileira de Agrociência**. v. 4, p. 172-176, 1998.

MÜLLER, G.; BERNE, M.E.A.; RAFFI, L.L. Influência da temperatura na longevidade infectiva de metacercárias de *Fasciola hepatica*. **Revista Brasileira de Agrociência**. v.5, p. 164-165, 1999.

OLAZARRI, J. *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835) (Moll., Gastr.) en Zona de Salto Grande. I- Ambientes de cria. **Comunicaciones de la Sociedad Malacologica del Uruguay**. v. 5, p. 321- 343, 1981.

OLIVEIRA-FILHO, E.C.; PAUMGARTTEN, F.J.R. Photodegradation of the molluscicidal latex of "Crown of Thorns" (*Euphorbia milii* var. *hislopilii*). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 92, p. 657-659, 1997.

OLIVEIRA, A.A.; NASCIMENTO, A.S.; SANTOS, T.A.M. Prevalence Survey and Factors Associated with Fascioliasis in the Municipality of Canutama, State of Amazon, Brazil. **Epidemiologia de Serviços Saúde**. v.16, p. 251-259, 2007.

OLIVEIRA, S.M.; SPÓSITO FILHA, E. DIVULGAÇÃO TÉCNICA: FASCIOLOSE HEPÁTICA. **Biológico**. v. 71, p. 5-7, 2009.

OLIVO, C. J. Óleo de citronela no controle do carrapato de bovinos. **Ciência Rural**. v. 38, p. 406-410, 2008.

PARAENSE, W.L.; DESLANDES, N. Diagnostic characters of the Brazilian species of "*Australorbis*" (Pulmonata, Planorbidae). **Revista Brasileira de Biologia**. v.16, p. 281 – 286, 1956.

PARAENSE, W.L. Apertural lamellae in *Australorbis glabratus*. **Proc. Mal. Soc. Lond.** v. 32, p. 175 – 179, 1957.

PARAENSE, W.L. The synonymy and distribution of *Biomphalaria peregrina* in the Neotropical Region. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 26, p. 269-296, 1966.

PARAENSE, W.L. Susceptibility of *Biomphalaria peregrina* from Brazil and Ecuador to two strains of *Schistosoma mansoni*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 15, p. 127-130, 1973.

PARAENSE, W.L. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. **Arquivo Museu Nacional Rio de Janeiro**. v. 55, p. 105-128, 1975.

PARAENSE, W.L.; CORRÊA, L.R. Unsusceptibility of *Biomphalaria occidentalis* to infection with a strain of *Schistosoma mansoni*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 77, p. 55–58, 1982.

PARAENSE, W.L. *Lymnaea columella* in northern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 78, p. 477–482, 1983.

PARAENSE, W.L. *Biomphalaria tenagophila guaibensis* ssp.n. from Southern Brazil and Uruguay (Pulmonata: Planorbidae). I. Morphology. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 79, n. 4, p. 465-469, 1984.

PARAENSE, W.L. *Biomphalaria kuhniana* (Clessin, 1883), planorbid mollusc from South America. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 83, p. 1-12, 1988.

PARAENSE, W.L. *Biomphalaria kuhniana* (Clessin, 1883), planorbid mollusc from South America. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 83, p. 1-12, 1989.

PARAENSE, W.L. The Schistosome Vectors in the Americas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 96, p. 7-16, 2001.

PARAENSE, W.L. Distribuição dos caramujos no Brasil. Modernos conhecimentos sobre a esquistossomose mansônica no Brasil. **Biblioteca da Academia Mineira de Medicina**. v. 14, p.117-128, 2002.

PARAENSE, W.L. Planorbidae, Lymnaeidae and Physidae of Ecuador (Mollusca: Basommatophora). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.99, p.357-362, 2004.

PASSOS, A.D.C. Controle da Esquistossomose: Diretrizes Técnicas, Fundação Nacional de Saúde. **Ministério da Saúde**, Brasília, 1998. 70 pp.

PAZ, R.J. Biologia e Ecologia de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Mollusca: Pulmonata: Planorbidae), na Fazenda Árvore Alta, Alhandra (Paraíba: Brasil). Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Zoologia, Universidade Federal do Paraíba. João Pessoa, 1997.

PAZ - SILVA, A.; HILLYER, G.V.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; RODRÍGUES-MEDINA, J.R.; ARIAS, M. MORRONGO, P.; DÍEZ – BAÑOS, P. Isolation, Identification and expression of a *Fasciola hepática* cDNA encoding a 2,9 – Kda recombinant protein for the diagnosis of ovine fasciolosis. **Parasitology Research**.2004.

PEPE, M.S. Identificação de populações de *Biomphalaria* (Gastropoda:Planorbidae) na região sul do Rio Grande do Sul, Brasil. Dissertação (Mestrado em Ciências - área do conhecimento: Parasitologia) - Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, 2006.

PEREIRA JUNIOR, O.S.P. Organização estrutural dos genes envolvidos com o complexo proteolítico proteasoma 26S e a análise de suas expressões durante o ciclo evolutivo de *Schistosoma mansoni*. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Programa de Pós - graduação em Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2005.

PEREZ, M.P.; FERNANDEZ, L.D.; GUIRADO, O.A.G.; CAPOTE, R.V.; AGUILAR, G.G. Actividad molusquicida del Paraiso (*Melia azedarach* L.) (Meliaceae) sobre *Lymnaea cubensis*, molusco vector de Fasciolosis.**Revista de Saúde Pública**. v. 32, p. 262-266, 1998.

PILE, E.; SANTOS, J.A.A.; PASTORELLO, T.; VASCONCELLOS, M. *Fasciola hepática* em búfalos (*Bubalus bubalis*) no município de Maricá, Rio de Janeiro,

Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 38, p 42-43, 2001a.

PILE, E.; SANTOS, J.A.A.; SÃO LUIZ, J.B.; VASCONCELLOS, M.C. Fasciolose bovina: controle com látex da “coroa-de-Cristo” (*Euphorbia splendens* var. *hislopii*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 38, p. 288-289, 2001b.

PINTO, J.S.P.; LANÇAS, F.M. Hidrólise do óleo de *azadirachta indica* em água subcrítica e determinação da composição dos triacilglicerídeos e ácidos graxos por cromatografia gasosa de alta resolução a alta temperatura e cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas. **Revista eletrônica Química Nova**. p. 1-4, 2010.

PREPELITCHI, L.; KLEIMAN, F.; PIETROKOVSKY, S.M.; MORIENA, R.A.; RACIOPPI, O.; ALVAREZ, J.; WISNIVESKY-COLLI, C. First Report of *Lymnaea columella* Say, 1817 (Pulmonata: Lymnaeidae) Naturally Infected with *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (Trematoda: Digenea) in Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 98, p. 889-891, 2003.

PROCÓPIO, S.O.; VENDRAMIM, J.D.; JÚNIOR, J.I.; SANTOS, J.B. Bioatividade de diversos pós de origem vegetal em relação a *Sitophilus zeamais* mots. (Coleoptera: Curculionidae). **Ciências agrotécnicas**. v. 27, p.1231-1236, 2003.

QUEIROZ, V.S.; LUZ, E.; LEITE, L.C.; CÍRIO, S.M. *Fasciola hepatica* (Trematoda, Fasciolidae): estudo epidemiológico nos municípios de Bocaiúva do Sul e Tunas do Paraná (Brasil). **Acta Biology Parasitology**. v. 31, p. 99-111, 2002.

QUEIROZ, V.S. Enzimoimunoensaio (ELISA), Imunoeletrotransferência (EITB) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), como ferramentas para diagnóstico de fasciolose hepática em bubalinos (*Bubalus bubalis* LINAEUS, 1758). Tese (Doutorado em Saúde Animal e Humana) - Programa de Pós Graduação em Processos Biotecnológicos. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

REZENDE, H.E.B.; ARAÚJO, J.L.B.; GOMES, P.A.C.; NUERNBERG, S.; PIMENTEL NETO, M.; OLIVEIRA, G.P.; MELLO, R.P. Notas sobre duas espécies de *Lymnaea* Lamark, 1799, hospedeiros inter-mediários de *Fasciola hepatica* L, no Estado do Rio de Janeiro (Mollusca, Gastropoda, Basommatophora, Lymnaeidae). **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**. v. 3, p. 21-23, 1973.

ROCHA, R.S.; SILVA, J.G.; PEIXOTO, S.V.; CALDEIRA, R.L.; FIRMO, J.O.A.; CARVALHO, O.S.; KATZ, N. Avaliação da esquistossomose e de outras parasitoses intestinais, em escolares do município de Bambuí, Minas Gerais, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 33, p. 431-436, 2000a.

ROCHA, S.F.R.; MING, L.C.; MARQUES, M.O.M. Influência de cinco temperaturas de secagem no rendimento e composição do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus* Jowitt). **Revista Brasileira P.L.Med.** v. 3, p. 73-78, 2000b.

RODRIGUES, A. L.; LOUZADA, M. C. Boletim Epidemiológico: A Experiência no Controle da Esquistossomose no Estado do Espírito Santo (2000 a 2002). **Secretaria Estadual de Saúde do Espírito Santo**. v. 3, p. 3-4, 2003.

ROEL, A.R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o Desenvolvimento Rural Sustentável. **Revista Internacional de Desenvolvimento Local**. v. 1, p. 43-50, 2001.

ROLLINSON, D.; SOUTHGATE, V.R. The genus *Schistosoma*: a taxonomic appraisal. **Academic Press**. p. 1-49, 1987.

RUBEL, D.; PREPELITCHI, L.; KLEIMAN, F.; CARNEVALE, S.; WISNIVESKY-COLLI, C. Estudio del foco en un caso de fasciolosis humana en Neuquen. **MEDICINA**. v. 65, p. 207-212, 2005.

SÁ – BARRETO, L.C.L.; CARVALHO, E.F.N.B.; CUNHA-FILHO, M.S.S.; FERREIRA, C.P.; XAVIER, H.S. Atividade moluscicidas de extratos e de Aucubina de *Vitex gardneriana* Schauer (Verbenaceae) em embriões de *Biomphalaria glabrata*. **Latin American Journal of Pharmacy**. v. 26, p.339-343, 2007.

SALLES, L. A.; RECH, N.L. Efeito de extratos de nim (*Azadiractha indica*) e cinamomo (*Melia azdarach*) sobre *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera:Tephritidae). **Revista Brasileira de Agrociência**. v. 5, p. 225-227, 1999.

SANTOS, M.C.V.; BRABO, E.S.; CARNEIRO, B.S.; FAIAL, K.F.; RODRIGUES, I.R.C. Estudo quantitativo de metais presentes na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda), infectadas e não infectadas com *Schistosoma mansoni*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.38, p.157-160, 2005 .

SARDINHA, D.H.; MACIEL, A.A.S.; MACHADO, K.K.G.; LEMOS, R.N.S.; GUISTEM, J.M.; GOMES, J.J.A. Diferentes concentrações de nim e citronela no controle de *Callosobruchus maculatus* (Fabr) (Coleoptera: Bruchidae) em feijão-caupi. Tecnologias para o agronegócio: **Anais...** [recurso eletrônico] / CONAC, I Congresso Nacional de Feijão-Caupi, VI Reunião Nacional de Feijão-Caupi, 2006.

SEFFRIN, R.C.A.S.; COSTA, E.C.; DOMINGUES, L.S.; DEQUECH, S.T.B.; SAUSEN, C.D. Atividade inseticida de meliáceas sobre *Diabrotica speciosa* (Col., Chrysomelidae). **Revista Ciência Rural**. v. 38, p. 1805-1809, 2008.

SERRA-FREIRE, N.M.; BORDIN, E.L.; LESSA, C.S.S. et al. Reinvestigação sobre a distribuição da *Fasciola hepatica* no Brasil. **A Hora Veterinária**. v. 1, p.19-21, 1995.

SESA - Secretaria Estadual de Saúde do Espírito Santo, 2004. Acessado em www.saude.es.gov.br, em 11 de janeiro de 2010.

SILVA, L.J. Crescimento urbano e doença: a esquistossomose no município de São Paulo (Brasil). **Revista de Saúde Pública**. v. 19, p. 1-7, 1985.

SILVA, R.E.; MELO, A.L.; PEREIRA, L.H.; FREDERICO, L.F. Levantamento malacológico da Bacia hidrográfica do lago Soledade, Ouro Branco (Minas Gerais, Brasil). **Revista do Instituto de medicina Tropical de São Paulo**. V. 36, ed.5, p. 437-444, 1994.

SILVA, N.F.S.; COGO, J.; WIEPIESKI, C.C.P.; LAVERDE, JR. Bioensaio de atividade moluscicida adaptado para a avaliação de extratos de plantas medicinais. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**. v. 11, p. 179-181, 2008.

SILVA, J.C.R. Zoonoses e Doenças Emergentes Transmitidas por Animais Silvestres. **Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens/ABRAVAS**, fonte: www.abravas.org.br, 2004. Acessado em 14 junho de 2009.

SIOLI, H. Schistosomiasis and limnology in the Amazon Region. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 2, p.700- 707, 1953.

SOUZA, C.P. Estudo de moluscos do gênero *Biomphalaria* de Minas Gerais, com relação a adaptação parasito hospedeiro e importância na epidemiologia da esquistossomose. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 28, p. 287-292, 1986.

SOUZA, C.P.; ARAÚJO, N.; CARVALHO, O.S.; FREITAS, J.R. Potencialidade de *Biomphalaria tenagphila* do lago da Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, como hospedeiro do *Schistosoma mansoni*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 81, p. 67-70,1987.

SOUZA, C.P.; LIMA, L.C.; JANNOTTI-PASSOS, L.K.; FERREIRA, S.S.; GUIMARÃES, C.T.; VIEIRA, L.B.F.; JUNIOR, R.M. Moluscos límnicos da microrregião de Belo Horizonte, MG, com ênfase nos vetores de parasitoses. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 31, p. 449-456, 1998.

SOUZA, C.P.; CALDEIRA, R.L.; DRUMMOND, S.C.; MELO, A.L.; GUIMARÃES, C.T.; SOARES, D.M.; CARVALHO, O.S. Geographical distribution of *Biomphalaria* snails in the state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 96, p. 293-302, 2001.

SOUZA, C.P.; MAGALHÃES, K.G.; PASSOS, L.K.J.; SANTOS, G.C.P.; RIBEIRO, F.; KATZ, N. Aspects of the Maintenance of the Life Cycle of *Fasciola hepatica* in *Lymnaea columella* in Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 97, p. 407-410, 2002.

SOUZA, M. A. A.; SOUZA, L. A.; COELHO-MACHADO, G. L. L.; MELO, A. L. Levantamento malacológico e mapeamento das áreas de risco para transmissão da esquistossomose mansoni no Município de Mariana, Minas Gerais, Brasil. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. v. 5, p. 132-139, 2006.

SOUZA, D.; FALCÃO, A. C. M. G.; GARGIONI, C.; KANAMURA, H. Y.; CIARAVOLO, R. M. C.; EDUARDO, M. B. P. **Vigilância Epidemiológica e Controle da Esquistossomose**: Normas e Instruções. São Paulo, 2007. Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br>>. Acesso em: 22 abr. 2010.

TANG, S.H.; WHITFIELD, P.J.; PERRETT, S. Activity of the molluscicidal plant *Milletia thonigii* (Leguminosae) toward *Biomphalaria glabrata* eggs. **Journal Parasitology**.v. 81, p. 833-835, 1995.

TELES, H.M.S. Distribuição de *Biomphalaria tenagophila* e *B. occidentalis* no Estado de São Paulo (Brasil). **Revista de Saúde Pública**. v. 23, p. 244-253, 1989.

TELES, H.M.S.; PEREIRA, P.A.C.; RICHINITTI, L.M.Z. Distribuição de *Biomphalaria* (Gastropoda, Planorbidae) nos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, Brasil. **Revista de Saúde Pública**. v. 25: 350-352, 1991.

TELES, H.M.S. Distribuição de *Biomphalaria straminea* ao Sul da Região Neotropical. **Revista de Saúde Pública**. v. 30, p. 341-349, 1996.

TELES, H.M.S. Distribuição geográfica das espécies dos caramujos transmissores de *Schistosoma mansoni* no Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, p. 426-432, 2005.

TIAGO, P.V.; COSTA, M.S.; PERASSOLO, V.; SOUZA, E.M.; GOMES, M. Prevalência de parasitoses intestinais em pacientes da unidade mista de saúde em Tangará da Serra, Mato Grosso, Brasil. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**. v.3, p.117-124, 2005.

TIBIRIÇÁ, S.H.C.; BESSA, E.C.A.; COIMBRA, E.S.; PINHEIRO, I.O.; EZEQUIEL, O.S. Avaliação biométrica de *Biomphalaria* spp. (preston , 1910) no município de Juiz de Fora, MG. **Revista de Patologia Tropical**. v.38, p. 52-62, 2009.

TOSTES, R.A.; SANTARÉM, V.A.; ALBERTI, H. Casos Autóctones de *Fasciola hepatica* na Região de Presidente Prudente, São Paulo, Brasil. **Revista Ciência Rural**. v. 34, p. 961-962, 2004.

UCHÔA, C.M.A.; LOBO, A.G.B.; BASTOS, O.M.P.; MATOS, A.D. Parasitoses intestinais: prevalência em creches comunitárias da cidade de Niterói, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v. 60, p. 97-101, 2001.

UENO, H.; GUTIERRES, V.C.; MATTOS, M.J.T.; MULLER, G. Facioliasis problems in ruminants in Rio Grande do Sul, Brasil. **Veterinary Parasitology**. v.11, p. 185-191, 1982.

UETA, M.T. Alguns aspectos da biologia de *Lymnaea columella* say, 1817 (Gastropoda, pulmonata). **Revista de Saúde Pública**. v. 10, p. 355-366, 1976.

UETA, M.T. Ocorrência de infecção natural de *fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 em *Lymnaea columella* Say, 1817 no Vale do Paraíba, SP, Brasil. **Revista de Saúde Pública**. v. 14, p. 230-233, 1980.

VARGAS, D; VEJA, M.; GONZÁLEZ, C.G. Aproximación a una caracterización molecular de *Fasciola hepatica* por la técnica RAPDs – PCR. **Parasitologia Latinoamericana**. v. 58, p. 11- 16, 2003.

VASCONCELLOS, M. C.; SCHALL, V. T. Latex of “coroa-de-Cristo” (*Euphorbia splendens*): An effective molluscicide. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 81, p. 475-476, 1986.

VASCONCELLOS, M.C. Ação do látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B. (Euphorbiaceae) sobre *Lymnaea columella*, hospedeiro intermediário de *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 (Trematoda: Fasciolidae), em laboratório e no campo. 75 f. Dissertação (Mestrado) – **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, 1996.

VASCONCELLOS, M. C. Controle de *Lymnaea columella* (Say, 1817)(Pulmonata:Lymnaeidae), hospedeiro intermediário de *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 (Trematoda: Fasciolidae) com o látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B. (Euphorbiaceae) no Vale do Paraíba – SP, 46f, p. 146. Tese (Doutorado) – **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Brasil, 2000.

VELÁSQUEZ, L.H. Synonymy between *Lymnaea bogotensis* Pilsbry, 1935 and *Lymnaea cousini* Jousseume, 1987 (Gastropoda: Lymnaeidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 101, p. 795-799, 2006.

VASCONCELOS, C.H.; CARDOSO, P.C.M.; QUIRINO,W.C.; MASSARA, C.L.; AMARAL, G.L.; CORDEIRO, R.; CARVALHO, O.S. Avaliação de medidas de controle da esquistossomose mansoni no Município de Sabará, Minas Gerais, Brasil, 1980-2007. **Caderno de Saúde Pública**. v. 25, n.5, 2009.

VIDIGAL, T.H.D.A., SPATZ, L., NUNES, N.D., SIMPSON, A.J.G., CARVALHO, O.S., DIAS NETO, E. *Biomphalaria* ssp: identification of the intermediate snail hosts of *Schistosoma mansoni* by polymerase chain reaction amplification and restriction enzyme digestion of the ribosomal RNA gene intergenic spacer. **Exp. Parasitol.** V. 89, p. 180–187, 1998.

VIDIGAL, T.H.D.A.; KISSINGER, J.C.; CALDEIRA, R.L.; PIRES, E.C.R.; MONTEIRO, E.; SIMPSON, A.J.G.; CARVALHO, O.S. Phylogenetic relationships among Brazilian *Biomphalaria* species (Mollusca: Planorbidae) based upon analysis of ribosomal ITS2 sequences. **Parasitology.** v. 121, p. 611-620, 2000.

VIDIGAL, T.H.; CALDEIRA, R.L.; SIMPSON, A.J.; CARVALHO, O.S. Identification of *Biomphalaria havanensis* and *Biomphalaria obstructa* populations from Cuba using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of the ribosomal RNA intergenic spacer. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** v. 96, p. 661-665, 2001.

VIDIGAL, T.H.D.A.; MAGALHÃES, K.G.; KISSINGER, J.C.; CALDEIRA, R.L.; SIMPSON, A.J.G.; CARVALHO, O.S. A Multiplex-PCR approach to identification of the Brazilian intermediate hosts of *Schistosoma mansoni*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** v. 97, p. 95-97, 2002a.

VIDIGAL, T.H.D.A.; MONTRESOR, L.C.; SIMPSON, A.J.G.; CARVALHO, O.S. Polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of cytochrome oxidase subunit I used for differentiation of Brazilian *Biomphalaria* species intermediate host of *Schistosoma mansoni*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** v. 97, p. 47-52, 2002b.

VIDIGAL, T.H.D.A.; MAGALHÃES, K.G.; CARVALHO, O.S. Polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis of the ITS2 region for differentiation of Brazilian *Biomphalaria* intermediate hosts of *Schistosoma mansoni*. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v. 37, p. 351 - 353, 2004.

WILSON, R.A.; LAWSON, J.R. An examination of the skin phase os schistosomose migration using hamster cheek pouch preparation. **Parasitology**. v. 80, p. 257-266, 1980.

WILSON, R.A. Cercariae to liver worms: development and migration in the mammalian host. The biology of Shistosomoses. **Academic Press Ltda**. p. 115-146, 1987.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. Memoranda - molluscicide screening and evaluation. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 33, n. 4, p. 567-581, 1965.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. Reports Of The Scientific Working Group On Plant Molluscicides. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 61, n. 6, p. 927-929, 1983.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. The control of Shistosomiasis. **Technical Report Series**. v. 83, p. 86, 1993.

WHO-World Health Organization. The prevention and control of schistosomiasis and soil-transmited helminthiasis. Report of the joint WHO expert committees. **Technical Report Series**, p.912-957, 2002.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. First report of joint WHO expert committees on prevation an control of shostosomiasis. **Technical Repor Series**, 2003.

ZAIDEN, M.F.; SANTOS, B.M.O.; CANO, M.A.T.; JÚNIOR, L.A.N. epidemiologia das parasitoses intestinais em crianças de creches de rio verde-go. **Revista de Medicina, Ribeirão Preto**. v. 41, p. 182-197, 2008.