

## Artigo

## Atividade Tóxica Frente à *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de Extratos Brutos e Frações Glicoalcaloidais de *Solanum* spp.

Lopes, G.; Silva, T. M. S.; Echevarria, A.\*

Rev. Virtual Quim., 2016, 8 (1), 141-156. Data de publicação na Web: 4 de janeiro de 2016

<http://rvq.sbq.org.br>

### Toxicity from Crude Extracts and Glycoalkaloid Fractions of *Solanum* spp. Against *Artemia salina* and *Biomphalaria glabrata*

**Abstract:** *Solanum* is the largest and most complex genus from the Solanaceae family; it is variously distributed in South America. Its species are rich in glycoalkaloids and flavonoids, which provide them with varied biological activities. This work obtained the ethanol crude extracts (90%) and the respective glycoalkaloid fractions of 6 species, *S. americanum*, *S. capsicoides*, *S. crinitum*, *S. lycocarpum*, *S. seaforthianum* and *S. variable*. *S. crinitum* and *S. seaforthianum* showed larger glycoalkaloid fractions. Assays conducted with the microcrustacean *Artemia salina* indicated that both crude extracts and glycoalkaloid fractions show significant toxicity, and that *S. seaforthianum* ( $DL_{50} = 1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) and *S. crinitum* ( $DL_{50} = 13 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) are the most toxic ones. Considering the molluscicide assays, none of the crude extracts showed any important activity, and only some of the glycoalkaloid fractions did. However, the fractions of *S. seaforthianum* and *S. crinitum* were very active,  $DL_{50} = 34.70 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  and  $4.90 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectively; an effect that can be correlated with the results of the general toxicity assay, and with the bountiful glycoalkaloid fractions in these species.

**Keywords:** Solanaceae; glycoalkaloids; molluscicide activity; *Biomphalaria glabrata*; *Artemia salina*.

### Resumo

O gênero *Solanum* é o maior e o mais complexo da família Solanaceae e, a América do Sul constitui seu centro de diversidade e distribuição. Suas espécies são ricas em glicoalcalóides e flavonoides que lhes conferem diversificadas atividades biológicas. Neste trabalho foram obtidos os extratos brutos em etanol (90%) de 6 espécies, *S. americanum*, *S. capsicoides*, *S. crinitum*, *S. lycocarpum*, *S. seaforthianum* e *S. variable* e as respectivas frações glicoalcaloidais. As espécies *S. crinitum* e *S. seaforthianum* apresentaram as frações glicoalcaloidais mais abundantes. Os ensaios frente ao microcrustáceo *Artemia salina* mostraram que, tanto os extratos brutos como as frações glicoalcaloidais apresentaram toxidez significativa, sendo as frações de *S. seaforthianum* ( $DL_{50} = 1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) e de *S. crinitum* ( $DL_{50} = 13 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) as mais tóxicas. Diante dos ensaios moluscicidas, todos os extratos brutos e algumas das frações glicoalcaloidais não apresentaram atividade significativa. Porém, as frações de *S. seaforthianum* e *S. crinitum*, mostraram-se bastante ativas,  $DL_{50} = 34,70 \mu\text{g}/\text{mL}$  e  $4,90 \mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente, podendo este efeito ser correlacionado aos resultados do ensaio de toxidez geral e à maior abundância das frações glicoalcaloidais nessas espécies.

**Palavras-chave:** Solanaceae; glicoalcaloides; atividade moluscicida; *Biomphalaria glabrata*; *Artemia salina*.

\* Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Química, ICE, CEP 23.890-000, Seropédica-RJ.

✉ [echevarr@ufrj.br](mailto:echevarr@ufrj.br)

DOI: [10.5935/1984-6835.20160010](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20160010)

## **Atividade Tóxica Frente à *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de Extratos Brutos e Frações Glicoalcaloidais de *Solanum* spp.**

**Grazielle Lopes,<sup>a</sup> Tânia Maria S. da Silva,<sup>b</sup> Aurea Echevarria<sup>a,\*</sup>**

<sup>a</sup> Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Química, ICE, CEP 23.890-000, Seropédica-RJ.

<sup>b</sup> Universidade Federal Rural do Rio de Pernambuco, Departamento de Ciências Moleculares, CEP 52171-900, Recife-PE, Brasil.

\* [echevarr@ufrj.br](mailto:echevarr@ufrj.br)

*Recebido em 3 de janeiro de 2016. Aceito para publicação em 3 de janeiro de 2016*

### **1. Introdução**

- 1.1.** Família Solanaceae: o gênero *Solanum*
- 1.2.** Atividade biológica do gênero *Solanum*

### **2. Parte Experimental**

- 2.1.** Coleta e identificação do material vegetal
- 2.2.** Preparação dos extratos e obtenção das frações glicoalcaloidais
- 2.3.** Ensaio biológicos

### **3. Resultados e Discussão**

- 3.1.** Os extratos brutos e as frações glicoalcaloidais
- 3.2.** Atividade biológica

### **4. Conclusões**

## **1. Introdução**

---

O uso de plantas medicinais é uma das práticas mais antigas e universais da espécie humana. Não importa que cultura ou sociedade se considere, até hoje é possível encontrar plantas sendo usadas no tratamento de enfermidades. Atualmente, muitos medicamentos usados pela população têm sua origem nas plantas medicinais, cujos princípios ativos são usados como protótipo

pela indústria farmacêutica.<sup>1-3</sup>

As espécies vegetais para uso medicinal têm recebido atenção especial, pelos diferentes significados que as plantas medicinais assumem em nossa sociedade como um recurso biológico e cultural, destacando-se seu potencial genético para o desenvolvimento de novos fármacos. Além disso, as plantas medicinais representam possíveis fontes de recursos financeiros através de sua comercialização resgatando o fortalecimento da identidade cultural de

várias comunidades.<sup>1</sup>

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam-se da medicina popular na atenção primária à saúde. Essas populações dependem, em grande parte, dos chamados profissionais tradicionais para a cura de seus problemas de saúde, seja pelas dificuldades impostas ao acesso à medicina, especialmente alopática, seja por questões de entendimento sobre a realidade social e aspectos culturais deste tipo de população, ou pela questão financeira.<sup>3</sup>

O conhecimento das propriedades medicinais das plantas, dos minerais e de certos produtos de origem animal é uma das maiores riquezas da cultura indígena, uma sabedoria tradicional que passa de geração em geração. Vivendo em permanente contato com a natureza, os índios e outros povos da floresta estão habituados a estabelecer relações de semelhança entre as características de certas substâncias naturais e seu próprio corpo.<sup>3</sup>

É impossível estabelecer precisamente quantas das 250.000-300.000 espécies de plantas do mundo são utilizadas medicinalmente, mas sabe-se que pelo menos de 10 a 20% de todas as espécies de uma determinada região tem seu uso na medicina tradicional. Entretanto, menos que 1000 são amplamente utilizadas. No Brasil, o uso de plantas medicinais pela população é bastante difundido, até mesmo por ser muitas vezes o único recurso terapêutico de algumas comunidades. Estima-se que pelo menos a metade das espécies nativas do Brasil possui alguma propriedade medicinal, entretanto menos de 1% ainda avaliada cientificamente adequadamente. As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem ainda seus constituintes químicos conhecidos.<sup>4</sup>

Os altos custos de produção dos

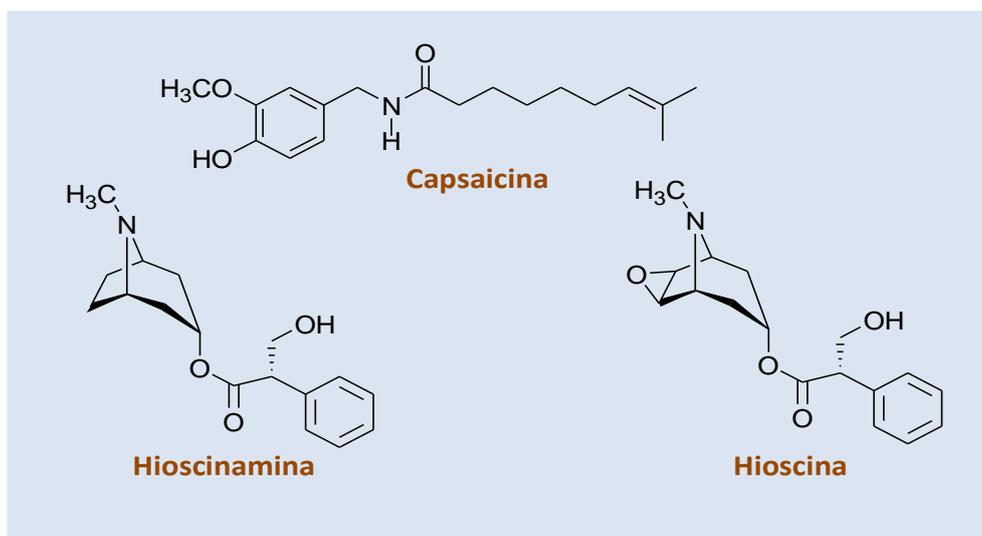
medicamentos sintéticos, a existência de estudos científicos para alguns produtos fitoterápicos que comprovam sua eficácia clínica e segurança, e a grande porcentagem da população mundial que não tem acesso aos medicamentos resultantes de síntese estão dentre as razões do crescente interesse por terapias alternativas e o uso terapêutico de produtos naturais, especialmente os derivados de plantas.<sup>5</sup>

Estes fatores têm estimulado à pesquisa de plantas medicinais como alternativa terapêutica, com resultados bastante satisfatórios e, espécies da família Solanaceae, gênero *Solanum* tem sido alvo de nossos estudos.

### 1.1. Família Solanaceae: o gênero *Solanum*

A família Solanaceae descrita por Antoine Laurent de Jussieu compreende 94 gêneros, com 2.950 espécies subcosmopolitas, sendo 56 gêneros espontâneos na América do Sul, dos quais 25 são endêmicos. Entre estes, encontram-se árvores, arbustos, lianas e ervas e muitos desses com grande ocorrência no Brasil. Os principais gêneros estão distribuídos em duas subfamílias: Solanoideae e Cestroideae.<sup>6</sup>

A subfamília Solanoideae compreende dentre os diversos gêneros o *Capsicum*, que inclui inúmeras pimentas vermelhas e amarelas usadas como condimento, de onde se isolou, entre outros compostos, a capsaicina, apresentada na Figura 1. Destaca-se, também, os gêneros *Datura*, com a espécie *D. stramonium* e outras de importância farmacológica pela presença de inúmeros alcaloides como a hioscinamina e hioscina (Figura 1) e *Solanum*, com inúmeras espécies presentes no Brasil, como o juá-bravo, fumobravo, cuvitinga e outras, amplamente usadas como alimento e que possuem elevado valor econômico, como é o caso da batata-doce e das mais variadas batatas.<sup>7</sup>



**Figura 1.** Estruturas químicas dos alcaloides presentes nos gêneros *Capsicum* e *Datura*

O gênero *Solanum* é considerado um dos maiores e mais complexos entre as angiospermas. Este compreende mais de 1000 espécies<sup>8</sup> e aproximadamente 3000 variedades são descritas na literatura.<sup>9</sup> O gênero é bem representado no Brasil e está amplamente distribuído de norte a sul, e em diversas regiões fitogeográficas, sendo muitas das espécies endêmicas destas regiões. No nordeste do Brasil, muitas espécies de *Solanum* são usadas na medicina popular e são comumente chamadas de jurubeba, sendo esta palavra originária do tupi guarani, yu'beba, que se refere à presença de espinhos em algumas delas.<sup>10,11</sup>

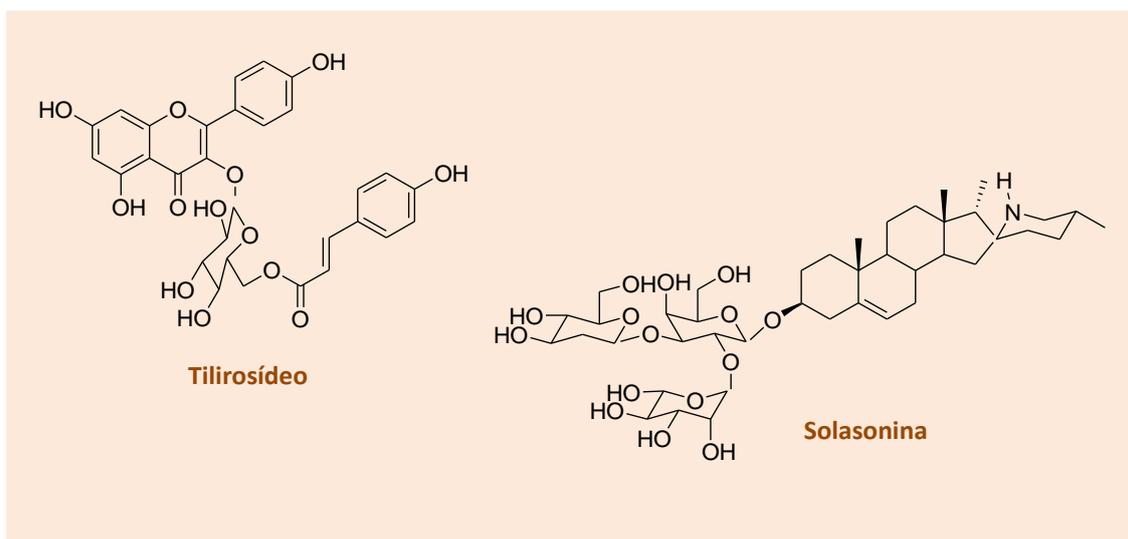
Na subfamília Cestroïdae, com diversos gêneros importantes, destaca-se o gênero *Nicotiana*, da famosa espécie *Nicotiana tabacum*, fonte de nicotina, usada como ferramenta farmacológica e, ainda do ponto de vista comercial e social, uma importante espécie cuja indústria do fumo, ainda movimenta milhões de dólares anualmente, mas que causa problemas de saúde extremamente sérios e graves.

## 1.2. Atividade biológica do gênero *Solanum*

O gênero *Solanum* apresenta grande importância econômica. Espécies de *Solanum* produzem uma grande variedade de saponinas esteroidais e alcaloides responsáveis pela atividade contra alguns agentes patogênicos. Cerca de 200 alcaloides com bases esteroidais diferentes (esqueletos colestano com 27 átomos de carbono divididos em 5 tipos de estruturas) já foram isolados e se apresentam na planta na forma livre ou como glicoalcalóides.<sup>12</sup>

Esteroides alcaloidais e outros glicosídeos ocorrem em numerosas espécies do gênero *Solanum* que demonstram possuir diversas atividades biológicas, incluindo citotóxica,<sup>13</sup> antimicrobiana,<sup>14,15</sup> moluscicida,<sup>16</sup> teratogênica e embriotóxica.<sup>17</sup> Preparações contendo o glicosídeo solasodina são patenteadas e utilizadas para certos tipos de câncer.<sup>18</sup> Espécies deste gênero também possuem flavonoides, como o tilirosídeo, e glicoalcalóides como a solasonina (Figura 2) extraídos dos tricomas de *Solanum crinitum* Lam com atividades citotóxicas avaliadas frente ao carcinoma de Ehrlich e a leucemia humana K562.<sup>19</sup> Adicionalmente, diversas atividades biológicas dos glicoalcalóides são

atribuídas à presença da porção oligossacarídica, incluindo cinco unidades monossacarídicas, usualmente ligadas no carbono 3 do esqueleto esteroidal.<sup>2</sup>



**Figura 2.** Estruturas químicas do flavonoide tilirosídeo e do glicoalcaloide solasonina

Embora sejam chamados glicoalcalóides, alguns destes compostos também apresentam características de saponinas. Muitos glicoalcalóides exibem dois principais tipos de atividades biológicas que refletem sua natureza química “dual”: atividade anticolinesterásica característica de alguns alcaloides e a propriedade de lise da membrana, relacionada as saponinas.<sup>19-21</sup>

Os alcaloides esteroidais são principalmente encontrados nas famílias Apocynaceae, Bruxaceae, Liliaceae e Solanaceae. A maioria dos alcaloides é tóxica para mamíferos quando na forma glicosilada. Alguns glicoalcalóides encontrados no gênero *Solanum*, frequentemente presentes em quantidades relativamente pequenas, podem provocar intoxicações alimentares quando em concentrações maiores na dieta humana normal, provocando problemas gastrointestinais e neurológicos. Esta toxidez permitiu sugerir que os alcaloides participam do processo defensivo dos vegetais. Várias atividades biológicas são atribuídas a tais produtos naturais. São conhecidos aproximadamente 1400 alcaloides esteroidais, que geralmente ocorrem nas partes aéreas de muitas espécies do gênero *Solanum*. Os tipos mais comuns são os

espirolosanos e solanidanos sendo que em muitos casos estes alcaloides são glicosilados, como a solasonina.<sup>12</sup>

Os glicoalcalóides causam efeitos tóxicos, como por exemplo, em micro-organismos e plantas, a toxidez é geralmente manifestada prejudicando o crescimento, desenvolvimento, permeabilidade ou metabolismo. Em animais inferiores a atividade alimentar, crescimento, desenvolvimento e mortalidade são os parâmetros mais comumente quantificados enquanto que, em mamíferos de laboratório uma grande variedade de parâmetros fisiológicos/farmacológicos é registrada. Informações de toxidez em humanos aparecem, principalmente, como casos de envenenamento acidental.<sup>22</sup>

Nosso interesse no estudo de plantas medicinais na busca de novos princípios ativos, particularmente da família Solanaceae, levou-nos a investigar as atividades biológicas dos extratos brutos dos frutos verdes em etanol de diferentes espécies do gênero *Solanum*, bem como de suas frações ricas em glicoalcalóides. Assim, neste trabalho o objetivo foi preparar e avaliar os extratos brutos dos frutos verdes,

bem como as frações alcalóidicas de 6 espécies do gênero *Solanum*: *S. americanum*, *S. capsicoides*, *S. crinitum*, *S. lycocarpum*, *S. seaforthianum* e *S. variabile*, quanto a atividade tóxica frente ao microcrustáceo *Artemia salina* e moluscicida, frente ao caramujo *Biomphalaria glabrata*. Estudos fitoquímicos já realizados com algumas das espécies objeto deste trabalho estão relatados na literatura, dentre eles: a) da planta inteira da espécie *S. seaforthianum* foram isolados os glicoalcalóides solanofortina, isosolanofortina e solanocapsina;<sup>23,24</sup> b) dos frutos verdes de *S. crinitum* foi isolado o glicoalcaloide solasonina e diversos flavonoides;<sup>25</sup> c) frações alcalóidicas dos frutos verdes da espécie *S. lycocarpum* apresentaram os glicoalcalóides solamargina e solasonina, que em mistura equimolar, exibiram atividade leishmanicida significativa frente a *Leishmania amazonensis*.<sup>26</sup> Além disso, o artigo de Silva e colaboradores relata a ocorrência de

flavonas, flavonóis e glicosídeos em diversas espécies do gênero *Solanum*.<sup>27</sup>

## 2. Parte Experimental

### 2.1. Coleta e Identificação do Material Vegetal

#### 2.1.1. *Solanum americanum*

Os frutos verdes de *S. americanum* (Figura 3) foram coletados em Seropédica - RJ e, depois de triturados obteve-se uma massa de 341,3 g que foi utilizada na preparação do extrato. A planta foi identificada pela professora Maria de Fátima Agra, LTF - Setor de Botânica da UFPB, e a exsicata depositada no Herbário Professor Lauro Pires Xavier Jardim Botânico da Paraíba (JBP) UFPB.



**Figura 3.** Foto da espécie *S. americanum* obtida por Forest e Kim Starr de acesso e cópia livre. ([http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Starr\\_010520-0074\\_Solanum\\_americanum.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Starr_010520-0074_Solanum_americanum.jpg))

#### 2.1.2. *Solanum capsicoides*

Os frutos verdes de *S. capsicoides* (Figura 4) foram coletados em Caieiras – SP e, depois de triturados obteve-se uma massa de 86,6 g

utilizada na preparação do extrato. A planta foi identificada pela professora Maria de Fátima Agra, LTF - Setor de Botânica da UFPB, e a exsicata depositada no Herbário Professor Lauro Pires Xavier Jardim Botânico da Paraíba (JBP) UFPB.



**Figura 4.** Foto da espécie *S. capsicoide* obtida por [Tau'olunga](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Solanum_capsicoides.jpg?uselang=pt) de acesso e cópia livre. ([http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Solanum\\_capsicoides.jpg?uselang=pt](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Solanum_capsicoides.jpg?uselang=pt))

### 2.1.3. *Solanum crinitum* Lam

O extrato dos frutos verdes de *S. crinitum* (Figura 5) foi preparado a partir dos frutos verdes coletados em Seropédica - RJ e,

depois de triturados obteve-se uma massa de 1,3 Kg. A planta foi identificada por comparação com exsicata depositada no Herbário do Departamento de Botânica da UFRRJ.



**Figura 5.** Foto da espécie *S. crinitum* L. obtida por Tatiana Gerus de acesso e cópia livre. ([http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Solanum\\_crinitum.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Solanum_crinitum.jpg)).

### 2.1.4. *Solanum lycocarpum*

Os frutos verdes de *S. lycocarpum* (Figura 6) foram coletados em Seropédica - RJ e, depois de triturados obteve-se uma massa

igual a 4,6 g que foi utilizada na preparação do extrato. A planta foi identificada pela professora Maria de Fátima Agra, LTF - Setor de Botânica da UFPB, e a exsicata depositada no Herbário Professor Lauro Pires Xavier Jardim Botânico da Paraíba (JBP) UFPB.



**Figura 6.** Foto da espécie *S. lycocarpum* obtida por [João Medeiros](#) de acesso e cópia livre. ([http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Solanum\\_lycocarpum.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Solanum_lycocarpum.jpg))

#### 2.1.5. *Solanum seaforthianum*

Os frutos verdes de *S. seaforthianum* (Figura 7) foram coletados em Seropédica - RJ e, depois de triturados obteve-se uma massa

igual a 154,3 g utilizada para preparação do extrato. A planta foi identificada pela professora Maria de Fátima Agra, LTF - Setor de Botânica da UFPB, e a exsicata depositada no Herbário Professor Lauro Pires Xavier Jardim Botânico da Paraíba (JBP) UFPB.



**Figura 7.** Foto da espécie *S. seaforthianum* obtida por [Ethel Aardvark](#) de acesso e cópia livre. ([http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Solanum\\_seaforthianum.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Solanum_seaforthianum.jpg))

#### 2.1.6. *Solanum variabile*

Os frutos verdes de *S. variabile* (Figura 8) foram coletados em Seropédica - RJ e, depois de triturados obteve-se uma massa igual a

35,3 g que foi utilizada na preparação do extrato. A planta foi identificada pela professora Maria de Fátima Agra, LTF - Setor de Botânica da UFPB, e a exsicata depositada no Herbário Professor Lauro Pires Xavier Jardim Botânico da Paraíba (JBP) UFPB.



**Figura 8.** Foto da espécie *S. variabile* obtida por Fernando Augusto de acesso e cópia livre. (<http://caminhosnaumbanda.blogspot.com.br/2010/09/jurubeba-planta-de-omulu.html>)

## 2.2. Preparação dos extratos brutos e obtenção das frações glicoalcaloidais

Os frutos verdes foram triturados e adicionou-se etanol (90%) contendo 2% de ácido acético, sendo a mistura mantida em repouso por no mínimo dois dias. Após este período o extrato foi filtrado e concentrado em rota-evaporador. Este procedimento foi realizado 3 vezes para exaustão do extrato.

A fração glicoalcaloidal foi obtida a partir do extrato bruto, já concentrado, sendo adicionado o mesmo volume de ácido acético 10% e, deixando-se pernoitar em resfriamento. Filtrou-se em celite a vácuo, e à solução foi adicionado  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrado (em banho de gelo) em quantidade suficiente para obter pH 10. Após pernoitar, filtrou-se a vácuo, sendo o filtrado descartado e o precipitado já constituía a fração rica em glicoalcaloides.

Foram efetuados testes simples, em bancada, para confirmar a presença de glicoalcalóides nas frações. Este teste consistia em solubilizar uma pequena quantidade da fração em ácido acético e, logo após, adicionar 2 gotas do reagente de Dragendorff,<sup>28</sup> sendo para o resultado positivo observado a formação de precipitado da cor alaranjada.

O procedimento acima descrito foi o mesmo para a preparação de todos os outros extratos e obtenção de suas respectivas frações glicoalcaloidais.

## 2.3. Ensaio biológicos

### 2.3.1. Ensaio de toxidez frente à *Artemia salina* Leach<sup>29</sup>

Preparou-se uma solução salina artificial, composta por 48 g de NaCl; 3 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,2 g de KBr; 1,4 g de KCl; 8 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ; 0,4 g de  $\text{NaHCO}_3$  e 22 g de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  para 2 L de solução, que foi utilizada como meio de cultura das ovas. Colocaram-se as ovas no criadouro e a solução salina até cobri-las totalmente. Tampou-se a parte contendo as ovas e direcionou-se a luz para a parte descoberta, onde após a eclosão, as larvas passam por fototropismo. Os microcrustáceos foram utilizadas após 48 h da eclosão.

Solubilizaram-se 0,05 g dos extratos e das frações glicoalcaloidais em 2 mL de DMSO, transferiu-se para um balão de 5 mL e completou-se o volume com 3 mL de solução salina. Desta solução, chamada de solução mãe, retiraram-se 5 alíquotas de volumes diferentes que variaram de 38 - 500  $\mu\text{L}$ . Transferiram-se aos cinco tubos de ensaio, sendo que cada dose foi preparada em quadruplicata. A cada tubo, com a suas devidas doses, foram adicionados 5 mL de solução salina medidos em uma bureta. Para comparação dos resultados, utilizou-se uma solução controle, com os mesmos volumes que os ensaios com os extratos (500 - 38  $\mu\text{L}$ ), a partir de uma solução estoque que

continha 2 mL de DMSO e 3 mL de solução salina, também preparada em quadruplicata. Utilizando-se uma pipeta Pasteur 10-15 larvas foram colocadas nos tubos de ensaio. As larvas ficaram expostas às amostras e ao controle por 24 h, e após este período realizou-se a contagem dos microcrustáceos vivos e mortos.

O cálculo da dose letal que mata 50% das larvas ( $DL_{50}$ ) foi realizado utilizando-se o log da concentração em função da percentagem de microcrustáceos mortos (método acumulativo) sendo obtidas curvas com perfil sigmoidal, fazendo-se necessário utilizar a técnica estatística de probitos.<sup>30</sup>

### 2.3.2. Ensaio da atividade moluscicida frente ao caramujo *Biomphalaria glabrata*<sup>15</sup>

Os ensaios para a avaliação da atividade moluscicida foram realizados a partir de soluções estoque de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  dos extratos brutos e frações glicoalcaloidais com a adição de 2 gotas de Tween 80. Inicialmente foram realizados testes preliminares transferindo-se alíquotas da solução estoque em 125 mL de água desclorada (concentrações de 80, 70, 50 e  $10 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e adicionadas em recipientes contendo 5 caramujos (25 mL por caramujo). Após 48 h de exposição os caramujos vivos e mortos foram contados.

Os ensaios definitivos foram realizados em duplicata de acordo com os ensaios preliminares em volumes de 250 mL contendo 10 caramujos. Após 24 h observou-se o comportamento dos caramujos e, com 48 h foram transferidos para placas de Petri quando se verificou a reação aos estímulos

provocados com uma espátula para confirmação da mortalidade. Posteriormente, os caramujos foram transferidos para recipientes contendo apenas água e alimento e, após 24 h foram realizados novos exames.

O cálculo dos valores de  $DL_{50}$  foi realizado utilizando o log da concentração em função da percentagem de caramujos mortos, sendo obtidas curvas com perfil sigmoidal, fazendo-se necessário utilizar a técnica estatística de probitos.<sup>30</sup>

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1. Os extratos brutos e frações glicoalcaloidais de *Solanum* spp.

Dentre as seis espécies estudadas, a única que não apresentou resultado positivo para glicoalcalóides foi a *S. capsicoides*. A presença da solasonina foi investigada nas frações, por CCD em comparação com a fração de *S. crinitum*, cuja presença é majoritária e anteriormente isolada e caracterizada.<sup>5</sup>

Os rendimentos dos extratos brutos foram calculados em relação ao peso dos frutos verdes moídos, e os rendimentos das frações glicoalcaloidais em relação aos correspondentes extratos brutos obtidos. Os respectivos valores de pesos e rendimentos estão descritos na Tabela 1, sendo que as espécies *S. crinitum* e *S. seaforthianum* apresentaram-se mais ricas nas frações glicoalcaloidais.

**Tabela 1.** Peso (g) dos frutos verdes, extratos e frações glicoalcaloidais das espécies de *Solanum* e respectivos rendimentos

Espécie	Peso dos frutos (g)	Extrato bruto		Fração glicoalcaloidal	
		Peso (g)	Rendimento (%)	Peso (g)	Rendimento (%)
<i>S. americanum</i>	341,3	70,0	20,1	0,6	0,9
<i>S. capsicoides</i>	86,6	25,0	29,0	-	-
<i>S. crinitum</i>	1.031	600,0	58,2	324,0	54,0
<i>S. lycocarpum</i>	35,3	17,0	48,2	0,4	2,3
<i>S. seaforthianum</i>	154,3	30,0	19,4	13,0	43,0
<i>S. variabile</i>	4,6	0,4	8,1	0,1	25,0

### 3.2. Atividade Biológica

#### 3.2.1. Avaliação da toxidez frente à *Artemia salina* Leach

A letalidade de organismos simples tem sido utilizada para um rápido e relativamente simples monitoramento da resposta biológica, onde existe apenas um parâmetro envolvido: morte ou vida, e os resultados podem ser facilmente tratados estatisticamente. O ensaio de letalidade permite a avaliação da toxidez geral e, portanto é considerado essencial como bioensaio preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica.<sup>29</sup> Dentre esses bioensaios, encontra-se a toxidez sobre *Artemia salina* Leach, que se caracteriza por ser de baixo custo e rápido. A *Artemia salina* é um microcrustáceo de água salgada que é utilizada como alimento vivo para peixes. O primeiro trabalho relativo ao uso desse bioensaio foi para avaliar resíduos de pesticidas.<sup>31</sup> E a partir daí inúmeros artigos têm sido publicados, até recentemente, na literatura em estudos ambientais entre outros, utilizando produtos e toxinas naturais, além de extratos de plantas e produtos de síntese validando, assim, o bioensaio como “screening” inicial para avaliação da toxidez.<sup>32-35</sup>

Os extratos brutos e frações glicoalcaloidais dos frutos verdes de *S. americanum*, *S. capsicoides*, *S. crinitum*, *S. lycocarpum*, *S. seaforthianum* e *S. variabile* foram submetidos ao ensaio de letalidade

frente a *Artemia salina*. Foram preparadas soluções-mãe de 40% (v/v) de DMSO e solução salina. Destas soluções foram retiradas alíquotas que variaram entre 500 – 38  $\mu\text{L}$  que foram adicionadas aos tubos de ensaio para a realização dos testes. Os ensaios foram realizados em quadruplicata para cada concentração. Os gráficos obtidos a partir dos valores do logaritmo das doses versus os percentuais de larvas mortas, em cada concentração ensaiada, apresentaram perfil sigmoidal, que foram tratados estatisticamente pelo método dos Probitos<sup>30</sup> e, posteriormente submetidos à regressão linear. As equações assim obtidas permitiram a obtenção dos valores da dose letal que mata 50% dos microcrustáceos ( $\text{DL}_{50}$ ). A Tabela 2 apresenta os valores para as  $\text{DL}_{50}$  dos extratos brutos bem como para as frações glicoalcaloídicas e as equações obtidas para o cálculo dos referidos valores.

A Tabela 2 apresenta os valores para as  $\text{DL}_{50}$  dos extratos brutos bem como para as frações glicoalcaloídicas e as equações obtidas para o cálculo dos referidos valores.

Os resultados obtidos mostraram que todos os extratos brutos apresentaram atividade tóxica significativa, sendo a espécie *S. seaforthianum* a mais ativa ( $\text{DL}_{50} = 23,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), enquanto que as frações alcaloidais foram mais ativas quando comparadas aos respectivos extratos brutos. A fração de glicoalcalóides mais ativa também foi de *S. seaforthianum* que apresentou  $\text{DL}_{50} = 1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , e a menos ativa foi a *S. variabile* com  $\text{DL}_{50} = 160 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

**Tabela 2.** Valores de DL<sub>50</sub> (µg.mL<sup>-1</sup>) frente à *Artemia salina* para os extratos brutos e frações glicoalcaloidais das espécies de *Solanum*

Espécie	Extrato Bruto DL <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )	Fração alcaloídica DL <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )	Atividade <sup>a</sup>
<i>S. americanum</i>	25,20	18,70	Ativa
<i>S. capsicoides</i>	40,00	n. t. <sup>b</sup>	Ativa
<i>S. crinitum</i>	57,70	13,00	Ativa
<i>S. lycocarpum</i>	80,00	70,00	Ativa
<i>S. seaforthianum</i>	23,60	1,00	Ativa
<i>S. variable</i>	n. t. <sup>b</sup>	160,00	Ativa

<sup>a</sup>Considera-se ativa quando DL<sub>50</sub> < 1.000 µg.mL<sup>-1</sup>; <sup>b</sup>n. t. = não testada.

### 3.2.2. Avaliação da atividade moluscicida frente a *Biomphalaria glabrata*

A esquistossomose é uma doença parasitária considerada como problema de saúde em muitos países tropicais e, mais de 300 milhões de pessoas estão infectadas. Os caramujos aquáticos são os hospedeiros intermediários para o parasita e por causa disto, a infecção é transmitida para os humanos através do contato com a água contaminada, principalmente em áreas rurais com o fornecimento precário de água para o consumo doméstico e de pobres instalações sanitárias. A erradicação da doença é impossível com os recursos disponíveis, entretanto o objetivo imediato é o controle da mortalidade. Apesar do sucesso de alguns programas de controle, a prevalência da esquistossomose continua constante, devido principalmente ao crescimento da população e ao aumento de áreas de irrigação.<sup>36</sup> No Brasil 8 milhões de pessoas são infectadas, com distribuição em vastas regiões, endêmica nos estados de Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Minas Gerais. No entanto, há focos importantes em vários municípios nos estados do Pará, Maranhão, São Paulo e Paraná que merecem a atenção das autoridades da área da saúde.<sup>37</sup>

É uma doença provocada pelo platelminto *Schistosoma mansoni* que caracteriza-se por uma fase aguda, muitas vezes despercebida,

e uma crônica, na qual podem surgir formas graves, evidenciadas principalmente pela hipertensão porta ou pulmonar.<sup>38</sup> Existe uma necessidade urgente de encontrar um agente moluscicida seletivo e eficiente para o controle dos caramujos (hospedeiros do *S. mansoni*), especialmente porque os compostos utilizados ou as formulações em geral são biocidas, afetando, também, muitos animais e plantas (ou ambos) onde estes habitam. Por esta razão, tem-se aumentado a procura por plantas ou seus metabólitos especiais com atividade moluscicida, na esperança de que espécies disponíveis localmente possam ser usadas para o controle da doença em áreas endêmicas.

Silva e colaboradores realizaram, anteriormente, ensaios com seis extratos brutos em metanol dos frutos das espécies *S. asperum*, *S. capsicoides*, *S. palinacantum*, *S. paludosum*, *S. paniculatum*, *S. paraibanus*, *S. sisymbriifolium* frente aos caramujos *Biomphalaria glabrata*. Os resultados mostraram valores de LD<sub>50</sub> na faixa de 20 a 50 µg/mL indicando que os extratos brutos apresentavam atividade moluscicida significativa, pois a Organização Mundial de Saúde indica que valores de DL<sub>50</sub> abaixo de 100 µg.mL<sup>-1</sup> são considerados potencialmente moluscicidas.<sup>16</sup>

Neste trabalho, os extratos brutos, em etanol (90%), dos frutos verdes e as frações glicoalcaloidais de *Solanum* spp. (S.

*americanum*, *S. capsicoides*, *S. crinitum*, *S. lycocarpum*, *S. seaforthianum* e *S. variable*) foram submetidos ao ensaio moluscicida frente ao caramujo *Biomphalaria glabrata*. Primeiramente, foram realizados ensaios

preliminares (triagem, conforme Parte Experimental) para verificar a existência ou não de atividade significativa. Os resultados dessa triagem estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Triagem da ação moluscicida dos extratos brutos e frações glicoalcaloidais das seis espécies do gênero *Solanum*

Espécie	Extrato bruto ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Mortalidade (%)	Atividade	Fração ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Mortalidade (%)	Atividade
<i>S. americanum</i>	100	0	Inativa	100	0	Inativa
<i>S. capsicoides</i>	100	0	Inativa	n. t. <sup>a</sup>	-	Inativa
<i>S. crinitum</i>	100	100	Ativa	100	100	Ativa
	50	0	Inativa	80	100	Ativa
				70	100	Ativa
				50	100	Ativa
<i>S. lycocarpum</i>	100	0	Inativa	100	0	Inativa
<i>S. seaforthianum</i>	100	0	Inativa	100	100	Ativa
				50	40	Ativa
<i>S. variable</i>	n. t.	-	-	100	0	Inativa

<sup>a</sup>n. t. = não testado.

De acordo com os resultados observados na Tabela 3, verificou-se que apenas as frações glicoalcaloidais de *S. seaforthianum* e *S. crinitum*, apresentaram atividade moluscicida significativa. Assim, os ensaios definitivos foram realizados apenas com as frações alcaloidais dessas espécies. As concentrações utilizadas variaram entre 40 e  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , conforme a metodologia detalhada na Parte Experimental e, os ensaios foram realizados em duplicata para cada dose, sendo cada experiência realizada com 20 caramujos. A contagem dos caramujos mortos e vivos foi realizada após 48 horas, mantendo-se os ensaios em observação por mais 24 horas. Os gráficos dos logs das doses versus os percentuais de caramujos mortos possibilitaram a obtenção dos valores de  $DL_{50}$ , após o tratamento estatístico pelo método dos Probitos<sup>30</sup>, sendo

posteriormente submetidos à regressão linear. A Tabela 4 mostra os valores de  $DL_{50}$  obtidos para as frações glicoalcaloidais de *S. crinitum* e *S. seaforthianum* frente aos caramujos *Biomphalaria glabrata*.

As frações glicoalcaloidais das espécies *S. crinitum* e *S. seaforthianum* apresentaram atividade moluscicida significativa com valores de  $DL_{50} = 34,70 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4,90 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectivamente, confirmando os resultados observados nos ensaios preliminares.

Os resultados obtidos para os valores de  $DL_{50}$  das espécies *S. crinitum* e *S. seaforthianum* foram significativamente baixos, em especial a espécie *S. seaforthianum* ( $4,90 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), e bem abaixo do  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  estabelecidos pela OMS para um reconhecido potencial moluscicida.<sup>39</sup>

**Tabela 4.** Valores de DL<sub>50</sub> (µg.mL<sup>-1</sup>) para as frações glicoalcaloidais de *S. crinitum* e *S. seaforthianum* frente aos caramujos *Biomphalaria glabrata*.

Espécie Vegetal	DL <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )	Coefficiente de correlação <sup>a</sup>
<i>S. crinitum</i>	34,70	0,9647
<i>S. seaforthianum</i>	4,90	0,9358

<sup>a</sup>Coefficiente de correlação, obtido após a regressão linear para o cálculo da DL<sub>50</sub>.

## 4. Conclusões

As frações glicoalcaloidais, mais abundantes, obtidas das espécies *S. crinitum* e *S. seaforthianum* apresentaram atividade moluscicida significativa que pôde ser correlacionada, também, com a maior toxidez frente a *Artemia salina*, uma vez que estas também foram as mais ativas frente a esse microcrustáceo, indicando a importância do ensaio de toxidez geral. Os valores de DL<sub>50</sub> obtidos para as frações glicoalcaloidais de *S. crinitum* e *S. seaforthianum* 34,70 e 4,90 µg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente, indicam que os frutos dessas espécies poderiam ser utilizados como agentes moluscicidas, após ensaios de toxidez frente a espécies animais e vegetais aquáticas, visando o controle desses caramujos.

### Referências Bibliográficas

- <sup>1</sup> Viegas Jr., C.; Bolzani, V. S.; Barreiro, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova* **2006**, *29*, 326. [CrossRef]
- <sup>2</sup> Petrovska, B. B. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy Reviews* **2012**, *6*, 1. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>3</sup> Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products* **2012**, *75*, 311-335. [CrossRef] [PubMed]

<sup>4</sup> Veiga Jr.; Pinto, A. C.; Maciel, M. A. M. Plantas medicinais: Cura segura? *Química Nova* **2005**, *28*, 519. [CrossRef]

<sup>5</sup> Maciel, M. A. M.; Pinto, A. C.; Veiga, V. F. J.; Grynberg, N. F.; Echevarria, A. Plantas Medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova* **2002**, *25*, 429. [CrossRef]

<sup>6</sup> Silva, T. M. S.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, 2002.

<sup>7</sup> Mabberly, D. J. *The Plant Book. A Portable Dictionary of the Vascular Plants*. 3a. ed., Cambridge University Press: Cambridge, 2008.

<sup>8</sup> Di Stasi, L. C.; Hiruma-Lima, C. A. *Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica*. 2a. ed., Editora UNESP: São Paulo, 2002.

<sup>9</sup> D'Arcy, W. G. *The Solanaceae since 1976 with a Review of its Biography*. In: J. G. Hawkes, R. N. Lester, M. Nee & N. Estrada-R. (eds.), *Solanaceae III: Taxonomy, Chemistry, Evolution*. Royal Botanic Gardens: Kew, 1991.

<sup>10</sup> Genus *Solanum*. PlantNET - New South Wales Flora Online. Royal Botanic Gardens & Domain Trust, Sydney Australia. Retrieved 2008-10-15. [Link]

<sup>11</sup> Silva, T. M. S.; Carvalho, M. G.; Braz-filho, R.; Agra, M. F. Ocorrência de flavonas, flavonóis e seus glicosídeos em espécies do gênero *Solanum* (Solanaceae). *Química Nova* **2003**, *26*, 517. [CrossRef]

<sup>12</sup> Agra, M. F.; Nurit-Silva, K.; Berger, L. R. Flora da paraíba, Brasil: *Solanum* L. (Solanaceae). *Acta Botanica Brasilica* **2009**, *23*, 826. [Link]

<sup>13</sup> Atta-Ur-Rahman; Choudhary, M. I. *Chemistry and Biology of Steroidal Alkaloids*.

- The Alkaloids: Chemistry & Biology* **1998**, *50*, 61. [[CrossRef](#)]
- <sup>14</sup> Li, J.; Zhang, L.; Huang, C.; Guo, F.; Li, Y. Five new cytotoxic steroidal glycosides from the fruits of *Solanum torvum*. *Fitoterapia* **2014**, *93*, 209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>15</sup> Al-Rehaily, A. J.; Ahmad, M. S.; Mustafa, J.; Al-Oqail, M. M.; Hassan, W. H.; Khan, S. I.; Khan, I. A. Solanopubamine, a rare steroidal alkaloid from *Solanum schimperianum*: Synthesis of some new alkyl and acyl derivatives, their anticancer and antimicrobial evaluation. *Journal of Saudi Chemical Society* **2013**, *17*, 67. [[CrossRef](#)]
- <sup>16</sup> Silva, T. M. S.; Batista, M. M.; Camara, C. A.; Agra, M. F. Molluscicidal activity of some Brazilian *Solanum* spp. (Solanaceae) against *Biomphalaria glabrata*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **2005**, *4*, 419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>17</sup> Aguilar-Santamaria, L.; Herrera-Arellano, A.; Zamilpa, A.; Alonso-Cortés, D.; Jimenez-Ferrer, E.; Tortoriello, G.; Zúñiga-González. Toxicology, genotoxicity, and cytotoxicity of three extracts of *Solanum chrysotrichum*. *Journal of Ethnopharmacology* **2013**, *150*, 275. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>18</sup> Cham, B. E.; Gerns, E. H. J.; Gerns, H. H., Pharmaceutical Compositions Comprising Steroid Alkaloids. *European Patent*, EP 002029, **1980**.
- <sup>19</sup> Esteves-Souza, A.; Silva, T. M. S.; Alves, C. C. F.; Carvalho, M. G.; Braz-Filho, R.; Echevarria, A. Cytotoxic activities against Ehrlich carcinoma and human K562 leukaemia of alkaloids and flavonoid from two *Solanum* species. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2002**, *13*, 838. [[CrossRef](#)]
- <sup>20</sup> Lu, Y.; Luo, J.; Huang, X.; Kong, L. Four new steroidal glycosides from *Solanum torvum* and their cytotoxic activities. *Steroids* **2009**, *74*, 95, [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>21</sup> Trevisan, M. T. S.; Macedo, F. V. V. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para o tratamento da doença de Alzheimer. *Química Nova* **2003**, *26*, 301. [[CrossRef](#)]
- <sup>22</sup> Patel, P. K.; Patel, M. A.; Vyas, B. A.; Shah, D. R.; Gandhi, T. R. Antiurolithiaticativity of saponin rich fraction from fruits of *Solanum xanthocarpum* Schrad. & Wendi (Solanaceae) against ethyleneglycol induced urolithiasis in rats. *Journal of Ethnopharmacology* **2012**, *144*, 160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>23</sup> Ali, E.; Chakravarty, A. K.; Dhar, T. K.; Pakrashi, S. C. Solaseaforthine and isosolaseaforthine, two novel 3-amino-20-pyridyl pregnanes from *Solanum seaforthianum*. *Tetrahedron Letters* **1978**, *19*, 3871. [[CrossRef](#)]
- <sup>24</sup> Ali, E.; Chakravarty, A. K.; Pakrashi, S. C.; Biemann, K.; Hignite, C. E. Studies on indian medicinal plants-XLIV: Solanoforthine, a new steroidal alkaloid from *Solanum seaforthianum*. A note on the mass spectrum of solanocapsine. *Tetrahedron* **1977**, *33*, 1371. [[CrossRef](#)]
- <sup>25</sup> Cornelius, M. T. F.; Alves, C. C. F.; Silva, T. M. S.; Alves, K. Z.; Carvalho, M. G.; Braz-Filho, R.; Agra, M. F. Solasonina e flavonoides isolados de *Solanum crinitum* Lam. *Revista Brasileira de Farmácia* **2004**, *85*, 57. [[Link](#)]
- <sup>26</sup> Miranda, M. A.; Tioosi, R. F. J.; Silva, M. R.; Rodrigues, K. C.; Kuehn, C. C.; Oliveira, L. G. R.; Albuquerque, S.; McChesney, J. D.; Lezama-Davila, C. M.; Isaac-Marquez, A. P.; Bastos, J. K. *In vitro* leishmanicidal and cytotoxic activities of the glycoalkaloids from *Solanum lycocarpum* (Solanaceae) fruits. *Chemistry & Biodiversity* **2013**, *10*, 642. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>27</sup> Silva, T. M. S.; Carvalho, M. G.; Braz-Filho, R. Ocorrência de flavonas, flavonóis e seus glicosídeos em espécies do gênero *Solanum* (Solanaceae). *Química Nova* **2003**, *26*, 517. [[CrossRef](#)]
- <sup>28</sup> Mattos, J. F. A. *Introdução à Fitoquímica Experimental*, 2a. ed., UFC: Fortaleza, 1997.
- <sup>29</sup> Mayer, B. N.; Ferrigne, N. R.; Putnam, J. E.; Jacobsen, L. B.; Nichols, B.; McLaughlin, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica* **1982**, *45*, 31. [[CrossRef](#)]
- <sup>30</sup> Bier, O. *Bacteriologia e Imunologia*. 12a. ed., Edições Melhoramentos: São Paulo, 1965.
- <sup>31</sup> Michael, A. S.; Thompson, C. G.; Abramovitz, M. *Artemia salina* as a test organism for bioassay. *Science* **1956**, *123*, 464. [[CrossRef](#)]
- <sup>32</sup> Ferraz-Filha, Z. S.; Lombardi, J. A.; Guzzo, L. S.; Saúde-Guimarães, D. A. Brine shrimp (*Artemia salina* Leach) bioassay of extracts

from *Lychnophoriopsis candelabrum* and diferente *Lynchnophora* species. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* **2012**, *14*, 358. [CrossRef]

<sup>33</sup> Rocha-Filho, C. A. A.; Albuquerque, L. P.; Silva, L. R. S.; Silva, P. C. B.; Coelho, L. B. B.; Navarro, D. M. A. F.; Albuquerque, M. C. P. A.; Melo, A. M. M. A.; Napoleão, T. H.; Pontual, E. V.; Paiva, P. M. G. Assessment of toxicity of *Moringa oleifera* flower extract to *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* and *Artemia salina*. *Chemosphere* **2015**, *132*, 188. [CrossRef]

<sup>34</sup> Caldwell, G. S.; Bentley, M. G.; Olive, P. J. W. The use of a brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay to assess the toxicity of diatom extract and short chain aldehydes. *Toxicon* **2003**, *42*, 301-306. [CrossRef]

<sup>35</sup> Asakawa, Y.; Ludwiczuk, A.; Nagashima, F. Phytochemical and biological studies of bryophytes. *Phytochemistry* **2013**, *91*, 52. [CrossRef]

<sup>36</sup> Sítio da Pan American Health Organization / World Health Organization – Regional Office for the Americas. Disponível em: <[http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=article&id=50&Itemid=40242](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=50&Itemid=40242)>. Acesso em: 10 novembro 2014.

<sup>37</sup> Sítio da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical - SBMT. Disponível em: <[http://www.sbmt.org.br/site/corpo\\_texto/774](http://www.sbmt.org.br/site/corpo_texto/774)>. Acesso em: 10 novembro 2014.

<sup>38</sup> Vitorino, R. R.; Souza, F. P.; C.; Costa, A. P.; Faria Junior, F. C.; Santana, L. A.; Gomes, A. P. Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle. *Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica* **2012**, *10*, 39. [Link]

<sup>39</sup> World Health Organization (1983). Reports of the Scientific Working Group on Plant Molluscicides. Document TDR/SCH.SWG/4/83.3. Geneva: WHO. [Link]