

Influência da radiação gama na ação moluscicida de extratos de cajueiro em *Biomphalaria glabrata*

G. H. F. Santos^{1*}; E. B. Silva^{1,2}; A. M. M. A. Melo³; E. L. C. Amorim⁴; T. J. S. Peixoto Sobrinho⁴; C. S. A. Lima³

¹ Departamento de Energia Nuclear/Grupo de Radioproteção e Radioecologia, Av. Prof. Luiz Freire, 1000. Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil. CEP. 50740-540

² Centro Acadêmico de Vitória, Rua do Alto do Reservatório, s/n - Bela Vista - Vitória de Santo Antão, CEP 50670-901, PE, Brasil.

³ Departamento de Biofísica/UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Recife, PE, Brasil. CEP. 50670-901 Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil,

⁴ Departamento de Farmácia, UFPE, Av. Prof. Arthur de Sá, s/n, CEP 50740-521, Cid Universitária, Recife, PE, Brasil,

santosghf@hotmail.com

(Recebido em 29 de março de 2013; aceito em 15 de julho de 2013)

Materiais vegetais ricos em compostos fenólicos, tais como o cajueiro (*Anacardium occidentale* Linn.), têm sido utilizados como alternativas aos pesticidas sintéticos, em programas de controle de *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário de *Schistosoma mansoni*. Estudos mostram que a radiação ionizante pode influenciar no conteúdo de compostos fenólicos e, portanto, suas ações biológicas. O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da radiação gama de ⁶⁰Co na composição de polifenóis de extratos hidroalcoólicos de cascas e folhas de *A. occidentale*, além de avaliar a ação tóxica destes extratos contra embriões e adultos de *B. glabrata*. Os extratos foram irradiados a 10 kGy, sendo mantidos os controles de 0 kGy e controles positivo (CaCO₃) e negativo (H₂O). Quantificou-se polifenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu e taninos por precipitação da caseína. Utilizaram-se extratos na concentração de 100 mg/L. Os resultados mostraram que a radiação provocou alterações, para folhas, dos percentuais de polifenóis e taninos, além do percentual de letalidade contra embriões e adultos de *Biomphalaria glabrata*, sendo estes percentuais de: 13 ± 5 (0 kGy) e 27 ± 2,5 (10 kGy) e, 36,67 ± 5,77 (0 kGy) e 56,67 ± 5,77 (10 kGy), respectivamente. A radiação gama provocou alterações importantes nos teores dos polifenóis para os extratos de folhas de *Anacardium occidentale* Linn., traduzidas pelo aumento da toxicidade deste extrato frente aos embriões e adultos de *Biomphalaria glabrata*. Isto indica que a radiação gama pode ser utilizada como agente potencializador da toxicidade de extratos vegetais no uso alternativo destes materiais como moluscicidas.

Palavras-chave: radiação gama, *Biomphalaria glabrata*, moluscicidas vegetais.

Influence of gamma radiation on the levels of polyphenols and lethality of ethanol extracts of *Anacardium occidentale* Linn., against *Biomphalaria glabrata*.

Plant materials rich in phenolic compounds, such as *Anacardium occidentale* Linn., have been used as alternatives to synthetic pesticides in *Biomphalaria glabrata* control programs, intermediate host of *Schistosoma mansoni*. Studies show that ionizing radiation can influence the content of phenolic compounds and thus their biological actions. The aim of this study was to evaluate the influence of gamma radiation of ⁶⁰Co in polyphenol composition of hydroalcoholic extracts of bark and leaves of *A. occidentale* and evaluate the toxicity of these extracts to embryos and adults of *B. glabrata*. To achieve this goal this, the extracts were irradiated at 10 kGy, the controls being maintained from 0 kGy and positive (CaCO₃) and negative (H₂O). We quantified the total phenols by the Folin-Ciocalteu and tannins by precipitation of casein. Extracts were used at a concentration of 100 mg/L. The results showed that the radiation caused the changes to the leaves, the percentage of polyphenols and tannins, and the percentage of lethality in embryos and adults *Biomphalaria glabrata*, these percentages being: 13 ± 5 (0 kGy) and 27 ± 2.5 (10 kGy), and 36.67 ± 5.77 (0 kGy), and 56.67 ± 5.77 (10 kGy), respectively. Gamma radiation caused significant changes in the levels of polyphenols in the extracts of leaves of *Anacardium occidentale* Linn., translated by the increased toxicity of this extract against embryos and adults of *Biomphalaria glabrata*. This indicates that gamma radiation can be used as an agent potentiating the toxicity of plant extracts on the alternate use of these materials as molluscicides..

Keywords: gamma radiation, *Biomphalaria glabrata*, vegetable molluscicides.

1. INTRODUÇÃO

Historicamente, o controle e combate à esquistossomose, doença transmitida pelo *Schistosoma mansoni*, ocorrem por meio de medidas educativas e de outras medidas mais efetivas, tais como a implementação de saneamento básico e o controle do seu hospedeiro intermediário^{1, 2, 3, 4, 5, 6}.

No Brasil, *Schistosoma mansoni* é transmitida por três espécies hospedeiras do gênero Biomphalaria: *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835), encontrada frequentemente no sul do país; *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) e *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) predominantes no Nordeste^{7, 8, 9, 10, 11, 12}.

Normalmente, os métodos utilizados para o controle destes moluscos são os seguintes: o ambiental, que altera condições físicas naturais do habitat em que vive o vetor, como a terra, água ou vegetação¹³; os biológicos, que consistem na implementação de bactérias, fungos, vírus e protozoários no habitat do caramujo, promovendo competição^{1, 14}; e os químicos, que utilizam moluscidas sintéticos (substâncias ministradas em baixas concentrações na água do habitat dos caramujos, causando letalidade total ou parcial dos caramujos)^{15, 16}.

Porém, todos os métodos citados, de alguma forma, causam danos ao meio ambiente. No caso do uso moluscidas sintéticos, surge a preocupação com o desenvolvimento de resistência dos caramujos a essas substâncias, além da baixa seletividade que apresentam (atuando sobre outras espécies da fauna, podendo perturbar o equilíbrio ecológico local). Isto tem levado os pesquisadores a procurarem novas substâncias que possam ser facilmente biodegradáveis e que não causem danos ao meio ambiente. Neste contexto, vários pesquisadores têm voltado seus trabalhos para o uso de moluscidas de origem vegetal, os quais são menos nocivos ao ambiente^{16, 17, 18, 19, 20, 21}.

No Nordeste brasileiro *Anacardium occidentale* Linn., conhecida por cajueiro, é uma planta da família Anacardiaceae, originária da América do Sul. Seus constituintes químicos mais abundantes são os polifenóis, o que lhe confere grande interesse para a medicina, indústria cosmética e alimentícia^{22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29}.

Os polifenóis, incluindo os taninos (responsável pela toxicidade do vegetal), são os constituintes mais abundantes em vegetais, depois da celulose, hemicelulose e lignina^{30, 31, 32, 33}. Estão presentes em quase todas as espécies, no estado livre na natureza, na forma de ésteres ou de heterosídeos sendo solúveis em água e em outros solventes orgânicos polares. Os taninos também contribuem com o sabor, odor e coloração de diversos vegetais, sendo utilizados como corantes de alimentos e bebidas^{34, 35}.

A atividade moluscida é determinada a partir da eficiência de uma substância em inviabilizar tanto os embriões dentro dos ovos dos caramujos (ação ovicida) quanto a dos animais adultos^{36, 37}.

A radiação gama, em doses que varia de 0.5 a 10 kGy, pode ou não desencadear mudanças físico-químicas em materiais de origem vegetal, sendo estas mudanças peculiares a cada espécie. Alguns autores^{29, 38, 39, 40, 41, 42}, observaram que a radiação provocou o aumento dos teores de flavonas, fenóis totais e taninos sem associação dose-dependente; Já^{43, 44, 45} observaram que a radiação gama age diminuindo os teores de taninos. Porém, alguns estudos mostraram que a radiação gama pode não influenciar os teores de fenóis e taninos, mesmo na dose de 10 kGy^{46, 47}.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivos avaliar a ação da radiação gama do ⁶⁰Co em extratos brutos de *A. occidentale* Linn., sobre os teores de compostos fenólicos e, posteriormente, avaliar a letalidade destes extratos frente a embriões e adultos de *B. glabrata*.

2. METODOLOGIA

2.1 Material botânico

Anacardium occidentale Linn (cascas e folhas) foram coletados em fragmento de caatinga arbórea, com cerca de 20 ha, dentro da "Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária" (IPA) da Estação Experimental, Estado de Pernambuco, Brasil (08°14'18.2"S e 35°54'57.1"W).

A área está localizada cerca de 9 km a nordeste da cidade de Caruaru, a cerca de 150 km da capital do estado de Recife⁴⁸. Esta área foi escolhida devido ao grande número de espécimes do gênero e por oferecer boas condições de preservação. Um espécime voucher (46.236) foi depositada no Herbário UFP Geraldo Mariz, do Departamento de Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

2.2 Preparação dos extratos vegetais

Os extratos brutos foram obtidos a partir das cascas e folhas de *A. occidentale* por maceração durante 72 horas em três extrações consecutivas com etanol/água 70%. Posteriormente, os extratos hidroalcoólicos foram filtrados e evaporados a secura em Evaporador Rotativo Marconi (modelo MA-120).

2.3 Irradiação dos extratos

As amostras de extratos brutos de cascas e folhas de *A. occidentale*, consistiram de 20g de cada material homogêneo (controle: 0 kGy; irradiado: 10 kGy).

Para irradiação, as amostras foram colocadas em tubos de vidro e levadas ao irradiador Gammacell com fonte de ⁶⁰Co (modelo 220-Excel MDS Nordion, taxa de dose de 10,040 kGy/h), pertencente ao Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco.

2.4 Determinação dos polifenóis totais e de taninos

O teor de polifenóis totais dos extratos foi determinado pelo método Folin-Ciocalteu e o conteúdo fenólico residual foi determinado pelo método de precipitação de caseína seguido pelo método de Folin-Ciocalteu, onde o teor de taninos é calculado pela diferença entre o conteúdo de fenóis totais e fenóis residuais. O teor de fenóis totais foi calculado a partir de 1 ml de extrato diluído (10 mg/ml, v/v), 5 ml de solução aquosa de Folin-Ciocalteu (10%, v/v), 10 ml de solução aquosa de carbonato de sódio (7,5% , v/v) e 84 ml de água destilada. A solução foi deixada em repouso no escuro durante 30 minutos e a absorvância foi medida a 760 nm. Para calcular o conteúdo fenólico residual, de 15 ml do extrato diluído (10 mg/ml, v/v), foi agitada durante 3 horas com 1 g de caseína, filtrada e ajustada a um volume final de 25 ml com água destilada. O conteúdo fenólico residual foi determinada com 5 ml do filtrado com o método de Folin-Ciocalteu. Os teores de fenóis totais e taninos foram expressos como de 1 mg equivalentes de ácido tânico, por cada grama de extrato (mg EAT/g). As amostras foram avaliadas com seis repetições. A equação de ácido tânico de calibração foi $y = 0,0676x + 0,0119$ ($R^2 = 0,9991$)^{49, 50, 51, 52}.

2.5 Letalidade de *Biomphalaria glabrata*

Os bioensaios para obtenção da atividade moluscicida foram realizados em triplicatas no Laboratório de Radiobiologia do Departamento de Biofísica e Radiobiologia da UFPE e consistiram dos seguintes testes:

2.5.1 Letalidade de embriões de *Biomphalaria glabrata*

O bioensaio seguiu os procedimentos descritos por Camey; Verdonk⁵³, o qual utiliza embriões no estágio de blástula de *B. glabrata* adultos. Para o ensaio de letalidade foram considerados os seguintes grupos: um grupo irradiado e exposto a concentração de 100 ppm (mg/L) de extratos de *A. occidentale*; um grupo não irradiado e expostos a extratos de folhas e cacas na concentração de 100 ppm de *A. occidentale*; um grupo submetido ao controle positivo Carbonato Cúprico (CaCO₃) e um outro formando o grupo submetido ao controle negativo com água potável. As análises foram realizadas em triplicata, utilizando-se um número mínimo de 100 embriões por repetição.

Os embriões foram distribuídos em placa de Petri e expostos às substâncias testes, por 24 horas. Posteriormente, as desovas foram transferidas para 10 ml de água filtrada e decolorada (Filtro BELLA-FONTE da -PURITY) e mantidos em estufa de demanda bioquímica de oxigênio (BOD-Eletrolab ®-122FC), a temperatura de 25° C e fotoperíodo de 12 horas, durante todo o experimento. Os embriões foram observados durante 10 dias consecutivos com auxílio de microscópio estereoscópio (Tecnival® SQZ). Ao final deste período foram contabilizados os embriões viáveis e inviáveis (mortos e malformados). Os embriões mortos foram aqueles que apresentavam massa intumescida, sem movimento corporal e cardíaco; já os embriões vivos foram aqueles que apresentaram desenvolvimento normal, que conseguiram eclodir durante o período de observação; já os embriões malformados foram classificados segundo o critério de Camey, and Verdonk⁵³.

2.5.2 Letalidade de *Biomphalaria glabrata* adulto

Grupos de 10 adultos de *B. glabrata* com diâmetro de concha de 8 a 10 mm foram expostas durante 24 horas a extratos não irradiados e irradiados de casca e folhas de *A. occidentale* na concentração de 100 ppm (mg/L). Os ensaios consistiram de dois grupos controle comparativos: água potável (controle negativo) e carbonato cúprico (CaCO₃) (controle positivo).

Após 24 horas, os caramujos foram lavados e mantidos em água filtrada e decolorada (Filtro BELLA-FONTE da -PURITY). Observou-se a ocorrência de mortalidade, adotando-se como critério a retração de caramujos em suas conchas ou a liberação de hemolinfa e observaram-se as mudanças, tais como resultado do batimento cardíaco, através de um microscópio estereoscópico.

2.6 Análises estatísticas

A influência da radiação gama nos teores de polifenóis totais e taninos dos extratos analisados e nos percentuais de letalidade destes extratos frente a embriões e adultos de *Biomphalaria glabrata* foi avaliada através de Análise de Variância: um critério seguido de comparações múltiplas pelo teste de Tukey, a um nível de a significância de 5% ($p < 0.05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinação de fenóis totais e taninos

A Figura 1 mostra as relações entre as concentrações e as medidas de absorvância das soluções-padrão de ácido tânico, nas seguintes concentrações: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 e 3,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O gráfico obtido é uma curva de calibração, onde, a partir dela, foi possível determinar as concentrações dos fenóis totais e residuais. A quantidade de taninos corresponde à diferença entre os valores encontrados nas duas leituras. Fenóis totais e taninos foram expressos em “mg” de matéria seca.

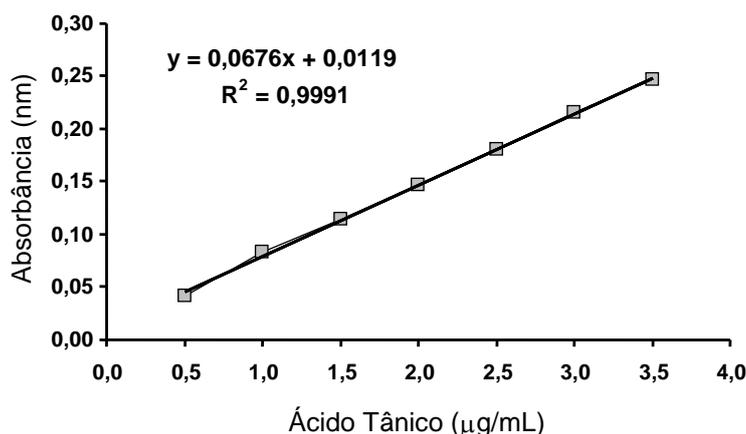


Figura 1: Curva de calibração da concentração de ácido tânico em mg/mL^{-1} pela absorbância. Em evidência, encontram-se a equação da reta e o coeficiente de determinação do ajuste.

Na Tabela 1 estão descritos os valores médios dos teores dos principais metabólitos secundários (polifenóis totais e taninos) presentes nos extratos brutos de *A. occidentale*.

Tabela 1: Polifenóis totais e taninos expressos em microgramas de equivalentes de ácido tânico (EAT) por grama de matéria seca (\pm desvio padrão) ($N = 6$) em cascas e folhas de *Anacardium occidentale* Linn, para o controle (0 kGy) e amostra irradiada (10 kGy) e análise estatística (ANOVA, seguido de Tukey, $p < 0,05$).

Dose (kGy)	Polifenóis totais (mg EAT/g)	Taninos (mg EAT/g)
	Cascas	
0	5,79 \pm 0,07	5,34 \pm 0,07
10	5,96 \pm 0,04	5,34 \pm 0,04
Dose (kGy)	Folhas	
	0	3,13 \pm 0,04 *
10	3,50 \pm 0,08 *	2,93 \pm 0,04 *

*Indica diferença estatística entre as amostras irradiadas e não irradiadas.

Os dados apresentados na Tabela 1 mostram que os teores de polifenóis totais e os percentuais relativos de taninos são mais elevados nos extratos brutos de cascas. Pode-se também observar que os taninos, nas amostras analisadas, correspondem de 89 a 92% do total de polifenóis nas cascas, e de 79 a 84%, nas folhas. Estes resultados concordam com os encontrados por Paes e colaboradores⁵⁴, os quais observaram que as cascas de *A. occidentale* consiste na estrutura que concentra maior quantidade de metabólitos secundários, em especial taninos, neste vegetal. O fato dos extratos de cascas terem permanecido sem alterações após a irradiação, sugere que a maior disponibilidade de taninos pode ter influenciado na ação da radiação.

A análise estatística realizada para se avaliar a ação da radiação gama nos teores de polifenóis e taninos, mostrou que não ocorreram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) para as concentrações de polifenóis totais e taninos, antes e após a irradiação, para os extratos de cascas. No entanto, a análise estatística mostra que houve influência da radiação gama nos teores de polifenóis totais de taninos para os extratos das folhas.

3.2 Efeito da radiação gama em extratos de *Anacardium occidentale* contra *Biomphalaria glabrata*

A Tabela 2 apresenta os dados obtidos para o percentual de letalidade embrionária e de adultos de *B. glabrata* expostos a extratos de cascas e folhas de *A. occidentale*, 0 e 10 kGy, na concentração de 100 ppm (mg/L).

Tabela 2: Média do percentual letal \pm desvio padrão ($N = 3$) dos extratos de cascas e folhas de *Anacardium occidentale* Linn., irradiadas e não irradiadas, na concentração de 100 ppm (mg/L), frente aos embriões e adultos de *Biomphalaria glabrata*, e análise estatística (ANOVA, seguido de Tukey, $p < 0,05$).

<i>Biomphalaria glabrata</i>			
Dose (kGy)	Embriões [‡]		Adultos [‡]
	Cascas		
0	100 \pm 0,0 a		67,0 \pm 5,8 e
10	92,5 \pm 1,9 b		90,0 \pm 10 f
Dose (kGy)	Folhas		
	0	13,0 \pm 5,0 c	37,0 \pm 5,8 g
10	27,0 \pm 2,5 d	56,7 \pm 5,8 e	

[‡] Valores percentuais de referência: controle negativo (H₂O) = 0; controle positivo (CuCO₃) = 100.

*Letras diferentes indicam haver diferença estatística entre as amostras irradiadas e não irradiadas ($p < 0,05$).

A partir da Tabela 2, observa-se que os extratos de cascas e folhas agiram diferentemente frente aos embriões e adultos de *B. glabrata*. A ANOVA, seguida de Tukey ($p < 0,05$), demonstrou haver diferença estatística significativa na letalidade dos extratos de cascas e folhas, irradiados e não irradiados, frente aos embriões e adultos de *B. glabrata*. As letras diferentes após os percentuais letais \pm desvio padrão indicam diferença estatística significativa entre as doses (letras diferentes nas colunas) e entre letalidade para embriões e adultos (letras diferentes nas linhas).

Observam-se, pelos percentuais mais elevados de letalidade, que os extratos de cascas se apresentaram mais tóxicos que os extratos de folhas. Porém, é possível observar (letras iguais após as médias) que os extratos não irradiados de cascas e os extratos irradiados de folhas, não apresentaram diferença estatística significativa entre os percentuais de letalidade ($p < 0,05$). Isto indica que para o controle de animais adultos, os extratos de folhas irradiados podem ser utilizados com a mesma eficiência que os extratos de cascas não irradiadas.

Contra embriões

Observa-se pelos resultados apresentados (Tabela 2) que ocorreu uma diminuição da toxicidade dos extratos de cascas frente aos embriões ($p < 0,05$), enquanto que para as folhas, ocorreu uma potencialização em mais de 100% ($p < 0,05$), apesar da letalidade ainda permanecer baixa, em torno de 27 %.

Lemma; Yau⁵⁵ mencionam que o alto peso molecular dos compostos fitoquímicos é um fator que pode dificultar a penetração dos extratos vegetais na membrana de desovas de *B. glabrata*. Assim, a radiação gama pode estar agindo quebrando as macromoléculas e transformando-as em estruturas com menor peso molecular e facilitando a sua entrada na membrana celular do *B. glabrata*.

Contra adultos

Observa-se pela Tabela 2 que a radiação gama promoveu o aumento da letalidade de extratos tanto das cascas quanto das folhas ($p < 0,01$), frente a adultos de *Biomphalaria glabrata*.

Alguns autores Pautou et al.^{56, 57, 58} reportam que os polifenóis, especialmente a presença de taninos, em extratos vegetais, são os responsáveis pela toxicidade ou potencial moluscicida. Os resultados encontrados para as cascas reforçam esta afirmação, uma vez que se observa um maior potencial letal frente a adultos de *B. glabrata*.

Os critérios estabelecidos para um moluscicida ideal estão relacionados à eficiência ovicida. Todavia, caso as concentrações letais para caramujos adultos não eliminarem os embriões imediatamente, como foi o observado no presente trabalho, ainda assim é possível que essas mesmas concentrações impeçam a eclosão dos ovos ou matem os embriões após uma exposição mais prolongada^{59, 60}.

Segundo a OMS⁶¹ apenas extratos vegetais em concentrações iguais ou inferiores a 20 mg/mL e que causem mínimo de 90% de letalidade quando expostos por 24 h a espécies de moluscos, pode ser utilizado em programas de controle biológico. O presente trabalho apresenta percentuais letais inferiores ao mínimo permitido mesmo em maiores concentrações. Souza e colaboradores²² observam que mesmo os vegetais considerados, pouco tóxicos para letalidade embrionária de moluscos expostos por 24 horas, podem causar um efeito inibidor em exposição prolongada e ser relevante para o emprego em programas de controle biológico. Neste sentido, levando em conta os resultados obtidos para as folhas irradiadas, percebe-se que a radiação gama pode ser uma peça importante na potencialização de extratos em longo prazo.

Já Clark e colaboradores⁶² reportam a existência de algumas características relevantes na escolha de um moluscicida ideal e que são encontrados nos extratos etanólicos de *A. occidentale*, apresentados neste trabalho: atividade embriotóxica e letalidade contra adultos de *B. glabrata*, baixa toxicidade, facilidade de preparo e de solubilidade em água dos mesmos, ressaltando ainda que *A. occidentale* ocorre naturalmente e de fácil cultivo, principalmente no Nordeste do Brasil, onde ocorrem os maiores índices de *Schistosoma mansoni*.

Esses resultados indicam que a radiação gama pode ser utilizada como uma ferramenta inovadora para potencializar a ação de materiais de origem vegetal no controle de diversos vetores de doenças tropicais endêmicas, em especial da esquistossomose. E ainda ressalta o uso de extratos, através do aproveitamento dos recursos naturais existentes partindo-se de uma fonte renovável e economicamente correta, reduzindo o impacto ambiental em relação aos pesticidas sintéticos utilizados atualmente.

4. CONCLUSÃO

A radiação gama provocou alterações importantes nos teores dos polifenóis para os extratos de folhas de *Anacardium occidentale* Linn., o que foi traduzido pelo aumento da toxicidade destes extratos frente aos embriões e adultos de *Biomphalaria glabrata*. Isto indica que a radiação gama pode ser utilizada como agente potencializador da toxicidade de extratos vegetais no uso alternativo destes materiais como moluscicidas.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradem ao CNPq pelo apoio financeiro que permitiu a realização deste trabalho.

-
1. Souza, C. P.; Lima, L. C. 'Moluscos de interesse parasitológico no Brasil', 1ª Ed. Belo Horizonte: Editora da Fiocruz/ CPqRR, 76p. (1990).
 2. Barbosa, F. S. Tópicos em Malacologia Médica. 1ª Ed. Rio de Janeiro: Editora da FIOCRUZ (1995).
 3. Coura, J. R. 'Control of schistosomiasis in Brazil: Perspectives and proposals. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 90(2): 257-260 (1995).
 4. Abdel-Hafez, A.M.; Zidan, Z.H.; Abdel-Megeed, M.I.; el-Emam, M.A.; Ragab, F.M.; el-Deeb, F.A. Effect of the plant *Azolla pinnata* on survival, growth rate, fecundity and hatchability of egg-masses

- of *Biomphalaria alexandrina* snails. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*. 27: 825-841 (1997).
5. Engels, D.; Chitsulo, L.; Montresor, A.; Savioli, L. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. *Acta Tropica*. 82: 139-146 (2002).
 6. Coura, J. R.; Amaral, R. S. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazil endemic áreas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 99 (1): 13-19. (2004).
 7. Teles, H. M. S. Distribuição de *Biomphalaria straminea* ao Sul da Região Neotropical. *Revista de Saúde Pública*. 30: 341-349 (1996).
 8. Nakano, E.; Watanabe, L. C.; Ohlwiler, F. P.; Pereira, C. A. B.; Kawano, T. Establishment of the dominant lethal test in the freshwater mollusk *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *Mutaion Research*. 536: 145-154 (2003).
 9. Salice, C. J.; Miller, T. J. Population-level responses to longterm cadmium exposure in two strains of a freshwater gastropod *Biomphalaria glabrata*: result from a life-table response experiment. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 22: 678-688 (2003).
 10. Bezerra, F. S. de M. Moluscos transmissores da esquistossomose mansoni. In: Neves, D. P. et al. *Parasitologia humana*. 10ª ed. São Paulo: Atheneu. 194-202 (2004).
 11. Oliveira-Filho, E. C.; Geraldino, B. R.; Grisolia, C. K.; Paumgarten, F. J. R. Acute toxicity of endosulfan, nonylphenol ethoxylate, and ethanol to different life stages of the freshwater snail *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 75: 1185-1190 (2005).
 12. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília (2006).
 13. WHO - World Health Organization. Epidemiology and control of schistosomiasis. Teach. Rep. Ser. Wld Hlth Org., Geneva. 649: 1-76 (1980).
 14. WHO - World Health Organization. Report of informal consultation on research on the biological control of snail intermediated hosts. Wld Hlth Org., (TDR/BCV-SCH/SIH/84.3) Geneve. 41 (1984).
 15. WHO - World Health Organization. Schistosomiasis control. Teach. Rep. Ser. Wld Hlth Org., Geneva. 515: 1-47 (1973).
 16. OMS (Organización Mundial de la Salud). Empleo inocuo de plaguicidas, Genève, OMS. 29 (1991).
 17. McCullough, F. S.; Gayral, P.; Duncan, J.; Christie, J. D. Molluscicides in schistosomiasis control. *Bulletin of the World Health Organization*. 58 (5): 681-689 (1980).
 18. Hostettmann, K.; Kizu, H.; Tomimori, T. 'Molluscicidal properties of various saponins. *Planta Medica*. 44: 34-35 (1982).
 19. Magalhães, A. F.; Tozzi, A. M. G. A.; Santos, C. C.; Serrano, D. R.; Zanotti-Magalhães, E. M.; Magalhães, E. G.; Magalhães, L. A. Saponins from *Swartzia langsdorffii*: biological activities. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 98: 713-718 (2003).
 20. Neves, D. P. *Parasitologia Humana*. 10º ed. São paulo : Editora Atheneu, 194-202 (2004).
 21. Luna, J. S.; Santos, A. F.; Lima, M. R. F.; Omena, M. C.; Mendonça, F. A. C.; Bieber, L. W.; Sant'Ana, A. E. G. 'A. Study of the larvicidal and molluscicidal activities of some plants from northeast Brazil. *Journal of Ethnopharmacology, Country Clare*. 97(2): 199-206 (2005).
 22. Souza, C. P.; Mendes, N. M.; Jannotti-Passos, L. K.; Pereira, J. P. O. Uso da casca da castanha do caju, *Anacardium occidentale*, como moluscicida alternativo. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 34 (5): 459-466 (1992).
 23. Rodrigues, R. R. Trilhas do parque da Esalq. Árvores medicinais. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, Departamento de Botânica, 28 (1996).
 24. Calixto, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 33: 179-189 (2000).
 25. Burns, J.; Gardner, P.T.; Matthews, D.; Duthie G.G.; Lean, M.E.J.; Crozier, A. Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 5797-5808 (2001).
 26. Sluis A.A.; Dekker M.; Jager A.; Jongen W.M.F. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 3606-3613 (2001).
 27. Newman, D.J.; Cragg, G.M.; Snader, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1991-2002. *Journal of Natural Products*. 66: 1022-1037 (2003).
 28. Novais, T.S.; Costa, J.F.O.; David, J.P.L.; David, J.M.; Queiroz, L.P.; França, F.; Giulietti, A.M.; Soares, M.B.P.; Santos, P.R. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 13: 5-7 (2003).

29. Santos, G. H. F.; Silva, E. B.; Silva, B. L.; Sena, K. X. F. R.; Lima, C. S. A. Influence of gamma radiation on the antimicrobial activity of crude extracts of *Anacardium occidentale* rich in tannins. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 21 (3): 444-449 (2011).
30. Scalbert, A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. 30 (12): 3875-3883 (1991).
31. Stern, J. L.; Hagerman, A. E.; Steinberg, P. D.; Mason, P. K. Phlorotannin-protein interactions. *Journal of Chemical Ecology*. 22: 1887-1899 (1996).
32. O'Kennedy, R.; Thornes, R. D. Coumarins: biology, applications and mode of action. New York: John Wiley (1997).
33. Harborne, J. B. The Comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. *Biochemical, Systematic and Ecology*. 27: 335-367 (1999).
34. Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 2ª Ed.. Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 312-320 (2001).
35. Aherne, S. A.; O'Brien, N. M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*. New York: 18(1): 75-81 (2002).
36. Meyer, B.N. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*. 45:31-34 (1982).
37. McLaughlin, J.L. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information Journal*. 32: 513-24 (1998).
38. Moussaid, M.; Lacroix, M.; Nketsia-Tabini, J.; Boubekri, C. Phenolic compounds and the colour of oranges subjected to a combination treatment of waxing and irradiation. *Radiation Physics Chemistry*. 57: 273-275 (2000).
39. Mechi, R.; Caniatti-Brazaca, S.G.; Arthur, V. Avaliação química, nutricional e fatores antinutricionais do feijão preto (*Phaseolus vulgaris* L.) irradiado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 25 (1): 109-114 (2005).
40. Miranda, M. B.; Horii, J.; Alcarde, A. R. Estudo do efeito da irradiação gama (^{60}Co) na qualidade da cachaça e no tonel de envelhecimento. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 26 (4): 772-778 (2006).
41. Bhat, R.; Sridhar, K. R.; Tomita-Yokotani, K. Effect of ionizing radiation on antinutritional features of velvet bean seeds (*Mucuna pruriens*). *Food Chemistry*. 103: 860-866 (2007).
42. Stajner, D.; Milosevic, M.; Popovic, B. M. Irradiation Effects on Phenolic Content, Lipid and Protein Oxidation and Scavenger Ability of Soybean Seeds. *International Journal of Molecular Sciences*. 8: 618-627 (2007).
43. Villavicencio, A.L.C.H.; Mancini-Filho, J.; Delincée, H.; Greiner, R. Effect of irradiation on anti-nutrients (total phenolics, tannins and phytate) in Brazilian beans. *Radiation Physics Chemistry*. 57: 289-293 (2000).
44. Brigide, P.; Caniatti-Brazaca, S.G. Antinutrients and "in vitro" availability of iron in irradiated common beans (*Phaseolus vulgaris*). *Food Chemistry*. 98: 85-89 (2006).
45. Toledo, T.C.F.; Caniatti-Brazaca, S.G.; Arthur, V.; Piedade, S.M.S. Effects of gamma radiation on total phenolics, trypsin and tannin inhibitors in soybean grains. *Radiation Physics and Chemistry*. 76: 1653-1656 (2007).
46. Koseki, P.M.; Villavicencio, A.L.C.H.; Brito, M.S.; Nahme, L.C.; Sebastião, K.I.; Rela, P.R.; Almeida-Muradian, L.B.; Mancini-Filho, J.; Freitas, P.C.D. Effects of irradiation in medicinal and edible herbs. *Radiation Physics and Chemistry*. 63: 681-684 (2002).
47. Santos, G.H.F.; Silva, E.B.; Sena, K.X.F.R.; Silva, B.L.; Lima, C.S.A. The influence of ^{60}Co gamma radiation on the action of phenolic compounds of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan in the microbiological control of crude extracts. *Intern. J. Low Radiat*. 7: 223-235 (2010).
48. Alcoforado-Filho, F.G.; Sampaio, E.V.S.B.; Rodal, M.J.N. Florística e fitossociologia de um remanescente de vegetação caducifolia espinhosa arborea em Caruaru, Pernambuco, *Acta Botanica Brasilica*. 17: 287-303 (2003).
49. Folin, O.; Ciocalteu, V. On tyrosine and tryptophane determination in proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 73 (1927).
50. Seigler, D.S.; Seilheimer, S.; Keesy, J.; Huang, H.F. Tannins from four common *Acacia* species of Texas and Northeastern Mexico. *Economic Botany*. 40: 220-232 (1986).
51. Mueller-Harvey, I. Analysis of hydrolysable tannins. *Animal Feed Science and Technology*. 91: 3-20 (2001).
52. Queiroz, C.R.A.A.; Morais, S.A.L.; Nascimento, E.A. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). *Revista Árvore*. 26: 485-492 (2002).
53. Comey, T.; Verdonk, N.H. The early development of the snail *Biomphalaria glabrata* (Say) and the origin of the head organs. *Netherlands Journal of Zoology*. 20 (1): 93-121 (1970).

54. Paes, J. B.; Marinho, I. V.; Lima, R. A.; Lima, C. R.; Azevedos, T. K. B. Viabilidade técnica dos taninos de quatro espécies florestais de ocorrência no semi-árido brasileiro no curtimento de peles. *Ciência Florestal*. 16 (4): 453-462 (2006).
55. Lemma, A.; Yau, P. Studies on the molluscicidal properties of endod (*Phytolacca dodecandra*). III. Stability and potency under different environmental conditions. *Ethiopian Medical Journal*. 12 (3): 15-24 (1974).
56. Pautou, M. P.; Rey, D.; David, J. P.; Meyran, J. C. Toxicity of vegetable tannins on crustacea associated with Alpine mosquito breeding sites. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 47: 323-332 (2000).
57. Bezerra, J.C.B.; Silva, I.A.; Ferreira, H.D.; Ferri, P.H.; Santos, S.C. Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal plants. *Fitoterapia*. 73: 428-430 (2002).
58. Santos, S. C.; Costa, W. F.; Ribeiro, J. P.; Guimarães, D. O.; Ferri, P. H.; Ferreira, H. D.; Seraphin, J. C. Tannin composition of barbatimão species. *Fitoterapia*. 73: 292- 299 (2002).
59. WHO (World Health Organization). Memoranda: molluscicide screening and evaluation. *Bulletin of the World Health Organization*. 33 (4), p.567-576 (1965).
60. Duncan, J.; Brown, N. Chronic exposure of the eggs and adults of *Biomphalaria glabrata* (Say) to the molluscicide nicotinanilide. *Tropenmedizin and Parasitologie*. 34: 184-186 (1983).
61. WHO (World Health Organization). Report of Scientific Working Group of Plant Molluscicide and guidelines for evaluation of plant molluscicides. Geneva: TDRS/SCH-SWESWE (4)/83.3 (1983).
62. 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 Ethnopharmacol*. 56: 1-13 (1997).