



**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**MAURICIO CARNEIRO AQUINO**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO CARACOL AFRICANO (*Achatina*  
(*Lissachatina*) *fulica* (Bowdich, 1822) E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO MUCO  
CUTÂNEO EM ÚLCERAS DE CórNEA EM COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*)**

**Maceió**  
**2013**

MAURICIO CARNEIRO AQUINO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO CARACOL AFRICANO (*Achatina*  
*(Lissachatina) fulica* (Bowdich, 1822) E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO MUCO  
CUTÂNEO EM ÚLCERAS DE CórNEA EM COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*)**

Dissertação de mestrado apresentada como requisito parcial para conclusão do curso de Mestrado em Ciências da Saúde do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) – 2013.

Orientadora: Profa. Dra Marília Oliveira Fonseca  
Goulart

Co-orientadora: Profa. Dra Silvana Ayres Martins

Maceió

2013

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale**

A657c Aquino, Maurício Carneiro  
Caracterização química do caracol africano (*Achatina (Lissachatina) fulica* (Bowdich, 1822) e avaliação dos efeitos do muco cutâneo em úlceras de córnea em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) / Maurício Carneiro Aquino. – 2013.  
94 f. : il.

Orientadora: Marília Oliveira Fonseca Goulart.  
Co-orientadora: Silvana Ayres Martins.  
Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2013.

Bibliografia: f. 87-93.  
Anexo: f. 94.

1. Caracol africano. 2. *Achatina fulica*. 3. Composição mineral. 4. Composição centesimal. 5. Efeito cicatrizante. 6. Muco. I. Título.

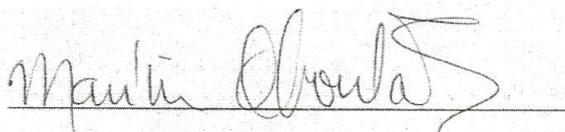
CDU: 594.3

## Folha de Aprovação

Maurício Carneiro Aquino

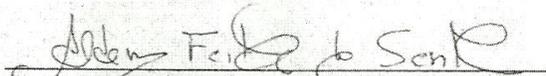
Caracterização química do caracol africano (*Achatina (Lissachatina) fulica* (Bowdich, 1822)) e avaliação dos efeitos do muco cutâneo em úlceras de córnea de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*)

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 24 de setembro de 2013.

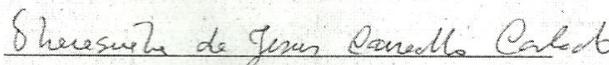


Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marília Oliveira Fonseca Goulart (Orientador)

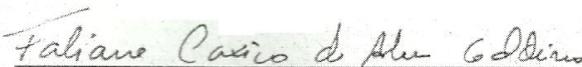
### Banca Examinadora



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Aldenir Feitosa dos Santos – (UNEAL)



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Theresinha de Jesus Carvalho Calado – (UFAL)



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fabiane Caxico de Abreu Galdino - (UFAL)

Dedico esta dissertação ao meu grande e saudoso amigo, Dickran Asfazadourian, o melhor criador de caracóis que o Brasil já conheceu.

Este trabalho contou com o apoio financeiro das seguintes instituições financeiras para a sua realização:

- Fundação de Amparo a Pesquisa de Alagoas (FAPEAL);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente, o meu agradecimento especial é direcionado à minha orientadora Dra Marília Oliveira Fonseca Goulart que, além de me aceitar como orientando acreditando no tema desta dissertação, ainda encarou outro grande desafio, o de orientar um estudante que estava fora do circuito acadêmico a mais tempo do que a média de vida da maioria de seus orientandos.

À minha co-orientadora, a Dra Silvana Ayres Martins, pela paciência e consideração.

Aos doutores Dra. Aldenir Feitosa dos Santos (UNEAL), Dra. Theresinha de Jesus Carvalho Calado, Dra. Fabiane Caxico de Abreu Galdino, Dra. Iracilda Maria de Moura Lima, Dr. Josué Carinhanha, Dra. Roberta Ferreira, Dr. Emiliano Barreto, Dr. Josealdo Tonholo, Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana, Dr. Hugo Juarez Vieira Pereira, Dra. Maria de Fátima Martins, Dra Vera Lobão, Dr. Ignacio Agudo, Dra Liboria Martinella, Dra. Iracy Léa Pecora, que colaboraram na execução e correção do presente trabalho.

Aos colegas Jaqueline Maria Silva Cicero, Fagner Messias de Lima, Orlando de Araújo, Elysson Lima, Jadriane Xavier, Humberto Tenório, Paulo Sérgio de Melo Carvalho e Cassio Heráclito Alves dos Santos pelo auxílio no compartilhamento de seus conhecimentos.

Aos professores do mestrado em Ciências da Saúde pelos ensinamentos repassados.

Ao técnico Aldir dos Santos da UFAL, a Iran Martins da Secretaria de Saúde de Capela e ao jornalista Geraldo Câmara pelo interesse e colaboração.

Ao Centro de Ciências Agrárias da UFAL, ao Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará e à Universidade Federal da Bahia pelo uso dos laboratórios.

À Fundação de Amparo a Pesquisa de Alagoas (FAPEAL); ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo recursos necessários à execução desta dissertação.

E finalmente à Maria Luiza Russo pelo apoio e incentivo.

## RESUMO

Desde que foi introduzido no Brasil na década de 80 o caracol africano *Achatina fulica* espalhou-se por todo o país. Alguns pesquisadores associam ao muco cutâneo desta espécie, parte do seu grande sucesso adaptativo. Com o objetivo de conhecer melhor as propriedades do muco do caracol africano e sugerir novas formas de aproveitamento visando o controle deste caracol exótico invasor, este trabalho realizou a caracterização química da concha, do caracol sem concha e do muco do caracol africano coletado em Alagoas e avaliou a ação cicatrizante de uma solução de muco, já comprovada para pele, em úlceras em córneas cirurgicamente produzidas em coelhos. Os caracóis asselvajados foram mantidos em laboratório utilizando-se uma nova metodologia desenvolvida especialmente para a manutenção de caracóis arborícolas, com sensíveis melhorias na higienização, na redução do tempo gasto para o tratamento diário e na diminuição do estresse dos animais. Foram realizadas as seguintes determinações: a composição mineral do caracol sem concha, da concha e do muco; a composição centesimal do muco liofilizado e a capacidade antioxidante avaliada por meio da atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). Em relação aos resultados, a composição de macro e micronutrientes presentes no caracol sem concha, na concha e no muco do *A. fulica* foi determinada para 23 nutrientes, 5 macronutrientes (Ca, P, Na, K e Mg) e 18 micronutrientes (Al, As, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Ni, Si, Sr, V, Zn, Co, Sb e Se). Na composição centesimal obtiveram-se os seguintes dados: matéria seca ( $91,72 \pm 1,85$ ), umidade ( $8,28 \pm 0,97$ ), cinzas ( $31,1 \pm 0,35$ ), proteína bruta ( $49,97 \pm 3,21$ ), carboidratos ( $8,15 \pm 1,43$ ), calorias totais ( $242,48 \pm 53,23$  kcal), lipídeos em 100 g ( $2,5 \pm 0,44$ ) e colesterol ( $50,2 \pm 0,3$ ); o muco não demonstrou capacidade antioxidante em nenhuma das amostras analisadas. Para orientar a escolha da concentração de muco ideal para o tratamento das lesões do experimento *in vivo*, foram testadas *in vitro* soluções com as seguintes concentrações  $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $0,03 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $0,06 \text{ mg mL}^{-1}$  e  $0,125 \text{ mg mL}^{-1}$ . A viabilidade celular foi aferida através do método MTT e Tripán Blue. Não foram observadas diferenças estatísticas entre as concentrações testadas, portanto, a concentração escolhida para ser a base para o preparo da solução oftálmica foi aquela que, graficamente, melhor estimulou a proliferação celular ( $0,125 \text{ mg mL}^{-1}$ ). No experimento *in vivo*, a evolução das lesões de córneas nos 18 coelhos, divididos em três grupos de 6 animais: o grupo controle, o grupo muco e o grupo tratado com o epitelizante epitegel, foi acompanhada pela medição do percentual de cicatrização das áreas das 36 lesões, através de 144 macrofotografias tiradas ao longo do experimento, às 0, 24, 48 e 72 h. Para a realização do experimento, aprovado pelo comitê de ética da UFAL, processo nº 010190/2011-85, foi utilizada uma lâmina de bisturi para escarificar o epitélio corneano circunscrito previamente por um bisturi circular (punch nº 5) e o protocolo anestésico utilizado teve 3 etapas: tranquilização com acepromazina ( $0,05 \text{ mg / kgPV/IM}$ ), anestesia com cloridrato de cetamina ( $12 \text{ mg/IM/kgPV}$ ) e anestesia local com cloridrato de proximetacaína 0,5%. Em relação aos resultados, não houve diferenças estatísticas entre os grupos muco e epitegel; a solução oftálmica à base do muco ( $0,125 \text{ mg } 25 \mu\text{L}^{-1}$ ) teve um desempenho semelhante ao epitelizante epitegel 10 g (Gel Oftalmológico Dexpanthenol  $50 \text{ mg g}^{-1}$ , controle positivo), um dos melhores medicamentos disponíveis no mercado para o tratamento de lesões de córnea. No entanto, ambos apresentaram significância em relação ao resultado do grupo controle, que apresentou um maior tempo de cicatrização. Com 72 h, das 12 lesões do grupo controle, apenas 2 (16,66%) estavam cicatrizadas; do grupo epitegel, apenas 8 (66,66%) estavam cicatrizadas e do grupo muco todas (100%) estavam cicatrizadas. Demonstrou-se desta forma, a capacidade de cicatrização do muco do *A. fulica* também para o tratamento de úlceras de córnea e a sua ação específica, além de acelerar a recuperação das lesões nos animais, não produziu em nenhum deles, uma única cicatriz visível.

**Palavras-chave:** Caracol africano gigante. *Achatina fulica*. Composição mineral. Composição centesimal. Efeito cicatrizante. Ação antioxidante. Proliferação celular. Muco.

## ABSTRACT

### **CHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE GREAT AFRICAN SNAIL (*Achatina (Lissachatina) fulica* (Bowdich, 1822) AND EVALUATION OF THE EFFECTS OF ITS CUTANEOUS MUCOUS IN CORNEAL ULCERS IN RABBITS (*Oryctolagus cuniculus*)**

Since it had been introduced in Brazil dating back to the 80s, the Great African Snail *Achatina fulica* has spread all over the country. Some researchers associate its incredibly good adaptation success to the dermal mucous of this species. With the objective and the aim of better knowing and understanding the dermal mucous of the Great African Snail and also suggesting new forms of taking advantage of it with a view to controlling this invading and exotic snail, this work carried out the chemical characterization of the shell, of the snail without the shell and of the dermal mucous of the Great African Snail, collected in the State of Alagoas, Brazil, and also evaluated and assessed the scarring/healing action of a solution from the mucous, already confirmed for skin tissue, in corneal ulcers surgically produced in rabbits. The wild snails were kept in a laboratory utilizing a new methodology specially developed for keeping arboreal snails in laboratory, with sensibly improved hygienic conditions, reduction of the time spent for the daily treatment and reduction of animal stress. The following determinations were carried out: the mineral composition of the snail without its shell, of the shell and of the mucous; the centesimal composition of the lyophilized mucous and the anti oxidizing capacity evaluated through the seizing activity of the free radical 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH). With regards to the results, the macro and micro minerals composition present in the snail without a shell, in the shell and in the dermal mucous of the *A. fulica* was determined for 23 nutrients, 5 macro-nutrients (Ca, P, Na, K and Mg) and 18 micro-nutrients (Al, As, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Ni, Si, Sr, V, Zn, Co, Sb and Se). With regards to the centesimal composition, the following data was obtained: dried matter ( $91.72 \pm 1.85$ ), humidity ( $8.28 \pm 0.97$ ), ashes ( $31.1 \pm 0.35$ ), crude protein ( $49.97 \pm 3.21$ ), carbohydrates ( $8.15 \pm 1.43$ ), total calories ( $242.48 \pm 53.23$  kcal), lipids in 100 g ( $2.5 \pm 0.44$ ), cholesterol ( $50.2 \pm 0.3$ ). The mucous did not show anti oxidizing capacity in any of the analysed samples. For the experiment in vivo, the evolution of the corneal lesions on the 18 rabbits, divided in three groups of 6 animals: the control group, the mucous group and the group treated with the ophthalmic solution Epitegel, was accompanied and monitored by the percentage measurement of scarring/healing of the 36 areas of scarring through 144 macro photographs taken along the experiment at 0, 24, 48 and 72 hours. To carry out the experiment, duly approved by the Ethical Committee of UFAL (The Federal University of Alagoas), process no. 010190/2011-85, a scalpel blade to remove the corneal epithelium previously circumscribed by a circular scalpel (punch no. 5) and the anaesthetic protocol utilized comprised 3 steps: tranquilizing with acepromazine (0.05 mg/kgPV/IM), anaesthetizing with cetamine chlorydrate (12 mg/IM/kgPV) and local anesthetizing with proxymethacaine chlorydrate 0,5%. For the orientation regarding the ideal choice for mucous concentration for the treatment of the lesions on the experiment in vivo, solutions were tested in the following concentrations:  $0.01 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $0.03 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $0.06 \text{ mg mL}^{-1}$  and  $0.125 \text{ mg mL}^{-1}$ . The cellular viability was verified through the MTT and Trypan Blue methods. No statistical differences were observed between the tested concentrations; therefore, the chosen concentration to be the base for the preparation of the ophthalmic solution was the one that better stimulated the cellular proliferation ( $0.125 \text{ mg mL}^{-1}$ ). With regards to the results, there were no statistical differences between the mucous group and the Epitegel; the ophthalmic solution based on the mucous ( $0.125 \text{ mg } 25 \mu\text{L}^{-1}$ ) had a similar performance to the ophthalmic solution Epitegel 10 g (Ophthalmological Gel Dexpanthenol  $50 \text{ mg g}^{-1}$ , positive control), one of the best available medicines in the market for the treatment of corneal ulcers/lesions.

Nevertheless, both presented some significance, regarding the result of the control group, which presented a longer scarring/healing time. With 72 hours, of the 12 lesions of the control group, only 2 (16.66%) were scarred/healed; of the Epitegel group, only 8 (66.66%) were scarred/healed and of the mucous groups, all (100%) were scarred/healed. It has been thus demonstrated the scarring/healing capacity of the *A. fulica*'s mucous also for the treatment of corneal ulcers and its specific action, besides accelerating the recovery of lesions in animals, it did not produce, in any of them, a single visible scar.

**Key words:** Great African Snail. *Achatina fulica*. Mineral composition. Centesimal composition. Scarring/healing effect. Mucous.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Comparação entre asangiostrongilíases transmitidas pelo caracol africano e algumas ocorrências de óbitos no Brasil.....	23
Figura 2 - Casos de meningite eosinofílica no Brasil até 2013.....	26
Figura 3 - Camadas histológicas da córnea de coelho.....	34
Figura 4 - Caracol Africano ( <i>Achatina fulica</i> ) de tamanho médio.....	37
Figura 5 - Sistema de criação desenvolvido para este experimento.....	38
Figura 6 - A técnica para coleta manual do muco do caracol.....	39
Figura 7 - Muco fresco (esquerda) e liofilizado (direita).....	51
Figura 8 - Diluição seriada da solução de muco.....	52
Figura 9 – Perfil didático da lesão cirurgica.....	54
Figura 10 - Macrofotografia da lesão com flash e luz ultravioleta.....	56
Figura 11 - Fotos ilustrativas do acompanhamento da evolução da cicatrização das lesões de córneas.....	57
Figura 12 - Calculo da área da lesão através do software Adobe Photoshop CS5.....	58
Figura 13 - Atividade e repouco do Caracol Africano ao longo de 24h .....	61
Figura 14 – Sistema de manejo em caixas plásticas .....	62
Figura 15 - Faixa de peso ideal para a produção de muco cutâneo.....	63
Figura 16 - Biometria das conchas.....	64

Figura 17 - Resultados percentuais obtidos pelo DPPH.....	67
Figura 18 - Curva de Calibração do colesterol.....	76
Figura 19 - Identificação dos ácidos raxos.....	78
Figura 20 - Diferenças entre o muco fresco e congelado pelo MTT.....	80
Figura 21 - Avaliação das diferentes soluções de muco em culturas celulares de cóneas de coelhos pelo MTT.....	81
Figura 22 - Comparativo do experimento <i>in vivo</i> .....	84

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Programa aplicado para digestão das amostras em sistema fechado e radiação micro-ondas.....	42
Tabela 2 - Definição de condições experimentais para o ensaio MTT.....	52
Tabela 3 - Valores do experimento da capacidade sequestradora do radical livres.....	67
Tabela 4 - Percentual das perdas de peso dos caracóis <i>Helix aspersa</i> e <i>Achatina fulica</i> ao longo do preparo da farinha de caracóis.....	68
Tabela 5 - Macronutrientes encontrados na concha, muco e carne do <i>A. fulica</i> .....	69
Tabela 6 - Micronutrientes encontrados no caracol africano.....	70
Tabela 7 - Composição mineral do <i>Achatina fulica</i> .....	71
Tabela 8 - Tabela comparativa de macronutrientes da concha de alguns moluscos.....	72
Tabela 9 - Tabela comparativa de macrominerais da carne de algumas espécies de Caracóis.....	72
Tabela 10 – 11 Micronutrientes: comparação entre as conchas e carne de alguns moluscos.....	74
Tabela 12 - Composição centesimal do muco liofilizado.....	75
Tabela 13 – Comparação da composição centesimal do muco do <i>A. fulica</i> .....	76
Tabela 14 - Valores médios dos ác. graxos presentes no muco do caracol africano.....	78
Tabela 15 - Concentração de proteínas no muco e na solução oftálmica utilizada no experimento <i>in vivo</i> .....	82

Tabela 16 - (a,b,c) Áreas percentuais correspondentes a cicatrização das

úlceras de córneas nos experimento *in vivo*..... 83

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AHRJ</b>	Associação de Helicicultores do Rio de Janeiro
<b>CDB</b>	Convenção sobre Diversidade Biológica
<b>CDC</b>	Centros de Controle de Doenças de Twain
<b>DERAL/PR</b>	Departamento de Economia Rural do Paraná
<b>DMSO</b>	Sulfóxido de dimetila
<b>DPPH</b>	Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
<b>EMATER/PR</b>	Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Paraná
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>GEDEON</b>	Global Infectious Diseases Database
<b>GISP</b>	Programa Global de Espécies Invasoras
<b>IAPAR</b>	Instituto Agrônômico do Paraná
<b>IBAMA</b>	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
<b>IBH</b>	Instituto Brasileiro de Helicicultura
<b>IUCN</b>	International Union for Conservation of Nature
<b>L-AAO</b>	<i>L</i> -aminoácido oxidase
<b>LD</b>	Limite de detecção
<b>MAPA/PR</b>	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
<b>ME</b>	Meningite Eosinofílica
<b>MTT</b>	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

<b>ND</b>	Não determinado
<b>PBS</b>	Solução Salina Tamponada
<b>PTN</b>	Proteína
<b>PUCRS</b>	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
<b>SEAB/PR</b>	Secretaria de Estado da Agricultura e Abastecimento do Paraná
<b>SESA /PR</b>	Secretaria da Saúde do Paraná
<b>UFAL</b>	Universidade Federal de Alagoas
<b>UFC</b>	Universidade Federal do Ceará
<b>USP</b>	Universidade de São Paulo

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>20</b>
<b>3.1</b>	<b>O caracol africano.....</b>	<b>20</b>
<b>3.2</b>	<b>Ecologia do caracol africano no Brasil.....</b>	<b>21</b>
<b>3.3</b>	<b>O caracol africano como vetor de doenças.....</b>	<b>22</b>
<b>3.4</b>	<b>O impacto sobre o ambiente.....</b>	<b>27</b>
<b>3.5</b>	<b>A carne do caracol africano e sua utilidade.....</b>	<b>28</b>
<b>3.6</b>	<b>O muco e suas utilidades.....</b>	<b>28</b>
<b>3.7</b>	<b>O muco como cicatrizante em pele.....</b>	<b>31</b>
<b>3.8</b>	<b>A córnea e o processo de cicatrização.....</b>	<b>32</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
<b>4.1</b>	<b>Materiais.....</b>	<b>36</b>
4.1.1	Reagentes.....	36
4.1.2	Equipamentos.....	36
<b>4.2</b>	<b>Caracterização taxonômica do caracol africano encontrado em Alagoas.....</b>	<b>37</b>
<b>4.3</b>	<b>Manutenção dos caracóis.....</b>	<b>37</b>
<b>4.4</b>	<b>A coleta do muco cutâneo de caracóis africanos.....</b>	<b>39</b>
<b>4.5</b>	<b>Estudo da citotoxicidade do muco liofilizado de células tumorais.....</b>	<b>40</b>
<b>4.6</b>	<b>Capacidade sequestradora do radical livre: DPPH.....</b>	<b>40</b>
<b>4.7</b>	<b>Caracterização química do caracol africano.....</b>	<b>41</b>
4.7.1	Procedimento para digestão das amostras.....	42
<b>4.8</b>	<b>Composição centesimal do muco liofilizado.....</b>	<b>43</b>
4.8.1	Umidade.....	43
4.8.2	Cinzas.....	43
4.8.3	Proteína bruta.....	44
4.8.4	Extração lipídica.....	45
4.8.5	Carboidratos (fração glicídica) .....	46
4.8.6	Valor calórico total.....	46
4.8.7	Colesterol por colorimetria.....	46
4.8.8	Quantificação e identificação de ácidos graxos.....	47
<b>4.9</b>	<b>Avaliação da atividade biológica do muco.....</b>	<b>49</b>

4.9.1	Manutenção da linhagem de células de córnea de coelho em cultura.....	49
4.9.2	Obtenção da solução de muco.....	49
4.9.3	Determinação da concentração de muco na solução estoque (1:3).....	50
4.9.4	Ensaio de viabilidade celular.....	50
4.9.5	Padronização do muco para os experimentos.....	51
4.9.6	Determinação do peso seco da solução estoque.....	53
<b>4.10</b>	<b>Análise de proteína na solução de muco.....</b>	<b>53</b>
<b>4.11</b>	<b>Experimentação <i>in vivo</i>.....</b>	<b>53</b>
4.11.1	Animais.....	53
4.11.2	Produção das lesões nas córneas de coelhos.....	54
4.11.3	Grupos de tratamento.....	55
<b>4.12</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>56</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>59</b>
<b>5.1</b>	<b>Manutenção dos caracóis.....</b>	<b>59</b>
<b>5.2</b>	<b>Coleta do muco cutâneo de caracóis africanos.....</b>	<b>63</b>
<b>5.3</b>	<b>Citotoxicidade do muco de caracóis africanos.....</b>	<b>62</b>
<b>5.4</b>	<b>Capacidade sequestradora do radical livre: DPPH.....</b>	<b>66</b>
<b>5.5</b>	<b>Composição mineral da carne, muco e concha.....</b>	<b>68</b>
<b>5.6</b>	<b>Composição centesimal do muco liofilizado.....</b>	<b>75</b>
<b>5.7</b>	<b>Experimento <i>in vitro</i>.....</b>	<b>78</b>
5.7.1	Citotoxicidade da solução do muco de caracóis africanos em culturas de células de córnea de coelhos.....	78
5.7.2	Determinação do peso seco da solução estoque.....	79
5.7.3	Padronização do muco a ser utilizado nos experimentos.....	80
5.7.4	Determinação da proteína na solução oftálmica para o experimentos <i>in vivo</i> .....	81
<b>5.8</b>	<b>Ação cicatrizante em lesões de córneas de coelhos.....</b>	<b>82</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>86</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>87</b>
	<b>ANEXO.....</b>	<b>94</b>

## 1 INTRODUÇÃO

De acordo com o Programa Global de Espécies Invasoras – GIPS (2010, p. 1), o Brasil é um dos 17 países que concentram 70% de todas as espécies animais e vegetais catalogadas no planeta, engendrando entre 15-20%, de toda a biodiversidade e o maior número de espécies endêmicas. No entanto, nas últimas décadas, novas espécies exóticas invasoras tem sido mais uma ameaça a esta rica biodiversidade.

Segundo Thiengo et al. (2006, p. 2) a Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB) define como espécie exótica aquela que se encontra fora de sua área de distribuição natural e como espécie exótica invasora, a que ameaça ecossistemas, habitats ou espécies. Segundo Souza (2009, p.35) por definição, espécies invasoras “têm que enfrentar pressões seletivas novas bem como novas situações de estresse”.

De acordo com a International Union for Conservation of Nature. – IUCN (2010), parceira do GISP, as invasões biológicas são a segunda maior causa de perda de biodiversidade no planeta.

As principais espécies invasoras no Brasil são: *Anthonomus grandis*, *Bemisia tabaci*, *Ceratitidis capitata*, *Paratrechina longicornis* (Insetos); *Ambrosia artemisiifolia*, *Lespedeza cuneata*, *Bambusa vulgaris*, *Eichhornia crassipes*, *Elaeis guineensis*, *Leucaena leucocephala*, *Ricinus communis*, *Rottboellia cochinchinensis* (Espécies Vegetais); *Aristichthys nobilis*, *Carassius auratus*, *Cyprinus carpio*, *Hypophthalmichthys molitrix*, *Micropterus salmoides*, *Oncorhynchus mykiss*, *Oreochromis aureus* (Peixes); *Phyllorhiza punctata* (Cnidário/ Medusa); *Columba livia* (Ave/ Pássaro); *Ficopomatus enigmaticus* (Anelídeo); *Lepus europaeus*, *Mus musculus*, *Sus scrofa* (Mamíferos); *Trachemys scripta elegans* (Réptil/ Tartaruga); *Schizoporella unicornis* (Briozoário); e até microorganismos como o *Vibrio cholerae*. Entre os moluscos tem o Mexilhão-dourado asiático, *Limnoperna fortunei*, e o *Achatina fulica*, popularmente conhecido como caracol africano, o alvo de nossa pesquisa.

Segundo Venette e Larson (2004) apud GIPS (2010) em todos os países onde se estabeleceu, o clima é tropical, com temperaturas quentes e suaves durante todo o ano, além de alta umidade.

Graças ao seu grande poder adaptativo, o caracol africano está presente em todos os estados da federação. De acordo com Lobão, Toledo e Rocco (2002, p. 277), o caracol africano realiza autofecundação, gerando descendentes férteis. Sua característica em se enterrar alguns centímetros no solo, só corrobora para se que possa entender a difícil tarefa que é a sua erradicação. Tentativas mal sucedidas, de acordo com Agudo-Padron e Lenhard (2011) têm levado o Brasil a assumir uma “posição de destaque, devido ao acelerado processo de extinção de caracóis nativos endêmicos no continente sul-americano [...] muitos deles raros e endêmicos [...] são os mais ameaçados”.

Neste contexto, a presente dissertação visa investigar novas utilidades para *Achatina fulica* no Brasil, como forma de seu aproveitamento racional, o que poderá corroborar, inclusive, para o seu correto controle na natureza, muito embora o grande risco proclamado por diversos pesquisadores ao longo desses 24 anos após a sua introdução, não tenha passado até agora, apenas de um “risco potencial”.

Entre as suas principais utilidades, Thomé, Gomes e Picanço (2006, p. 41) citam que os caracóis são importantes na polinização e disseminação de sementes e esporos que ficam aderidos ao muco ou são expelidas nas fezes, contribuindo ainda para a reciclagem de nutrientes, como o cálcio, pois são consumidos como alimento pelas planárias, anfíbios, aves, répteis e insetos. É um bioindicador devido à sua sensibilidade à poluição, servindo inclusive para o lazer, pois se presta como animal de estimação, além de material instrucional para educação ambiental. Os caracóis são utilizados para pesquisa científica experimental e para a zooterapia, já que a sua criação é muito simples.

Os caracóis terrestres são fontes de proteínas, particularmente, o *Archachatina marginata* (Swainson, 1821), considerados como uma iguaria em alguns países na África, principalmente na Nigéria. De acordo com Ademolu et al. (2004), o desmatamento, a destruição do seu habitat e a coleta indiscriminada para o consumo humano, tem levado a rápida redução das populações de caracóis terrestres gigantes em seus locais de origem.

Na pesquisa de Ademolu et al. (2004), entre todos os minerais encontrados na casca dos caracóis (cálcio, magnésio, zinco), o ferro foi o que apresentou maior concentração, qualificando sua utilização para o tratamento de anemias-ferropriva.

Segundo Taguchi (2011), o suco digestivo do caracol africano tem enzimas, bactérias e fungos importantes, capazes de quebrar moléculas de celulose, resultando na produção de açúcares. O pesquisador destaca que esta espécie pode vir a assumir, um importante papel para a segunda geração de etanol brasileiro, onde se espera poder até dobrar a produção de etanol sem aumentar a área de cana-de-açúcar plantada.

O muco auxilia o caracol africano na sua locomoção, na captura de alimentos, na reprodução, na proteção contra a desidratação, além de apresentar outras utilidades, como a defesa contra predadores e microorganismos, por exemplo. No entanto, de acordo com Shim et al. (2002, p.891-892) o muco do caracol africano, por apresentar em sua composição o sulfato de acharan, um glicosaminoglicano recentemente isolado Kim et al. (1996), contribuiu para diminuir a hiperglicemia, o colesterol, os triglicérides e fortalecer o sistema imunológico de camundongos.

Lee (2003) relatou que esse glicosaminoglicano, o sulfato de acharan, presente no muco do caracol também tem propriedade anti-tumoral potencial tanto *in vitro* como *in vivo*. Tempone (2007) avaliou o seu potencial anti-leishmania. Autores como Iguchi, Aikava e Matsumoto (1982), Martins et al. (2003, p.213), Sírio (2005), Lorenzi (2006) e Santana (2012) vem descrevendo os efeitos antimicrobiano e cicatrizante do muco em pele de camundongos e coelhos.

Segundo Muniappan (1990 apud GIPS, 2010) o caracol africano tem importância econômica como fonte medicinal e nutricional. Mead (1982), Upatham et al. (1988), Runham (1989), Monney (1994), Raut e Barker (2002 apud GIPS, 2010) citam que com o advento da criação em cativeiro, o africano vem sendo comercializado em todo o mundo e uma quantidade significativa vem sendo exportada para a Europa e América do Norte, a partir de Taiwan, além de outros países asiáticos. O seu interesse como comestível estimulou a sua criação em São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Paraná e Santa Catarina, segundo Teles et al. (1997 apud GIPS 2010).

Nesta dissertação, além de se pesquisar a composição química do caracol africano (carne, muco e concha), avaliou-se o efeito cicatrizante do muco sobre úlceras de córnea em coelhos. Segundo Steele (1999) apesar da cicatrização da córnea apresentar semelhanças com a da pele, apresenta particularidades, como a regeneração da estrutura original, sem comprometer a visão.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

O objetivo deste trabalho foi caracterizar quimicamente o caracol africano (*Achatina fulica*) encontrado no Estado de Alagoas, assim como verificar a ação cicatrizante do muco cutâneo desses animais na recuperação de úlceras em córneas de coelhos.

### 2.2 Específicos

1. Indicar nova técnica de manejo que permita manter, em boas condições, o *Achatina fulica* em laboratório;
2. Analisar a citotoxicidade do muco em diferentes células;
3. Analisar a capacidade antioxidante do muco do caracol africano;
4. Analisar os principais macro e microminerais presentes na carne, concha e muco do caracol africano encontrado asselvajado no Estado de Alagoas;
5. Indicar a concentração ideal de uma solução de muco que favoreça *in vitro*, a proliferação de células de córnea de coelhos em cultura;
6. Indicar uma solução apropriada de uso oftálmico, para sua utilização nos experimentos *in vivo* em lesões cirurgicamente produzidas em córneas de coelhos;
7. Analisar, *in vivo*, a ação cicatrizante da solução de muco em lesões em córneas de coelhos.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Contemporaneamente o caracol africano é encontrado em todos os estados brasileiros. O único ecossistema onde ainda não foi registrada a sua presença é o bioma Pampa.

#### 3.1 O Caracol Africano

Embora seja nativo da costa leste da África (Quênia e Tanzânia) é encontrado, contemporaneamente, em todos os continentes, exceto na Antártida. É uma espécie muito resistente e capaz de modificar o seu ciclo de vida para se adaptar a distintas condições ambientais. Por conta disso, o *Achatina fulica* é apontado pela International Union for Conservation of Nature (2010) como uma ameaça à agricultura, tendo um impacto negativo sobre a fauna nativa, atuando ainda como vetor de doenças humanas. De acordo com Sankaran (2010, p.1), o caracol gigante africano é uma das 100 espécies invasoras mais prejudiciais do planeta. Não sendo exigente quanto à alimentação, consome 500 diferentes tipos de plantas, incluindo fruta-pão, mandioca, cacau, mamão, amendoim e a maioria das variedades de feijão, ervilha, pepino e melão. Come areia, pedriscos, ossos de carcaças e até concreto.

O filo Mollusca reúne perto de 100.000 espécies, constituindo-se no segundo maior filo animal, perdendo apenas para o filo Arthropoda com cerca de 891.000 espécies. De acordo com Lorenzi (2006, p. 30), o sucesso do filo Mollusca é atribuído à sua extrema adaptabilidade. De acordo com Ruppert, Fox e Barnes (2005 apud LORENZI; MARTINS, 2008, p.31-32) todas as sete classes (Aplacophora, Polyplacophora, Monoplacophora, Gastropoda, Cephalopoda, Bivalvia e Scaphopoda) estão presentes e melhor adaptadas ao ambiente marinho; alguns bivalves e gastrópodes são encontrados em habitats de água doce, mas somente os gastrópodes estão presentes na terra, possuindo entre os seus representantes, caramujos aquáticos, caracóis e lesmas terrestres. O Gastropoda: Pulmonata constituem o maior grupo entre os moluscos terrestres. (YOLOYE, 1984 apud UBOH; EBONG; MBI, 2010)

O Caracol Africano *Achatina (Lissachatina) fulica* (Bowdich, 1822) é um molusco terrestre pulmonado superior, pertencente ao Reino Animalia, Filo Mollusca, Classe Gastropoda, Subclasse Pulmonata, Ordem Stylommatophora, Família Achatinidae e Gênero *Achatina*. A espécie de acordo com Lorenzi, (2006, p. 33) pertence a um grupo com cerca de

60 mil espécies de gastrópodes viventes descritas e outros 15 mil fósseis conhecidos e diversificados. Apesar de serem lentos e intimamente dependentes do substrato que habitam, apresentam uma notável capacidade de irradiação adaptativa que reflete no tipo da concha, nos tipos de alimentação e na especialização de diversos habitats.

Segundo Cooling (2005 apud GIPS, 2010), a sua concha é cônica, estreita, com um comprimento duas vezes maior que a largura, com 7 a 9 voltas, normalmente de cor marrom-avermelhada ou café; tem fracas marcações verticais amareladas, dependendo das condições ambientais e de sua dieta. Os adultos podem exceder os 20 cm de comprimento de concha mas, geralmente, a média é de cerca de 5 a 10 cm e o seu peso médio é de 32 gramas.

De acordo com Smith e Fowler (2003 apud GIPS, 2010) o *Achatina fulica* permanece ativo em uma faixa de temperatura de 9° C a 29° C e sobrevive a temperaturas de 2° C por hibernação e 30° C por estivação.

### 3.2 Ecologia do Caracol Africano no Brasil

De acordo com Agudo-Padrón e Lenhard (2010) existem duas espécies de caracóis africanos no Brasil: o *Achatina fulica* asselvajado e o *A. monochromatica*, ocorrendo exclusivamente, confinado em cativeiro no Estado de São Paulo/ SP, nas instalações experimentais da Universidade de São Paulo (USP) / Pirassununga e na propriedade comercial do Eng. Agr. Carlos Alberto da Fonseca Funcia.

As duas primeiras matrizes de *Achatina fulica* foram contrabandeadas para Curitiba, estado do Paraná em 1988, oriundas da Indonésia. Em outubro de 1990, os seus descendentes começaram a ser comercializados numa feira agropecuária na capital paranaense (ESCARGOT, 1992; ESCARGOT, 1994).

Em menos de 20 anos, o caracol africano espalhou-se por todos os estados do Brasil. O fato de *A. fulica* ser considerado hermafrodita verdadeiro, resistente às intempéries, às enfermidades, prolífero, se alimentar de uma enorme quantidade de vegetais além de se enterrar no solo para hibernar durante os períodos mais quentes do ano, corroboram para o insucesso das tentativas de controle empetradas pelo governo. Segundo Souza (2007, p. 4), pouco sucesso tem sido obtido através do controle químico, realizado por meio de pesticidas que apresentam problemas de toxicidade ao ser humano, aos animais domésticos e ao meio ambiente.

Prasad et al. (2004, p. 1658) afirma que o controle biológico realizado por espécies malacofágicas é desaconselhável, pois estas espécies, além de exóticas, acabam comprometendo a malacofauna nativa. O pesquisador cita as espécies de caracóis *Euglandina rosea* e *Gonaxis quadrilateralis* introduzidas no Haváí para o controle do caracol africano, que acabaram sendo mais danosas ao ecossistema do que o próprio *A. fulica*.

Prasad et al. (2004) investigou novas formas de controle químico e biológico do caracol africano e sugeriu o uso do *Annona glabra* L. (Annonaceae), conhecido no Brasil como Araticum-do-brejo ou Araticum-bravo por ser um vegetal resistente ao ataque dos caracóis. Segundo Siebra (2007), a *A. glabra* é uma árvore de pequeno porte encontrada em todo território brasileiro, principalmente nas áreas costeiras. Programa Global de Espécies Invasoras - GIPS (2010) cita que o fruto de *Thevetia peruviana* (Pers.) Schum, originária da América Central, conhecida popularmente como chapéu-de-napoleão, também têm ação contra o caracol africano. Segundo Oliveira, Godoy e Costa (2006), os principais componentes tóxicos desta planta pertencem à classe dos glicosídeos cardiotoxicos.

De acordo com Mead (1979) apud PROGRAMA GLOBAL DE ESPÉCIES INVASORAS - GIPS (2010) o processo de naturalização pode amenizar os impactos dessa espécie invasora; em sua opinião “o fenômeno do declínio das populações de *A. fulica* parece ser inevitável”. No Brasil a presença de predadores nativos já começa a ser relatada. De acordo com Colley e Fischer (2009, p. 678) tem sido verificado o consumo de *A. fulica* asselvajado pelo Mico Leão Dourado (*Leontopithecus rosalia rosalia*) na Reserva Biológica de Poços das Antas, no Rio de Janeiro.

### 3.3 O caracol africano como vetor de doenças

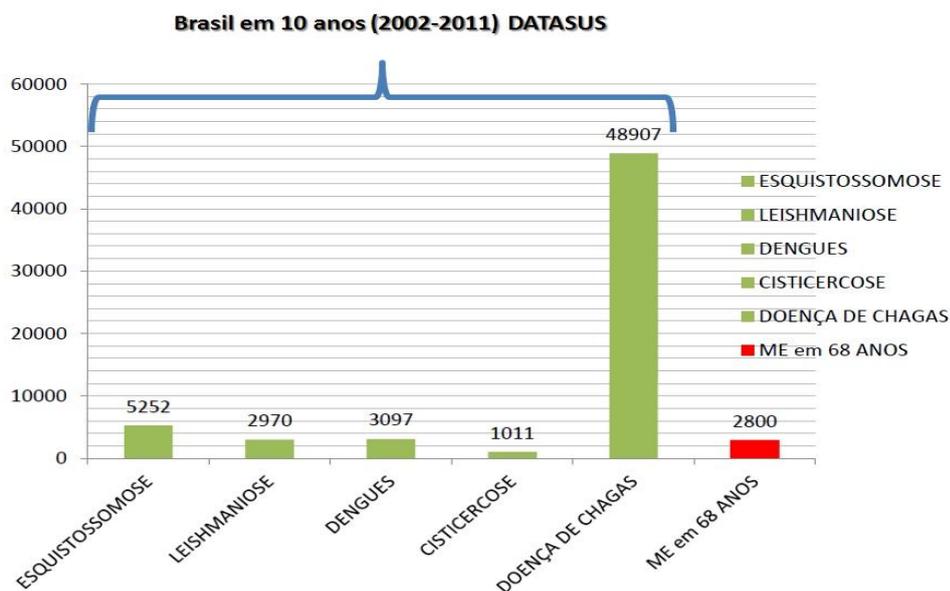
Sankaran (2010, p. 1) cita que o *A. fulica* pode atuar como vetor intermediário de *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935), verme pulmonar de ratos, responsável pela meningite eosinofílica (ME) em seres humanos (SÃO PAULO, 2010). Segundo Tsai et al. (2001), desde o seu primeiro diagnóstico em 1945, a ME foi responsável por mais de 2.800 mortes, em todo o mundo, nos últimos 68 anos. Sankaran (2010, p. 1) também cita a *Aeromonas hydrophila*, uma bactéria gram-negativa que pode causar grande variedade de sintomas, especialmente, em indivíduos imunodeprimidos. Sankaran (2010, p. 1) comenta ainda que o *Achatina fulica* propaga outras doenças como a podridão-parda do cacauero, causada pelo fungo *Phytophthora palmivora*, que se dissemina através de suas fezes.

Segundo Caldeira et al. (2007, p. 887-889) a descoberta do primeiro africano naturalmente infectado com *Angiostrongylus cantonensis* no Brasil deve-se à pesquisadora paulista, Dra. Iracy Lea Pecora, pesquisadora da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, em São Vicente, São Paulo.

Colley e Fischer (2009, p. 674) afirmam que o caracol africano é considerado um problema de saúde pública por ser potencialmente hospedeiro de nematoides causadores da angiostrongilíase humana, no entanto, é fato que, diversas espécies nativas podem causar estes mesmos infortúnios, porém, tais enfermidades potencialmente danosas à saúde, só se manifestam, segundo Vitta et al. (2011, p. 5970) se forem ingeridos crus ou mal cozidos, hábito alimentar comum apenas no continente asiático. Na figura 1 temos a comparação entre os óbitos produzidos pela meningite eosinofílica desde 1945 (68 anos) no mundo e algumas causas de óbitos no Brasil entre 2002-2011 por outras causas.

Segundo Chroschiechowski (1977) é surpreendente a falta de especificidade do *A. cantonensis* em relação aos seus hospedeiros intermediários e paratênicos (planária, caranguejos, camarões, peixes, rãs e sapos), citando uma longa lista de moluscos gastrópodes terrestres e de água doce (caramujos, caracóis e lesmas) capazes de se infectar por via natural ou experimental, hospedando larvas infectantes deste perigoso parasito de roedores.

**Figura 1 – Comparação entre as angiostrongilíases transmitidas pelo caracol africano e algumas ocorrências de óbitos no Brasil**



Fonte: o autor (2013)

Chrosciechowski (1977, p. 296) cita que larvas de terceiro estágio do *A. cantonensis* podem utilizar hospedeiros paratênicos (transporte), sobrevivendo por um período prolongado sem sofrer alterações tornando-se, portanto, reservatórios. Até verduras cruas podem se comportar como reservatórios ocasionais se tiveram contato com moluscos triturados, assim, tanto o homem como os roedores, podem infectar-se pela ingestão do hospedeiro intermediário cru ou mal cozido ou seus reservatórios. Segundo Chrosciechowski (1977, p. 296) diversos autores apresentam uma longa lista de moluscos gastrópodes terrestres e de água doce, caracóis e lesmas, infectados por via natural ou experimental, hospedando larvas infectantes em sua terceira fase. O autor cita que entre esses moluscos, o *Biomphalaria glabrata*, conhecido como o hospedeiro intermediário de *Schistosoma mansoni*, ao ser exposto em laboratório, resultou ser um excelente hospedeiro intermediário de *A. cantonensis*.

Thiengo et al. (2006, p. 2-7) citam no Brasil os seguintes gastrópodes exóticos invasores de importância médica: o *Achatina fulica*, naturalmente, o *Bradybaena similares*, o *Limax flavus*, o *Deroceras laeve*, o *Melanoides tuberculatus* e, inclusive, o *Helix aspersa*, atualmente asselvajado no Rio Grande do Sul e identificado naturalmente infectado com larvas de *A. costaricensis* neste estado.

Rambo et al. (1997), Laitano et al. (2001), Thiengo, (2007 apud COLLEY; FICHER 2009, p. 678) citam diversas espécies de gastrópodes terrestres, encontrados naturalmente infectados no território brasileiro por *A. costaricensis*, entre elas algumas nativas, que podem transmitir ou já transmitiram angiostrongilíases: *Bradybaena similares* (Férussac, 1821) (BRADYBAENIDAE - exótica), *Limax maximus* (Linnaeus, 1758) e *Limax flavus* (Linnaeus, 1758) (LIMACIDAE - exóticas), *Helix aspersa* Müller, 1774 (HELICIDAE - exótica), *Phyllocaulis variegatus* (Semper, 1855), *Phyllocaulis soleiformis* (d'Orbigny, 1835), *Sarasinula linguaeformis* (Semper, 1885) e *Belocaulus angustipes* (Heynemann, 1885) (VERONICELLIDAE - nativas), além de *Leptinaria unilamellata* (D'Orbigny, 1835) (SUBULINIDAE - nativa).

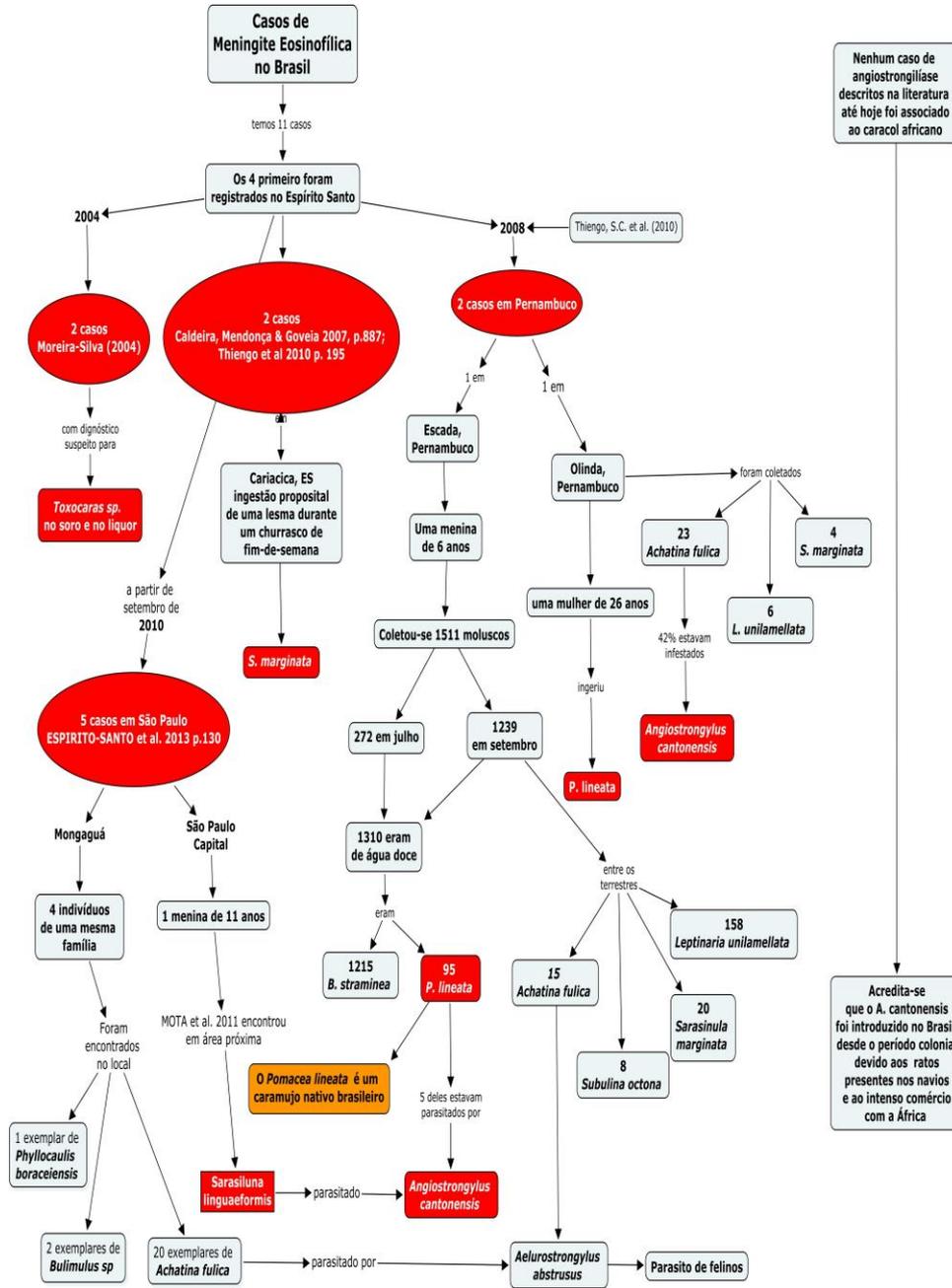
Segundo Neuhauss et al. (2007), os caramujos africanos no sul do Brasil não são hospedeiros permissíveis para as duas espécies de *Angiostrongylus*, não representando, portanto, um risco significativo para a transmissão destes parasitas. Porém, o *A. costaricensis*, até o momento, com vários casos registrados no Brasil, nunca foi associado à transmissão pelo caracol africano no país. Os principais hospedeiros intermediários para o *A. costaricensis*

são lesmas da família Venonicellidae (ALICATA (1965), MORERA (1973 apud NEUHAUSS, 2007; SILVA, 2003, p. 6)

No Brasil foram divulgados até hoje, apenas 11 casos de ME, a pior doença atribuída ao Africano (Figura 2). Os quatro primeiros casos foram relatados no Espírito Santo. Os dois primeiros foram descritos por Moreira-Silva et al. (2004, p. 169) em um casal de crianças em Vitória e o diagnóstico foi associado a *Toxocaras spp*, um nematódeo comum em cães e gatos. Em 2007, o responsável pelos terceiro e quarto casos, ocorridos no município de Cariacica – ES, segundo Caldeira et al. 2007, p. 887 e Thiengo et al 2010 p. 195, foi uma lesma, *Sarasinula marginata* (Semper, 1885) ingerida crua. Os quinto e o sexto casos ocorreram em Pernambuco, em 2008, respectivamente nos municípios de Escada e Olinda e foram provocados pela ingestão crua de moluscos nativos, provavelmente, um caramujo límnico o *Pomacea lineata* Spix, 1827. Os 5 casos seguintes, de acordo com Espirito-Santo et al. (2013, p.130), foram reportados a partir de 2010 no estado de São Paulo, 4 casos numa mesma família em Mongaguá e o último, registrado na capital paulista, comprometeu uma menina de 11 anos. No peridomicílio de Mongaguá não foi encontrado nenhum *A. fulica* parasitado por *A. cantonensis* e na capital paulista, o responsável foi uma lesma nativa (*Sarasiluna linguaeform*).

Maldonado Junior et al. (2010, p. 940) publicaram que a distribuição silvestre do *A. cantonensis* no Brasil é o resultado de múltiplas introduções do parasita por ratos a partir do período colonial brasileiro, consequência do intenso comércio praticado na época com o continente Africano. Portanto, a ocorrência deste parasito no país, segundo Maldonado Junior (2010, p. 940) não é decorrente da presença do Africano, pois o *A. cantonensis* já estava aqui muito antes da introdução do primeiro Africano, há apenas duas décadas.

Figura 2 - Casos de meningite eosinofílica no Brasil até 2013.



### 3.4 O Impacto sobre o ambiente

Colley e Fischer (2009, p. 677) publicaram que a Secretaria do Estado do Paraná (SESA/PR) registrou a ocorrência de *A. fulica* em 132 dos 399 municípios do estado, entretanto, o impacto econômico do molusco não foi evidenciado. Neste mesmo artigo, citam que após consultarem representantes da Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER/PR), Secretaria de Estado da Agricultura e Abastecimento do Paraná (SEAB/PR), Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA/PR), a impressão continuou unânime: nenhuma das instituições apontou o *A. fulica* como praga agrícola. Segundo Colley e Fischer (2009, p. 677), a EMATER/PR e o DERAL vinculado a SEAB/PR não detinham nenhuma informação sobre prejuízos agrícolas e que o IAPAR ressaltou que os prejuízos ocasionais por caramujos e lesmas sobre a agricultura paranaense são eventuais e de ocorrência local, não havendo estimativa sobre o grau de prejuízo. Colley e Fischer (2009, p. 677) entrevistaram, ainda, diversos produtores rurais em Morretes – PR e também não revelaram a existência de grandes prejuízos econômicos; 63% dos entrevistados afirmaram não estarem sofrendo economicamente pela presença do invasor e em Guaraqueçaba/PR, todos os entrevistados afirmaram que *A. fulica* representa um transtorno, pelo fato de comer as plantas do quintal, liberar uma grande quantidade de muco e fezes, além de representar ameaça à saúde.

Após comentar sobre os riscos à saúde pública e à agricultura, o próximo passo consiste em analisar o seu risco potencial ao meio ambiente brasileiro. Mais uma vez, de acordo com Colley e Fischer (2009, p. 678, 680), a principal ameaça, inclusive em ambientes antrópicos, tem sido relacionada aos danos causados aos “grandes moluscos nativos pertencentes à família Megalobulimidae. [...] As pessoas não distinguem a espécie invasora das nativas e acabam sacrificando os caramujos nativos juntamente com o invasor. [...] A dificuldade para diferenciar a espécie invasora das nativas é acentuada uma vez que alguns panfletos informativos sobre o *A. fulica* até apresentam ilustrações de uma espécie de *Achatina* Lamarck, 1799, diferente daquela introduzida no Brasil. Outro fator que dificulta a identificação é o fato do *A. fulica* apresentar um forte polimorfismo durante o desenvolvimento ontogenético. Isso sem mencionar que as tentativas frustradas de controle do caracol africano têm exigido grande soma de esforços e recursos financeiros, com quase nenhum resultado encorajador.”

A proibição da criação e comercialização do caracol (*Achatina fulica*) em todo o território nacional ocorreu em 18 de agosto de 2005, com a Instrução Normativa número 73 do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), que passou a considerar o *A. fulica* como espécie exótica invasora, portanto, nociva às espécies silvestres nativas, ao ambiente, à agricultura e à saúde pública, autorizando a implementação de medidas de controle, coleta e eliminação deste caracol.

Atualmente, o Brasil lidera um acelerado processo de extinção de caracóis nativos endêmicos no continente sul-americano, muitos deles ameaçados de extinção devido às campanhas públicas mal conduzidas desde 2003 "Pro Erradicação do Africano" no meio ambiente do Brasil. Entre todas as espécies nativas de caracóis terrestres, especialmente os representantes específicos das Famílias Bulimulidae, Strophocheilidae e Megalobulimidae, muitas delas raras e endêmicas, no geral, muito pouco conhecidas cientificamente até hoje, são as mais ameaçadas.

### **3.5 A carne do caracol africano e sua utilidade**

A carne de caracol é relatada por como um alimento de alta qualidade, rico em proteínas, pobre em gorduras, de baixo custo e uma boa fonte de minerais essenciais, necessários para o desenvolvimento dos tecidos (ORISAWUYI, 1989; ADEMOLU et al., 2004; FAGBUARO et al., 2006; FUNMILAYO, 2008; apud UBOH; EBONG; MBI, 2010, p.15).

Na pesquisa de Uboh, Ebong e Mbi (2010, p. 15), as concentrações de ferro, magnésio, cálcio, fósforo, potássio e sódio foram consideradas elevadas, enquanto o cobre, cobalto e chumbo não foram detectados, o que levou os autores a recomendar os caracóis como alimento para favorecer o crescimento e desenvolvimento do ser humano, corroborando as publicações anteriores de Ademolu et al. (2004) e Fagbuaro et al. (2006).

Pearson e Gillet (1999 apud UBOH; EBONG; MBI, 2010, p. 15) relataram que o cálcio é o mineral mais abundante encontrado na carne dos caracóis, mineral importante no processo de coagulação do sangue e desenvolvimento dos ossos no ser humano.

### 3.6 O muco e suas utilidades

Segundo Costa Neto (2006), o uso de animais como fonte de medicamentos é “um fenômeno transcultural historicamente antigo e geograficamente disseminado”. De acordo com ele, a literatura registra o uso clínico e terapêutico de compostos provenientes de diferentes espécies de moluscos. A química de produtos naturais de ostras, mexilhões, mariscos, caracóis, caramujos e lesmas foi substancialmente investigada, mas a maioria dos estudos se concentra nas subclasses Opisthobranchia e Prosobranchia.

Segundo Lorenzi (2006, p. 25) existem nos moluscos dois grupos de reação de defesa: uma celular e outra mediada por fatores de defesa humoral. A primeira envolve a fagocitose de partículas e o encapsulamento de materiais estranhos. Já, a segunda, envolve lisozimas, como proteínas, lectinas, fatores antibacterianos ou antivirais e opsonização. Segundo a pesquisadora, o muco liberado pelos moluscos é um fluido viscoelástico, constituído de uma matriz polimérica formada por longas cadeias de mucinas, uma glicoproteína (proteínas densamente glicolisiladas), cuja principal função é a proteção do corpo do animal contra a desidratação. Estas glicoproteínas têm alta massa molecular e são resultantes da mistura de materiais provenientes de diversas glândulas e exsudatos gerais das células epiteliais, contendo duas subunidades idênticas e proteínas chamadas de Achacin. Esta proteína, o Achacin, uma glicoproteína com alto peso molecular, foi isolada a partir do caracol gigante africano e foi purificada e isolada por Otsuka-Fuchino (1993), que relata a sua propriedade em destruir a superfície do *Staphylococcus aureus*, sem prejudicar as células eucarióticas do organismo infectado.

Kubota et al. (1985, p. 214) descreveram a presença da mucina no muco cutâneo, com poder antimicrobiano, que inibe o crescimento de bactérias gram-positivas (*Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*) e gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*), propriedade citada também por Iguchi, Aikava e Matsumoto (1982 apud LORENZI, 2006, p. 37). A mucina confere ao muco, resistência à proteólise e a propriedade de absorver água, dando-lhe a consistência de gel. A mucina é encontrada na maioria das glândulas secretoras de muco e é o lubrificante que protege a superfície corporal contra o atrito e a erosão. Apresenta seu esqueleto peptídico rico nos seguintes aminoácidos: serina, treonina e tirosina. O muco produzido pelos caracóis é constituído por uma série de lectinas, mucopolissacarídeos, glicoproteínas, proteínas, ácido urônico, ácido siálico, hexosaminas e uma variedade de outras moléculas (GLINSKI; JAROSZ, 1997 apud LORENZI, 2006, p. 35).

Jeong et al. (2001 apud LORENZI, 2006, p. 36), cita que os caracóis terrestres *A. fulica* possuem uma proteína glicosaminoglicana (GAG) presente no corpo, chamada sulfato de Acharan, que representa cerca de 3 a 5% do peso seco dos tecidos deste animal e constitui quase que inteiramente o muco secretado por estes animais.

Costa Neto (2006) dedicou-se ao levantamento do uso dos moluscos na medicina tradicional, tendo publicado um artigo que descreve o uso de diversos moluscos nativos, especialmente, no nordeste brasileiro.

Em busca de produtos de origem animal de importância terapêutica, a exemplo dos venenos dos aracnídeos, própolis e mel das abelhas e, com a experiência acumulada ao longo destes anos sobre as propriedades farmacológicas do muco do caracol *A. fulica* e *A. monochromatica*, Martins et al. (2003) relatam que muitas questões estão sendo revisadas e indagações suscitadas, com vistas às aplicações terapêuticas e cosméticas utilizadas desde os primórdios da humanidade.

Na França e na Alemanha, Pons et al. (1998 apud LORENZI, 2006, p. 25) relatam o uso do muco do caracol terrestre como base de preparações cosméticas e, com efeito broncorelaxante devido à presença de helicidina, que é caracterizada como extrato biológico obtido do muco de caracóis da espécie *Helix pomatia*, utilizado como um agente antitussígeno.

De acordo com Tempone (2007, p.73), venenos e secreções cutâneas de anfíbios, são fontes ricas de novas moléculas químicas, que podem ser utilizadas como protótipos farmacêuticos no desenvolvimento de novos fármacos. A secreção cutânea de vários animais, especialmente, anfíbios, tem apresentado compostos de importância significativa com ação antiparasitária e antifúngica. Segundo o pesquisador existe um grande potencial a ser explorado em produtos naturais derivados da fauna brasileira. Em relação ao *A. fulica*, cita ainda que a sua abundante secreção cutânea tem significativo potencial terapêutico e, recentemente, comenta sobre a sua atividade antiangiogênica em células tumorais, enfatizando, em sua pesquisa, a ação leishmanicida do muco bruto do *A. fulica* sobre formas promastigotas de *L.(L.) chagasi*, descrevendo, por meio de ensaios enzimáticos, a detecção de atividade da L-aminoácido oxidase (L-AAO) no muco bruto do *A. fulica*. Neste trabalho, os autores demonstraram que o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) gerado por essa enzima é um dos compostos responsáveis pela morte de 54% dos parasitos em culturas de *Leishmania*,

demonstrando dessa forma a ação anti-*Leishmania*. De acordo com Ferreira et al. (2009) esta enzima é, também, amplamente distribuída em peçonhas ofídicas, catalisa a desaminação oxidativa de aminoácidos do tipo *L*. Além disso, a *L*-AAO tem atividade antimicrobiana, citotóxica, apoptótica e edematogênica, principalmente através da formação do peróxido de hidrogênio que contribui para a ação citotóxica da enzima.

### 3.7 O muco como cicatrizante em pele

O homem possui, segundo Isaac et al. (2010), três interfaces de contato com o meio ambiente: as mucosas do trato gastrointestinal, do trato pulmonar e a pele, sujeitas frequentemente a estímulos danosos que desencadeiam processos biológicos para a restauração das funções perdidas. Ao conjunto dessas vias denomina-se cicatrização. O processo de cicatrização depende do agente agressor, profundidade da lesão, tamanho, tipo, localização, presença de infecção, estado de saúde e idade do indivíduo.

A cicatrização está dividida em três fases: inflamatória, proliferativa e remodeladora. A primeira fase é caracterizada pela hemostasia, responsável pela formação de um coágulo de fibrina e pela migração de leucócitos fagocitários para o local da ferida, na tentativa de remover substâncias estranhas e microorganismos. A segunda fase, a proliferativa, envolve a migração e proliferação de três classes celulares: fibroblastos, endotélio e queratinócitos, além da deposição de fibronectina sobre o coágulo, formando o fibronexus. Nesta fase ocorre ainda a secreção de colágeno III e a síntese de outros elementos matriciais, especialmente o fibroblasto, o maior responsável pelas mudanças estruturais. Na última fase, a remodeladora, ocorre mudança no padrão de organização do colágeno III que é substituído pelo colágeno I e ocorre o aumento da resistência da ferida. Todo o processo de cicatrização é controlado por polipeptídeos chamados fatores de crescimento, que modificam a fisiologia de suas células-alvo. (ISAAC, 2010, p. 125)

Autores como Martins et al. (2003), Sírio (2005) e Lorenzi (2006) descreveram efeitos benéficos, antimicrobianos e cicatrizantes do muco extraído de caracóis *Achatina sp* e a potencialização destes efeitos a partir do acréscimo de plantas medicinais à dieta base dos caracóis, constatando a capacidade de retenção nestes organismos de propriedades de alimentos por eles ingeridos.

Martins et al. (2003) avaliou macroscopicamente e histologicamente os efeitos reparadores do muco do caracol *A. fulica* em lesões provocadas por instrumento cortante na pele de coelhos. As características macroscópicas da lesão foram registradas diariamente e para a análise histológica, uma biópsia foi realizada após 72 h de tratamento. Os fragmentos foram processados rotineiramente e corados com Tricrômio de Masson. Histologicamente, a epiderme dos coelhos tratados mostrou uma camada basal de células cúbicas, enquanto os do grupo controle apresentaram uma camada basal de células cilíndricas com áreas desorganizadas e a derme apresentou um estágio mais avançado no processo de reparo, quando comparado ao controle. A evolução macroscópica no processo de cicatrização ocorreu num menor espaço de tempo nos coelhos do grupo pomada em relação aos demais tratamentos, concluindo que o muco dos caracóis influenciou o processo de reparo de lesões provocadas em pele de coelhos por meio de instrumento cortante e que a pomada produzida com o muco do *A. fulica* apresentou melhor reparação tecidual, tanto clinicamente quanto histologicamente, sendo, portanto, uma alternativa aparentemente viável para o tratamento de feridas em pele de animais.

Sirio (2005) concluiu que as feridas de camundongos tratadas com muco de caracóis alimentados com ração base e com ração contendo *Symphytum officinale* (confrei), apresentaram melhor recuperação da ferida tanto clínica quanto histologicamente, quando comparados ao grupo controle. Macroscopicamente, os animais tratados mostraram edemas menores, maior presença de crosta e maior contração das bordas das feridas ao final do experimento, quando comparados ao grupo controle. Histologicamente, os grupos tratados também revelaram melhor reparação da lesão, apresentando edemas menos intensos, grande quantidades de tecido de granulação e infiltrados inflamatórios e o grupo tratado com muco de caracóis alimentados com confrei foi o que apresentou melhores resultados.

### **3.8 A córnea e o processo de cicatrização**

Segundo Brukitt et al. (1994), a córnea é a porção transparente espessa da camada córneo-escleral encerrando a sexta parte anterior do olho. A córnea é uma estrutura avascular, de espessura muito pequena. No ser humano, ela tem 0,6 mm e consiste em cinco camadas: epitélio, a membrana de Bowman, o estroma, a membrana de Descemet e o endotélio. A córnea é mantida por difusão de metabólitos do humor aquoso e os vasos sanguíneos do limbo e parte do oxigênio advém diretamente do meio externo. No entanto, cientistas da Universidade de Nottingham (Reino Unido) descobriram, de acordo com Thorne (2013), uma

nova camada da córnea humana, batizada com o nome do seu descobridor, Harminder S. Dua. “A nova camada agora descoberta está localizada na parte de trás da córnea, entre o estroma corneano e a membrana Descemet. Embora tenha apenas 15 micrômetros de espessura - a córnea inteira tem cerca de 550 micrômetros ou 0,5 milímetro de espessura - a camada de Dua é forte o suficiente para resistir a 1,5 bar de pressão”.

O epitélio é a camada mais superficial da córnea, formado por epitélio pavimentoso estratificado com espessura de aproximadamente cinco células e detém alta capacidade de regeneração. O epitélio em seu todo funciona como uma espécie de barreira contra a perda de líquidos e penetração de microrganismos, bem como apresenta uma superfície lisa e brilhante, o que garante o seu poder refrativo.

A coesão do epitélio é mantida pelos desmossomas e hemidesmossomas. Esse epitélio é sustentado por uma membrana basal especializada, conhecida como membrana de Bowman, que é particularmente proeminente no homem. É uma camada acelular, formada por fibras de colágeno e proteoglicanas densamente entrelaçadas. É formada a partir de células do epitélio basal, da lâmina basal, bem como de fibras do estroma anterior. Se lesada, a membrana de Bowman não se regenera, tendo por consequência a perda de sua transparência. A membrana de Bowman tem por função manter a integridade e a organização epitelial, bem como separar o epitélio do estroma.

O estroma é responsável pelo maior volume da córnea com aproximadamente 90% da espessura total da córnea e consiste em uma forma altamente regular de tecido colágeno denso formando lamelas delgadas. Sua densidade celular é reduzida, estando os ceratócitos localizados entre as lamelas, no terço anterior e médio do estroma. No estroma são, também, encontrados os axônios dos nervos, as células de Schwann, os fibroblastos e alguns leucócitos são dispersos entre as lamelas.

A superfície interna da córnea é revestida por uma camada de células endoteliais achatadas que são sustentadas por uma membrana basal elástica muito espessa, conhecida como membrana de Descemet, formada a partir do endotélio. Essa camada é facilmente regenerada.

Segundo Steele (1999, p.28), coelhos não possuem a membrana de Bowman.

De acordo com Melo (2007) o endotélio é uma camada única de células hexagonais, medindo aproximadamente de 4 a 6  $\mu\text{m}$  de altura e 20  $\mu\text{m}$  de comprimento, no qual as células dispõem-se em um padrão tal que, por sua semelhança, é chamado de mosaico endotelial. Quando há perda de células endoteliais, as remanescentes "deslizam" em direção à área lesada para ocupá-la, aumentando de tamanho (polimegatismo) e alterando a sua forma (pleomorfismo). Esse mecanismo é responsável pelo reparo do endotélio, uma vez que a mitose em células endoteliais adultas é escassa e lenta. É importante enfatizar que o endotélio é fundamental para manter a transparência e organização das camadas da córnea, evitando-se o edema corneano (Figura 3).

**Figura 3 - Camadas Histológicas da Córnea de Coelho.**

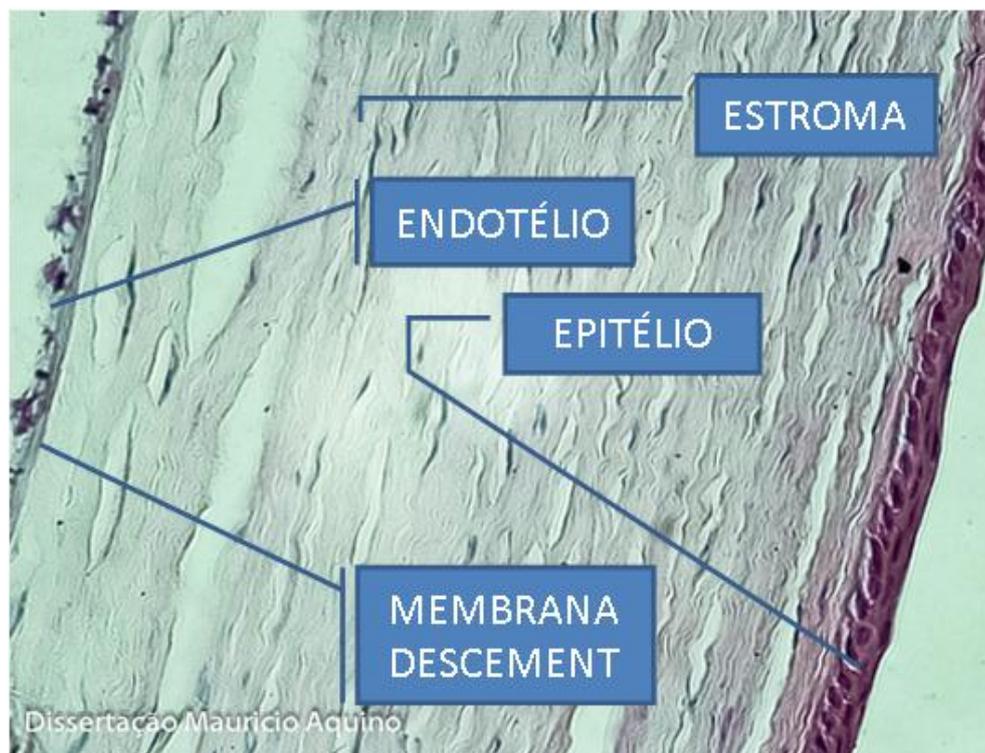


Foto: Silvana Ayres Martins

Segundo Fine e Stramer (2005, p. 2), a pele proporcionou o modelo básico para o estudo da cicatrização e muito do que é estudado em pele, pode ser transferido para a córnea. Entretanto, a cicatrização da córnea tem diferenças importantes que devem ser entendidas devido ao mecanismo e seus efeitos finais. Enquanto na pele, o objetivo é a formação de um tecido cicatricial resistente, na córnea, um dos aspectos mais importantes de cicatrização é a forma como os processos de cura visam minimizar estes resultados finais que teriam consequências visuais graves.

Segundo Monteiro et al. (1999 apud PONTES et al., 2011) o processo de cicatrização corneana se dá diferentemente do processo em pele, dependendo da profundidade e do tipo de lesão envolvida. No caso da profundidade, a reparação poderá ocorrer pelo deslizamento ou migração das células epiteliais para cobrir a área lesada e para reconstituir o número de células epiteliais normais o processo se dá por mitose.

De acordo com Klenkler e Sheardown (2004) apud Pontes et al. (2011) a reparação de lesões que envolvem a córnea, é muito complexa e consiste em uma série de eventos que ocorrem simultaneamente. A integração da proliferação celular, migração, diferenciação, apoptose e comunicação intercelular envolvem proteínas da matriz mesenquimal, proteoglicanos, fatores solúveis e enzimas proteolíticas, além de alguns tipos celulares. Isso se dá graças à ativação de células tronco limvais na ultima fase do processo de regeneração, a proliferativa. As células tronco produzem células amplificadas e transientes (TACs); as TACs se transformam em células pós-mimóticas (PMCs), as PMCs se transformam em células terminalmente diferenciadas (TCDs); em seguida ocorre o estabelecimento adicional de hemidesmosomos; possível hiperplasia epitelial e a substituição das extremidades terminais do nervo axon da córnea.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Materiais:

#### 4.1.1 Reagentes

Reagentes 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT), acepromazina, acetona P. A., ácido acético glacial, ácido bórico ( $H_3BO_3$ ), ácido clorídrico (HCl), ácido nítrico ( $HNO_3$ ); ácido sulfúrico concentrado, albumina bovina sérica, células fibroblásticas de córnea de coelho da linhagem SIRC 0224, cloreto de amônio, cloreto de amônio, cloreto de potássio (KCl), cloridrato de cetamina, cloridrato de proximetaína, clorofórmio ( $CHCl_3$ ), colesterol (Sigma), dimetilsulfóxido (DMSO), colírio de fluoresceína, etanol, hexano, fosfato de sódio dibásico ( $Na_2HPO_4$ ), gel oftalmológico dexpanthenol 50 mg/g, solução salina tamponada (PBS), fosfato de sódio monobásico ( $NaH_2PO_4$ ), hidróxido de potássio (KOH), hidróxido de sódio (NaOH), hipoclorito de sódio (NaClO), L-glutamina, meio de MEM Eagle Sigma, metanol (MeOH), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), tartarato duplo de sódio e potássio tetra-hidratado ( $KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$ ), reagente de Biuret, solução saturada de NaCl, soro bovino fetal, sulfato de cobre penta-hidratado ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ), sulfato de sódio anidro ( $Na_2SO_4$ ), sulfato ferroso, dimetilssulfóxido (DMSO), tartarato duplo de sódio, tripsina/EDTA, vermelho de metila.

#### 4.1.2 Equipamentos

Foram utilizados: agitador de soluções AP 56 Phoenix, agitador magnético, almofariz e pilão, aparelho de destilação de amônia, banho-maria, bisturi punch nº 5, caixas plásticas transparentes de polietileno, câmara de fluxo laminar, cápsula de porcelana, centrífuga, dessecador, espectrofotômetro de placa, espectrofotômetro MultiSpec-1501 da marca Shimadzu, espectrofotômetro UV/vis Thermo Scientific, flash circular para macrofotografia, forno de mufla, liofilizador marca Thermo Savant, Microondas (Milestone), objetiva Canon macro de 100 mm, rota-evaporador, shaker orbital, aparelho de Soxhlet.

#### 4.2 Caracterização taxonômica do caracol africano encontrado em Alagoas

Os animais coletados no estado foram identificados taxonomicamente pelo geógrafo e pesquisador malacologista Ignacio Agudo-Padrón, consultor vinculado ao Museu Zoobotânico Augusto Ruschi - MUZAR, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Passo Fundo - UPF/ RS, à Estação Experimental do Arroz - EEA, do Instituto Riograndense do Arroz - IRGA, Cachoeirinha/ RS e ao "Projeto Avulsos Malacológicos - AM", Florianópolis/ SC (Anexo A).

#### 4.3 Manutenção dos caracóis

Inicialmente foram capturados 100 caracóis asselvajados da espécie *A. fulica* (figura 4) oriundos do Campus da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), no bairro do Tabuleiro dos Martins, em Maceió e do município de Capela, interior do estado de Alagoas, durante o mês de junho de 2011, quando o autor acompanhou uma equipe da TV Gazeta, como consultor, para prestar esclarecimentos sobre uma grande infestação desses moluscos na zona rural do município. Estes primeiros animais, com massa corporal média de 29 gramas, foram mantidos em laboratório como doadores de o muco, a principal matéria-prima desta pesquisa.

**Figura 4 - Caracol Africano *Achatina (Lissachatina) fulica* de tamanho médio.**



Fonte: o autor (2013)

Os caracóis foram mantidos no interior de caixas plásticas transparentes, de polietileno de alta densidade da Plasbox, com capacidade para 50 Litros, medindo em centímetros, 28x42x49 de modo a proporcionar aos animais uma maior higiene e um mínimo de estresse. Para a manutenção destes animais em laboratório foi desenvolvido uma técnica de criação inédita, que poderá ser utilizada para a criação intensiva de caracóis arborícolas (AQUINO, 2012) em qualquer parte do mundo (Figura 5) (Apendice A).

**Figura 5 - Sistema de criação desenvolvido para este experimento.**



Fonte: o autor (2013)

Os caracóis foram alimentados com ração para codornas, eleita por Ademolu et al. (2004, p. 416) como uma das melhores rações para esta espécie, além de água ofertada *ad libitum*. A ração adotada foi da linha natural da marca PURINA para codornas em produção. Acrescentou-se à ração base, 10% de farinha de ostras da marca Volare para a manutenção da integridade das conchas dos caracóis. A alimentação e a limpeza das caixas foram realizadas, diariamente, pouco antes dos caracóis acordarem, ao anoitecer.

#### 4.4 Coleta do muco cutâneo de caracóis africanos

Para a coleta do muco, os caracóis foram mantidos em jejum alimentar por três dias para minimizar a contaminação por coliformes fecais. Após o jejum, as conchas foram lavadas com escova e água de torneira e os animais deixados para escorrer.

O muco do caracol foi coletado através de movimentos longitudinais repetitivos, pressionando-se o polegar contra as glândulas podais para estimulá-las, seguindo a orientação de Lorenzi (2006) (Figura 6). A maioria dos animais responde à “ordenha”, produzindo até 20% do seu peso em muco. No experimento, optou-se por ordenhas mensais.

**Figura 6 - A técnica para coleta manual do muco do caracol**



Fonte: o autor (2013)

#### 4.5 Estudo da citotoxicidade do muco liofilizado em células tumorais

O material foi testado em três linhagens distintas de células tumorais: MDA-MB435 (melanoma - humano), HCT-8 (côlon - humano) e SF-295 (glioblastoma - humano), que foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA) e cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos e mantidos em estufa a 37° C e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. As amostras foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO), na concentração estoque de 5 mg mL<sup>-1</sup>.

A citotoxicidade das amostras foi avaliada pelo método do 3-(4,5-dimetiltiazol)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT) (Mosman, 1983) no Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará - UFC. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços nas densidades de 0,7 x 10<sup>5</sup> (HCT-8), 0,6 x 10<sup>5</sup> (SF-295) e 0,1 x10<sup>6</sup> (MDA-MB-435) respectivamente. Em seguida, as soluções de muco foram adicionadas e as placas incubadas por 72 h em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

As amostras foram testadas em concentrações que variaram de 0,048 a 25 µg mL<sup>-1</sup> e as absorvâncias, obtidas com o auxílio de um espectrofotômetro de placa, um aparelho amplamente utilizado em laboratórios, cuja função é a de medir e comparar a quantidade de luz (energia radiante) absorvida por uma determinada solução, em comprimento de onda de 595 nm.

#### 4.6 Capacidade sequestradora de radical livre: DPPH

De acordo com Souza, Alves, A. G. C. e Alves, M. S. (2007) várias técnicas são utilizadas para determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas. Uma das mais utilizados avalia a atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), de coloração púrpura que absorve a um comprimento de onda de 516 nm. Por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R), o DPPH é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da banda de absorção original, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorvância. A partir dos resultados obtidos, determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional.

O muco *in natura* foi diluído em água milli-Q na proporção de 1:5, respectivamente e submetido ao tratamento em ultrassom por 5 min para homogeneização das soluções. Depois foi acrescentado o DPPH ( $40 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e a sua absorbância foi aferida em espectrofotômetro MultiSpec-1501 da marca Shimadzu, a cada 5 min nos primeiros 30 min e a cada 10 pelos últimos 20 min.

A técnica utilizada para analisar as amostras do muco liofilizado e submetido à extração por Soxhlet em metanol foi a mesma. Prepararam-se soluções  $50 \text{ mg L}^{-1}$  em balões de 5 mL. As soluções foram homogeneizadas manualmente e, em seguida, com o muco *in natura*, acrescentou-se o DPPH ( $40 \text{ mg mL}^{-1}$ ). A partir daí, procedeu-se como descrito anteriormente.

#### **4.7 Caracterização química do caracol africano**

O muco cutâneo liofilizado, o pó da concha e a farinha de carne do caracol africano foram submetidos à análise da composição mineral.

Para a obtenção do pó das conchas dos caracóis para a análise físico-química, adaptou-se a técnica descrita por Nunes et al. (2006) utilizada para conchas de ostras, já que houve dificuldade em se encontrar uma metodologia específica para conchas de *A. fulica*. Seis caracóis de tamanho médio (peso total 151 g) permaneceram por três minutos em água fervente ( $100 \text{ }^\circ\text{C}$ ) para facilitar a retirada das conchas, cujo peso correspondeu a 16% do peso total dos animais vivos. Em seguida, as conchas foram lavadas com detergente para a remoção de resíduos orgânicos e depois, imersas em solução de hipoclorito de sódio ( $\text{NaClO}$ ) a 1% por 24 h.

Após esse período, as conchas foram lavadas com água corrente abundante e colocadas em estufa a  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  por 2 h, para retirar os resíduos da solução de  $\text{NaClO}$  sendo, posteriormente, trituradas e secas com o auxílio de um almofariz e pilão até a obtenção de um pó fino e homogêneo.

Este material foi levado à estufa onde permaneceu por mais três horas a  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  para eliminar as possíveis contaminações durante a tamisação. O material foi acondicionado em sacos plásticos e mantido em freezer até ser enviado para análises.

Para a obtenção da farinha de carne, inicialmente, foram sacrificados oito animais que permaneceram por 1 h, em congelador. Em seguida, as conchas foram extraídas e os animais embalados e levados ao freezer (-18 °C) para congelarem. Após dois dias foram levados ao liofilizador marca Thermo Savant, onde permaneceram por 48 horas. Os animais liofilizados foram triturados em moinho de facas para a obtenção de um material homogêneo, semelhante a uma farinha.

#### 4.7.1 Procedimento para digestão das amostras

Utilizou-se um sistema fechado com emprego de radiação microondas (Milestone) para digestão das amostras em frascos sendo que cada um continha 250 mg de material e solução ácida (3,5 ml de HNO<sub>3</sub>), 3,5 ml de H<sub>2</sub>O deionizada e 1,0 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Os frascos de digestão foram estão devidamente fechados, inseridos na cavidade do micro-ondas e o programa que foi aplicado na digestão das amostras está apresentado na Tabela 1. Em seguida, os frascos foram mantidos sob sistema de ventilação por 20 minutos para resfriamento. Completou-se com água o volume do material digerido com 20 mL para posterior análise através de Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICPOES) (Varian) (Tabela 1).

**Tabela 1 - Programa aplicado para digestão das amostras em sistema fechado e radiação micro-ondas.**

<b>Etapa</b>	<b>Tempo (min)</b>	<b>Potência (w)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
<b>I</b>	<b>4</b>	<b>750</b>	<b>90</b>
<b>II</b>	<b>2</b>	<b>750</b>	<b>90</b>
<b>III</b>	<b>8</b>	<b>1000</b>	<b>180</b>
<b>IV</b>	<b>20</b>	<b>1000</b>	<b>180</b>

Fonte: o autor (2013)

Nota: A digestão das amostras em sistema fechado, comparado ao sistema aberto, tem como principal característica, a melhor preservação dos componentes da amostra a ser analisada.

## 4.8 Composição centesimal do muco liofilizado

As análises a seguir foram realizadas no Laboratório de Análise Nutricional e Bromatológicas do Centro de Ciências Agrárias e da UFAL.

### 4.8.1 Umidade

Foram pesadas aproximadamente 5 g da amostra de muco liofilizado em cápsula de porcelana, anteriormente tarada e aquecida em estufa regulada a 105° C. A amostra permaneceu por 4 h em estufa a 105° C e, em seguida, foi resfriada em dessecador por 15 min e pesada, segundo Association Of Official Analytical Chemists (2000). O teor de umidade foi expresso da seguinte forma:

$$\% \text{ Umidade} = (P1 + X - P2) / X \times 100$$

Onde:

P1 = Peso da cápsula seca

X = Peso da amostra *in natura* (g)

P2 = Peso da cápsula + amostra seca

Resíduo Seco: 100 – U%, onde:

U% = Percentual de umidade.

### 4.8.2 Cinzas

Foram pesadas aproximadamente 3 g de amostra em cadinho de porcelana previamente tarado e aquecido em forno de mufla regulada a 550° C e tarada. A amostra permaneceu por 4 h em forno de mufla a 550° C e, em seguida, foi resfriada em dessecador por 15 minutos e pesada, segundo Association Of Official Analytical Chemists (2000). O teor de cinzas foi expresso da seguinte forma:

$$\% \text{ Cinzas} = 100 \times N / P$$

Onde:

N = Número de gramas de cinzas

P = Número de gramas da amostra

% Cinzas na amostra integral: % Cinzas na amostra seca X % Resíduo seco/100

#### 4.8.3 Proteína bruta

Colocou-se 0,15 g da amostra em um tubo de digestão e em seguida adicionaram-se 5 mL da mistura digestora (ácido sulfúrico + catalisador). O material foi levado para a digestão, com o aumento da temperatura de 50 em 50 °C, alcançando 350 °C. Esperou-se resfriar e iniciou-se a destilação. Ao tubo com amostra digerida, adicionaram-se 15 mL de água e 15 mL da solução de NaOH a 40% (m/v). Então, o tubo foi acoplado ao aparelho de destilação de amônia. Nesta etapa foram colocados, em um frasco Erlenmeyer, 25 mL de solução de ácido bórico e uma mistura indicadora de vermelho de metila. A amostra foi destilada até dobrar o volume inicial, até aproximadamente 50 mL. Titulou-se com HCl 0,05 mol L<sup>-1</sup> até a coloração mudar para o alaranjado, segundo Association of Official Analytical Chemists (1984).

Os níveis foram medidos utilizando-se um fator de conversão padrão para alimentos de 6,25, para conversão do nitrogênio total em proteína bruta, da seguinte forma:

Nitrogênio % (AS) =  $(V_a - V_b) \times N \times F \times 14 \times 100 / \text{Peso da Amostra (mg)}$

Proteína % (AS) = % Nitrogênio x Fator de Conversão

Onde:

V<sub>a</sub> = Volume de ácido clorídrico gasto na titulação da amostra

V<sub>b</sub> = Volume de ácido clorídrico gasto na titulação do branco

N = Normalidade do HCl

F = Fator de correção do HCl

14 = Miligramas de nitrogênio ou 1 mEq de nitrogênio

100 = Porcentagem

AS = Amostra seca

Proteína Bruta % (AI) = % Proteínas (AS) x % Resíduo seco (RS) / 100

AI = Amostra *in natura*

#### 4.8.4 Extração lipídica

##### Fração Lipídica (Método de FOLCH; LEES; SLOANE STANLEY, 1957)

Pesaram-se 4 g de amostra e homogeneizou-se em becker com 40 mL de metanol e 80 mL de clorofórmio por 1 minuto. O homogeneizado foi filtrado em bomba de vácuo e o filtrado foi recolhido em frasco Kitasato. O resíduo retido no papel de filtro foi novamente homogeneizado, por 3 minutos, com 40 mL de metanol + 80 mL de clorofórmio e novamente filtrado. Este procedimento foi repetido por uma terceira vez. O filtrado total foi recolhido em proveta de 500 mL com tampa esmerilhada e o seu volume foi aferido. Em seguida foi transferido para um funil de separação de 500 mL e adicionou-se ¼ do volume medido em KCl 0,88% em H<sub>2</sub>O. Agitou-se manualmente e esperou-se a separação das fases. Depois, transferiu-se a fase inferior para proveta de 500 mL e desprezou-se a fase superior. O volume foi medido na proveta e transferido para outro funil de separação de 250 mL. A esta amostra foi adicionado ¼ do volume medido de uma mistura de metanol H<sub>2</sub>O (1:2) e agitou-se manualmente.

Em seguida, a fase inferior foi filtrada em balão para rota-evaporador utilizando um papel de filtro com sulfato de sódio anidro e o filtrado no balão é levado ao rota-evaporador para evaporar o clorofórmio (T = 40° C).

Após evaporação o resíduo no balão (fração lipídica) foi resuspendido em 10 mL de clorofórmio. Esse volume foi armazenado em frasco âmbar após retirar-se todo o oxigênio com nitrogênio gasoso. Em seguida foi levado ao freezer a -80 °C.

O teor de lipídeos totais foi determinado por gravimetria utilizando a perda de massa em estufa regulada a 105 °C (FOLCH; LEES; SLOANE STANLEY, 1957). O vidro de relógio foi previamente aquecido em estufa a 105 °C por uma hora. Em seguida foi resfriado em dessecador por 15 minutos, até temperatura ambiente e depois pesado. Transferiu-se 1 mL do extrato lipídico para o vidro de relógio. Após duas horas em estufa a 105 °C o vidro de relógio foi resfriado em dessecador por 15 minutos e pesado. O teor de lipídeos totais foi expresso através da seguinte expressão:

$$\% \text{ Lipídeos Totais} = (M_{\text{final}} - M_{\text{inicial}}) \times 100 / \text{Massa da amostra } in \text{ natura (g)},$$

onde:

$$M_{\text{inicial}} = \text{Massa do vidro de relógio seco}$$

$M_{\text{final}} = \text{Massa do vidro de relógio} + \text{amostra após 2 horas.}$

#### 4.8.5 (Fração Glicídica) Carboidratos

A fração de carboidratos foi determinada pela expressão abaixo.

Valor de carboidratos =  $100 - (\% \text{ de umidade} + \% \text{ de cinzas} + \% \text{ de proteínas} + \% \text{ de lipídeos}).$

Os resultados foram expressos em porcentagem em relação à massa da amostra seca. Para o cálculo da base seca utilizou-se uma regra de três a qual constava do percentual do nutriente com umidade e sem a umidade (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2001).

#### 4.8.6 Valor calórico total

Foi calculado a partir dos coeficientes calóricos correspondentes para carboidratos, proteínas e lipídeos, respectivamente 4, 4 e 9 kcal/g (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1990)

Valor Calórico =  $(\text{carboidratos} \times 4) + (\text{proteína} \times 4) + (\text{lipídeos} \times 9)$

#### 4.8.7 Colesterol por colorimetria

O colesterol foi determinado por colorimetria segundo Bohac et al. (1988) adaptado por Bragagnolo e Rodriguez-Amaya, (1997). Os lipídeos foram extraídos a frio pelo método de Folch, Lees e Sloane Stanley (1957).

Para a quantificação do colesterol total, uma saponificação prévia foi necessária para transformar os ésteres em colesterol livre. Embora a saponificação direta seja mais rápida para análise de colesterol, optou-se, neste trabalho, pela extração dos lipídeos antes da saponificação para permitir a determinação de lipídeos totais, colesterol e ácidos graxos a partir do mesmo extrato.

Uma alíquota de 2,5 mL do extrato lipídico foi evaporada sob fluxo de  $N_2$ , em tudo de ensaio. Uma vez o solvente seco, a amostra foi saponificada com 5 mL de KOH a 12,0 % em etanol, em banho-maria a 80 °C, com agitação, durante 15 min. A reação foi imediatamente

resfriada com a adição de 2,5 mL de água destilada e ficou esfriando por 15 min. A fração insaponificável foi extraída por duas vezes consecutivas com 5 mL de hexano.

Então, foi tomada uma alíquota de 2,5 mL do extrato de hexano, evaporada sob fluxo de N<sub>2</sub>. Foi acrescido ao resíduo 3 mL de solução saturada de sulfato ferroso em ácido acético glacial e 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. A reação com ácido sulfúrico concentrado e ácido acético saturado mais sulfato ferroso, no qual o sulfato ferroso agiu como um catalisador deu origem na presença de colesterol a uma coloração estável (SEARCY; BERGQUIST, 1960). A reação de Liebermann-Burchard se baseia na oxidação da substância (colesterol) por meio de íon férrico em meio sulfúrico. A densidade ótica foi medida em espectrofotômetro a 490 nm (Spectrumlab 21 - Model 1058) obedecendo-se um tempo de leitura de 10 minutos.

A curva de calibração para colesterol foi elaborada segundo Searcy e Bergquist (1960), utilizando-se 0,06 g de colesterol (Sigma) diluído em 100 mL da solução (50 mL de acetona P. A. e 50 mL de etanol), do qual foram retiradas alíquotas de 0,1 mL a 0,8 mL da solução de colesterol padrão. Essa curva foi linear utilizando-se o padrão de colesterol obteve-se a equação  $\hat{y} = 0,1359x + 0,0885$  com  $R^2 = 0,9496$ , passando pela origem e cobriu a faixa de concentração das amostras.

#### 4.8.8 Quantificação e identificação de ácidos graxos

Os lipídeos extraídos foram saponificados e os ácidos graxos esterificados em ésteres metílicos. Os ésteres metílicos foram obtidos modificando-se apenas as proporções dos reagentes das amostras (HARTMAN; LAGO, 1973). Após a extração dos lipídeos totais, uma alíquota de 25 a 50 mg de lipídeos, correspondente a 3 mL do extrato lipídico, foi saponificada, utilizando-se 2 mL de solução de NaOH 0,5 mol L<sup>-1</sup>, em metanol. A mistura foi aquecida em banho-maria fervente em tubo de ensaio com tampa por 5 min e depois esfriada em temperatura ambiente. Para o processo de esterificação, foi utilizada uma solução (mistura para esterificação), cuja preparação envolveu a adição de 16 g de cloreto de amônio, com acréscimo de 480 mL de metanol seco (anidro) e 16 mL de ácido sulfúrico, sob refluxo, em condensador à água com sistema tipo Soxhlet, durante 15 minutos, até total solubilização do cloreto de amônio.

Após o resfriamento da solução, adicionou-se 6 mL da mistura esterificada em tubo de ensaio contendo o extrato lipídico e a solução de NaOH 0,5 N em metanol. Nesta fase, a mistura foi aquecida em banho-maria fervente por 3 minutos e, após este período, foi adicionados à mistura, 5 mL de solução saturada de NaCl e agitou-se em agitador magnético por 10 s.

Para a extração dos ésteres metílicos formados adicionaram-se 2 mL de *n*-hexano por 3 vezes, transferindo a fase orgânica para um outro tubo de ensaio com o auxílio de uma pipeta Pasteur e agitador magnético. Depois adicionou-se a fase extraída pelo *n*-hexano mais 5 mL de solução saturada de NaCl, agitando no agitador magnético por 10 segundos. Após agitação, a fase orgânica superior foi transferida para um tubo do rota-evaporador para evaporação do solvente. A ressuspensão da amostra se deu com 1 mL de *n*-hexano.

A amostra foi transferida para frascos de vidro selados com tampa de teflon. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Os ésteres de ácidos graxos foram submetidos à cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. O material foi injetado manualmente em cromatógrafo a gás Shimadzu, modelo GC-17A, equipado com uma coluna capilar DB-5, série US 1352151h, com 30 m de comprimento, 0,25 µm de espessura e 0,25 mm de diâmetro interno. Foi utilizado Hélio (He) como gás de arraste a um fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup> e pressão de 50 kPa.

A temperatura inicial foi de 50 °C que permaneceu constante durante 2 min, em seguida houve aumento de temperatura até atingir 250 °C. O tempo total de análise foi de 60 min. As temperaturas do injetor e da interface foram mantidas, respectivamente, a 250 °C e 310 °C. O modo de controle de injeção foi o Split, com razão de 30:1. Foram obtidos os espectros de massas por impacto eletrônico (IE). Para a identificação dos ácidos graxos foram utilizados padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos puros, comparando-se o tempo de retenção dos ésteres metílicos das amostras e dos padrões. A quantificação dos ácidos graxos foi feita por normalização de área. Os diferentes ácidos graxos foram identificados por comparação aos tempos de retenção apresentados pelo padrão cromatográfico (Sigma – Aldrich). A quantificação dos ácidos graxos foi feita com a seguinte equação onde a área do pico observado multiplicado pela concentração do padrão interno e dividido pela área do padrão interno, expressando-se o resultado em mg mL<sup>-1</sup> de cada ácido graxo sobre o total de ácidos graxos.

## 4.9 Avaliação da atividade biológica do muco

Para os experimentos *in vitro* utilizou-se culturas de células fibroblásticas de córnea de coelho da linhagem SIRC 0224 (Banco de Células/UFRJ) em meio de MEM Eagle Sigma, suplementado com 10% de soro bovino fetal e 1% de *L*-glutamina.

### 4.9.1 Manutenção da linhagem de células de córnea de coelho em cultura

As garrafas de cultura foram mantidas a 37 °C em atmosfera umedecida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi renovado a cada dois dias, retirando-se o meio antigo e colocando-se meio de cultura novo. Apenas quando as culturas chegavam a semiconfluência, as células foram liberadas das garrafas pelo uso da solução de tripsina/EDTA livre de cálcio e magnésio, em pH 7,2 e replaqueadas em densidade ideal para sua manutenção em cultura (10<sup>5</sup> cels/garrafa de 25 cm<sup>3</sup>).

### 4.9.2 Obtenção da solução de muco

Inicialmente optou-se por trabalhar com o muco liofilizado do *A. fulica*, utilizado nas análises anteriores. Devido à dificuldade em solubilizá-lo e a variedade dos resultados obtidos a partir das soluções testadas, foi substituído por uma solução de muco recém colhido e diluído em solução salina tamponada (PBS), passando esta a ser chamada de solução estoque com 0,5 mg mL<sup>-1</sup>.

Para a obtenção desta solução estoque de muco, utilizou-se a técnica descrita por Iguchi, Aikava e Matsumoto (1982, p. 571) adaptada pela Dra Maria de Fátima Martins, da Universidade de São Paulo (USP), obtida através de comunicação pessoal. Esta técnica produziu uma solução densa, homogênea, sem precipitado, diferente das soluções anteriores preparadas com o muco liofilizado, as quais deixavam grande quantidade de precipitado. Para cada parte de muco bruto foram adicionadas duas partes de PBS, deixando-se em agitação em “shaker” orbital por 90 minutos. Em seguida a solução foi centrifugada a 4.000 rpm por 30 min para o aproveitamento do sobrenadante, que apresentou pH de 7,46.

Devido à impossibilidade de filtrar-se a solução estoque através de um filtro Millipore de 0,22 µm para a retenção de microrganismos, optou-se por sua exposição aos raios Ultra Violeta (UV) em câmara de fluxo laminar, para sua esterilização.

#### 4.9.3 Determinação da concentração de muco na solução estoque (1:3)

Num frasco de vidro previamente pesado, colocou-se 10 mL (**11,29 g**) da solução de muco em PBS (1:3) que foi, em seguida, congelada a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Após 24 horas este frasco com o muco congelado por levado ao liofilizador onde permaneceu por 48 h. Após a liofilização, o frasco com a amostra liofilizada foi novamente pesada, obtendo-se um novo valor para o muco. Desta forma foi possível determinar a concentração do muco na solução estoque.

#### 4.9.4 Ensaio de viabilidade celular

O ensaio de MTT inicialmente foi realizado para escolher a concentração ideal para a utilização da solução de muco em culturas celulares entre as soluções testadas, com diferentes concentrações.

A viabilidade celular avaliada pelo ensaio colorimétrico de MTT é um ensaio quantitativo para determinar a interrupção de uma função bioquímica crítica. Este ensaio é baseado no teste de atividade mitocondrial das células pela redução do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] por meio da quebra do sal de tetrazólio, de coloração amarelada, em cristais de formazan, de coloração azul escuro, pela enzima succinato desidrogenase presente nas mitocôndrias ativas. A quantidade de cristais formada é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Assim, quanto mais escura a coloração ao final da reação, maior é a viabilidade celular. A densidade óptica resultante do teste de MTT é determinada em espectrofotômetro, em 540 nm (COSTA et al., 1999).

As células, cultivadas em uma placa de 96 poços (densidade de  $10^4$  células/poço) foram incubadas por um período de 16 h para adesão celular. O ensaio foi realizado em todos os grupos, sendo utilizado, em cada poço, o volume de 200  $\mu\text{L}$ . A leitura óptica da placa foi efetuada 24 h após o início da cultura celular, conforme procedimento a seguir: após retirado o meio de cultura, cada poço da placa a ser lida recebeu 277  $\mu\text{L}$  de meio de cultura suplementado com 22,5  $\mu\text{L}$  de MTT, em concentração de 5  $\text{mg mL}^{-1}$  sendo, em seguida, incubado por 4 h a  $37^{\circ}\text{C}$ .

Posteriormente, o meio de cultura suplementado com MTT também foi retirado e os cristais de formazan foram solubilizados pela adição de 200  $\mu\text{L}$  de Dimetilsulfóxido de Sódio

(DMSO) e sua concentração quantificada espectroscopicamente por meio de um leitor de microplacas (espectrofotômetro), em comprimento de onda de 540 nm.

#### 4.9.5 Padronização do muco para os experimentos

Para a padronização do muco a ser utilizado nos experimentos, optou-se em trabalhar com amostras congeladas da solução de muco confeccionada a partir de uma única partida de muco coletado. (Figura 7)

Este procedimento eliminaria o problema de aferição do peso seco da amostra de muco para cada experimento que fosse necessário fazer. No entanto, questionou-se se o congelamento da solução poderia interferir nas propriedades biológicas do material. Para avaliar se haveria diferenças significativas entre a solução fresca e a congelada, realizaram-se ensaios *in vitro* pela metodologia de MTT em células SIRC, com uma solução de mesma partida de muco fresco e após congelamento.

**Figura 7 - Muco fresco (esquerda) e liofilizado (direita).**



Visando a obtenção de soluções menos concentradas para os testes *in vitro*, acrescentaram 25  $\mu\text{L}$  de solução de muco [ $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ] a 1.975  $\mu\text{L}$  de meio de cultura, obtendo-se uma solução de  $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ . A partir desta solução, para obtenção de soluções com menores concentrações, realizou-se uma diluição seriada obtendo-se quatro outras diluições testes: 0,125; 0,06; 0,03 e 0,015  $\text{mg mL}^{-1}$  (Figura 8) (Tabela 2).

**Figura 8 - Diluição seriada da solução de muco.**



Fonte: o autor (2013)

Os grupos de tratamento nesta tabela representam as diferentes concentrações de muco testadas em culturas de células de córnea como propósito de eleger-se a de melhor rendimento para orientar o preparo da solução oftálmica para o experimento *in vivo* em coelhos.

**Tabela 2 - Definição de condições experimentais para o ensaio MTT.**

GRUPOS	DESCRIÇÃO
I	Meio de cultura sem tratamento (controle)
II	Meio de cultura + 0,125 mg de solução de muco fresco
III	Meio de cultura + 0,06 mg de solução de muco fresco
IV	Meio de cultura + 0,03 mg de solução de muco fresco
V	Meio de cultura + 0,01 mg de solução de muco fresco

Fonte: o autor (2013)

#### 4.9.6 Determinação do peso seco da solução estoque

Uma amostra de 10 mL (11,29 g) da solução de muco estoque foi acondicionada em um frasco de vidro previamente pesado e congelada a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 h. Após esse tempo a solução congelada foi liofilizada por 48 h, e novamente pesada para obtenção do seu peso seco.

#### 4.10 Análise de proteína na solução de muco

Esta análise foi realizada para se determinar a quantidade de proteínas da solução de muco a ser utilizada no tratamento *in vivo* das úlceras, em córneas de coelhos. Inicialmente foi construída uma curva utilizando-se a albumina sérica bovina para o cálculo da proteína da amostra do experimento. Logo depois, uma alíquota da solução estoque ( $0,5\text{ mg } 25\text{ }\mu\text{L}^{-1}$ ) foi misturada a três partes de tampão PBS,  $\text{pH} = 7,4$  e em seguida,  $125\text{ }\mu\text{L}$  desta nova solução foi adicionada em um eppendorf juntamente com 1 mL de reagente de Biureto (1,5 g de sulfato de cobre penta-hidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )) que foi misturado a 6 g de tartarato duplo de sódio e potássio tetra-hidratado ( $\text{C}_4\text{HO}_6\text{KNa}_4 \cdot 4\text{ H}_2\text{O}$ ) em 300 mL de hidróxido de sódio (NaOH), armazenado em um frasco âmbar, e incubado à temperatura ambiente por 30 min. Em seguida, foram pipetadas alíquotas de  $200\text{ }\mu\text{L}$  em uma placa de 96 poços e lidas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 550 nm.

#### 4.11 Experimentação *in vivo*

Projeto aprovado pelo comitê de ética, processo nº 010190/2011-85.

##### 4.11.1 Animais

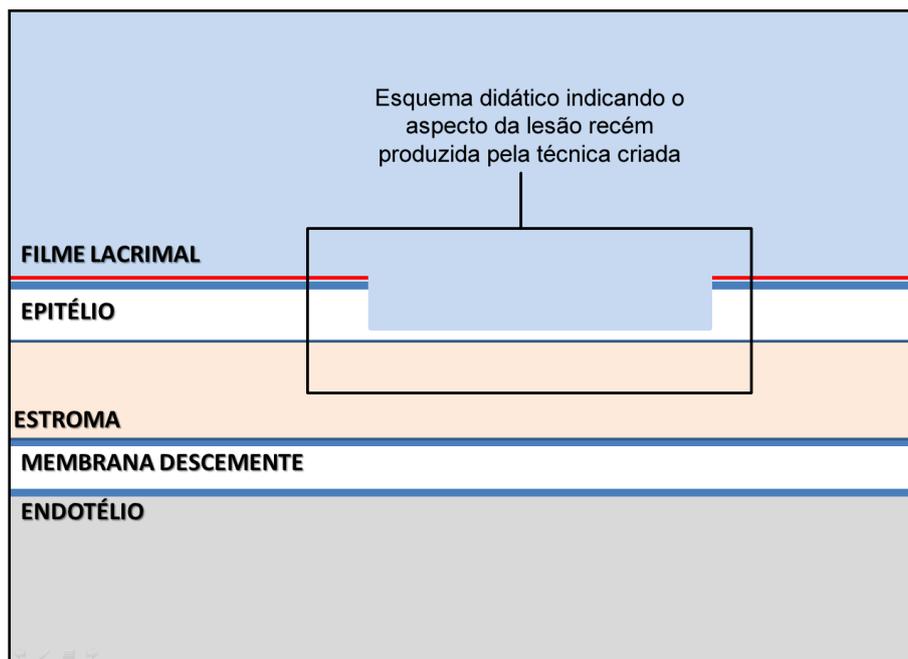
Foram utilizados 18 coelhos da raça Nova Zelândia, com idades entre 4 a 6 meses e massa corporais que variavam de 1.100 g a 1.740 g, adquiridos na Escola Técnica Federal em Satuba, Alagoas. Esta espécie animal foi escolhida em função do grande tamanho do globo ocular. Após a aquisição, os animais foram vermifugados e alimentados por duas semanas para a padronização dos animais, com ração industrializada para coelhos da marca PURINA. Ao final, todos os animais estavam aparentemente, em bom estado nutricional e de saúde.

#### 4.11.2 Produção das lesões nas córneas de coelhos

Para a produção das úlceras nas córneas dos coelhos, optou-se pela desepitelização mecânica que, segundo Martins (2009, p.71) é mais indicada para os estudos que envolvem apenas regeneração, pois promove uma menor inflamação do tecido quando comparada com a observada nas lesões produzidas por álcalis. Para a realização do protocolo anestésico, seguiu-se a orientação de Fachine-Jamacaru, Fachine Júnior e Moraes Filho (2005, p. 66) alterando apenas o pré-anestésico. Neste experimento, substituiu-se o cloridrato de xilazina pela acepromazina (0,05 mg/kg PV/IM). Após 15 minutos, os animais foram anestesiados com Cloridrato de Cetamina (12 mg/IM/kgPV). Após 10 minutos, o protocolo foi complementado com a instilação tópica, no saco conjuntival, de duas gotas de anestésico local (cloridrato de proximetacaína 0,5%).

As lesões de córneas foram produzidas nos dois olhos, em todos os coelhos, para aumentar o N do experimento. Um bisturi descartável de lamina circular (punch) fabricado em diâmetros que variam de 1 mm a 1 cm e rotineiramente utilizados para biópsia de pele foi adotado para a circunscrever e padronizar as áreas das lesões iniciais em todas as córneas de coelhos. Neste experimento elegemos o punch de número 5. (Figura 9)

**Figura 9 Perfil didático da lesão cirúrgica.**



Inicialmente, o punch foi posicionado no centro da córnea, levemente pressionado e rotacionado, entre os dedos, no sentido horário, com muito cuidado, para não escorregar sobre a superfície corneal produzindo uma lesão irregular. Para produzir as lesões, foi utilizado um *punch* novo a cada três animais. Logo depois, com o auxílio de uma lâmina de bisturi nº 22, escarificou-se superficialmente a área circunscrita anteriormente pelo punch, na tentativa de se retirar apenas o epitélio corneal. O uso do punch permitiu a padronização da área das lesões em todos os animais.

#### 4.11.3 Grupos de tratamento

Os coelhos foram divididos aleatoriamente por sorteio, em três grupos de seis animais: o grupo CONTROLE, o grupo EPITEGEL e o grupo MUCO, sem critérios de seleção por sexo, peso ou idade.

No grupo MUCO imediatamente após o procedimento cirúrgico, a solução oftálmica do muco cutâneo esterilizado na concentração eleita no item 4.8.5 (0,125 mg 25  $\mu\text{L}^{-1}$ ) começou a ser instilada, 1 gota/olho, repetindo-se a aplicação a cada duas horas, das 8:00 às 18:00 horas, por 4 dias.

No grupo EPITEGEL utilizou-se um colírio epitelizante denominado Epitegel 10g (Gel Oftalmológico Dexpantenol 50 mg/g), um dos fármacos disponíveis no mercado mais indicados para esta finalidade, repetindo-se o mesmo protocolo utilizado no grupo anterior.

No grupo CONTROLE nenhuma medicação foi utilizada.

Imediatamente após a cirurgia, todos os animais receberam uma gota de um colírio a base de fluoresceína, para corar as lesões recém-produzidas. Em seguida foram feitas macrofotografias (Figura 10) de todos os animais utilizando uma câmera Canon Digital T3i, uma objetiva Canon macro de 100 mm, um flash circular e um tripé à 40 cm do objeto. As imagens não sofreram nenhum tipo de pós-edição.

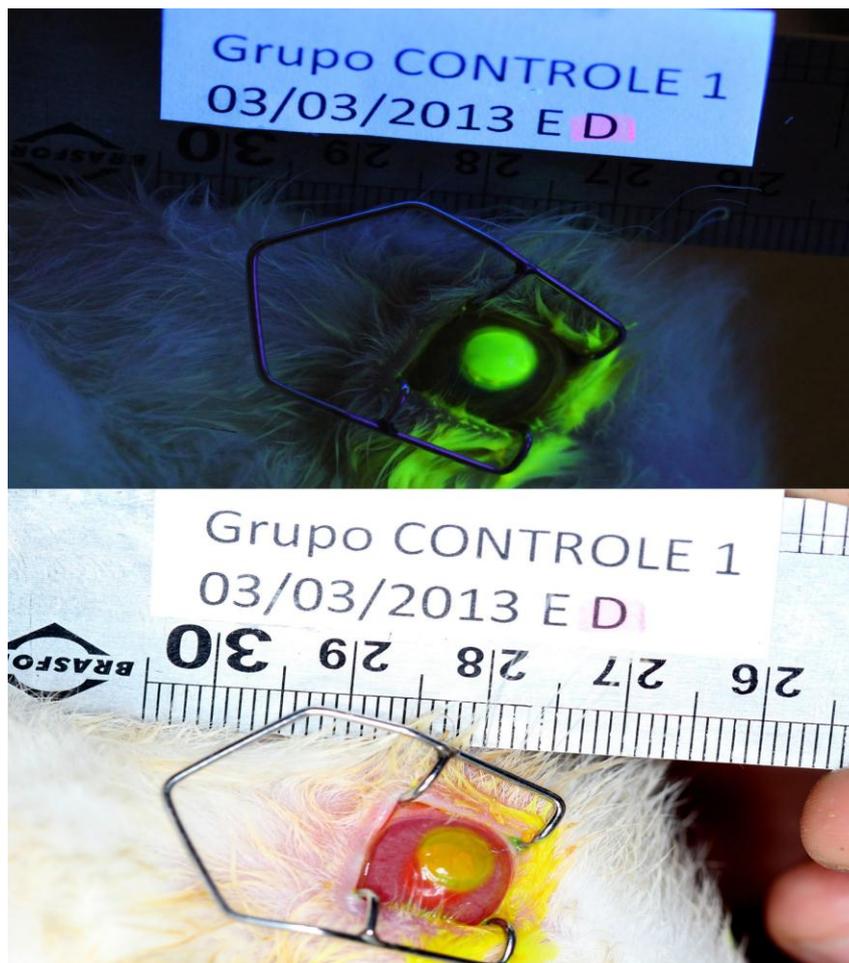
As fotografias foram repetidas após 24, 48 e 72 horas (Figura 11) e as áreas coradas com a fluoresceína foram medidas com o auxílio do programa Adobe Photoshop CS5 (Figura h) e os resultados submetidos à análise estatística. Depois da última sessão fotográfica (72 horas), todos os coelhos foram anestesiados e então eutanasiados com cloreto de potássio endovenoso (E.V.).

O uso do Photoshop CS5 seguiu o seguinte fluxograma: abre o programa => clica em análises => define a escala de medição => personaliza => mede a referência (régua) => marca cm => ok => seleciona a ferramenta de medição => delimito a área => ok => registra a medição (Figura 12).

#### 4.12 Análise estatística

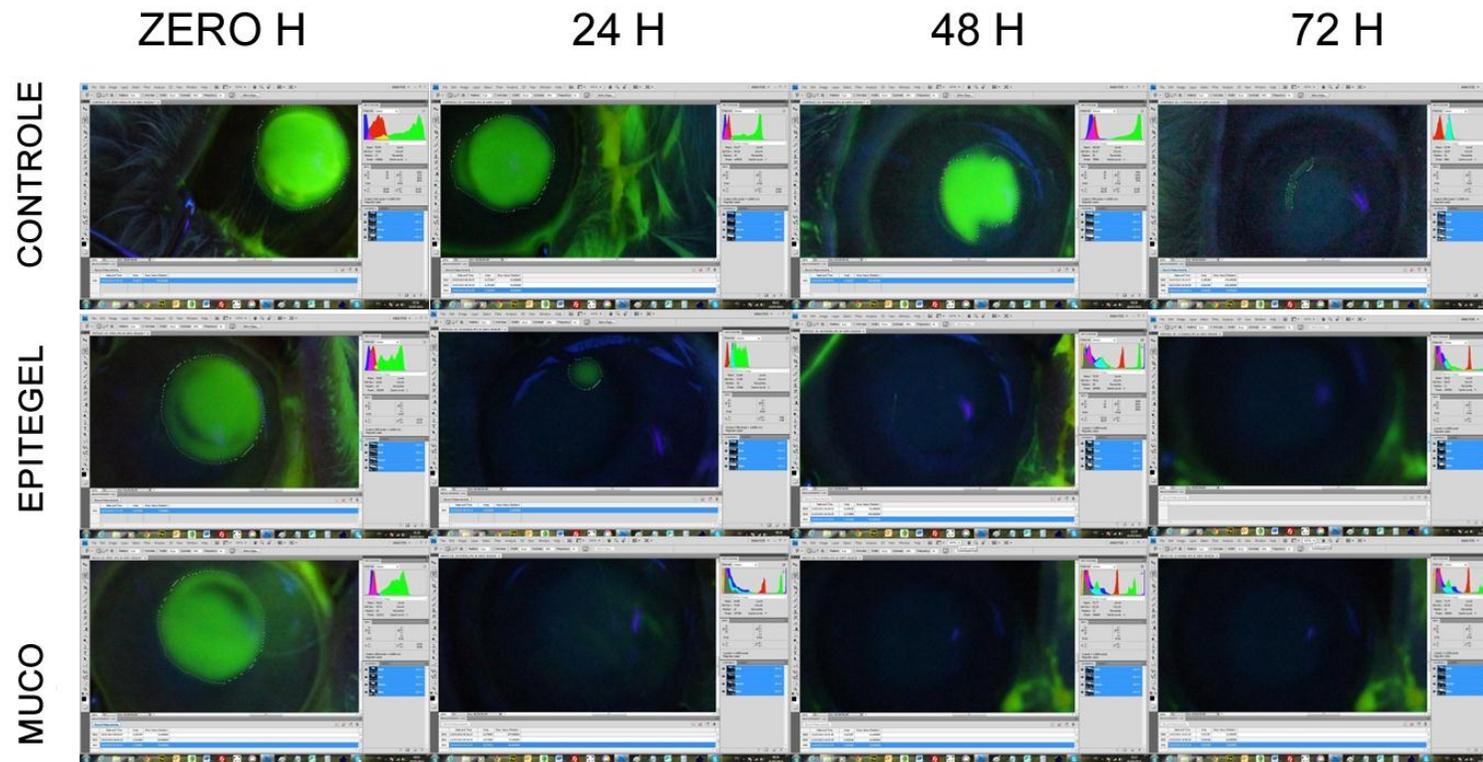
Analisaram-se os dados obtidos utilizando o teste ANOVA para determinar sua significância estatística entre os grupos seguidos dos pós-testes Dunnett's e Turkey, *in vitro* e *in vivo* respectivamente. Os valores estão apresentados pela Média (M) ± Erro Padrão Médio (EPM) e considerados significativos, quando  $p \leq 0,05$ . A análise estatística foi realizada utilizando o software Graph Prism ©5.0 (San Diego, CA, USA).

**Figura 10 – Macrofotografia da lesão com flash e luz ultravioleta.**



Fonte: o autor (2013)

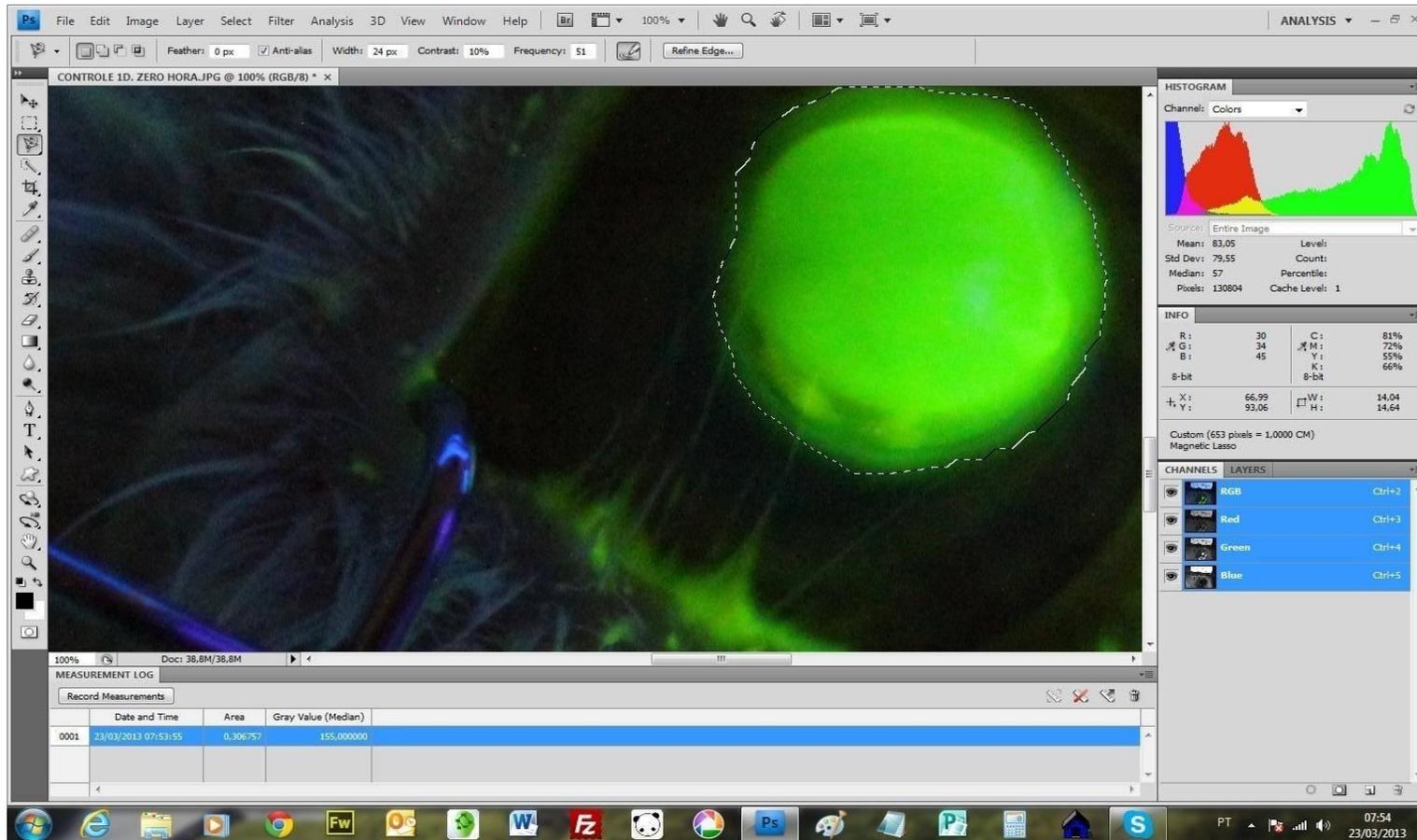
Figura 11 - Fotos ilustrativas do acompanhamento da evolução da cicatrização das lesões de córneas (0, 24, 48 E 72 h).



3 GRUPOS / 48 FOTOS POR GRUPO / 144 FOTOS NO TOTAL

Fonte: o autor (2013)

Figura 12 - Cálculo da área da lesão através do software Adobe Photoshop CS5.



## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 A manutenção dos caracóis**

O caracol africano invasor é encontrado asselvajado hoje em todos os estados brasileiros, no entanto, quanto ao aspecto zootécnico para a sua manutenção em cativeiro com finalidade de pesquisa pouco se evoluiu nas últimas décadas. Um dos objetivos desta dissertação foi desenvolver um novo sistema de manejo que apresentasse vantagens significativas sobre as metodologias atualmente utilizadas para a criação de caracóis arborícolas, principalmente, no que concerne ao aspecto higienização, tempo de tratamento e estresse dos animais em cativeiro. Esta nova metodologia poderá ser utilizada, inclusive, para as criações comerciais intensivas em qualquer país do mundo, desde que observada a legislação vigente local sobre espécies invasoras.

Os caracóis capturados inicialmente no Campus da UFAL foram acondicionados em um aquário seco com água e alimentos, tampado por uma tela de arame e o seus hábitos foram acompanhados a cada 2 horas, durante um período de 24 horas. Durante este acompanhamento não se registrou atividade dos animais entre as 9 e as 17 h, momento em que permaneceram em repouso no teto do aquário, no entanto, entre às 18 e às 8 h, foi registrada intensa atividade (Figura 13). A simples análise dessas informações coletadas durante este período possibilitou, em combinação com o uso de duas bacias plásticas móveis, dispostas horizontalmente, uma contra a outra, a elaboração de um revolucionário sistema de manejo que permitiu não só maximizar o aproveitamento da mão-de-obra mas também diminuir, consideravelmente, o tempo gasto com uma higienização mais eficiente do ambiente e a alimentação dos animais.

Este novo manejo consiste, basicamente, do uso de duas bacias termoplásticas em polipropileno, de formato circular com 49 cm de diâmetro e 22 cm de altura, emborcadas uma sobre a outra e separadas, parcialmente, por uma chapa de aço de 2 mm tipo moeda, aqui denominada tela de alimentação, utilizada para a sustentação de um comedouros para ração e um bebedouro plásticos, os legumes e as verduras. O uso das duas caixas e da tela já permitiu, inicialmente, separar os animais da maioria de seus dejetos, estes depositados por gravidade, na caixa inferior.

Para a higienização das caixas e a alimentação dos caracóis, deve-se aproveitar o horário de descanso dos caracóis, enquanto ainda permanecem no teto da bacia superior. Em torno das 17 h, a bacia inferior, repleta de urina e fezes depositadas durante a noite pela gravidade é então retirada para limpeza, junto com a tela de sustentação, o comedouro e o bebedouro. A bacia superior, contendo a maioria dos animais em repouso é então invertida, sendo reposicionada no lugar da bacia removida. Sobre ela é colocada outra tela de alimentação, outro comedouro com ração, outro bebedouro, além de legumes e vegetais frescos. Sobre a bacia com os animais e a tela de alimentação, uma nova bacia higienizada é colocada, funcionando como uma tampa. Todos os utensílios utilizados são limpos com escova, em água corrente.

O ideal é dispor-se, para possibilitar um tratamento mais rápido dos caracóis, de uma bacia, uma tela, um comedouro e um bebedouro extras e limpos, portanto, recomenda-se que para cada lote de animais sejam utilizadas, em sistema de rodízio, três caixas plásticas de formato circular, sem ângulos acentuados e idênticas além de duas telas de alimentação, dois comedouros e dois bebedouros, desta forma não se perde tempo desnecessário durante o trato diário pois o material contaminado e recolhido poderá ser imediatamente substituído por outro submetido a higienização prévia e os principais agentes etiológicos presentes nas fezes (vermes e protozoários) e que necessitam de um tempo no ambiente para se tornarem infectantes são completamente eliminados através da limpeza diária do material recolhido, sem o uso de desinfetantes ou medicamentos, tanto que, durante os exames parasitológicos realizados, periodicamente, no plantel dos animais no laboratório da universidade, não evidenciou-se a presença de nenhum nematódeo ou oocistos de protozoários, comprovando os efeitos benéficos do novo manejo.

Nesta dissertação optou-se pelo uso de caixas retangulares que, embora menos práticas para limpeza, eram transparentes, o que permitiu aos caracóis a correta distinção entre dia-e-noite e conseqüentemente, a manutenção de seus hábitos fisiológicos normais (horário de descanso, de atividade, de alimentação, etc).

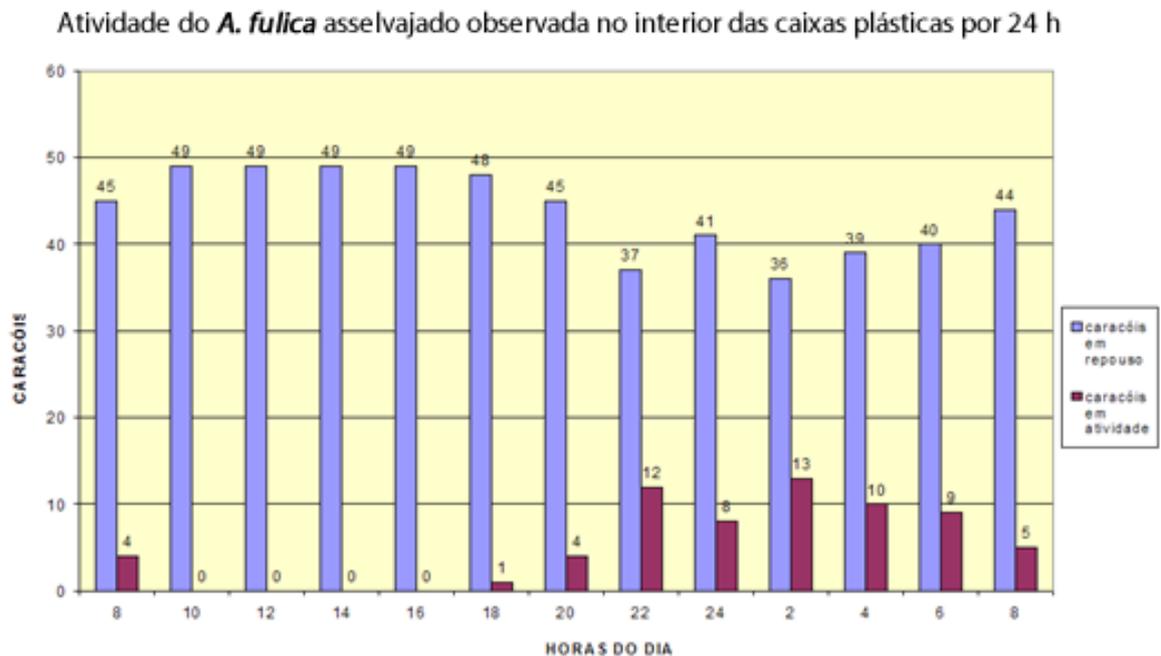
Para entendermos melhor a grande vantagem da higienização quando comparado ao sistema extensivo de criação sobre a terra, por exemplo, segundo Cabaret et al. (1988), nos parques de criação extensiva numa pesquisa realizada em 35 fazendas francesas, entre 1984 e 1985, demonstrou-se que os nematóides foram os parasitas mais frequentemente encontrados nos parques externos de criação realizados sobre o solo. Em caracóis jovens, o *Alloionema*

*appendiculatum* (Schneider 1859) foi a espécie com maior prevalência, enquanto os *Angiostoma aspersae* (Morand, 1986) e *Nemhelix bakeri* (Morand & Petter) foram encontrados, principalmente, em animais em idade reprodutiva.

Além disso, as bacias plásticas são mais baratas que as de madeira, com maior durabilidade e recicláveis, portanto, ecologicamente corretas, permitindo na sua higienização o uso de escovas, sabão e até desinfetantes, quando necessário, sem deixar nenhum resíduo devido a sua impermeabilidade, evitando a contaminação dos animais quando reutilizadas.

No entanto, o que diferencia este novo método de criação, não é apenas o uso correto das caixas plásticas e a sua perfeita higienização, mas também, conforme já se demonstrou, a correta escolha do horário para tratamento e a ausência do manuseio direto dos animais o que contribui, sensivelmente, para minimizar o estresse, um dos principais motivos do aumento da mortalidade entre os caracóis em criações comerciais.

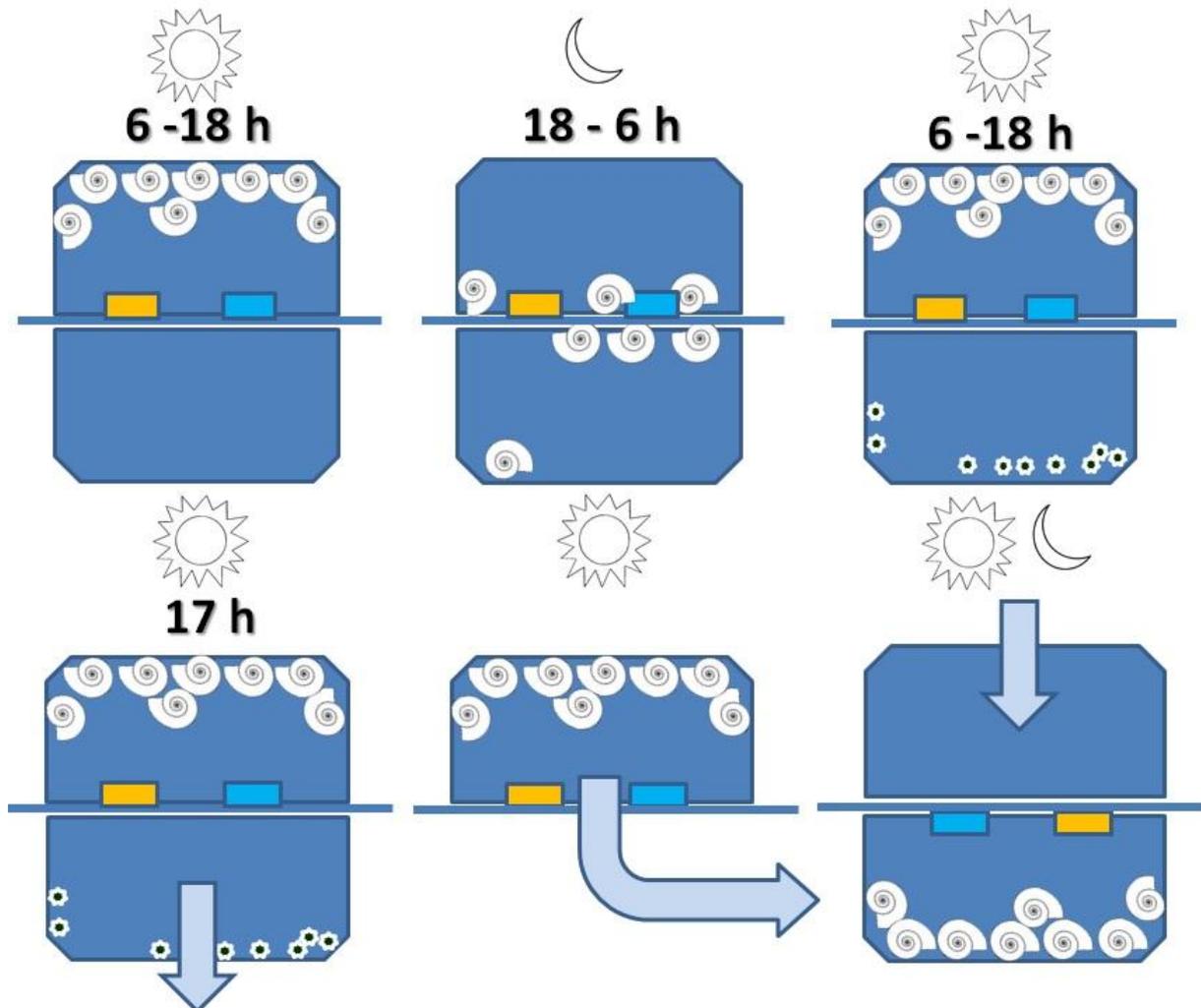
**Figura 13 – Atividade e repouso do Caracol Africano ao longo de 24 h.**



Fonte: o autor (2013)

Na figura 14, a fileira superior de caixas demonstra a atividade dos caracóis ao longo das 24 horas. A fileira inferior esclarece como deve ser o manejo das caixas no horário de tratamento.

**Figura 14 - Sistema de manejo em caixas plásticas**



A caixa suja, a tela de alimentação, o comedouro e o bebedouro são retirados para higienização.

A caixa superior onde os caracóis estão repousando é reposicionada no lugar da caixa retirada.

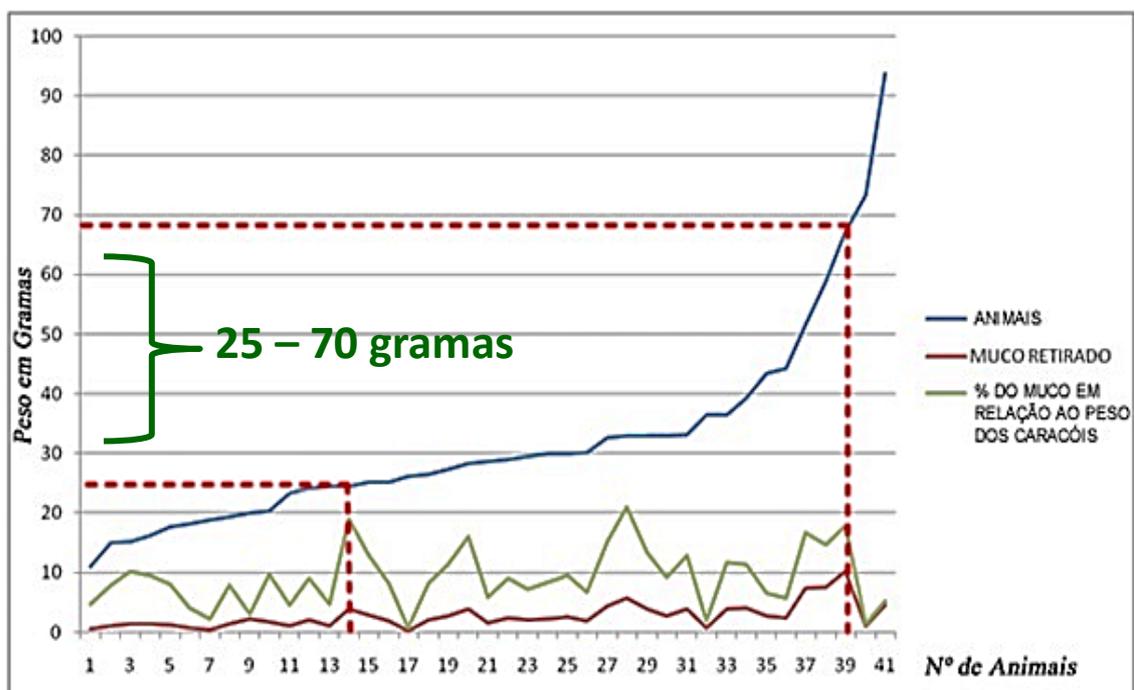
Finalmente, uma caixa, uma tela, um comedouro e um bebedouro limpos previamente são utilizados para substituição imediata dos que foram retirados.

## 5.2 Coleta do muco cutâneo de caracóis africanos

Foram utilizados para a coleta de muco, inicialmente, caracóis com pesos que variavam de 22 a 78 g. Após a pesagem de todos os animais, antes e depois da “ordenha”, nomenclatura utilizada por diversos autores para definir a extração manual de muco cutâneo dos caracóis, constatou-se que os animais que produziram mais muco estavam na faixa de peso entre os 25 e 70 g. Esta informação orientou a primeira seleção do plantel da pesquisa. Os animais acima ou abaixo desta faixa de peso foram abatidos. (Figura 15)

O muco coletado durante as ordenhas, com valor de pH médio de 8,06, foi rapidamente congelado por 48 h, antes de ser submetido à liofilização. O índice de umidade no material liofilizado é extremamente reduzido, o que resulta na inibição da ação dos microorganismos e das enzimas que normalmente, degradam a amostra. A perda de umidade nesse processo foi de 98,7%, ou seja, cada 100 mL de muco fresco congelado obteve-se 1,3 g de muco liofilizado.

**Figura 15 - Faixa de peso ideal para a produção de muco cutâneo.**



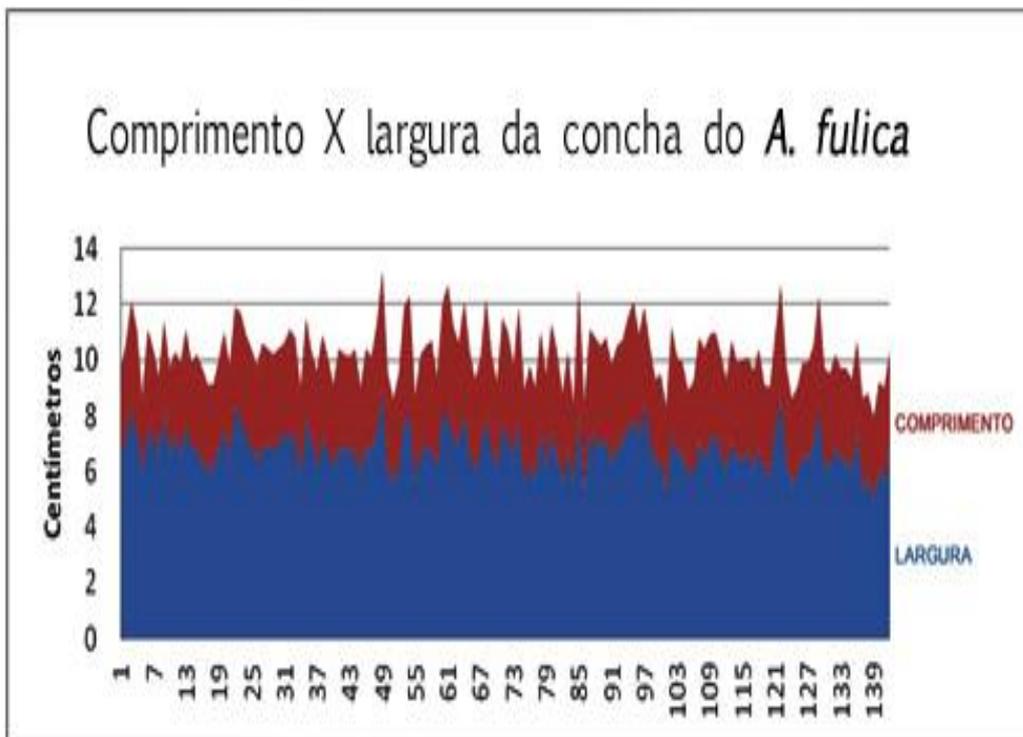
Fonte: o autor (2013)

Na primeira ordenha, realizada antes da seleção, obteve-se uma produção média de 2,67 g de muco por caracol, correspondente a 7,5% do peso médio dos animais e a produção máxima foi de 10,2 g obtidas de um caracol com 67,2 g. Já na segunda ordenha, realizada após a primeira seleção, obteve-se um incremento de 31% na produção de muco. Em média extraiu-se 9,85% do peso médio dos animais em muco.

A quantidade de muco produzida a partir da seleção pela faixa de peso ideal aumentou, como verificado, a produção de muco, no entanto, a produção não está ligada, exclusivamente ao peso do caracol, sugerindo que o seu estado de hidratação também é determinante para uma boa extração de material. Alguns animais com mais de 70 g de peso, por exemplo, não produziram quantidade significativa de muco. Os animais desidratados apresentam a superfície do corpo menos brilhante.

Durante o processo de ordenha aproveitou-se para fazer a biometria das conchas dos caracóis, demonstrando uma estreita relação entre o comprimento e a largura, respectivamente, de 2:1 (Figura 16).

**Figura 16 - Biometria da concha**



Fonte: o autor (2013)

### 5.3 Citotoxicidade do muco do caracol africano

Em relação à citotoxicidade do muco do caracol africano *in vitro*, existem discrepâncias entre os dados encontrados na literatura e a comparação, entre esses poucos resultados, não é possível, já que existem diferenças no estado de apresentação das amostras, como também nas linhagens de células adotadas nos os exames. Por exemplo, Tempone (2007, p.73) cita dados obtidos a partir de secreção de muco bruto de caracóis africanos (*Achatina fulica*) em culturas de células de linhagem epiteliais de macacos (LLC-MK2) tratadas, onde demonstrou citotoxicidade moderada na concentração de  $83,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Toledo-Piza (2012) pesquisando a citotoxicidade do muco de outro gastrópodo terrestre pulmonado, a lesma *Phyllocaulis boraceiensis*, verificou que uma solução de muco com uma concentração de  $12 \text{ mg mL}^{-1}$  em cultura de células de fibroblastos humanos normais e em células endoteliais, estimulava a proliferação celular, concentração essa bem maior que a usada no presente estudo e que a mortalidade celular só foi relatada em concentrações a partir de  $180 \text{ mg mL}^{-1}$ .

Como um dos objetivos desta pesquisa era obter e avaliar os efeitos cicatrizantes de uma solução oftálmica à base de muco do caracol africano para ser usada em lesões de córneas de coelhos, tão logo se produziu a primeira amostra de muco liofilizado, uma alíquota foi encaminhada para o laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará - UFCE, onde foram realizados os primeiros ensaios para aferir a possibilidade do seu uso *in vivo*. No Ceará, a citotoxicidade de diferentes soluções elaboradas a partir do muco liofilizado produzido na UFAL foram testadas em três linhagens de células tumorais: MDA-MB435 (melanoma - humano), HCT-8 (côlon - humano) e SF-295 (glioblastoma - humano), não tendo sido observada citotoxicidade em nenhuma das amostras analisadas, ficando demonstrada a sua inocuidade até a concentração de  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Os resultados citados acima não podem ser comparados entre si, pois além da metodologia e da forma de apresentação das amostras de mucos examinados, Sirio (2005) ainda comenta que os alimentos consumidos pelos caracóis podem interferir na composição do muco do animal. Faz-se necessário, portanto, novos experimentos na tentativa de realizar uma padronização não só da amostra, mas das linhagens de células envolvidas no experimento, além da metodologia da criação que envolve, inclusive, a alimentação ofertada aos caracóis e a metodologia das análises.

#### 5.4 Capacidade sequestradora do radical livre - DPPH

De acordo com Reis et al. (2009) o consumo de antioxidantes naturais presentes em algumas frutas, chás, legumes e grãos, pode reduzir a incidência de doenças crônicas como: câncer, doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral além de outras patologias ligadas ao envelhecimento. Esta propriedade pode ser aferida por diferentes métodos analíticos, métodos colorimétricos, biológicos e eletroquímicos, entre outros.

De acordo com Cogo et al. (2009), diversos organismos vivos, especialmente os de ambientes aquáticos vêm sendo utilizados como biomarcadores para se verificar a presença de compostos xenobióticos (poluentes gerados pela atividade antrópica) no meio ambiente. Isto é feito através da avaliação da atividade enzimática envolvida na destoxificação de compostos formados nos seres vivos, resultantes do estresse oxidativo e as principais enzimas aferidas são: catalase, superóxido dismutase, glutathion redutase e peroxidase.

Moncheva et al. (2004) avaliaram a capacidade de destoxificação de compostos antioxidantes de extratos de tecidos do marisco *Mytilus galloprovincialis* no Mar Negro. Franco et al. (2006) avaliou a resposta enzimática do *Perna perna*, um marisco largamente cultivado no estado de Santa Catarina, ao zinco.

Neste experimento avaliou-se a capacidade antioxidante do muco do caracol africano frente ao radical DPPH. O método do DPPH, utilizado para analisar a capacidade redutora das três amostras de muco: muco *in natura*, muco liofilizado e o muco submetido à extração por Soxhlet, não se verificou qualquer capacidade antioxidante (Tabela 3) nessas amostras (Figura 16).

No entanto, sabe-se que o DPPH é apenas um entre várias metodologias que se prestam para esta análise e antes de descartar esta possibilidade em definitivo, seria recomendado que a solução estoque do muco (0,5 mg mL<sup>-1</sup>) e a farinha de carne do *A. fulica* fossem submetidos a novas análises empregando-se outras metodologias, perspectivas para novos trabalhos. Uma justificativa são os experimentos de Moncheva (2004) e de Franco (2006) realizados, respectivamente, com extratos de tecidos do *Mytilus galloprovincialis* no Mar Negro e *Perna perna* em Santa Catarina e não com o muco dos moluscos.

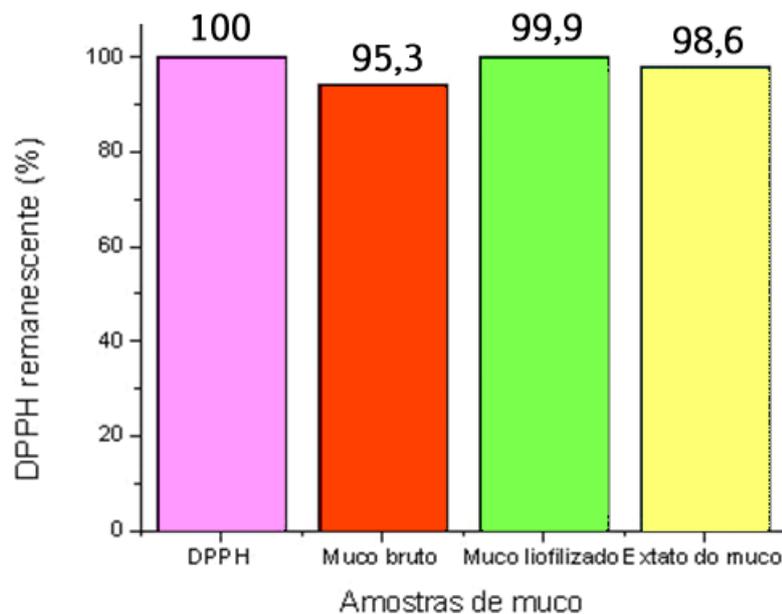
Tabela 3 – Valores do experimento da capacidade sequestradora do radical livres.

Amostras de muco submetidas a DPPH			
Tempo	Muco Bruto	Muco Liofilizado	Muco / Soxhlet
0	1,0510	1,0822	0,9865
5'	1,0355	1,0820	0,9844
10'	1,0088	1,0821	0,9801
15'	0,9956	1,0817	0,9737
20'	0,9900	1,0815	0,9700
25'	0,9842	1,0809	0,9640
30'	0,9878	1,0807	0,9661
40'	0,9852	1,0807	0,9661
50'	0,9810	1,0806	0,9661

Fonte: o autor (2013)

Na figura 17, temos a representação em gráfico dos percentuais médios obtidos através da comparação dos resultados com o grupo controle, representado aqui como a coluna do DPPH.

Figura 17 - Resultados percentuais remanescentes obtidos pelo DPPH.



Fonte: o autor (2013)

## 5.5 Composição mineral da carne, muco e conchas

Realizou-se o balanço de massas do processo da preparação da farinha de carne, desde a coleta dos animais até a obtenção do liofilizado (Tabela 4). Na metodologia utilizada para o preparo da farinha de carne do caracol africano, o muco não foi extraído antes do abate. As perdas desta substância foram ocorrendo, naturalmente, ao longo do processamento. Os resultados obtidos (*Rendimento 1*) foram comparados com os que Cabezas García (2011, p. 3) publicou (*Rendimento 2*) para a espécie de caracol (*Helix aspersa*).

**Tabela 4 - Percentual das perdas da massa dos caracóis *Helix Aspersa* e *Achatina fulica* ao longo do preparo da farinha de caracóis**

Percentual do peso nas diferentes fases do preparo da farinha de carne liofilizada	Rendimento 1 (%) <i>Achatina fulica</i>	Rendimento 2 (%) <i>Helix aspersa</i>
Caracol vivo em pé	100	100
Após jejum	96,78	94
Caracol vivo sem baba	*Não extraímos o muco	73,1
Caracol morto após tratamento Térmico	73,81	49,4
Carne uma vez extraída da concha	52,55	41,5
Farinha de carne / Carne Liofilizada	12,11	10,7

Fonte: o autor (2013)

A avaliação da composição mineral do muco do caracol africano foi realizada para se aferir as quantidades dos principais macro e micronutrientes da sua composição. Ao todo foram determinados 28 nutrientes, 5 macronutrientes, como cálcio (Ca), fósforo (P), sódio (Na), potássio (K) e magnésio (Mg), listados na tabela 5 e 23 micronutrientes como alumínio (Al), arsênio (As), bário (Ba), cádmio (Cd), cromo (Cr), cobre (Cu), ferro (Fe), lítio (Li), manganês (Mn), molibdênio (Mo), níquel (Ni), silício (Si), estrôncio (Sr), vanádio (V) e zinco (Zn), listados na tabela 6. Micronutrientes como o Co (cobalto), Sb (antimônio) e o Se (selênio) apesar de pesquisados, apresentaram valores abaixo do limite de detecção (LD) do aparelho e, portanto não foram inseridos na tabela 6. Todos os nutrientes pesquisados estão disponibilizados na tabela 7.

Tabela 5 – Macronutrientes encontrados na concha, muco e carne do *A. fulica*

<b>Macronutrientes (%) <i>A. fulica</i> (Alagoas)</b>					
<b>Partes do Caracol</b>	<b>Ca</b>	<b>P</b>	<b>Na</b>	<b>K</b>	<b>Mg</b>
<b>Concha</b>	45,3 ± 0,12	0,05 ± 0,003	0,06 ± 0,003	0,07 ± 0,003	2,83 ± 0,01
<b>Muco</b>	5,14 ± 0,05	0,20 ± 0,03	0,44 ± 0,02	1,35 ± 0,036	5,50 ± 0,02
<b>Carne</b>	21,91 ± 0,09	0,55 ± 0,01	0,54 ± 0,0004	7,98 ± 0,01	5,47 ± 0,04

Fonte: o autor (2013)

Alguns dos valores encontrados na pesquisa dos macro e microminerais estão acima dos encontrados por outros pesquisadores. Acredita-se que isso seja reflexo, principalmente, da alimentação utilizada para a manutenção dos animais em laboratório (ração industrializada de codornas, farinha de ostra, verduras e legumes cultivados).

Uma explicação que reforça esta hipótese é apresentada por Galo (1984) e Gomot (1997 apud Sirio, 2005) que sugerem que o alimento consumido pelos caracóis acaba retido em seus corpos, podendo influenciar, inclusive, no sabor de sua carne. O autor cita ainda que os caracóis de outra espécie (*Helix aspersa aspersa*) retiveram partículas de metais pesados após a ingestão de diferentes amostras de solos contaminados, se comportando como um bioacumulador, demonstrando a sua utilidade como indicadores biológicos. Ademolu et al. (2004, p.417) também registraram em seu trabalho, diferenças significativas na composição de cálcio, magnésio, sódio, potássio, zinco, ferro e cloro na hemolinfa de caracóis (*A. marginata*) alimentados com rações de fontes proteicas distintas que, além de afetar o seu crescimento afetou também o seu valor nutricional.

Pearson e Gillet (1999 apud UBOH; EBONG; MBI, 2010, p. 15) citam que as concentrações de ferro, magnésio, cálcio, fósforo, potássio e sódio foram consideradas elevadas, enquanto o cobre, cobalto e chumbo não foram detectados, levando os autores a recomendar os caracóis como alimento para suplementar o crescimento e desenvolvimento do ser humano, apoiando publicações anteriores de Ademolu et al. (2004) e Fagbuaro et al. (2006). (Tabela 8) (Tabela 9)

Tabela 6 – Micronutrientes encontrados no Caracol Africano.

Micronutrientes ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) Conchas de Moluscos													Ref.			
	Al	As	Ba	Cd	Cr	Cu	Fe	Li	Mn	Mo	Ni	Si	Sr	V	Zn	
<i>Concha</i>	26,32 $\pm$ 2,4	<LD	23,04 $\pm$ 1,8	<LD	36,80 $\pm$ 2,7	13,03 $\pm$ 0,6	10,87 $\pm$ 0,63	<LD	25,79 $\pm$ 0,4	<LD	<LD	21,04 $\pm$ 0,44	765,76 $\pm$ 35,5	0,04 $\pm$ 0,001	63,68 $\pm$ 1,2	
<i>Muco</i>	25,96 $\pm$ 2,4	<LD	489,36 $\pm$ 34,1	<LD	60,42 $\pm$ 2,6	10545,61 $\pm$ 640,1	79,7 $\pm$ 3,5	15,7 $\pm$ 0,12	32,50 $\pm$ 0,4	57,56 $\pm$ 5,5	4,56 $\pm$ 0,2	256,6 $\pm$ 27,83	499,99 $\pm$ 19,95	0,20 $\pm$ 0,04	76,98 $\pm$ 6,02	Aquino, 2013
<i>Carne</i>	6,18 $\pm$ 1,6	8,31 $\pm$ 0,98	109,80 $\pm$ 1,5	8,26 $\pm$ 0,15	147,7 $\pm$ 16,6	2000,13 $\pm$ 76,1	166 $\pm$ 3,34	<LD	125,61 $\pm$ 1,5	122,95 $\pm$ 0,64	38,92 $\pm$ 1,6	26,80 $\pm$ 0,53	155,98 $\pm$ 12,66	0,20 $\pm$ 0,04	98,10 $\pm$ 2,42	

Fonte: o autor (2013)

**Tabela 7 - Composição mineral do *Achatina fulica***

Amostras		Concentração de metais ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )				
<b>Metais</b>	<b>Al</b> Alumínio	<b>As</b> Arsênio	<b>Ba</b> Bário	<b>Ca</b> Cálcio	<b>Cd</b> Cádmio	<b>Co</b> Cobalto
Caracóis	6,18 ± 1,6	8,31 ± 0,98	109,80 ± 1,5	219100 ± 973	8,26 ± 0,15	< LD
Muco	25,96 ± 2,4	< LD	489,39 ± 34,1	51400 ± 542	< LD	< LD
Pó da concha	26,32 ± 2,3	< LD	23,04 ± 1,8	452900 ± 1223	< LD	< LD
		Concentração de metais ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )				
<b>Metais</b>	<b>Cu</b> Cobre	<b>Fe</b> Ferro	<b>Li</b> Lítio	<b>Mg</b> Magnésio	<b>Mn</b> Manganês	<b>Mo</b> Molibdênio
Caracóis	2000,13 ± 76,1	166 ± 3,34	< LD	54700 ± 423	125,61 ± 1,5	122,95 ± 0,64
Muco	10547,61 ± 640,1	79,7 ± 3,5	15,7 ± 0,12	55000 ± 218	32,50 ± 0,4	57,56 ± 5,5
Pó da concha	13,03 ± 0,6	10,87 ± 0,63	< LD	28300 ± 176	25,79 ± 0,4	< LD
		Concentração de metais ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )				
<b>Metais</b>	<b>Na</b> Sódio	<b>Ni</b> Níquel	<b>P</b> Fósforo	<b>Sb</b> Antimônio	<b>Se</b> Selênio	<b>Sr</b> Estrôncio
Caracóis	5442,79 ± 4,8	38,92 ± 1,6	5596 ± 127	< LD	< LD	155,98 ± 12,66
Muco	4441,61 ± 244	4,56 ± 0,2	1987 ± 321	< LD	< LD	499,99 ± 19,95
Pó da concha	667,4 ± 30,2	< LD	452 ± 35	< LD	< LD	765,76 ± 34,5
		Concentração de metais ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )				
<b>Metais</b>	<b>V</b> Vanádio	<b>Zn</b> Zinco	<b>Cr</b> Cromo	<b>K</b> Potássio	<b>Si</b> Silício	
Caracóis	0,20 ± 0,04	98,10 ± 2,42	147,7 ± 14,6	7988,2 ± 146,8	26,80 ± 0,53	
Muco	0,20 ± 0,02	76,79 ± 6,02	60,42 ± 2,6	13483 ± 362,7	256,6 ± 27,83	
Pó da concha	0,04 ± 0,001	63,68 ± 1,2	36,8 ± 2,7	743,06 ± 30,48	21,04 ± 0,44	

Nota: ND – Não determinado, LD – Limite de detecção

Fonte: o autor (2013)

Tabela 8 - Tabela comparativa de macronutrientes das conchas de alguns moluscos

	Macronutrientes / Conchas ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )					Referencias
	Ca	P	Na	K	Mg	
<i>A. fulica</i>	<b>45,3 ± 0,12</b>	<b>0,05 ± 0,003</b>	<b>0,06 ± 0,003</b>	<b>0,07 ± 0,003</b>	<b>2,83 ± 0,01</b>	<b>Nossa Pesquisa</b>
<i>A. fulica</i>	36,86 (36,8-36,9)	0,05 (0,05-0,05)	0,045 (0,04-0,05)	0,03 (0,03-0,03)	0,005 (0,004-0,006)	Aboua, 1990
Ostras	34,3	ND	0,008	0,0004	0,27	Nunes, 2006
Mexilhões	33,0	ND	0,006	0,0001	0,046	

Fonte: o autor (2013)

Tabela 9 - Tabela comparativa de macrominerais da carne de algumas espécies de caracóis

	Macronutrientes / Carne ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )					Referencias
	Ca	P	Na	K	Mg	
<i>A. fulica</i>	<b>21,91 ± 0,09</b>	<b>0,55 ± 0,01</b>	<b>0,54 ± 0,0004</b>	<b>7,98 ± 0,01</b>	<b>5,47 ± 0,04</b>	<b>Presente trabalho</b>
<i>A. fulica</i>	2,18	0,57	0,34	1,09	0,60	Pecora, 2009
<i>A. fulica</i>	1,06 (1,05-1,07)	0,5 (0,5-0,5)	0,03 (0,02-0,03)	0,57 (0,55-0,58)	0,34 (0,34-0,34)	Aboua, 1990
<i>A. marginata</i>	0,19 ± 0,01	0,003 ± 0,001	0,030 ± 0,003	0,098 ± 0,002	0,031 ± 0,003	Uboh, 2010
<i>A. achatina</i>	0,20 ± 0,012	0,003 ± 0,001	0,034 ± 0,002	0,099 ± 0,001	0,031 ± 0,003	

Fonte: o autor (2013)

O cobre (Cu), no presente trabalho, apresentou valores muito altos, contrariando Pearson e Gillet (1999 apud UBOH; EBONG; MBI, 2010, p.15) que não detectaram a sua presença. Este achado sugere a possibilidade de uma contaminação da amostra em alguma etapa. Infelizmente, não foi possível repetir a análise deste elemento. Como a legislação do IBAMA proíbe a sua criação em cativeiro, os caracóis tiveram que ser coletados no ambiente, em duas áreas distintas e, portanto, não se pode garantir que algumas delas não estivessem contaminadas, antes do experimento (Tabelas 10 e 11).

Já o teor de ferro (Fe), por exemplo, encontrado na carne do *A. fulica* neste experimento, foi compatível com os valores encontrados pela Dra Iracy Léa Pecora, pesquisadora da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, em São Vicente, São Paulo e enviados por meio de comunicação pessoal e por Aboua (1990) que, no entanto, encontrou valores bem elevados na sua concha, mais próximos dos valores que Nunes et al. (2006) relataram ter encontrado nas conchas de ostras e mexilhões.

Curiosamente, o valor de cálcio presente da concha do africano, neste experimento, foi superior aos encontrados por Nunes et al. (2006) nas conchas de ostras e mexilhões. Como o autor sugere o uso do pó da concha de ostras para o tratamento de osteoporose, não há razão para excluir essa possibilidade, portanto, para o pó da concha do africano.

Vários microminerais pesquisados nesta dissertação como o Al, As, Ba, Cd, Li, Mo, Ni, Si, Sr, V, que podem ser observados na tabela 6, não foram registrados em nenhum dos trabalhos pesquisados, o que impossibilita a comparação dos resultados encontrados.

Tabela 10 e 11 - Micronutrientes: comparação entre as conchas e carne de alguns moluscos

	Micronutrientes ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) Conchas de Moluscos															Ref.
	Al	As	Ba	Cd	Cr	Cu	Fe	Li	Mn	Mo	Ni	Si	Sr	V	Zn	
<i>Achatina fulica</i>	26,32 $\pm 2,4$	< LD	23,04 $\pm 1,8$	< LD	36,80 $\pm 2,7$	13,03 $\pm 0,6$	10,87 $\pm 0,63$	< LD	25,79 $\pm 0,4$	< LD	< LD	21,04 $\pm 0,44$	765,76 $\pm 35,5$	0,04 $\pm 0,001$	63,68 $\pm 1,2$	Nossa Pesquisa
Ostra	ND	ND	NE	0,03	3,82	1,81	360,72	ND	42,29	ND	1,77	ND	867,08	ND	9,20	Nunes, 2006
Mexilhão	ND	ND	ND	0,03	80,23	2,70	478,09	ND	25,90	ND	6,16	ND	1120,96	ND	3,34	
<i>Achatina fulica</i>	ND	ND	ND	ND	ND	6 (4,8-7,2)	809 (747-870)	ND	10,1 (10-10,1)	ND	ND	ND	ND	ND	11,1 (11-12,1)	Aboua, 1990

Fonte: o autor (2013)

	Micronutrientes ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) Carne de Moluscos															Ref.
	Al	As	Ba	Cd	Cr	Cu	Fe	Li	Mn	Mo	Ni	Si	Sr	V	Zn	
<i>Achatina fulica</i>	6,18 $\pm 1,6$	8,31 $\pm 0,98$	109,80 $\pm 1,5$	8,26 $\pm 0,15$	147,7 $\pm 16,6$	2000,13 $\pm 76,1$	166 $\pm 3,34$	< LD	125,61 $\pm 1,5$	122,95 $\pm 0,64$	38,92 $\pm 1,6$	26,80 $\pm 0,53$	155,98 $\pm 12,66$	0,20 $\pm 0,04$	98,10 $\pm 2,42$	Nossa Pesquisa
<i>Achatina fulica</i>	ND	ND	ND	ND	ND	60,91	148,91	ND	49,12	ND	ND	ND	ND	ND	43,33	Pecora, 2009
<i>Achatina fulica</i>	ND	ND	ND	ND	ND	10,4 (10,3-10,5)	128 (120-135)	ND	17,2 (15,4-19)	ND	ND	ND	ND	ND	47,0 (43,9-50)	Aboua, 1990
<i>Archatina marginata</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	6,4 $\pm 0,1$	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	20 $\pm 10,0$	Uboh, 2010
<i>Archatina Achatina</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	6,4 $\pm 0,3$	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	20,1 $\pm 10,3$	

Fonte: o autor (2013)

## 5.6 Composição centesimal do muco liofilizado

Quanto à composição centesimal do muco do *A. fulica* existem poucos trabalhos que tratam deste tema especificamente. A composição centesimal do muco nesta dissertação foi determinada a partir do muco liofilizado e os resultados estão representados na tabela 12.

A proporção entre proteínas (49,97%) e carboidratos (8,15%) no muco liofilizado é de 1:5, semelhante às encontradas por Iguchi (1982), que variaram de 1:3 a 1:6.

**Tabela 12 - Composição centesimal do muco liofilizado.**

Composição Centesimal do Muco Liofilizado							
Matéria Seca	Umidade	Cinza	Proteína Bruta	Carboidratos	Calorias Totais (kcal)	Lipídeos em 100 g	Colesterol
91,72 ± 1,85	8,28 ± 0,97	31,1 ± 0,35	49,97 ± 3,21	8,15 ± 1,43	242,48 ± 53,23	2,5 ± 0,44	50,2 ± 0,3

Sirio (2005) ao pesquisar o efeito cicatrizante do muco dos caracóis alimentados com ração à base de confrei (*Symphytum officinale*) analisou bioquimicamente a porção solúvel do muco do africano, encontrando: Açúcar Total 3,67 (g %), Açúcar Redutor 0,70 (g %), Proteína 78,76 (g%), Lipídeos 7,18 (g %) e Mucoproteína 0,25 (g%). Já Lorenzi (2008), ao realizar a análise colorimétrica e espectroscópica do muco do *A. fulica* alimentado com diferentes rações, encontrou uma média percentual de 7,87 de açúcares totais e 92,12 de proteínas.

Na tabela 13, compararam-se os resultados das análises empreendidas nesta dissertação para o muco liofilizado, descritos na primeira coluna, com os resultados encontrados por Lorenzi e Martins (2008), que ocupam as demais colunas da mesma tabela. Em nossa pesquisa seguimos as metodologias de AOAC (1984) para proteínas e Brasil/ANVISA (2001) para carboidratos. Lorenzi e Martins (2008) obtiveram os seus resultados a partir de uma solução de muco bruto em água milli-Q através colorimetria. Para os açúcares Lorenzi e Martins (2008) utilizaram o método Fenol-sulfúrico (Dubois et al.,

1956) e para as proteínas utilizaram o método Biureto. Portanto, tanto a forma de apresentação do material pesquisado, quanto as metodologias empregadas, foram distintas. Outra explicação para a variabilidade dos resultados é o uso de plantas medicinais (*Symphytum officinale*, *Centella asiatic*, *Carica papaya*, acrescidas às rações do experimento de Sirio (2005) e Lorenzi e Martins (2008) podem ter influenciado no aumento da concentração proteica. O melhor desempenho destas rações corroboram para a teoria de vários autores que atribuem à proteína do muco a sua ação biológica.

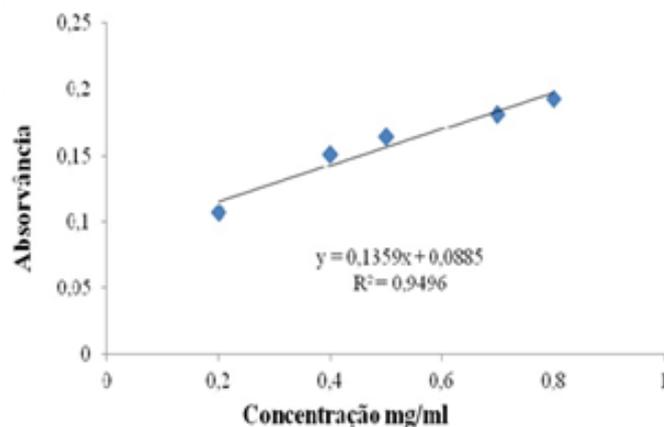
**Tabela 13 - Comparação da composição centesimal do muco do *Achatina fulica*.**

	Muco de <i>A. fulica</i> Liofilizado	Muco de <i>A. fulica</i> (*) Valores %	Muco de <i>A. monochromatica</i> (*) Valores %
Umidade (%)	8,28 ± 0,97	ND	ND
Matéria Seca	91,72 ± 1,85	ND	ND
Cinza	31,1 ± 0,35	ND	ND
PTN Bruta (%)	49,97 ± 3,21	92,18	92,61
Carboidratos (%)	8,15 ± 1,43	7,81	7,51
Calorias Totais (Kcal)	242,48 ± 53,23	ND	ND
Lipídios em 100 mg	2,5 ± 0,44	ND	ND
Fontes	Aquino (2013)	Lorenzi (2008)	Lorenzi (2008)

Fonte: o autor (2013)

A curva de calibração do colesterol foi elaborada segundo Searcy e Bergquist (1960) (Figura 18).

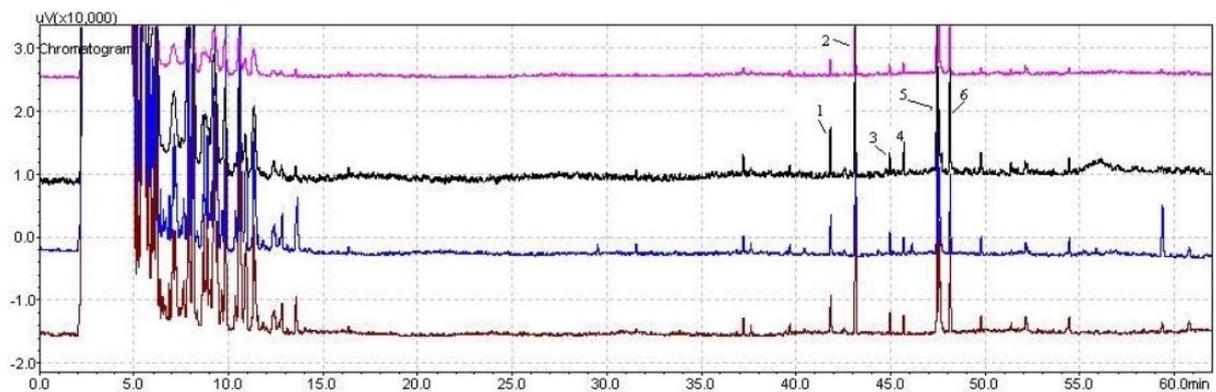
**Figura 18 - Curva de Calibração do Colesterol.**



Fonte: o autor (2013)

Quanto aos ácidos graxos presentes no muco do caracol africano, especificamente, não encontrou-se resultados para comparação em nenhum dos trabalhos consultados, exceto em Saldanha (2001) que analisou os ácidos graxos na carne do *Achatina fulica*, determinados por cromatografia gasosa capilar e obteve teores de 56,78% em ácidos graxos polinsaturados, 15,54% por cento em monoinsaturados e 23,25% em saturados, observando-se uma relação polinsaturados/saturados de 3:1, recomendando a carne do *Achatina fulica* para o consumo como fonte de ácidos graxos essenciais como o ácido linoleico (C18:2) - 18,49%, importante na formação de eicosanoides, potentes reguladores de funções teciduais e celulares (Figura 19) (Tabela 14).

**Figura 19 – Identificação dos ácidos graxos.**



<b>Pico 1</b>	<b>C17:0</b>	<b>Palmítico</b>
<b>Pico 2</b>	<b>C18:0</b>	<b>Estéarico</b>
<b>Pico 3</b>	<b>C18:1 n-9</b>	<b>Oléico</b>
<b>Pico 4</b>	<b>C20:0</b>	<b>Araquidônico</b>
<b>Pico 5</b>	<b>C22-5:n-3</b>	<b>Docosanóico</b>
<b>Pico 6</b>	<b>C22-6:n-3</b>	<b>Docosaenoico-DHA</b>

Fonte: o autor (2013)

A identificação dos ácidos graxos do muco liofilizado nesta dissertação foi obtida através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. A fórmula para o cálculo foi a área do pico medida multiplicada pela concentração do padrão interno e dividida pela área do padrão interno, expressando-se o resultado em  $\text{mg mL}^{-1}$  de cada ácido graxo sobre o total de ácidos graxos.

Tabela 14 - Valores médios dos ácidos graxos presentes no muco do caracol africano.

<b>ÁC. GRAXOS NO MUCO DO CARACOL AFRICANO</b>		
<b>A.G. Saturados</b>	<b>Nomenclatura</b>	<b>Média ± DP (mg mL<sup>-1</sup>)</b>
	Palmítico	0,9511 ± 0,5061
	Esteático	2,3052 ± 1,7495
	Araquidônico	2,4400 ± 1,3601
<b>A.G. Monoinsaturados</b>	Oléico	0,4600 ± 0,1573
<b>A.G. Poli-insaturados</b>	Docosanóico	0,2343 ± 0,0401
<b>Analisadas 5 amostras com média e desvio-padrão (mg mL<sup>-1</sup>)</b>		

Fonte: o autor (2013)

## 5.7 Experimentos *in vitro*

Em observação à ética no uso de animais para experimentação, foi necessário, primeiramente, definir alguns parâmetros através de experimentação *in vitro* utilizando-se culturas de células.

### 5.7.1 Citotoxicidade da solução do muco de caracóis africanos em culturas de células de córnea de coelhos

Devido a inexistência de dados na literatura científica recomendando a utilização do muco bruto do *Achatina fulica* ou uma solução oftálmica diluída elaborada a partir dele, para ser usada com finalidade cicatrizante em lesões de córnea e, como referido anteriormente, este muco pode sofrer alterações em alguns de seus constituintes, devido a condições particulares de seu habitat e hábitos alimentares, um dos objetivos desta etapa da pesquisa foi o de avaliar os efeitos biológicos do muco do caracol africano *in vitro* usando uma linhagem de células de córnea de coelho obtida no Banco de Células da UFRJ/Rio de Janeiro, a SIRC 0224.

### 5.7.2 Determinação do peso seco da solução estoque

Este procedimento demonstrou haver 0,21 g de muco em 10 mL de solução estoque, contabilizando-se uma perda de 98,14% de umidade após sua liofilização. Assim, estimou-se que na solução estoque havia 20 mg de muco/mL (1000  $\mu$ L) ou 0,5 mg/25  $\mu$ L (volume estimado de uma gota utilizada no experimento *in vivo* com os coelhos).

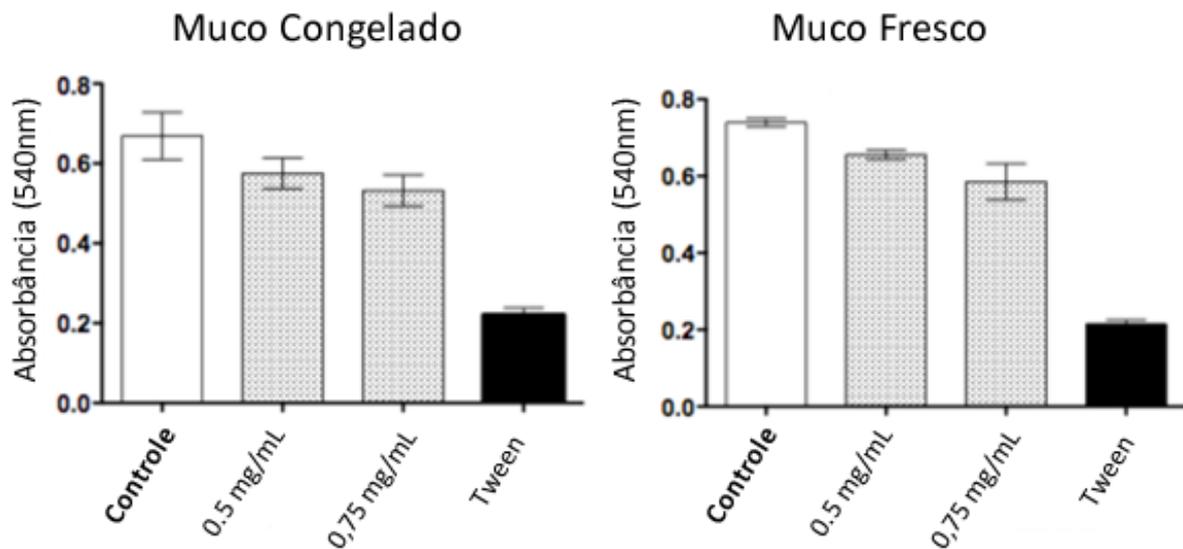
Para determinar a concentração do muco mais apropriada para o uso *in vivo*, primeiramente, foi avaliada a citotoxicidade da solução de muco através do método do MTT. As concentrações entre 0,5 mg mL<sup>-1</sup> e 0,75 mg mL<sup>-1</sup> não apresentaram diferença estatística significativa, embora a partir de 0,5 mg mL<sup>-1</sup> a diminuição do número de células sugira sofrimento celular (Figura 18).

Levando-se em conta as diferenças apresentadas, embora sutis, entre o aspecto do muco das diferentes coletas, inclusive de seu conteúdo proteico, optou-se por trabalhar com o material congelado a partir de uma única coleta.

Houve, no entanto, a preocupação de que o muco congelado pudesse perder alguma propriedade biológica importante em relação ao muco fresco. Para dirimir quaisquer dúvidas a este respeito, foram feitos experimentos com o muco recém coletado e refrigerado e também com o mesmo muco, submetido ao congelamento a -80 °C após 48 h. Os resultados obtidos com as amostras contendo soluções de muco fresco e congelado não mostraram diferenças significativas entre elas (Figura 20).

No entanto, a diminuição da viabilidade celular nas culturas expostas a ambas as amostras, demonstrou que as concentrações adotadas nos experimentos (0,5 mg mL<sup>-1</sup> e 0,75 mg mL<sup>-1</sup>) aparentemente apresentavam leve toxicidade para as células (Figura 20).

Figura 20 - Diferença entre o muco fresco e o muco congelado pelo MTT.



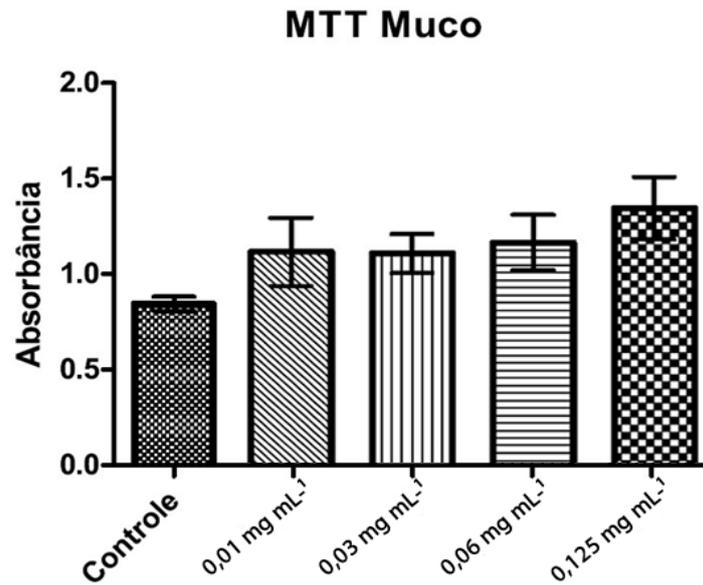
Fonte: o autor (2013)

### 5.7.3 Padronização do muco a ser utilizado nos experimentos

Nos experimentos *in vitro*, a partir da diluição seriada realizada com a solução estoque (1:3) foram obtidas as concentrações expressas na figura 21. Muito embora não tenha havido diferença estatística significativa entre as diluições testadas (0,01, 0,03, 0,06 e 0,125 mg mL<sup>-1</sup>), optou-se pela concentração que, aparentemente, apresentou melhor ação sobre a multiplicação das células das culturas: 0,125 mg mL<sup>-1</sup>. A solução testada e aprovada *in vitro* orientou a elaboração da solução oftálmica utilizada *in vivo*, no último experimento de nossa pesquisa.

A solução oftálmica produzida foi esterelizada em camara de fluxo laminar, sob a ação dos raios UV. A primeira alíquota submetida ao UV por 20 min apresentou crescimento de *Citrobacter* sp., a segunda, exposta por 30 min, foi positiva para *Pseudomonas aeruginosa* e, finalmente, aos 60 min, não houve crescimento bacteriano.

**Figura 21 - Avaliação das diferentes soluções de muco em culturas celulares de córneas de coelhos pelo MTT.**



Fonte: o autor (2013)

#### 5.7.4 Determinação da proteína na solução oftálmica para o experimentos *in vivo*

A quantidade de proteína presente na solução para o tratamento *in vivo* das lesões de córneas foi determinada porque alguns autores como Iguchi, Aikava e Matsumoto (1982) e Sírio (2005) sugerem que a ação biológica do muco está na sua porção proteica.

Iguchi, Aikava e Matsumoto (1982) citam que o fator antibacteriano presente no muco do *A. fulica* foi encontrado na fração de mucina da fração solúvel em água, extraída pela precipitação com o etanol.

Sírio (2005) sugere que o princípio ativo contido no muco dos caracóis, pertença ao grupo das proteínas, presente em maior quantidade percentual, portanto, uma vez desconhecida a concentração ideal do muco para a ser utilizada no experimento *in vivo*, quantificou-se a proteína presente nesta solução utilizando-se o método do Biureto. Entre algumas vantagens, ele é um dos métodos mais rápidos e de fácil execução.

A quantidade de proteína presente em nossa solução oftálmica foi de 2,61 mg mL<sup>-1</sup>. (Tabela 10) Os resultados encontrados pelo método (Biuret) estão listados na tabela 15.

**Tabela 15 - Concentração de proteínas no muco e na soluções oftálmica utilizada no experimento *in vivo*.**

Amostras	PTN (mg mL <sup>-1</sup> )
Solução Oftálmica 0,125 mg mL <sup>-1</sup>	0,872
Solução Estoque (1:3) 0,5 mg mL <sup>-1</sup>	2,619
Muco Bruto	13,094

Fonte: o autor (2013)

## 5.8 Ação cicatrizante em lesões de córneas de coelhos

A tabela 16 (a, b e c) reúne os resultados comparativos da cicatrização das córneas dos grupos controle, muco e epitegel ao longo do experimento *in vivo*. Os resultados representam as áreas em percentual, correspondentes à cicatrização das úlceras de córneas ao longo do experimento *in vivo* logo após as cirurgias. Os resultados negativos correspondem aos aumentos das áreas das lesões provocadas, muito provavelmente, pela ação mecânica dos próprios animais ao coçarem os olhos.

Os dados foram obtidos através dos cálculos das áreas das lesões através de microfotografias digitais, pelo software Adobe Photoshop CS 5. No grupo Controle, dois animais (2 e 5) apresentaram uma recuperação muito mais lenta quando comparada aos demais componentes do grupo. Por conta disso, todos os animais, de todos os grupos, foram necropsiados após a eutanásia. Coincidentemente, os dois animais do grupo Controle apresentaram lesões pulmonares, sugerindo uma infecção assintomática. Os dados de ambos os animais foram extraídos das análises estatísticas.

**Tabela 16 - (a, b e c) - Áreas percentuais correspondentes à cicatrização das úlceras de córneas no experimento *in vivo*.**

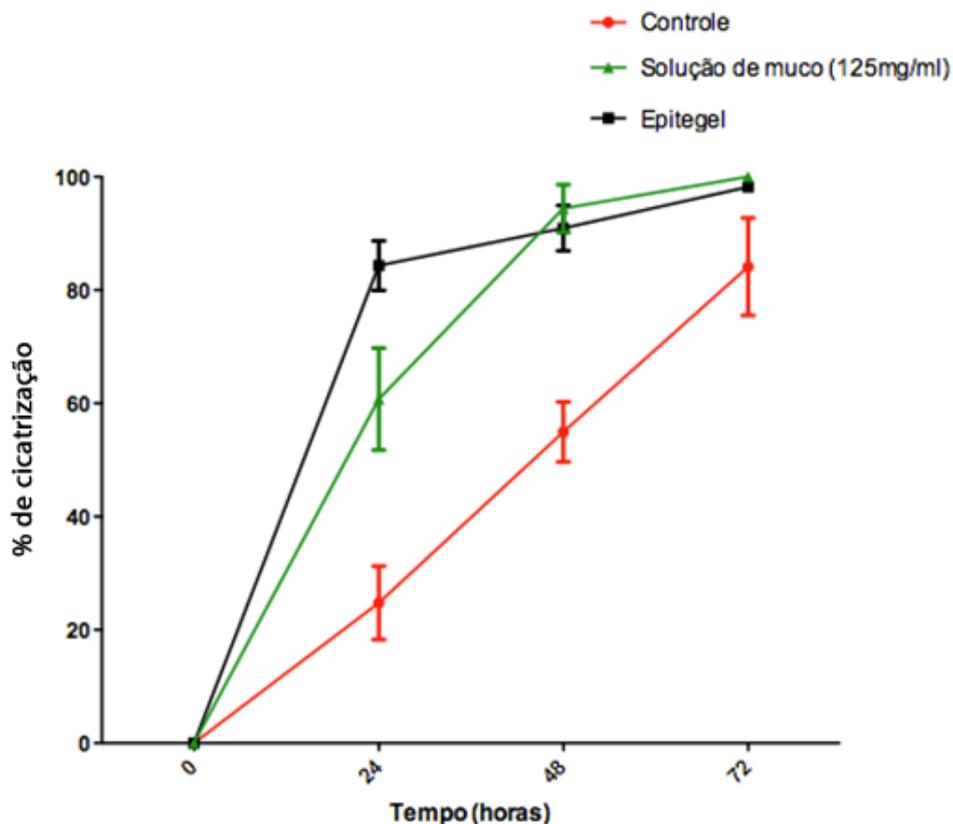
Tabela 16(a) Grupo <b>CONTROLE</b> / ÁREA DA LESÃO EM PERCENTUAL DE CICATRIZAÇÃO												
	COELHO 1		COELHO 2		COELHO 3		COELHO 4		COELHO 5		COELHO 6	
	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E
0 H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24 HS	7,86	34,95	11,39	-12,71	28,18	19,86	7,29	39,23	19,19	-46,87	21,21	8,83
48 HS	53,71	60,91	10,42	18,74	62,27	52,50	43,45	62,47	26,74	18,96	27,07	77,48
72 HS	94,66	91,22	30,65	66,76	100	97,18	94,52	64,19	43,92	24,42	31,15	100

Tabela 16(b) Grupo <b>EPITEGEL</b> / ÁREA DA LESÃO EM PERCENTUAL DE CICATRIZAÇÃO												
	COELHO 1		COELHO 2		COELHO 3		COELHO 4		COELHO 5		COELHO 6	
	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E
0 H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24 HS	93,18	73,26	66,82	39,86	79,95	81,68	72,30	72,89	53,09	23,09	74,23	75,80
48 HS	100	100	90,21	98	95,96	100	100	100	71,57	64,31	100	78,11
72 HS	-----	-----	93,56	97,33	93,27	-----	-----	-----	93,56	100	-----	100

Tabela 16(c) Grupo <b>MUCO</b> / ÁREA DA LESÃO EM PERCENTUAL DE CICATRIZAÇÃO												
	COELHO 1		COELHO 2		COELHO 3		COELHO 4		COELHO 5		COELHO 6	
	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E
0 H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24 HS	100	72,79	33,92	10,04	40	68,76	75,79	71,20	100	100	53,09	54,69
48 HS	-----	100	59	100	100	85,20	100	100	-----	78,76	100	100
72 HS	-----	80,91	100	-----	-----	100	-----	-----	-----	100	-----	-----

A partir dos valores percentuais computados nas três tabelas elaboramos o gráfico da figura 16. O coelho 5, do grupo do Muco, foi o primeiro animal a apresentar 100% de cicatrização em ambos os olhos em apenas 24 horas. O olho direito do coelho 1 deste grupo, também apresentou 100% de cicatrização com apenas 24 horas. No entanto, o Grupo do Muco e o Grupo do Epitegel não apresentaram diferenças estatísticas significativas porém, ambos apresentaram diferenças significativas quando comparados com o Grupo Controle, como fica evidenciado na figura 22.

**Figura 22. Comparativo do experimento in vivo.**



O

Fonte: o autor (2013)

O muco do caracol tem propriedades comprovadamente cicatrizantes, se destacando por possuir atividade hipoglicemiante, imunoestimulante, hipolipemiante, broncorelaxante e antitussígena, antibacteriana, cosméticas, anti-leishmania e antiangiogênica em células tumorais, portanto, merecedor de muita atenção dos pesquisadores devido as suas propriedades ainda pouco exploradas.

Sirio (2005) e Martins (2003, p.217) ao tratarem lesões em pele de camundongos e

coelhos, com uma pomada à base do muco do caracol africano, observaram melhor reparação das lesões, quando comparados com o grupo controle.

Muito embora, os mucos de alguns gastrópodes, terrestres e aquáticos, apresentem propriedade cicatrizante, a sua função só havia sido testada, até hoje, em pele. Com este estudo demonstrou-se que o muco possui ação reparadora também em lesões de córnea, comparável a um dos melhores epitelizantes disponíveis no mercado e a sua ação específica, além de acelerar a recuperação das lesões nos animais, não produziu em nenhum deles, uma única cicatriz visível. Resta entender melhor o seu mecanismo junto ao conjunto de etapas da cicatrização da córnea, especialmente, se o muco detém ação estimuladora sobre a reprodução das células-tronco, responsáveis pela regeneração da última etapa da cicatrização.

## 6 CONCLUSÃO

Houve padronização da nova metodologia para a manutenção do *Achatina fulica* em laboratório, com sensíveis melhorias na higienização, na redução do tempo gasto para o tratamento diário e na diminuição do estresse dos animais. Esta metodologia poderá ser adotada, com a mesma eficiência, para outras espécies de caracóis arborícolas, inclusive, para criadores comerciais como é o caso do caracol *Helix aspersa*, criado em São Paulo já que, no momento, a criação do caracol africano no país está proibida pelo IBAMA.

As análises da sua composição mineral e centesimal nos encorajam a afirmar que o seu uso no Brasil, para a alimentação humana, deve ser desmistificado e recomendado, pois além de comestível, rico em proteínas e minerais, o caracol africano é abundante nas estações chuvosas, podendo contribuir, de imediato, para minimizar as carências nutricionais de populações subnutridas. O seu teor de Ca, superior aos encontrados na casca da ostra e do mexilhão, sugere o seu aproveitamento também, para o tratamento de doenças debilitantes, como o raquitismo e a osteoporose.

Demonstrou-se a capacidade de cicatrização do muco do *A. fulica* para o tratamento de úlceras de córnea e a sua ação específica, que além de acelerar a recuperação das lesões nos animais, não produziu em nenhum deles, uma única cicatriz visível. A sua utilização para esta finalidade merece atenção para que possa se somar, como uma nova opção, ao arsenal medicamentoso hoje existente para o tratamento desta patologia. No entanto, há necessidade de um maior número de análises para a comprovação irrefutável de sua ação cicatrizante. Novas pesquisas deverão ampliar, ainda mais, o leque de potencialidades para o uso desta espécie.

Esta dissertação, ao divulgar os benefícios da carne, concha e muco do caracol africano, dá argumentos para estimular o seu aproveitamento racional como um patrimônio que não deve ser menosprezado, chamando a atenção, concomitantemente, para a crítica situação das espécies nativas, ora ameaçadas.

## REFERÊNCIAS

- ADEMOLU, K. O. et al. Performance, proximate and mineral analyses of African giant land snail (*Archachatina marginata*) fed different nitrogen sources. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 3, n. 8, p. 412-417, 2004. ISSN 1684-5315. Disponível em: <<http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/viewFile/14989/58897>> Acesso em: 31 ago. 2012.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução - RDC nº 40, de 21 de março de 2001**. Regulamento técnico para rotulagem nutricional obrigatório de alimentos e bebidas embaladas. Brasília, DF, 2001. Disponível em: <http://www.hidrolabor.com.br/RDC40.pdf>. Acesso em: 26 fev. 2012.
- AGUDO-PADRÓN, A. I.; LENHARD, P. Introduced and invasive molluscs in Brazil: an brief overview. **Tentacle**, v. 37, p. 37-41, Jan. 2010. ISSN 0958-5079. Disponível em: [http://www.hawaii.edu/cowielab/tentacle/Tentacle\\_18.pdf](http://www.hawaii.edu/cowielab/tentacle/Tentacle_18.pdf). Acesso em: 4 jun. 2011.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of association of analitic chemists**. Washington, 1984.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of association of analitic chemists**. 15. ed. Washington, 1990.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of association of analitic chemists**. 17. ed. Washington, 2000.
- AQUINO, M. C. Novo manejo zootécnico malacocultor para criação de caracóis (Mollusca: Gastropoda: Pulmonata) em caixas. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE MALACOLOGIA, 22., 2011, Fortaleza. [**Painel apresentado...**]. Fortaleza: Sociedade Brasileira de Malacologia, 2011.
- AQUINO, M. C. New Breeding management for snails (Mollusca: Gastropoda: Pulmonata) in plastic boxes. (Recipientes/containers. **REDVET Revista Electrónica de Veterinaria**, v. 13, n. 2, 2012. Disponível em: <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n020212.html>> Acesso em: 26 fev. 2012.
- BRAGAGNOLO, N.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. Otimização da determinação de colesterol por CLAE e teores de colesterol, lipídio total e ácidos graxos em camarão rosa (*Penaeus brasiliensis*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, n. 3, p. 275-280, 1997. ISSN 1678-457X.
- BURKITT H.G., YOUNG B., HEATH J.W.. *Wheater Histologia Funcional*. Guanabara Koogan, 3ª Edição, 1994.
- CABARET, J. et al. Snail farming: a survey of breeding management, hygiene and parasitism of the garden snail, *helix aspersa müller*. **Journal of Molluscan Studies**, v.. 54, n. 2, p. 209-214. 1988. ISSN 1464-3766.
- CALDEIRA, R. L. et al. First record of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1035) (*Nematoda: Metastrongylidae*) in Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 7, p. 887-889, 2007. ISSN 1678-0276. Disponível em: <http://memorias.ioc.fiocruz.br/component/k2/item/798-first-record-of-molluscs-naturally-infected-with-angiostrongylus-cantonensis-chen-1935-nematoda-metastrongylidae-in-brazil>. Acesso em: 20 mar. 2010.

- CALVINO, H. C. de J. P. **Úlcera de córnea em cães**. 2006. – Monografia (Pós-graduação “Lato Sensu” em Clínica Médica e Cirurgia de Pequenos Animais) - Universidade Castelo Branco, Campo Grande, 2006. Disponível em: <http://www.qualittas.com.br/uploads/documentos/Ulcera%20de%20Cornea%20em%20Caes%20-%20Helen%20Cristina%20de%20Jesus%20Porral%20Calvino.PDF>. Acesso em: 20 mar. 2010.
- CHROSCIECHOWSKI, P. *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda): una amenaza potencial. **Boletín de Malariología y Salud Ambiental**, Maracay, p. 295-299, dez. 1977. ISSN 1690-4648.
- COGO, A. J. D. et al. Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. **Natureza on line**, n.7, n. 1, p. 37-42, 2009. Disponível em: <http://www.naturezaonline.com.br>. Acesso em: 23 set. 2011.
- COLLEY, E.; FISCHER, M. L. Avaliação dos problemas enfrentados no manejo do caramujo gigante africano *Achatina fulica* (Gastropoda: Pulmonata) no Brasil. **Zoologia**, Curitiba, v. 26, n. 4, p. 674-683, 2009. ISSN 1984-4670. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/zool/v26n4/v26n4a12.pdf>. Acesso em: 14 dez. 2012.
- COSTA NETO, E. M. Os moluscos na zooterapia: medicina tradicional e importância clínico-farmacológica. **Biotemas**, Feira de Santana, v. 19, n. 3, p. 71-78. 2006. ISSN 0103-1643. Disponível em: <<http://www.biotemas.ufsc.br/volumes/pdf/volume193/p71a78.pdf>>. Acesso em: 23 set. 2011.
- COSTA, A. O. et al. Comparative analysis of three methods to assess viability of mammalian cells in culture. **Biocell**, Mendoza, v.23, n.1, p. 65-72, 1999. ISSN 0327-9545.
- ESPÍRITO-SANTO, Maria Cristina Carvalho do et al. The first case of *Angiostrongylus cantonensis* eosinophilic meningitis diagnosed in the city of São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v. 2, n. 55, p.129-132, mar. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23563769>>. Acesso em: 30 ago. 2013.
- FAQBUARO, O. et al. Nutritional status of four species of giant land snails in Nigeria. **Journal of Zhejiang University Science B**, Hangzhou, v. 7, n. 9, p. 686-689, 2006. ISSN 1673-1783.
- FECHINE-JAMACARU, F. V.; FECHINE JÚNIOR, J. U.; MORAES FILHO, M. O. Modelo de angiogênese inflamatória em córnea de coelho induzida pela cauterização alcalina pontual. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 20, n.1, p. 2005. ISSN 1678-2674. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/acb/v20n1/23288.pdf>. Acesso em: 9 dez. 2012.
- FERREIRA, F. de C. F. et al. Ação da L-Aminoácido Oxidase (LAAO) da Serpente *Bothrops alternatus* em macrófatos de rato. In: CONGRESSO INTERNO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNICAMP (PIBIC), 17., 2009, Campinas. [**Cadernos de resumos...**]. Campinas: UNICAMP, 2009. Disponível em: <http://www.prp.unicamp.br/pibic/congressos/xviiicongresso/cdrom/pibic/cadernosderesumos/LivroIC.pdf>. Acesso em 9 dez. 2012.
- FINE, M. E.; STRAMER, B. M. How the cornea heals: cornea-specific mechanisms affecting surgical outcomes. **Cornea**, New York, v. 24, suppl. 8, S2-S11, 2005. ISSN 0277-37-40.
- FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957. ISSN 0021-9258.

FRANCO, J. L. et al. Antioxidant status and stress proteins in the gills of the brown mussel *Perna perna* exposed to zinc. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 160, n. 3, p. 232-240, 2006. ISSN 0009-2797.

ESCARGOT: caracol tropical. **Revista Globo Rural**, São Paulo, ano 7, n. 75, p. 31-32, jan. 1992, pp. 31-32. . ISSN 0102-6178.

ESCARGOT: mais que um simples caracol. **Revista Globo Rural**, São Paulo, ano 10, n. 101, p. 24-34, mar. 1994. ISSN 0102-6178.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. Rapad preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, London, v. 22, n. 6, p. 475-476, 1973. ISSN 0023-6853.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENÓVAVEIS (IBAMA). **Instrução normativa nº 73, de 18 de agosto de 2005**. Disponível em:

<[http://licenciamento.cetesb.sp.gov.br/legislacao/federal/inst\\_normativa/2005\\_Instr\\_Norm\\_IBAMA\\_73.pdf](http://licenciamento.cetesb.sp.gov.br/legislacao/federal/inst_normativa/2005_Instr_Norm_IBAMA_73.pdf)> Acesso em: 15 jul. 2013

IGUCHI, S. M.; AIKAVA, T.; MATSUMOTO, J. J. Antibacterial activity of snail mucus mucin. **Comparative Biochemistry and Physiology**, London, v. 72, n. 3, p.571-574, 1982. ISSN 0300-9629.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE.( IUCN). **Impact of nature's invading aliens measured for first time**. Press Release 22 January 2010.

Disponível: < <http://www.gisp.org/>> Acesso em: 17 fev. 2010.

KERN, T.J. Ulcerative keratitis. **Veterinary Clinics of North American: Small Animal Practice**, Philadelphia, v.20, n.3, p.643-666, 1990. ISSN 0195-5616.

KIM, Y. S. et al. A new glycosaminoglycan from the giant African snail *Achatina fulica*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 271, n. 20, May, p. 11750-11755, 1996. ISSN 0021-9258.

KUBOTA, Y. et al. Purification and characterization of an antibacterial factor from snail muçus. **Comparative Biochemistry Physiology C: Comparative Pharmacology and Toxicology**, Oxford, v. 82, n. 2, p. 345-348, 1985. ISSN 0742-8413.

LEE, Y. S. et al. Suppression of tumor growth by a new glycosaminoglycan isolated from the african giant snail *Achatina fulica*. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 465, n. 1-2, p. 191-198. ISSN 0014-2999. Disponível em: <<http://www-heparin.rpi.edu/main/files/papers/303.pdf>>. Acesso em: 1 nov. 2012.

LOBÃO, V. L.; TOLEDO, P. A. R.; ROCCO, S. C. Ocorrência de autofertilização em *Achatina fulica* (Gigante Africano) (Mollusca Pulmonata Stylommatophora). In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE MALACOLOGIA, 5., 2002, São Paulo. **Anales...** p.277-278.

LORENZI, A. T. **Estudo colorimétrico e espectroscópico do muco de caracóis *Achatina sp* alimentados com rações acrescidas de plantas medicinais**. 2006. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Reprodução Animal, 2006.

LORENZI, A. T.; MARTINS, M. de F. Análise colorimétrica e espectroscópica do muco de caracóis terrestres *Achatina sp* alimentados com ração diferenciada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.3, p. 572-579, 2008. ISSN 1806-9290. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbz/v37n3/24.pdf>> Acesso em: 18 out. 2011.

- MALDONADO JÚNIOR, A. et al. First report of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae) in *Achatina fulica* (Mollusca: Gastropoda) from Southeast and South Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 7, p. 938-941, 2010. ISSN 0074-0276.
- MARTINS, M. F. et al. Avaliação fenotípica e histológica de feridas cirúrgicas de coelhos tratados com secreção mucoglicoprotéica de escargot *Achatina fulica*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 29., 2002, Gramado. **Resumos...** Gramado: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 2002.
- MARTINS, M. F. et al. Avaliação macro e microscópica da cicatrização de lesões experimentalmente provocadas em pele de coelhos tratadas com secreção mucoglicoproteica do escargot *Achatina fulica*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 40, supl. 3, p. 213-218, 2003. ISSN 1678-4456. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/bjvras/v40s3/25963.pdf>. Acesso em: 14 mar. 2013.
- MATINELLA, L. et al. *Achatina fulica*: un caracol de interés para la salud pública. **INIAHO**, sept-dic. 2009. ISSN 1856-9951. Disponível em: <[http://www.inia.gob.ve/index2.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&gid=2287&Itemid=28](http://www.inia.gob.ve/index2.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=2287&Itemid=28)> Acesso em: 15 fev. 2013
- MELO, C. M. de. **Estudo das amostras endoteliais de microscopia especular de córnea**. 2007. Tese (Doutorado) - Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2007.
- MONCHEVA, S. et al. Total antioxidant capacity in the black mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from Black Sea coasts. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, n. 59, p. 475-484. 2004.
- MOREIRA-SILVA, S. F. et al. Toxocariasis of the central nervous system: with report of two cases. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 37, n. 2, p.169-174, 2004. ISSN 0037-Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v37n2/19602.pdf>>. Acesso em: 2 dez. 2011.
- MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v.65, n.1-2, p 55-63. 1983. ISSN 0022-1759.
- NEUHAUSS, Erli et al. Low susceptibility of *Achatina fulica* from Brazil to infection with *Angiostrongylus costaricensis* and *A. cantonensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 1, p. 49-52, 2007. ISSN 0074-0276. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/mioc/v102n1/5644.pdf>. Acesso em: 21 set. 2011.
- NUNES, L. C. C. et al. Obtenção de comprimidos contendo cálcio de conchas de ostras: pré-formulação e biodisponibilidade comparativa. **Acta Scientiarum Health Science**, Maringá, v. 28, n. 1, p.49-55, 2006. ISSN 1679-9291. Disponível em: <<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciHealthSci/article/viewArticle/1116>>. Acesso em: 3 abr. 2013.
- OLIVEIRA, R. B.; GODOY, S. A. P.; COSTA, F. B. **Plantas tóxicas**: conhecimento para a prevenção de acidentes. São Paulo: Holos, 2006. 64 p.
- OTSUKA-FUCHINO, H. O. et al. Morphological aspects of achacin-treated bacteria. **Comparative Biochemistry and Physiology**. C, Comparative pharmacology and toxicology, Oxford, v. 104, n. 1, p. 37-42, 1993. ISSN 0742-8413.
- PONTES, K. C. de S. et al. Processo de reparação de lesões da córnea e a membrana amniótica na oftalmologia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 12, p. 2120-2127, 2011.

ISSN 0103-8478. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cr/v41n12/a18611cr5105.pdf>. Acesso em: 15 jul 2013.

PRASAD, G. S. et al. Eco-friendly way to keep away pestiferous Giant African snail, *Achatina fulica* Bowdich from nursery. *Global Invasive Species Current Science*, Bangalore, v. 87, n. 12, p. 1657-1659, 2004. ISSN 0011-3891. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/012/al333e/al333e00.pdf>>. Acesso em: 13 mar. 2012.

PROGRAMA GLOBAL DE ESPÉCIES INVASORAS (GISP). **Bioinvasion and Global Environmental Governance**: the transnational policy network on invasive alien species. Costa Rican Disponível em: <http://www.cbd.int/invasive/doc/legislation/Costa-Rica.pdf> Acesso em: 16 fev 2010.

REIS, Nathasha S. et al. Métodos eletroquímicos usados para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais. *Acta Farmaceutica Bonaerense: Latin American Journal Pharmacy*, Buenos Aires, v. 28, n. 6, p. 949-953, 2009. ISSN 0326-2383. Disponível em: <[http://www.latamjpharm.org/trabajos/28/6/LAJOP\\_28\\_6\\_3\\_2\\_CXNVVPMJM.pdf](http://www.latamjpharm.org/trabajos/28/6/LAJOP_28_6_3_2_CXNVVPMJM.pdf)> Acesso em: 22 jul. 2013

SALDANHA, T., GARPAR, A.; SANTANA D. M. N. Composição centesimal da carne de escargots (*Achatina fulica*) criado em Iguape, SP. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 15, n.85, p. 69-74, 2001.

SANKARAN, K.V. **Giant African snail. Forest Invasive Species Network**. Disponível em: <[http://apfisn.net/sites/default/files/Achatina%20fulica\\_0.pdf](http://apfisn.net/sites/default/files/Achatina%20fulica_0.pdf)> Acesso em: 20 mar 2010.

SANTANA, W. A. et al. Assessment of antimicrobial activity and healing potencial of mucous secretion of *Achatina fulica*. *International Journal of Morphology*, Temuco, v. 30, n.2, p. 365-373, 2012. ISSN 0717-9367.

SÃO PAULO. Secretária de Estado da Saúde. Coordenadoria de Controle e Doenças. Centro de Doenças Epidemiológica. **Manual das doenças transmitidas por alimentos: *Angiostrongylus/Angisostrongilíase***. Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/angiostrongylus.htm>> Acesso em: 17 fev 2010.

SEARCY, R. L., BERGQUIST, L.M. A new color reaction for the quantitation of serum cholesterol. *Clinica Chimica Acta*, Amsterdam, v. 5, p.192-199, 1960. ISSN 0009-8981.

SHIM, Jin Young et al. Pharmacological activities of a new *glycosaminoglycan*, *acharan* sulfate isolated from the giant African snail *Achatina fulica*. *Archives of Pharmacal Research*, Seoul, v. 25, n. 6, p.889-894, 2002. ISSN 0253-6269.

SIEBRA, C. de A. **Atividades biológicas de *Annona glabra* Linn, *Annonaceae***. 2007. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Paraná, Curitiba, 2007.

SILVA, Maurício da et. al. ***Achatina fulica* Bowdich, 1822 (caramujo gigante africano)**. Rio de Janeiro: Secretaria de Estado e Saúde do Rio de Janeiro. 2003. (Informe técnico). revisado em 2005. Disponível em: < <http://portal.saude.rj.gov.br/Docs/cvas/caramujo.pdf>> Acesso em: 24 mar 2010.

SÍRIO, O. J. **Verificação da potencialização do efeito cicatrizante do muco de caracóis do gênero *Achatina* promovida por dieta à base de confrei**. 2005. 87 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2005.

SOUSA, C. M. M. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, São Paulo, v. 30, n. 2, 351-355, 2007.

SOUZA, R. M. de; ALVES, Â. G. C. ALVES, M. S. Conhecimento sobre o molusco gigante africano *Achatina fulica* entre estudantes de uma escola pública na Região Metropolitana do Recife. **Biotemas**, Florianópolis, v. 20, n. 1, p. 81-89, 2007. ISSN 0103-1643. Disponível em: <http://www.biotemas.ufsc.br/volumes/pdf/volume201/p81a89.pdf>. Acesso em: 7 ago. 2008.

SOUZA, R. C. C. L.de; CALAZANS, S. H.; SILVA, E. P. Impacto das espécies invasoras no ambiente aquático. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 61, n. 1, p.35-41, 2009. Disponível em: <[http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0009-67252009000100014&lng=en&nrm=iso](http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252009000100014&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 10 jan. 2012.

STEELE, C. Corneal wound healing: a review. **Optometry today**, Sept. 1999. Disponível em: <[http://www.optometry.co.uk/uploads/articles/08f2dd1c8e4b1478d82662b59289398c\\_Steele1990924.pdf](http://www.optometry.co.uk/uploads/articles/08f2dd1c8e4b1478d82662b59289398c_Steele1990924.pdf)> Acesso em: 8 ago. 2013.

TAGUCHI, Viviane. Caramujos africanos podem virar etanol de segunda geração. **Globo Rural**, 7 jul. 2011. ISSN 0102-6178. Disponível em: <<http://revistagloborural.globo.com/Revista/Common/0,,EMI247005-18080,00-CARAMUJOS+AFRICANOS+PODEM+VIRAR+ETANOL+DE+SEGUNDA+GERACAO.html>> Acesso em: 7 ago.2011.

TEMPONE, A. G. Cutaneous secretion from the giant African snail, *Achatina fulica*, as a source of Antileishmanial compounds. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, n. 1, p.72-77, 2007. ISSN 1983-3814. Disponível em: [http://revista.ial.sp.gov.br/index.php?option=com\\_remository&Itemid=27&func=startdown&id=240](http://revista.ial.sp.gov.br/index.php?option=com_remository&Itemid=27&func=startdown&id=240). Acesso em: 7 ago. 2007.

THIENGO, S. C. et al. **Moluscos exóticos com importância médica no Brasil: espécies exóticas invasoras: situação brasileira**. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Biodiversidade e Florestas, 2. ed., 2006. 24 p. Disponível em: <[http://www.mma.gov.br/estruturas/174/\\_publicacao/174\\_publicacao17092009113400.pdf](http://www.mma.gov.br/estruturas/174/_publicacao/174_publicacao17092009113400.pdf)> Acesso em: 30 mar.2013.

THIENGO, S. C. et al.. The giant African snail *Achatina fulica* as natural intermediate host of *Angiostrongylus cantonensis* in Pernambuco, northeast Brazil. **Acta Tropica**, Babel, v. 115, p. 194-199, 2010. ISSN 0001-706X.

THOMÉ, J. W.; GOMES, S.R.; PICANÇO, J. B. **Guia ilustrado: os caracóis e as lesmas dos nossos bosques e jardins**. Pelotas: USEB, 2006. 123 p.

THORNE, Emma. **Scientists discover new layer of the human cornea**. University of Nottingham. 11 Jun 2013. Disponível em: <<http://www.nottingham.ac.uk/news/pressreleases/2013/june/scientists-discover-new-layer-of-the-human-cornea-.aspx>> Acesso em: 28 ago.2013.

TOLEDO-PIZA, A. R. **Avaliação de caracterização proteica do muco de *Phyllocaulis boraceiensis* sobre a capacidade proliferativa de fibroblastos, células endoteliais e no modelo de cicatrização**. 2012. 184 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

TSAI, H-c. et al. Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*: report of 17 cases. **The American Journal of Medicine**, New York, v. 111, n. 2, p. 109-114, 2001.ISSN 0002-9343.

UBOH, F.; EBONG, P.; MBI, E.. Cultural discrimination in the consumption of black snail (*Archachatina marginata*) and white snail (*Achatina achatina*), any scientific justification? **International Research Journal of Microbiology**, p. 13-17, 2010. ISSN 0975-9174.

Disponível em:

<<http://www.interestjournals.org/IRJM/Pdf/2010/March/Uboh%20et%20al.pdf>>. Acesso em: 20 mar. 2012.

VITTA, A. et al. Survey of *Angiostrongylus cantonensis* in rats and giant african land snails in Phitsanulok province, Thailand. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, Phitsanulok**, p. 597-599, 2011.

ZAIA, D. A.M. et al. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n.6, p. 787-793, 1998. ISSN 0100-4042.

## ANEXO A – AVULSOS MALACOLÓGICOS



### CONSTÂNCIA

A petição de parte interessada, por médio do presente damos fé e constância de que o **M.V. Maurício Carneiro Aquino** encontra-se desenvolvendo atividade acadêmica/ pesquisa experimental de cunho zootécnico na cidade de Maceió, no Estado de Alagoas - AL, utilizando para os efeitos espécimes obtidos em vida silvestre/ asselvajada da espécie de molusco gastrópode exótico invasor africano terrestre (caracol) *Achatina (Lissachatina) fulica* (Bowdich, 1822), representante da Família **ACHATINIDAE** devidamente verificado com base no conhecimento taxonômico até hoje disponível, única forma do seu tipo com ocorrência reportada em vida livre no território do Brasil.

Porto Alegre, 03 de Julho de 2011

  
**Aisur Ignacio Agudo-Padrón**  
Geógrafo CREA/SC 080504-0  
Pesquisador Malacologista/ PDPM Editor  
Projeto "Avulsos Malacológicos - AM"  
<http://noticias-malacologicas-am.webnode.pt>

## **TRABALHOS PUBLICADOS**

**REDVET** Rev. electrón. vet. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>  
2012 Volumen 13 Nº 2 - <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n020212.html>  
**REDVET - Revista electrónica de Veterinaria** - ISSN 1695-7504  
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n020212/021209.pdf>

**NEW BREEDING MANAGEMENT FOR SNAILS  
(MOLLUSCA: GASTROPODA: PULMONATA) IN PLASTIC BOXES  
(RECIPIENTS/CONTAINERS)**

**NUEVO MANEJO PARA LA CRÍA INTENSIVA DE CARACOLES  
(MOLLUSCA: GASTROPODA: PULMONATA) EN CAJAS PLÁSTICAS  
NOVO MANEJO PARA A CRIAÇÃO INTENSIVA DE CARACÓIS  
(MOLLUSCA: GASTROPODA: PULMONATA) EM CAIXAS PLÁSTICAS**

**Mauricio Carneiro Aquino**

Instituto de Ciências e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas – UFAL. Pça  
Afrânio Jorge, s/nº, Prado, 57010-020, Maceió, Alagoas, Brasil.  
[projeto@caracolafricano.com](mailto:projeto@caracolafricano.com)

## **Resumen**

El uso de cajas plásticas para la cría de caracoles no es una novedad. Son prácticas, económicas, fáciles de limpiar, durables, ecológicamente indicada y hasta bonitas. La originalidad de este trabajo está en el manejo de dos cajas, dispuestas una sobre la otra y separadas, parcialmente, por una malla de metal que sostiene el comedero y bebedero. Esta simple disposición favorece el libre desplazamiento de los caracoles entre las cajas en su horario de mayor actividad, el nocturno entre las 22h00 y 8h00, y la concentración instintiva de la población en la caja superior en su horario de menor actividad, el diurno entre las 10h00 y 16h00. De esta forma la caja inferior, llena de desperdicios, puede ser retirada para su limpieza durante el período de descanso de los caracoles, disminuyendo la mortalidad de los animales y contribuyendo para a mejorar la calidad de vida de los animales.

**Palabras clave:** Metodología de cría de caracoles, malacocultura continental, heliocultura, cría intensiva de caracoles.

## **Resumo**

O uso de caixas plásticas para a criação de caracóis não é novidade. São práticas, baratas, fáceis de higienizar, duráveis, ecológicamente corretas e até bonitas. A originalidade deste trabalho está no manejo de duas caixas, dispostas uma contra a outra e separadas, parcialmente, por uma tela de metal que sustenta o comedouro e bebedouro. Esta simples disposição favorece o livre trânsito dos caracóis entre as caixas, no seu horário de maior atividade, o noturno, entre as 22h00h e 8h00h e a concentração

instintiva da população na caixa superior, no seu horário de menor atividade, o diurno, das 10h00h às 16h00h. Desta forma a caixa inferior, repleta de dejetos, pode ser retirada para sua higienização durante o período de descanso dos caracóis, diminuindo o estresse, eliminando os agentes patológicos, permitindo a maximização de espaço interno, diminuindo a mortalidade e contribuindo para a qualidade de vida dos animais.

**Palavras chaves:** metodologia de criação de caracóis, malacocultura continental, helicicultura, criação intensiva de caracóis.

### **Abstract**

The use of plastic boxes (recipients/containers) for snail breeding is nothing new. They are practical, cheap, of easy hygiene, durable, environmentally correct and friendly and often even of good appearance. The originality of this study work is in the breeding management of two boxes (recipients/containers), disposed one facing the other, and partially separated by a supporting metal fabric that holds and drinker. This simple disposition favours the free movement of the snails between the boxes during the time of its major activity, the nocturnal period, between 22h00 and 8h00, the instinctive concentration of the population in the upper box during the time of lesser activity, the daytime, between 10h00 and 16h00. In this way the box below filled with dejects may be removed for the hygiene and cleaning process during the snails' resting period, thus reducing the stress, eliminating pathological agents, allowing for the maximizing of internal space, reducing the mortality rate and improving the life quality of the animals.

**Key words:** methodology for snail breeding management, continental mollusk culture, heliciculture, snail intensive breeding.

### **INTRODUCTION**

The consumption of snails in Brazil is practically restricted to two antagonists parts of the society: in one hand the minority of high income, gourmets and Europeans residing in Brazil, and on the other hand the rural folk of low income specially living in the North and North East regions of the country, who made the collection of native snails as one of the few alternative during the periods of scarce food supply and/or, as it is stated by Costa Neto (2006), to use it as traditional medicine.



*Fig. 1 Wooden boxes used between the 80s and 90s. Photographs by the Author.*

Currently the most widely adopted breeding method in the commercial exploitation of snails abroad is the extensive handling, whereby the animals are bred in enclosures directly above the soil.

In Brazil, between 1970 and 1990, intensive breeding was diffused by the use of wooden boxes probably due to the fact the matrix commerce was extremely lucrative, and the first breeders at the time stimulated the breeding in small spaces like in apartments based on the fact that, for example, the activity would be lucrative even in small spaces. Also erroneously diffusing the practice of heliciculture in Brazil as a little demanding activity with disregard to the limiting environmental factors.

The boxes used for breeding were made of wood, wire screens and glass. They presented fixed components which generated corners of difficult access, allowing the development of bacteria, parasitic worms, protozoa and fungus, thus demanding an enormous expenditure of energy and time to hygiene and clean and, consequently, more labour was required.

Nevertheless, for the snails' intensive breeding to be successfully adopted, it must be fully modified. This is the very objective of this study work, to improve the intensive breeding methodology carried out by the utilization of plastic containers aiming to improve the quality of the breeding environment and to reduce labour costs, mortality rate and the slaughter period time for the snails.

This study describes a new methodology wich considers mainly the physiology of these molluscs and can be used to breed different species of snails of economic interest and also represents the evolution of Brazilian

heliciculture, which started with the intensive breeding of ***Helix (Cornu) aspersa Müller, 1774*** and, more recently, the exotic African snail ***Achatina (Lissachatina) fulica (Bowdich, 1822)***.

The breeding of the African snail has been forbidden in Brazil, but this new methodology may and should be adopted by breeders in other countries and also by researchers for facilitates the handling and breeding of snails in laboratories with a scientific objective. The nationwide prohibition regarding the breeding and commercializing occurred, in fact, in 2005 with the Normative Instruction No. 73 from IBAMA (The Brazilian National Institute for the Protection of the Environment), which considered the African snail ***Achatina (Lissachatina) fulica (Bowdich, 1822)*** "not belonging to the native wildlife, thus, being an exotic invasive species/alien species, harmful to the native wildlife species, to the environment, to the agriculture and to public health, and authorizing the implementation of controlling, collecting and elimination steps" (THIENGO et.al., 2007 apud COLLEY, pg. 674, 2009).

## MATERIAL AND METHODS

The study was developed in April 2011 using 49 specimen of wild ***Achatina(Lissachatina) fulica (Bowdich, 1822)*** captured at the Campus of the Universidade Federal de Alagoas, in Maceió, without previous selection regarding weight, size or age.

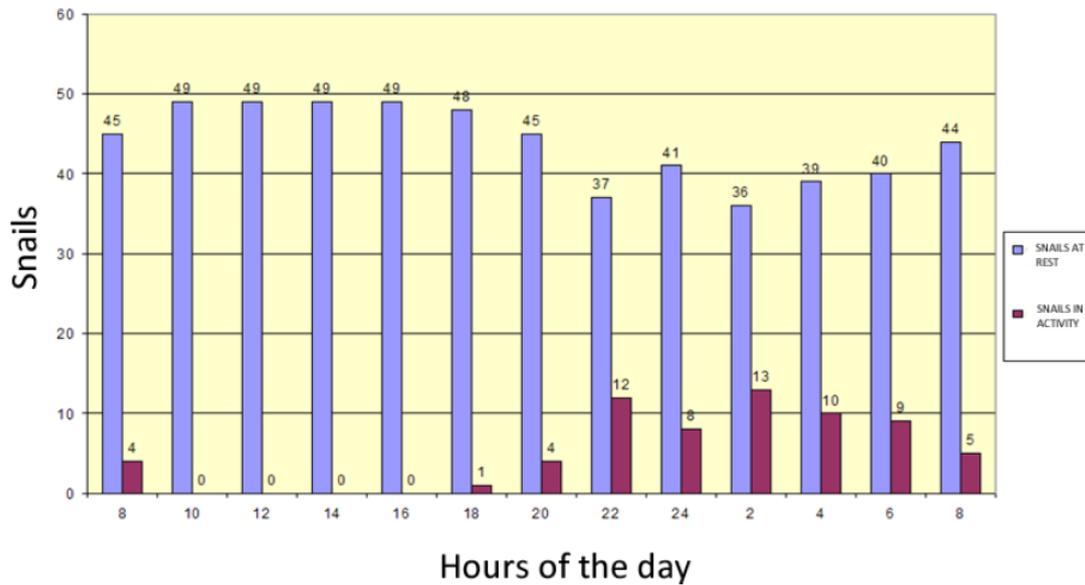


*Figs. 2 and 3. Set of super imposed boxes: closed (left) and opened (right), containing a support screen for feeding and drinking.*

The specimen were conditioned between two thermoplastic polypropylene boxes (recipients/containers), easily available in the market, with a circular format, measuring 49 cm in diameter and 22 cm in height, of yellow colour (*colour chosen for being clearer and more visible*), placed one on the top of the other and partially separated by a 2 mm steel mesh, used as a support to place the water and food like vegetables and greenery.

The animals were observed and monitored every two hours during a period of 24 hours.

### Physiological Activity of the wild *Achatina* in Plastic Boxes



### RESULTS AND ARGUMENTS

The obtained results during the monitoring of the 49 snails *A. fulica* are hereby presented in the graph, which shows that the resting hours preferred by the snails are in the daytime between 10h00 and 16h00; we can also observe that activity begins from 20h00 reaching a peak between 02h00 and 04h00.

*A priori*, the adoption of plastic boxes (recipients/containers), disposed one on top of the other, allows for the separation of the animals from the majority of their physiological dejects. During the day, between 10h00 and 16h00, whilst the snails are resting on the ceiling of the top box, the lower/bottom container filled with urine and faeces deposited by gravity during the night, can be duly cleaned and hygiene, together with the support screen, the feeding and drinking area. The top box containing the majority of the animals is then inverted being positioned in place of the bottom recipient, which has been removed for the cleaning process. On top of it, a new support screen is placed, a feeding area for new foodstuff, fresh vegetables and greenery, all cleaned and disinfected.

With regards to the actual breeding process of the animals, it is ideal to have for immediate substitution, another clean support screen for feeding and drinking, thus minimizing the stress for the animals. During the day, the person responsible for handling and breeding management of the animals should be very concerned with the cleaning of the breeding area, as well as the cleanliness of the utensils used for the handling and breeding management; the boxes, the screens, the eating and drinking

areas which, if possible, should be dried under the sun to obtain better hygiene. Moreover, it was found that the boxes' arrangement, one above the other, yield important results (Figs 2 and 3) since it allowed the separation of the snails from their physiological rejects, keeping them hygienic and less stressed.

## CONCLUSION

The adoption of this new system of intensive snails breeding presents a great number of advantages over the breeding in wooden boxes, particularly with regards to: the reduction of the period of time for growth until the slaughter time; reduction of losses due to bad weather conditions and attack of predators, as well as smaller physical space for high production rate.

The advantages of the new methodology intensive snail farming are:

- *Cost effective labour* in practice, the best time for the removal of the lower/bottom box for the cleaning step is between 17h00 and 18h00. Unfortunately this very period coincides with the end of the daily ordinary working hours. However, with the new handling and breeding management, the direct treatment for the animals has become much more practical and fast.
- *A perfect daily hygiene and cleanness of the area most contaminated of the set*, the lower/bottom box (recipient/container). The adoption of plastic boxes with a circular format and without sharp angles, makes it possible for a much more efficient and rapid disinfection. In the parasitological exams conducted, periodically, on the African snails breeding at the Federal University of Alagoas (UFAL = Universidade Federal de Alagoas), it hasn't observed the presence of any nematodes. Following the research carried out in 35 extensive breeding management French farms between 1984 and 1985, Cabaret et al. (1988) reported that the nematodes were the most frequently encountered parasites in the external breeding management parks occurring on soil. In young snails the ***Alloionema appendiculatum* (Schneider 1859)** was the most predominant species, whilst the ***Angiostoma aspersae* (Morand, 1986)** and the ***Nemhelix bakeri* (Morand & Petter)** were found, particularly in the reproductive stage of the snails.
- *Elimination of the main etiological agents* duly eliminated in the faeces (mainly worms and protozoa), besides the daily cleaning routine of the bottom/lower box associated with other forms of prophylaxis, allow us, practically, to eliminate the contamination of the animals without the use of disinfectants or medicaments.
- *The plastic boxes (recipients, containers) are cheaper* than the wooden boxes, as well as capable of recycling therefore ecologically correct,

allowing in its cleaning and hygiene the use of brushes, soap and even disinfectants whenever necessary, without leaving residues due to its imperviousness, thus avoiding the contamination of the animals when reutilized.

## OUR THANKS TO

Dra Marília Fonseca Goulart, my supervisor, who always supported me in an unrestricted way.

Dra Iracilda Maria de Moura Lima for revising the article and for the incentive for its publication.

Mr. Raimundo Carneiro de Oliveira for helping to count the animals during the time of the experiment.

Mr. Mario Antônio Mello and Geographer A. Ignacio Agudo-Padrón who translated this article.

## REFERENCES

- BERTRAN, Paulo. **História da Terra e do Homem no Planalto Central: Eco-história do Distrito Federal.** Available online at: <<http://www.pirenopolis.tur.br/cultura/historia> >. Access on: 01<sup>st</sup> of September 2011.
- CABARET, J., MORAND, S., AUBERT, C., YVORE, P.. **Snail farming: a survey of breeding management, hygiene and parasitism of the garden snail, *Helix aspersa* Müller.** Journal of Molluscan Studies, 54(2): 209-201, 1988.
- COSTA NETO, Eraldo Medeiros. **Os moluscos na zooterapia: medicina tradicional e importância clínico-farmacológica: medicina tradicional.** Biotemas, Florianópolis, 3(19): 71-78, 2006. Available online at: <<http://www.biotemas.ufsc.br/volumes/pdf/volume193/p71a78.pdf> >. Access on: 01<sup>st</sup> September 2011.
- COLLEY, Eduardo. **Avaliação dos problemas enfrentados no manejo do caramujo gigante africano *Achatina fulica* (Gastropoda: Pulmonata) no Brasil.** Zoologia, Curitiba, 26(4):674-683, 2009. Available online at: <<http://www.scielo.br/pdf/zool/v26n4/v26n4a12.pdf>> Access on: 30<sup>th</sup> August 2011.

## REDVET: 2012, Vol. 13 N° 2

Recibido 30.10.2011 / Ref. prov. MAR1117\_RED VET / Revisado 22.11.2011 / Aceptado 15.01.2012 / Ref. def. 021209\_RED VET / Publicado: 01.02.2012

Este artículo está disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n020212.html>

concretamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n020212/021209.pdf>

REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria está editada por Veterinaria Organización®. Se autoriza la difusión y

reenvío siempre que enlace con [Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org)® <http://www.veterinaria.org> y con REDVET®-

<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>