ADRIANA TARLÁ LORENZI

**Estudo colorimétrico e espectroscópico do muco de
caracóis *Achatina sp* alimentados com rações acrescidas
de plantas medicinais**

Pirassununga

2006

ADRIANA TARLÁ LORENZI

**Estudo colorimétrico e espectroscópico do muco de
caracóis *Achatina sp* alimentados com rações acrescidas
de plantas medicinais**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Nutrição Animal da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Medicina Veterinária

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de Concentração:

Nutrição Animal

Orientador:

Profa. Dra. Maria de Fátima Martins

Pirassununga

2006

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1756
FMVZ

Lorenzi, Adriana Tarlá
Estudo colorimétrico e espectroscópico do muco de caracóis *Achatina*
sp alimentados com rações acrescidas de plantas medicinais / Adriana
Tarlá Lorenzi. – São Paulo : A. T. Lorenzi, 2006.
107 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e
Reprodução Animal, 2006.

Programa de Pós-graduação: Nutrição Animal.
Área de concentração: Nutrição Animal.

Orientador: Profa. Dra. Maria de Fátima Martins.

1. *Achatina fulica*. 2. Escargots. 3. Espectroscopia Infravermelho.
4. Espectroscopia Raman. 5. Muco. 6. Plantas medicinais. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

PARECER

Interessado: Adriana Tarlá Lorenzi

Assunto: Protocolo de experimentação adotado em experimento animal.

A Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, após analisar o projeto sob o número 664/2005, intitulado: "Estudo colorimétrico e espectroscópico do muco de caracóis *Achatina sp* alimentados com rações acrescidas de plantas medicinais", utilizando 120 scargots, sob responsabilidade da Profa. Dra. Maria de Fátima Martins, constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de bioética, adotados por esta Comissão.

São Paulo, 19 de junho de 2006

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: LORENZI, Adriana Tarlá

Título: Estudo colorimétrico e espectroscópico do muco de caracóis *Achatina sp* alimentados com rações acrescidas de plantas medicinais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

"Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação, seja animal ou vegetal, ninguém precisará ensiná-lo a amar seu semelhante." - Albert Schweitzer
(Nobel da Paz - 1952)

*Dedico este projeto aos meus amados pais Luiz e
Carmen, e aos meus amados irmãos Fernanda, Luciana e
Marcelo, que são o alicerce da minha vida, o meu porto seguro.*

AGRADECIMENTOS

- Primeiramente a **Deus** pela oportunidade;
- Aos meus amados pais **Luiz** e **Carmen** que acreditaram, apoiaram e ampararam mais esta etapa da minha vida, possibilitando a continuidade da minha formação profissional e pessoal, sempre com muito amor e carinho;
- Aos meus amados irmãos **Fernanda**, **Luciana** e **Marcelo** pelo carinho, confiança e apoio em todos os momentos da minha vida;
- À professora e amiga **Dra. Maria de Fátima Martins** por todas as oportunidades, pela dedicação e carinho;
- À minha amiga **Gislaine C. Greghi** em especial, pois sem ela, esta conquista não teria sido possível; ao amigo **Otávio J. Sírío**, por todo apoio, e a todos os meus amigos que mesmo distantes, souberam colaborar;
- Ao meu noivo **Alexandre**, pela sua (im)paciência, pelo amor, respeito e pela compreensão, em todos os momentos vividos juntos;
- Ao meu sogro **Sr. José**, minha sogra **D. Elena** e aos cunhados **Valéria** e **Cláudio** pela compreensão e apoio;
- À colaboração de todos os professores do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ/USP, em especial o **Prof. Dr. Félix Ribeiro de Lima (*in memorian*)** e o **Prof. Dr. Paulo Henrique Rodrigues Mazza** pela oportunidade e compreensão, e a todos os funcionários;
- Ao **Prof. Dr. Júlio César de Carvalho Balieiro**, da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP de Pirassununga, por toda atenção e colaboração nas análises estatísticas;

- À **Profa. Dra. Carem Gledes Vargas Rechia**, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP de Ribeirão Preto, e a **Profa. Dra. Dalva Lúcia de Araújo Faria**, do Instituto de Química da USP de São Paulo, pela colaboração e apoio, possibilitando a execução de parte deste projeto;
- À **Profa. Dra. Mamie Misuzaki Iyomasa** e ao **Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira**, da Faculdade de Odontologia da USP de Ribeirão Preto por todo apoio, atenção e colaboração;
- Aos funcionários do Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP de Pirassununga, pelo auxílio nas análises bromatológicas;
- Aos funcionários do Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP de Ribeirão Preto, em especial à **Ieda**, ao **Fernando**, ao **Wagner** e ao **Alcides**;
- Aos funcionários do Laboratório de Química Orgânica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP de Ribeirão Preto;
- A **Empresa Natural Pharma** que tornou parte deste projeto possível pelo fornecimento de matéria-prima Papaína Pó e Centella asiatica Pó;
- A **Empresa Yod Produtos Químicos** pelo fornecimento de Confrei Pó, tornando possível parte deste projeto;
- A **Empresa Santos Flora** que tornou parte deste projeto possível pelo fornecimento de matéria-prima Confrei Pó;
- A todos que me acolheram nesta cidade que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste projeto;
- Àqueles que duvidaram obrigada, pois de vocês obtive a força e a garra para completar mais esta etapa da minha vida.

Aproveito a oportunidade para deixar aqui registrado a minha admiração e consideração por uma pessoa maravilhosa que surgiu na minha vida, meio no inesperado, mas que muito me ensinou. Uma pessoa muito especial, que sempre acreditou na minha capacidade e na minha dedicação por todas as coisas, e principalmente, confiou.

Por muitas vezes nos desentendemos, mas nunca nos desrespeitamos pessoal nem profissionalmente. Houve sempre muito carinho e respeito desde o momento em que lapidamos todas as arestas que nos impediam de caminharmos juntas, para um mesmo objetivo.

Sabe-se o quanto é difícil conviver com as pessoas, mas basta ter persistência, bom senso, dedicação e respeito que vencemos estas diferenças. E não poderia ser diferente o início de nossa convivência. Mas, vencemos! Conquistamos os nossos espaços, os nossos limites. E assim,

permanecerá sempre em meu coração!

*E esta pessoa tão especial a que me refiro, é você, minha querida mestra e amiga, **Professora Dra. Maria de Fátima Martins!***

Muito obrigada por tudo, por todas as oportunidades, por todas as palavras e por todos os gestos.

RESUMO

LORENZI, A. T. **Estudo colorimétrico e espectroscópico do muco de caracóis *Achatina sp* alimentados com rações acrescidas de plantas medicinais.** [Colorimetric and spectroscopic study of mucus of *Achatina sp* snails fed with increased rations of medicinal plants]. 2006. 107 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2006.

Os caracóis terrestres pertencem às famílias *Achatinidae* (África) e *Helicidae* (Europa). A espécie mais conhecida é a *Achatina fulica* (Gigante africano), sendo a mais recomendada para as regiões tropicais e subtropicais devido a sua capacidade de adaptação a estes climas. O muco de caracóis terrestres *Achatina sp* tem sido pesquisado devido sua atividade cicatrizante, além da atividade antibacteriana. A suplementação (plantas com finalidades cicatrizantes definidas como: confrei, papaína e centelha asiática nas rações destes animais) teve o propósito de caracterizar a composição glicoproteica do muco, considerando o bem-estar do animal, haja vista que os mesmos não foram sacrificados. Fez-se uso de uma metodologia envolvendo a coleta através de estímulo manual da glândula podal, responsável pela secreção do muco. Metodologia esta divergente de alguns autores que fizeram uso de estímulo elétrico com corrente elétrica nos animais para a coleta do muco, método este que vai contra os propósitos de bem-estar animal. Este estudo, além de utilizar uma metodologia menos drástica e prejudicial aos animais, permitiu que os mesmos retornassem ao seu ambiente de criação. As análises realizadas por testes colorimétricos e espectroscópicos, constataram que as alterações apresentadas nos testes foram muito semelhantes; no entanto,

mostraram uma variação significativa na composição glicoproteica dos mucos analisados.

Palavras-chave: *Achatina fulica*. Escargots. Espectroscopia Infravermelho. Espectroscopia Raman. Muco. Plantas medicinais.

ABSTRACT

LORENZI, A. T. **Colorimetric and spectroscopic study of mucus of *Achatina sp* snails fed with increased rations of medicinal plants**. [Estudo colorimétrico e espectroscópico do muco de caracóis *Achatina sp* alimentados com rações acrescidas de plantas medicinais]. 2006. 107 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2006.

The terrestrial snails belong to the families *Achatinidae* (Africa) and *Helicidae* (Europe). The most known species is the *Achatina fulica* (Giant African), being the most recommended for the tropical and subtropical regions due its capacity of adaptation to these climates. Mucus of terrestrial snails *Achatina sp* has been searched had its wound healing activity, beyond the antibacterial activity. The supplementation (plants with defined wound healing purposes as comfrey, papain and centella asiatic in the rations of these animals) had the intention to characterize the glycoprotein composition of mucus, considering well-being of the animal, since the same ones had not been sacrificed. Using a methodology holding the collection through manual stimulation of the pedal, responsible gland for the secretion of mucus. This methodology is divergent of some authors who had used electric stimulation with electric current on the animals for the collection of mucus, method contrary to the intentions of animal well-being. This study, beyond using a less drastic and harmful methodology to the animals, allowing that the same ones returned to its own creation environment. The analyses carried through for color and spectroscopy tests, evidenced that the alterations presented in the tests had been very similar;

however, showed a significant variation in the glycoproteic composition of the analysed mucus.

Key words: *Achatina fulica*. Infrared spectroscopy. Medicinal plants. Mucus. Raman spectroscopy. Scargots.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Rações desenvolvidas para o tratamento dos grupos experimentais	58
Figura 2 –Extração do muco dos caracóis <i>Achatina fulica</i>	61
Figura 3 – Extração do muco dos caracóis <i>Achatina monochromatica</i>	61
Figura 4 –Diferença de volume do muco extraído dos caracóis <i>Achatina fulica</i> , pertencentes aos grupos experimentais de I a IV	61
Figura 5 – Diferença de volume do muco extraído dos caracóis <i>Achatina monochromatica</i> , pertencentes aos grupos experimentais de V a VIII.....	61
Figura 6 – Coloração do muco coletado dos grupos de I a IV, pertencentes à espécie <i>Achatina fulica</i>	70
Figura 7 – Coloração do muco coletado dos grupos de V a VIII, pertencentes à espécie <i>Achatina monochromatica</i>	70
Figura 8 – Espectro Infravermelho do Grupo I – <i>Achatina fulica</i> – Controle.....	82
Figura 9 – Espectro Infravermelho do Grupo II – <i>Achatina fulica</i> – Centelha asiatica.	82
Figura 10 –Espectro Infravermelho do Grupo III– <i>Achatina fulica</i> – Papaína.....	83

Figura 11 –Espectro Infravermelho do Grupo IV – <i>Achatina fulica</i> – Confrei	83
Figura 12 – Espectro Infravermelho do Grupo V – <i>Achatina monochromatica</i> – Controle	83
Figura 13 – Espectro Infravermelho do Grupo VI – <i>Achatina monochromatica</i> – Centelha asiática.	83
Figura 14 – Espectro Infravermelho do Grupo VII – <i>Achatina monochromatica</i> – Papaína.....	84
Figura 15 – Espectro Infravermelho do Grupo VIII – <i>Achatina monochromatica</i> – Confrei	84
Figura 16 – Espectro Raman dos grupos experimentais pertencentes à espécie <i>Achatina fulica</i> – grupos de I a IV	86
Figura 17 – Espectro Raman dos grupos experimentais pertencentes à espécie <i>Achatina monochromatica</i> – grupos de V a VIII.	86

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Comportamento da espécie <i>Achatina fulica</i> frente às diferentes rações ofertadas aos grupos experimentais.....	72
Gráfico 2 – Comportamento da espécie <i>Achatina monochromatica</i> frente às diferentes rações ofertadas aos grupos experimentais	73
Gráfico 3 – Variação das concentrações de açúcares totais e proteínas presentes no muco de caracóis terrestres <i>Achatina fulica</i> dos grupos I (controle), II (Centelha), III (Papaína) e IV (Confrei).....	73
Gráfico 4 – Variação das concentrações de açúcares totais e proteínas presentes no muco de caracóis terrestres <i>Achatina monochromatica</i> dos grupos V (controle), VI (Centelha), VII (Papaína) e VIII (Confrei)	76
Gráfico 5 – Diferença no teor de açúcares totais presente no muco dos caracóis terrestres <i>Achatina sp</i> pertencentes a cada um dos grupos experimentais.....	78
Gráfico 6 – Diferença no teor de proteínas presente no muco dos caracóis terrestres <i>Achatina sp</i> pertencentes a cada um dos grupos experimentais.....	80
Gráfico 7 – Variação da relação carboidratos - proteínas presente no muco de caracóis <i>Achatina fulica</i> e <i>Achatina monochromatica</i> , frente as diversas rações administradas aos animais.	85
Gráfico 8 – Variação da relação proteínas - carboidratos presente no muco de caracóis <i>Achatina fulica</i> e <i>Achatina monochromatica</i> , frente as diversas rações administradas aos animais	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –Subdivisão dos grupos experimentais das duas espécies estudadas. Pirassununga, 2006	57
Tabela 2 –Relação dos ingredientes que constituem as diferentes rações (1 a 4) ofertadas aos grupos experimentais (I a VIII) das espécies <i>Achatina fulica</i> e <i>Achatina monochromatica</i> , durante todo o período experimental (150 dias). Pirassununga, 2005/2006	58
Tabela 3 –Relação da composição bromatológica das diferentes rações ofertadas aos grupos experimentais (rações 1 a 4), realizadas no Laboratório de Bromatologia, FMVZ/USP. Pirassununga, 2006	59
Tabela 4 –Relação de peso e volume do muco de caracóis <i>Achatina sp</i> desidratado. Ribeirão Preto, 2006	65
Tabela 5 –Relação do peso inicial (P_i), P_{30} , P_{60} , P_{90} , P_{150} dias dos grupos de I a VIII dos caracóis <i>Achatina fulica</i> e <i>Achatina monochromatica</i> . Pirassununga, 2006	68
Tabela 6 –Relação do volume de muco coletado e o número de animais de cada um dos grupos experimentais das espécies <i>Achatina fulica</i> e <i>Achatina monochromatica</i> . Pirassununga, 2006	69
Tabela 7 –Estatística descritiva para o período experimental. Pirassununga, 2006.....	70
Tabela 8 –Equações de regressão para a espécie <i>Achatina fulica</i> nas quatro diferentes rações avaliadas. Pirassununga, 2006	71

Tabela 9 –Equações de regressão para a espécie <i>Achatina monochromatica</i> nas quatro diferentes rações avaliadas. Pirassununga, 2006.....	72
Tabela 10 –Relação das proteínas e dos açúcares totais presentes no muco de caracóis <i>Achatina fulica</i> nas diferentes rações ofertadas. Ribeirão Preto, 2006.....	74
Tabela 11 –Relação das proteínas e dos açúcares totais presentes no muco de caracóis <i>Achatina monochromatica</i> nas diferentes rações ofertadas. Ribeirão Preto, 2006	74
Tabela 12 –Médias das concentrações de açúcares totais do muco de <i>Achatina fulica</i> e <i>Achatina monochromatica</i> em função das quatro diferentes rações avaliadas. Ribeirão Preto, 2006	77
Tabela 13 –Médias das concentrações de proteínas do muco de <i>Achatina fulica</i> e <i>Achatina monochromatica</i> em função das quatro diferentes rações avaliadas. Ribeirão Preto, 2006	79

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DA LITERATURA	30
2.1	Considerações gerais sobre o muco dos caracóis terrestres <i>Achatina sp.</i>	30
2.1.1	Origem dos moluscos.....	30
2.2	O muco de caracóis terrestres <i>Achatina sp</i> como agente cicatrizante e antibacteriano.....	36
2.3	Atividade do muco de caracóis terrestres <i>Achatina sp</i>	38
2.4	A ração base utilizada nos tratamentos dos caracóis terrestres <i>Achatina sp.</i>	40
2.5	Plantas medicinais com atividade cicatrizante adicionadas à ração base dos caracóis terrestres <i>Achatina sp</i>	42
2.5.1	Centelha (<i>Centella asiatica</i>)	44
2.5.2	Papaína (<i>Carica papaya</i>)	45
2.5.3	Confrei (<i>Symphytum officinale</i> L.)	47
2.6	Os testes colorimétricos para análise do muco dos caracóis terrestres <i>Achatina sp.</i>	48
2.7	O uso de técnicas de espectroscopia para análise do muco de caracóis terrestres <i>Achatina sp.</i>	49
2.7.1	A espectroscopia em Infravermelho.	49
2.7.2	A espectroscopia Raman.	52

3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	56
3.1	A seleção dos caracóis terrestres <i>Achatina sp.</i>	56
3.2	Preparo das rações a serem utilizadas nos tratamentos propostos.	56
3.2.1	Efeito da densidade populacional sobre o desenvolvimento de caracóis terrestres.....	60
3.3	A obtenção do muco dos caracóis terrestres <i>Achatina sp.</i>	61
3.4	Análises colorimétricas do muco dos caracóis terrestres <i>Achatina fulica</i> e <i>Achatina monochromatica</i>	62
3.4.1	Dosagem de açúcares totais.....	63
3.4.2	Dosagem de proteínas.....	63
3.5	Análise do muco dos caracóis terrestres <i>Achatina sp</i> através das técnicas de espectroscopia.	64
3.5.1	Espectroscopia em Infravermelho.....	65
3.5.2	Espectroscopia Raman.	65
3.6	Análise estatística.	66
4	RESULTADOS.	68
4.1	Relação do ganho de peso dos grupos experimentais.....	68
4.2	Retirada do muco dos caracóis terrestres <i>Achatina sp.</i>	69
4.3	Análise do desempenho das rações em função do período experimental.....	70
4.4	Análises colorimétricas do muco dos caracóis <i>Achatina sp.</i>	74

4.5	Análise estatística do teor de açúcares totais presente no muco de cada um dos grupos experimentais <i>Achatina sp</i> em relação à ração ofertada.	77
4.6	Análise estatística do teor de proteínas presente no muco de cada um dos grupos experimentais <i>Achatina sp</i> em relação à ração ofertada aos animais.	78
4.7	Análises em espectroscopia dos mucos dos caracóis <i>Achatina sp</i>	80
4.7.1	Espectroscopia em Infravermelho.	80
4.7.1.1	Relação carboidrato – proteína.	84
4.7.2	Espectroscopia Raman.	85
4.7.2.1	Relação proteína – carboidrato.	87
5	DISCUSSÃO	90
5.1	Análise do desempenho das rações em função do período experimental.	90
5.2	Retirada do muco dos caracóis terrestres <i>Achatina sp</i>	90
5.3	Análises colorimétricas do muco dos caracóis <i>Achatina sp</i>	91
5.4	Análise da espectroscopia em Infravermelho e Raman dos mucos dos caracóis terrestres <i>Achatina sp</i>	92
5.4.1	Relação carboidrato – proteína (Espectros Infravermelho).	93
5.4.2	Relação proteína - carboidrato (Espectros Raman).	94
6	CONCLUSÃO	97
	REFERÊNCIAS	99

1 INTRODUÇÃO

Os caracóis terrestres são herbívoros e comestíveis, pertencentes às famílias *Achatinidae* (África) e *Helicidae* (Europa). A espécie mais conhecida é a *Achatina fulica* (Gigante africano), sendo a mais recomendada para as regiões tropicais e subtropicais devido a sua capacidade de adaptação a estes climas (PACHECO; MARTINS, 1998). No Brasil, as regiões de cerrado são aquelas que podem apresentar maior potencialidade para uma heliocultura tropical extensiva, devido a suas características climáticas, sociais e econômicas (MARTINS et al., 2000).

O caracol *Achatina fulica* caracteriza-se por ser uma espécie rústica que tem a carne mais escura do que a espécie européia e melhor adaptação ao clima tropical brasileiro e possui alta produtividade, podendo ter seis posturas ao ano, com uma média de 300 ovos a cada postura, e abate, aos 90 dias de idade. Sua carne é constituída de 32% proteína e 0,5% gordura, além de possuir cálcio, ferro, zinco e um pH alcalino, o que segundo Iguchi, Aikawa e Matsumoto (1982), pode ser adequado ao tratamento de úlceras, caracterizando propriedades terapêuticas a sua carne.

Acredita-se que os caracóis *Achatina fulica* tenham sido introduzidos no Brasil por volta de 1988, no Paraná, por criadores de escargot europeu (*Helix aspersa*), pelo fato de acreditarem que a introdução desta espécie de caracóis *Achatina fulica* seria uma alternativa viável economicamente, pois são animais que se reproduzem intensamente, com rápido crescimento e fornecem mais carne do que os caracóis *Helix aspersa*. Vários cursos foram ministrados por criadores, propagando também a

venda de matrizes destes caracóis. No entanto, os consumidores não apreciaram o sabor, a textura e o aspecto da carne deste novo caracol. O que seria uma alternativa viável tornou-se inviável devido a rejeição do mercado de *Achatina fulica*; porém, os animais apresentaram uma proliferação desordenada e mantiveram seu processo reprodutivo, fato este, que passou a proporcionar gastos excessivos aos proprietários, que frente a esta problemática e ao desconhecimento da biologia dos caracóis, agiram de forma catastrófica no meio ambiente, ou seja, jogaram estes animais na natureza de forma inconseqüente em rios, matas, terrenos baldios ou mesmo colocando-os no lixo. Estes animais, associados à alta adaptabilidade ao ambiente, extremamente resistentes a longos períodos de seca, suportando grandes variações climáticas, alimentando-se de diversas plantas e elevados níveis de umidade relativa, não encontraram dificuldades em território brasileiro para crescer e multiplicarem-se intensamente. Toda esta problemática levou o IBAMA a proibir, no Estado de São Paulo (Lei Estadual 11756, de 1º de julho de 2004, escrita pelo deputado estadual Fausto Figueira), a comercialização e a criação destes animais para estes fins, exceto aos animais criados em cativeiro para fins de pesquisa, como é o caso desta (CAETANO, 2005; IBAMA, 2006).

Além das propriedades da carne, o caracol terrestre *Achatina sp* produz uma secreção mucoglicoprotéica já pesquisada por Martins et al. (2000, 2002) e Sírío (2005), à qual é composta por uma mistura de materiais provenientes de diversas glândulas e exudato geral das células epiteliais que são glicoproteínas de alto peso molecular, contendo duas subunidades idênticas e proteínas chamadas de **Achacin**, que possuem algumas propriedades bioquímicas; e, segundo Obara et al., 1992, existem nos moluscos dois tipos de grupos de reação de defesa: uma celular e outra

mediada por fatores de defesa humoral. A primeira envolve a fagocitose de partículas estranhas e o encapsulamento de materiais estranhos. Já, a segunda, envolve lisozimas, como proteínas, lectinas, fatores antibacterianos ou antivirais e opsonização.

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 escargot *Achatina fulica* e *Achatina monochromatica* (MARTINS et al., 2000, 2002), muitas questões estão sendo revisadas e indagações suscitadas, com vistas às aplicações terapêuticas e cosméticas utilizadas desde os primórdios da humanidade e, concomitantemente, a França e a Alemanha 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 (PONS et al., 1998).

O muco liberado pelos moluscos é um fluido viscoelástico resultante da mistura da secreção de várias glândulas e apresenta entre outras funções: veículo de transporte de partículas da superfície ciliada, secreção de produtos, transferência de água e eletrólitos através da epiderme, auxílio na locomoção (IGUCHI et al., 1982), sendo que a principal função da secreção glicoprotéica envolve a proteção do corpo do animal contra desidratação (SÍRIO, 2005).

O muco dos caracóis terrestres é constituído de uma matriz polimérica que produz longas cadeias de glicoproteínas, chamadas **mucinas**. O mecanismo molecular, liberado do aparato secretório, controla o estoque de mucinas dentro da célula secretora. Segundo Verdugo et al. (1987), a compreensão do mecanismo molecular que controla a estrutura e a função do muco tem provado ser um poderoso critério para a pesquisa do muco; assim, como a utilização de plantas com finalidades medicinais para tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), planta medicinal é todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos (VEIGA JR; PINTO; MACIEL, 2005).

Baseado em uma associação que propiciasse novos conhecimentos e perspectivas para o estudo deste muco secretado por caracóis *Achatina sp*, foram utilizadas plantas com finalidades cicatrizantes definidas como confrei, papaína e centelha asiática.

Os métodos colorimétricos são utilizados para determinação quantitativa, em micro-gramas (μg), de açúcares presentes em determinada amostra, incluindo também as análises para a determinação de proteínas (DUBOIS et al., 1956). Essas metodologias envolvem reações sensíveis e de coloração estável. São métodos simples, rápidos e sensitivos, nos fornecendo dados reproduzíveis que também foram utilizados nesta pesquisa. As técnicas de espectroscopia de Infravermelho e Raman também foram utilizadas e são duas das ferramentas mais comuns para a identificação de compostos orgânicos e inorgânicos. Seu uso para a análise do

muco de gastrópodes representa uma nova aplicação destas técnicas tendo por base que o muco, em geral, é utilizado como agente protetor de células da superfície expostas ao ambiente externo e é crucial para a defesa e locomoção dos caracóis (SKINGSLEY; WHITE; WESTON, 2000).

Apesar da importância do muco, cuja produção e secreção é de pelo menos 30% dos metabólitos expandidos nos moluscos, pouco é conhecido sobre sua composição bioquímica independente do conteúdo das bases químicas. São carentes as pesquisas a respeito das macromoléculas secretadas pelos pés dos moluscos, que conferem propriedades reológicas ao muco. Os principais candidatos para a formação do gel de macromoléculas pouco descritos no muco dos moluscos são as longas glicoproteínas, com a estrutura das proteoglicanas e as de longas cadeias de O-glicosídicos ligados a pequenos centros de peptídeos. Ainda que haja uma escassez de disponibilidade bioquímica, outra família de longos carboidratos, rica em glicoproteínas, é tida como forma estrutural de géis de muco de moluscos. Esta é a secreção de glicoproteína mucina (BALLANCE et al., 2004).

Com base em informações da literatura e em trabalhos desenvolvidos no Helicário Experimental da FMVZ/USP, com parcerias existentes nas Faculdades de Odontologia e Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, na cidade de Ribeirão Preto/SP, esta pesquisa teve como objetivos específicos a análise bioquímica e nutricional de caracóis terrestres, fazendo uso de testes colorimétricos e espectroscopia de Infravermelho e Raman, do muco de caracóis *Achatina fulica* e *Achatina monochromatica*, que receberam rações diferenciadas, acrescidas de

plantas medicinais com propriedades cicatrizantes como já mencionado anteriormente.

Tais premissas são base para o desenvolvimento desta pesquisa e motivação para que este tipo de estudo germine e prolifere para a elaboração de fármacos e cosméticos para utilização em tratamentos em animais e humanos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Considerações gerais sobre o muco dos caracóis terrestres *Achatina SP.*

2.1.1 Origem dos moluscos

Os moluscos são animais invertebrados que constituem um filo distinto e particular destituído de semelhança ou afinidade filogenética com qualquer outro grupo vivo. O filo *Mollusca* possui uma abundância de espécies, cerca de 100.000 espécies vivas, constituindo o segundo maior filo animal. Sucesso este atribuível à extrema plasticidade e adaptabilidade do plano básico corporal. Os moluscos podem ser encontrados no mar, na água doce e na terra e, devido a sua imunidade natural, formada pelas barreiras de proteção anatômica e química que previnem danos aos tecidos básicos, perda de fluido corporal e infecções por microorganismos patógenos e parasitas, obtiveram grande sucesso adaptativo e reprodutivo. A principal barreira física é a concha e o muco que envolve todo o corpo do animal (BARNES; CALOW; OLIVE, 1995).

Possuem uma longa história evolutiva, graças à concha calcária facilmente preservada. Os primeiros moluscos com concha calcária apareceram no registro fóssil durante a chamada Explosão do Cambriano, quando fósseis de animais apareceram pela primeira vez (cerca de 540 milhões de anos atrás). Presumivelmente, eles foram precedidos por espécies sem concha do pré-cambriano superior que não deixaram registros (período entre o surgimento da terra, 4,5 bilhões de anos atrás, e o surgimento dos fósseis, 540 milhões de anos atrás).

São principalmente marinhos, e todas as sete classes (*Aplacophora*, *Polyplacophora*, *Monophaconophora*, *Gastropoda*, *Cephalopoda*, *Bivalvia* e *Scaphopoda*) estão presentes e melhores adaptados em ambientes marinhos. Alguns bivalves e gastrópodes são encontrados em habitats de água doce, mas somente os gastrópodes estão presentes na terra. Todas as sete classes principais de moluscos vivos compartilham um plano corpóreo básico comum, mas cada um modificou um ou mais aspectos desse padrão básico, de um modo característico da classe pertencente. Por isso, nenhum deles, em particular, representa completamente esse plano corpóreo básico e nenhum pode ser considerado modelo de Mollusca (RUPPERT; FOX; BARNES, 2005). Os caracóis terrestres *Achatina sp*, motivo deste estudo, pertencem à classe dos gastrópodes terrestres.

Segundo Ruppert e Barnes (1996), um molusco terrestre é um animal que se move e se alimenta na superfície de um substrato duro. Seu corpo é assimétrico, com alguns centímetros de comprimento e uma forma um pouco ovóide. Sua superfície ventral é achatada e muscular formando uma sola rastejante, denominada pé. A superfície dorsal é coberta por uma concha oval, convexa e em forma de escudo, que protege os órgãos internos subjacentes ou massa visceral. A epiderme subjacente (manto) secreta a concha do animal e a secreção mais ativa ocorre ao redor da borda do manto. Conseqüentemente, a concha aumenta de diâmetro e de espessura ao mesmo tempo.

O registro fóssil dos gastrópodes tem início no período Cambriano inferior (cerca de 540 milhões de anos atrás) e se estende até o presente. Nenhuma outra classe de moluscos experimentou a extraordinária irradiação adaptativa constatada nos gastrópodes durante esse período. Originam-se do mar, mas colonizaram a água doce e são os únicos moluscos encontrados em habitats terrestres (RUPPERT;

FOX; BARNES, 2005). Os gastrópodes se originaram quando um ancestral monoplacóforo sofreu torção, um giro radical de 180° da massa visceral em sentido anti-horário em relação à cabeça e ao pé, de maneira que a cavidade do manto ocupou uma posição anterior e, o ânus e os rins, por conseguinte, desembocam anteriormente. Todos denotam algum grau de torção e, conseqüentemente, dela advindas sendo esta a única característica unificadora da classe. O familiar corpo torcido, enrolado em espiral e assimétrico dos gastrópodes evoluiu a partir de uma série de processos seqüenciais, cada qual contribuindo com uma característica essencial para o plano corpóreo geral. Os processos são: alongamento da concha para torná-la um refúgio portátil, dobramento do tubo digestivo, enrolamento plano - espiral, torção, enrolamento cone - espiral e assimetria (BARNES; CALOW; OLIVE, 1995; RUPPERT; FOX; BARNES, 2005).

A classe gastrópoda constitui um grupo muito grande, com cerca de 60 mil espécies de gastrópodes viventes descritas, e outros 15 mil fósseis conhecidos e diversificados. São caramujos aquáticos, caracóis e lesmas terrestres e a classe inclui uma enorme diversidade destes animais (RUPPERT; FOX; BARNES, 2005). Muitos dos gastrópodes pertencem em especial à subclasse *Pulmonata*, ordem *Stylommatophora*, onde se encontram os pulmonados ditos superiores, compreendendo os gêneros terrestres *Achatina*, *Helix* e *Bulimulus*. Os pulmonados são caracterizados, principalmente, pela conversão da cavidade do manto em um pulmão respiratório, com uma abertura contrátil, o pneumostômio. A maioria se alimenta de plantas terrestres e todos eliminaram o estágio larval, desenvolvendo-se diretamente em lesmas ou caracóis jovens. O gênero *Achatina*, que é o motivo deste estudo, pertence à família *Achatinidae* (África) e são animais lentos, intimamente associados ao substrato, mas que, apesar desta condição, apresentam uma notável

capacidade de irradiação adaptativa que reflete no tipo da concha, nos tipos de alimentação e na especialização de diversos microhabitats e nichos. Muitos pulmonados retiveram a concha helicoidal típica dos gastrópodes, embora ela seja geralmente mais fina (BARNES; CALOW; OLIVE, 1995).

A locomoção dos moluscos pode ser conseguida através da combinação de ondas progressivas (ondas pedais) da superfície ventral do pé, juntamente com a secreção do muco viscoso na superfície. O muco consiste em aproximadamente 93% da água e em 7% da glicoproteínas. O movimento dos caracóis é obtido por peristaltismo fino, baseado na combinação da contração sinuosa do músculo da superfície ventral, com as ondas dos músculos pedal e de superfície ventral (KOBAYASHI; YAMAMOTO; AOYAMA, 2002).

A pele representa a interface entre o meio externo e o interno de um animal. Em muitos moluscos, a epiderme está envolvida na troca respiratória, no fluxo de água e, provavelmente, na regulação iônica. É bastante innervada e contém um número de órgãos sensitivos de grande importância para seu contato com o meio externo. Estes animais se protegem com um muco e uma concha característicos. Muitos moluscos também secretam uma variedade de substâncias derivadas de ácidos de ésteres aromáticos e que podem atuar como protetores (SIMKISS; WILBUR, 1977).

As substâncias que os animais secretam através da superfície da pele não incluem apenas pequenas moléculas e íons livres, mas também uma ampla variedade de materiais na forma de barreiras. Engloba grânulos do muco de moluscos pulmonados, glóbulos gordurosos e produtos de secreção de glândulas, incluindo entidades hidrofóbicas (lipídeos, hidrocarbonetos), substâncias protetoras

(muco) e substâncias potencialmente prejudiciais (enzimas digestivas, toxinas) (DEYRUP-OLSEN; LUCHTEL, 1998).

A habilidade de secretar muco através da epiderme consiste numa propriedade particular dos caracóis. O muco é produzido em algumas regiões e é freqüentemente misturado a materiais advindos de glândulas juntamente com o exudato geral das células epiteliais. Considera-se, primeiramente, que a superfície ciliada é caracteristicamente coberta pelo muco que atua como um veículo para o movimento das partículas através do epitélio, e está relacionado com a função de locomoção propriamente dita do molusco. Sugere-se também que, a alta viscosidade do muco é produzida pelas glândulas suprapodais enquanto que a baixa viscosidade viria do enchimento das cavidades inferiores dos “pés”, causadas pela oscilação dos músculos (SIMKISS; WILBUR, 1977).

O corpo dos caracóis *Achatina fulica* é revestido por uma rica secreção mucoglicoprotéica que apresenta funções já identificadas como facilitador de seus movimentos e a prevenção de sua desidratação (IGUCHI et al., 1982). Além das importantes funções citadas, estudou-se também a presença de aglutinina que não apresenta aglutinação específica contra os eritrócitos humanos (MITRA; SARKAR; ALLEN, 1988).

Segundo Iguchi et al. (1982), os invertebrados não possuem organismo imunoespecíficos como os encontrados nos vertebrados. Esses invertebrados, possuem fatores de defesa que impedem a entrada de materiais estranhos. Para tal, o muco do molusco possui fatores antibacterianos que exibem atividades contra organismos gram-positivos e gram-negativos.

De acordo com Otsuka-Fuchino et al. (1992), os fatores de defesa nos moluscos são principalmente as reações de defesa celular e humoral, sendo que, na

primeira, envolvem fagocitose e, na segunda, englobam: lisozimas, lecitinas, fatores antibacterianos ou antivirais e opsonização. Em observação à atividade bactericida da glicoproteína (Achacin) presente no muco do caracol da espécie *Achatina fulica* e também na membrana citoplasmática e nas células da parede da bactéria *E.coli* por microscopia imunoeletrônica, foi observado que não houve qualquer atividade bacteriostática, apenas nos estágios de crescimento da bactéria. Segundo Ehara et al. (2002), a Achacin está intimamente ligada à fase de crescimento da bactéria, ou seja, uma função importante na fase dependente de crescimento antibacteriano e também pode atuar como uma defesa molecular contra a invasão bacteriana.

Os componentes humorais da imunidade dos moluscos são formados por atividade lisoenzimática, lectinas e o sistema feniloxidase, sendo que o mecanismo de defesa interno dos moluscos envolve reações celulares tais como: fagocitose, formação de nódulos, encapsulação, formação de pérola, atrofia, necrose e liquefação do tecido (GLINSKI; JAROSZ, 1997).

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 como carreadores médios aquosos. É produzido continuamente por uma série de glândulas que terminam na epiderme, sendo estas glândulas podais utilizadas na locomoção dos animais terrestres e aquáticos (SKINGSLEY; WHITE; WESTON, 2000).

Os caracóis terrestres *Achatina fulica* possuem uma proteína glicosaminoglicana (GAG) presente em seu corpo, chamada **Acharan sulfato**, 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. As proteínas proteoglicanas são macromoléculas complexas constituídas de um centro de proteínas e uma ou

mais ligações covalentes de cadeias de glicosaminas. A função primária das proteoglicanas resulta de cadeias de GAGs dominantes, estruturalmente originárias de um centro de proteínas da molécula. Os caracóis são ricos nestes polissacarídeos, comparados a outras espécies de animais que o possuem. Geralmente eles são encontrados na matriz extracelular dos vertebrados e nos tecidos dos invertebrados. Nestes, possuem uma variação incomum de distribuição de sulfato e ácido urônico (JEONG et al., 2001).

2.2 O muco de caracóis terrestres *achatina sp* como agente cicatrizante e antibacteriano

Desde a Antigüidade, há indícios do uso dos caracóis para “cura” de males estomacais, hidropisia e até em partos. Durante a Idade Média, a água da fervura destes animais era utilizada em afecções gastrointestinais, cataplasma, dores de garganta e bronquite. Há citações onde apontam tratamentos de úlcera gástrica através da ingestão de caracóis vivos (retirado das conchas), por um período de uma semana. Apesar disso, devemos notificar as diferenças entre o científico e as crenças. Existem indicadores que comprovam a ação terapêutica dos caracóis, tais como os aminoácidos encontrados nas proteínas da carne e no muco que auxiliam na reconstituição da integridade dos tecidos gástricos, e assim, o tratamento da úlcera. Aparentemente, o muco, característico dos caracóis da espécie *Achatina fulica* pode ser útil na prevenção da evaporação da umidade, o que os auxilia nos movimentos e protege o corpo de prejuízos mecânicos. No entanto, apesar da

fragilidade da estrutura e da condição de umidade do tecido cutâneo, os animais são claramente resistentes às infecções por microorganismos, o que indica a existência de um fator antibacteriano presente no muco. Essa atividade antibacteriana encontrada foi relatada para bactérias gram-positivas, tais como *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*; e para bactérias gram-negativas tais como *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* relativas às frações solúveis em água e mucínica. Essa atividade biológica foi designada pela metade da proteína mucina do muco (IGUCHI et al., 1982).

O muco liberado pelos moluscos é um fluido elástico resultante da mistura da secreção de várias glândulas, sendo que, suas principais funções são: agir como veículo de transporte de partículas da superfície ciliada; secretar produtos; transferir água e eletrólitos através da epiderme e auxiliar na locomoção. Alterações da pressão sangüínea permitem a liberação de muco na locomoção ou nas fibras musculares controladas nervosa ou endocrinamente e dispostas ao redor das glândulas que levam à liberação do muco quando contraem (CAMPION, 1961).

O muco do caracol da espécie *Achatina fulica* apresentou uma aglutinina (peso molecular de 70.000) que, não especificamente, é capaz de aglutinar os eritrócitos humanos. Em um estudo realizado por Mitra, Sarkar e Allen (1988), purificou-se a aglutinina presente no muco de caracóis *Achatina sp* por afinidade cromatográfica utilizando Sefarose 4B-hog mucina gástrica como matriz de afinidade. A homogeneidade foi checada pelo gel de poliacrilamida em eletroforese, imunodifusão, imunoeletroforese e filtração em gel. Os aminoácidos predominantes são ácido aspártico e o ácido glutâmico (ou amidas) e serinas, equivalente a 32% do total de aminoácidos residuais. Possuem 10% de carboidratos e o açúcar mais abundante é o N-acetilglucosamina.

Segundo Martins et al. (2000), feridas de animais tratados com formas do muco, liofilizado ou pomada, apresentaram processo de reparação mais precoce que quando comparado ao grupo controle, ou mesmo do grupo tratado com produto comercial.

O estudo piloto realizado por Iyomasa et al. (2002) revelaram histologicamente uma diferença na maturação do epitélio, em favor da aplicação da secreção mucosa sobre a área lesada, quando comparada ao controle.

O fator antibacteriano dos caracóis demonstrou grande atividade inibitória de crescimento tanto para bactérias gram-positivas quanto bactérias gram-negativas, ainda que a estrutura da parede celular seja diferente. Isso sugere que cada célula bacteriana é atacada por um fator antibacteriano que pode não estar localizado na parede celular, mas em algum outro local (KUBOTA et al., 1985).

2.3 Atividade do muco de caracóis terrestres *Achatina sp*

O caracol terrestre é responsável por um balanço entre a água contida nos tecidos musculares e a umidade do ambiente; por exemplo, quando o clima é seco, o caracol começa a desidratar-se para garantir o balanço. É capaz de absorver ou rejeitar água através da pele. Para realizar o balanço, o animal faz uso da hibernação se a temperatura estiver abaixo de 5°C; porém, pode morrer caso a temperatura esteja abaixo de 0°C – e seu período de maior atividade é durante a noite (SIMKISS; WILBUR, 1977).

O período de dormência dos caracóis terrestres ocorre em temperaturas abaixo de 17°C, chamado de hibernação, e também em temperaturas acima de

38°C, chamado de estiva. Ambos induzem os caracóis ao período de dormência. Tanto a hibernação quanto a estiva interfere no ciclo reprodutivo destes animais, bem como a maturidade e largura da concha e a postura dos ovos que, geralmente, é tardia e reduz o crescimento do tamanho e peso da concha. A hibernação e a estiva são características de uma inatividade provisória ocasionada por alterações fisiológicas dos caracóis - uma parada ao crescimento e a formação do epifragma por toda a abertura da concha, que se enrijece durante o período dormente, associado a uma reintegração refratária do crescimento e da atividade se o período dormente for interrompido artificialmente (ELMSLIE, 2001).

Os caracóis terrestres secretam, durante o período de dormência, um opérculo – chamado epifragma calcário – que atua como um dos principais mecanismos de preservação de água para os caracóis terrestres, em mais de 20% do controle de perda de água por evaporação durante este período. É utilizado também para proteger os caracóis de predadores e patógenos e, uma última função não menos importante para os caracóis durante este período de dormência, é a de que eles se enterram no solo com a boca da concha para baixo (STRUTHERS et al., 2002).

O muco, em geral, é utilizado como agente protetor de células da superfície expostas ao ambiente externo e é crucial para a defesa e locomoção dos caracóis. É produzido continuamente por uma série de glândulas que terminam na epiderme, sendo estas glândulas podais utilizadas na locomoção dos animais terrestres e aquáticos. Os moluscos produzem de 60 a 400µg de muco seco/hora/grama de peso corporal, que produz 24J/mg de peso. O muco expressa informações sobre o estado sexual dos animais e direção para locomoção (SKINGSLEY; WHITE; WESTON,

2000). E é também, freqüentemente misturado a materiais oriundos de glândulas juntamente com o exudato geral das células epiteliais (SIMKISS; WILBUR, 1977).

O muco secretado pelos moluscos é constituído de um hidrogel polimérico, que atua com uma capa protetora na superfície do tegumento e mucosa. A matriz polimérica do muco é produzida fora da longa cadeia de glicoproteínas (Mucinas) que são entrelaçadas juntas, formando um “trançado” ao acaso, trabalho altamente poliiônico. O muco dos caracóis *Achatina sp* possui alto poder de hidrofiliçidade, pois é capaz de absorver vapores d’água, que em equilíbrio com a atmosfera pode medir a função da umidade relativa (RH). A compreensão da funcionalidade do muco, inclusive a interação com o vapor d’água pode, conseqüentemente, comandar o significado do controle da reprodução dos caracóis, limitando seu impacto ao ambiente. O muco consiste em 90 a 99,7% de seu peso em água. O principal constituinte do muco gastrópoda é um complexo de proteínas e polissacarídeos. Esse complexo é usualmente classificado numa ampla categoria de mucopolissacarídeos e glicoproteínas (LINCOLN et al., 2004).

2.4 A ração base utilizada nos tratamentos dos caracóis terrestres *Achatina sp*

A ração base é produzida a partir de uma mistura de ingredientes em diferentes proporções e balanceadas para atender as exigências nutricionais dos animais. O objetivo de se formular rações é fornecer aos animais uma mistura de ingredientes que permita um bom desempenho evolutivo dos mesmos (OLIVEIRA,

2003). Para a produção das rações utilizadas nos tratamentos, fez-se uso de subprodutos industriais, ou seja, materiais de valor nutritivo para os animais, geralmente obtido ao final da colheita de alguma cultura ou após o processamento agro-industrial de algum produto destinado à alimentação humana. A utilização de subprodutos é uma alternativa de reduzir o custo da ração produzida (IMAIZUMI, 2005; PEREIRA, 2005).

A ração base utilizada nos tratamentos, consistiu-se em uma mistura de farelo de trigo, farelo de soja, farelo de milho e carbonato de cálcio. O farelo de trigo, um dos subprodutos da produção de farinha de trigo para consumo humano, é adequado para a alimentação animal por possuir 73 a 83% de NDT (nutriente digestível total), 35% de FDN (fibra em detergente neutro) e 17 a 18% de proteína bruta. Esta por sua vez, apresenta alta degradabilidade e o alimento, como um todo, apresenta alta degradabilidade inicial quando comparado com outros produtos. Pode conter alto teor de fibra e baixos níveis de amido em relação aos grãos de cereais (PEREIRA, 2005). O farelo de soja, outro subproduto da industrialização da soja, é rico em proteína que tem um papel importante na alimentação dos animais, pois é fonte verdadeira de proteína (FERNANDES, 2004). O farelo de milho é um subproduto obtido da moagem seca do milho. Consiste na mistura de embriões de milho, tegumentos e uma porção amilácea da semente. É rico em proteína e fibra. O farelo de milho amarelo possui uma grande quantidade de vitamina A (MORRISON, 1955). Constitui a principal fonte de energia para os animais (CARMO, 2005). O carbonato de cálcio, para os caracóis terrestres, é de fundamental importância em sua alimentação, por ser elemento essencial na formação da concha e demais elementos do corpo, assim como no controle da hidratação, reduzindo as perdas de água do corpo (BONNET et al., 1990). A sua disponibilidade está diretamente

relacionada à vitalidade, crescimento, reprodução e sobrevivência dos caracóis terrestres (COBBINAH, 1993). Pacheco e Martins (1996) constataram que os níveis de carbonato de cálcio tinham forte influência sobre o desempenho ponderal dos caracóis da espécie *Achatina fulica*, sendo que o nível que propiciaria maior ganho de peso seria de 25% na ração empregada.

2.5 Plantas medicinais com atividade cicatrizante adicionada à ração base dos caracóis terrestres *Achatina sp*

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza, muitas vezes, o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana. Ainda hoje, nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais. As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos. Em geral, a escolha de uma determinada planta medicinal é feita através da abordagem etnofarmacológica, ou seja, a exploração científica interdisciplinar dos agentes biologicamente ativos, tradicionalmente empregados ou observados pelo homem (ELISABETSKY, 2003). As plantas contêm inúmeros constituintes e, seus extratos quando testados, podem apresentar efeitos sinérgicos

entre os diferentes princípios ativos devido à presença de compostos de classe ou estruturas diferentes contribuindo para a mesma atividade (MACIEL et al., 2002).

As plantas, além de suas funções de equilíbrio no ambiente, podem também desempenhar papéis ornamentais e terapêuticos. Ao longo dos tempos, gerações transmitem ensinamentos sobre a flora e suas propriedades curativas; no entanto, o crescimento da indústria farmacêutica, a pressão dos meios de comunicação e o mito do progresso, como símbolo do moderno, provocaram o declínio das práticas populares da Medicina. A fitoterapia vem, com a retomada da consciência ecológica, despertando progressivamente o interesse na área da pesquisa e da saúde pública. A carência de informações científicas sobre plantas medicinais ou com potencial medicinal, tem levado cientistas a direcionarem suas pesquisas não somente em nível farmacêutico e químico, mas também em níveis fitotécnicos do crescimento, desenvolvimento e produção (CASTRO, 1999).

2.5.1 Centelha (*Centella asiatica*)

A *Centella asiatica* (L.) Urban pertence à família *Umbelliferae* (*Apiaceae*), originalmente encontrada na Índia e no Paquistão, ocorre em vários países, nas regiões tropicais e subtropicais, incluindo o Brasil (Minas Gerais, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e São Paulo). É um vegetal de porte herbáceo e de caule rasteiro, freqüentemente encontrado em gramados, pastagens, jardins e terrenos baldios. Foi usado por diversos séculos na Medicina tradicional da Índia e de países orientais como um tratamento para feridas cutâneas. Despertou o interesse no Brasil e no mundo devido as variadas formas em que é empregada na Medicina folclórica em tratamentos como: hanseníase, abscessos, queimaduras, distúrbios intestinais, eczema, entre outros. A análise cromatográfica desta planta identificou uma mistura de saponinas, onde se conseguiu isolar duas delas: o asiaticoside e madecassoside. O primeiro mostrou uma atividade promotora de cicatrização em feridas, enquanto que o madecassoside mostrou-se inativo. Em testes realizados *in vivo*, demonstrou-se que o asiaticoside poderia aumentar a força tênsil das feridas realizadas em ratos experimentais. A centelha mostrou promover a proliferação do fibroblasto e a síntese do colágeno. O extrato alcóolico da planta mostrou atividade significativa em processos de cicatrização de tecido cutâneo (FISCHER; KATO; SCHLEIER, 1995; MAQUART et al., 1999; SHUKLA et al., 1999).

A espécie vegetal centelha tem sido muito empregada na terapêutica e na cosmética, sendo amplamente comercializada. A droga, constituída de folhas e caules de centelha, apresenta comprovada ação cicatrizante. O odor da droga é aromático e característico, de sabor amargo, acre. O pó apresenta coloração bege-

esverdeada ou bege-amarelada, odor e sabor característicos da droga (FISCHER, KATO; SCHLEIER, 1995).

Em estudo realizado na Índia, observou-se os efeitos cicatrizantes da administração oral e tópica de extrato alcoólico de centelha em feridas dérmicas de camundongos. O extrato elevou a proliferação celular e a síntese de colágeno no local ferido, como foi evidenciado pelo aumento no DNA, proteínas e colágeno contidos nos tecidos granulares. Produtos naturais têm mostrado um bom potencial terapêutico como agente antiinflamatório e por promoverem a cicatrização devido a presença ativa de terpenos, alcalóides e flavonóides (SUGUNA; SIVAKUMAR; CHANDRAKASAN, 1996).

Foi demonstrado em um estudo realizado por Cheng et al. (2004) que o extrato aquoso de centelha e seu maior componente, o asiaticoside, acelerou o processo de cicatrização de úlcera gástrica, promoveu a angiogênese e facilitou o processo de proliferação epitelial.

2.5.2 Papaína (*Carica papaya*)

O mamoeiro é cultivado em países tropicais e seu fruto é apreciado pelo sabor, pela fácil digestão e pelos valores nutritivos. O mamão possui propriedades nutricionais e curativas excelentes. É rico em vitaminas A, B₁, B₂, B₆ e C e sais minerais como cálcio, fósforo e ferro. Seu látex (fruto verde) apresenta grande quantidade de uma enzima proteolítica – a **papaína**. Esta é caracterizada por ser uma mistura constituída de cisteína endopeptidase, tais como papaína EC, papaia endopeptidase II e IV, entre outras (MONETTA, 1987; MONTI; CONTIERO;

GOULART, 2004). A papaína possui um mecanismo de ação onde provoca a dissociação das moléculas de proteínas, resultando em um debridamento químico. Possui ação bactericida e bacteriostática, estimula a força tênsil da cicatriz e acelera a cicatrização (BRASIL, 2002).

Após a colheita do fruto, a maioria das mudanças bioquímicas que ocorrem, quantitativamente, envolve carboidratos. Uma das mais importantes alterações que ocorre durante a fase de maturação é o drástico aumento em seus conteúdos de açúcares (SANTANA; MATSUURA; CARDOSO, 2004).

Desde 1986 fala-se muito sobre a utilização da papaína no tratamento de lesões da pele. A papaína é uma mistura complexa de enzimas proteolíticas e peroxidases no látex do mamoeiro, conhecido popularmente como "leite do mamão" (MONETTA, 1990; NOGUEIRA; KITAMURA; AGUIAR, 2005). Segundo Medina (1980), a papaína é caracterizada por provocar, em doses diminutas, a proteólise, ou seja, a dissociação de uma quantidade importante de proteínas em moléculas mais simples e, finalmente, em aminoácidos.

A papaína é uma enzima proteolítica de origem vegetal, extraída do mamão verde, apresentada, após purificação, como um pó de cor leitosa, com odor forte e característico. É inativada ao reagir com agentes oxidantes como ferro, oxigênio, derivados do iodo, água oxigenada e nitrato de prata (SANCHEZ, 1993), e sofre influência do pH (pH ótimo = 5 a 8). É uma enzima de fácil deterioração, devendo sempre ser mantida em local fresco, seco, ventilado e protegido da luz (MARTINDALE, 1982).

O uso da papaína no tratamento de lesões da pele vem sendo testado há muitos anos e, experiências anteriores com tribos sul-africanas, utilizaram fatias de mamão verde como tratamento de uma deiscência cirúrgica, pós-transplante renal,

que não havia respondido a antibioticoterapia tradicional, e obteve-se sucesso em poucas aplicações (MONETTA, 1987).

A utilização da papaína em ferimentos cutâneos mostrou um alinhamento das fibras que compõem o colágeno e, conseqüentemente, um crescimento tecidual uniforme com um produto cicatricial mais plano, o que justifica o fato de se encontrarem cicatrizes planas (ausência de quelóides) nas lesões tratadas com papaína (MONETTA, 1990).

2.5.3 Confrei (*Symphytum officinale* L.)

O confrei é uma planta nativa da Europa e Ásia, embora, hoje, seja comum em todas as partes do mundo, inclusive no Brasil. Pertence à família *Boraginaceae*, possui em sua composição química os alcalóides pirrolizidínicos, além da alantoína, tanino e esteróides. Estes elementos, juntos, conferem à planta propriedades curativas como emoliente, calmante e consolidação de fraturas ósseas (BARROSO et al., 2002; SÍRIO, 2005).

O confrei é uma espécie que possui algumas particularidades de interesse, como produção contínua durante o ano todo, alta adaptabilidade a diferentes tipos climáticos, sendo de grande importância nas regiões temperadas. As folhas e, principalmente, as raízes e rizomas podem ser utilizados com finalidade medicinal, sendo muito empregado devido às suas propriedades cicatrizante e regeneradora de tecidos, atribuídos à alantoína, substância que atua como regeneradora de tecidos novos e sadios e, atividade anti-hemorrágica e antiinflamatória, propriedades estas

devido a presença de taninos e mucilagens. A alantoína é, quimicamente, considerada um produto de oxidação do ácido úrico (próprio de plantas do gênero *Symphytum*). Certos animais, exceto o homem, possuem a enzima ucrease que promove esta oxidação (CASTRO, 1999).

Os mecanismos farmacológicos do confrei são baseados na alantoína que é responsável pela estimulação da proliferação e da regeneração do tecido conectivo. As propriedades antiinflamatórias são mediadas, provavelmente, pelo ácido rosemarínico que também relata efeitos analgésicos e adstringentes. Estas propriedades não são transportadas completamente com a inibição do metabolismo do ácido araquidônico, mas parecem ser o resultado de ações inibitórias de extratos da planta sobre caminhos clássicos e alternativos da ativação do complemento (STICKEL; SEITZ, 2000).

2.6 Os testes colorimétricos para análise do muco dos caracóis terrestres

Achatina sp

Os testes colorimétricos consistem no estudo de uma substância, através de um reagente que produz uma coloração na solução, a qual é proporcional à concentração da substância presente nesta solução. Os métodos são aplicáveis para determinação de muitos metais, radicais e compostos orgânicos. As colorações são mensuradas através de colorímetros que utilizam bandas de raios visíveis não absorvidos pela solução (SNELL; SNELL, 1941).

Os açúcares são pequenas moléculas de carboidratos, solúveis em água, incluindo açúcares simples, tais como a glicose, frutose e ribose, açúcares um pouco mais complexos, como a maltose, lactose e sacarose, e os açúcares trissacarídeos, tais como a melitose. Muitos açúcares são unidades básicas na construção de compostos naturais (NOVA ENCICLOPÉDIA, 1996).

As análises realizadas por métodos colorimétricos são utilizadas principalmente para a determinação quantitativa, em micro-gramas (μg), de açúcares presentes em determinada amostra e também para a determinação de proteínas. Esses tipos de métodos envolvem reações sensíveis e de coloração estável. Em geral, são métodos simples, rápidos e sensitivos, fornecendo dados reproduzíveis (DUBOIS et al., 1956).

2.7 O uso de técnicas de espectroscopia para análise do muco de caracóis terrestres *Achatina sp*

As técnicas de espectroscopia utilizadas neste estudo foram: Espectroscopia em Infravermelho e Espectroscopia Raman. Estas duas metodologias são complementares entre si, fornecendo ao estudo resultados reproduzíveis.

2.7.1 A espectroscopia em Infravermelho

Uma das primeiras aplicações da espectroscopia de Infravermelho como ferramenta analítica, foi durante o período da Segunda Guerra Mundial. Na ocasião, esta técnica foi usada no setor de controle de qualidade em algumas indústrias químicas alemãs. Entretanto, este tipo de análise foi rapidamente substituído pela cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), devido ao fato destas ferramentas de análise viabilizarem a realização de determinações multicomponente quantitativas e qualitativas em amostras complexas de interesse industrial de maneira mais eficiente. Estas vantagens agregaram um alto valor à cromatografia, tornando-a rapidamente uma ferramenta padrão de análise para os mais diversos tipos de análises químicas. Contudo, sabia-se que os espectros de Infravermelho armazenavam uma grande gama de informações sobre a amostra e, portanto, apresentavam um elevado potencial para serem empregados nos mais diversos tipos de análises químicas e/ou físicas. Entretanto, até duas décadas atrás era praticamente impossível extrair informações quantitativas a partir dos espectros de Infravermelho. Devido a este fato, a espectroscopia de Infravermelho restringiu-se basicamente a aplicações qualitativas ou para reforçar hipóteses propostas sobre a estrutura química das espécies. Em meados dos anos oitenta, uma série de fatos nas áreas científicas e tecnológicas contribuíram para a inversão deste quadro. Dentre estes, podemos destacar o desenvolvimento da microeletrônica e a popularização dos microcomputadores que proporcionaram um significativo avanço nas análises instrumentais, possibilitando a aquisição de maneira fácil e rápida de um grande número de dados de uma mesma amostra. A crescente preocupação mundial com relação à questão ambiental é outro aspecto de grande relevância que tem incentivado o desenvolvimento e aperfeiçoamento das análises espectroscópicas de Infravermelho. Estas análises, além de fornecerem os

resultados de maneira mais rápida, não são destrutivas e invasivas, assim como não geram subprodutos químicos tóxicos. Devido a estas vantagens, este tipo de análise tem sido aplicada no monitoramento em linha de sistemas químicos industriais, na determinação de glicose, colesterol e triglicerídeos em plasma sangüíneo, no auxílio de identificação de tumores em células, no controle de qualidade, na determinação de nitrogênio em plantas, na indústria de polímeros, no estudo da composição química de solos, na adulteração da composição química de combustíveis, óleos comestíveis e alimentos, entre outros (COSTA FILHO; POPPI, 2002).

Apesar de ser uma técnica muito sensível, é pouco seletiva no caso de misturas complexas, onde é difícil quantificar as concentrações dos seus componentes (CHAAR, 2000). O espectro de Infravermelho é um dos métodos mais comumente empregados na determinação de açúcares devido as bandas de absorção de carboidratos (RAMBLA; GARRIGUES; LA GUARDIA, 1997).

Na espectroscopia de Infravermelho, luz e freqüências diferentes atravessam uma amostra e a intensidade da luz transmitida é medida para cada freqüência incidente. Em freqüências que correspondem a estados vibracionais da amostra, mais luz é absorvida e menos luz é transmitida que em freqüências que não correspondem a energias vibracionais da molécula (MUNIZ, 2003).

O comprimento de onda da luz do Infravermelho é mais freqüentemente expressa em termos de número de onda, as quais são recíprocas aos comprimentos de ondas expressas em centímetros. O comprimento de onda é expresso em μm , enquanto que as ondas são expressas em cm^{-1} . Uma faixa de 2,5 – 25 μm equivale à região de 4000 – 400 cm^{-1} no Infravermelho. As moléculas são consideradas como átomos de grupos químicos. O movimento dos átomos dos grupos químicos pode ser constituído por um sistema de molas e bolas em constante movimentação. Esse

movimento pode ser considerado como o início de dois componentes, a vibração da extensão e da curva. A frequência das bandas em uma molécula é afetada por todo ambiente molecular. No entanto, algumas bandas possuem características específicas (NAKANISHI; SOLOMON, 1977).

A espectroscopia de Infravermelho é uma ferramenta analítica capaz de detectar as características do modo vibracional de grupos químicos individuais e de ligações. Vem sendo utilizada para examinar e providenciar importantes dados de uma grande variedade de moléculas biológicas. Pode ser utilizada para diversos tipos de análises de moléculas, em diversos sistemas biológicos, além da biologia forense, de diagnósticos clínicos, monitoração ambiental. O uso da espectroscopia para a análise do muco de gastrópodes representa uma nova aplicação desta técnica (SKINGSLEY; WHITE; WESTON, 2000).

O espectro de Infravermelho pode mensurar compostos biológicos em soluções aquosas também; porém, é necessário o uso de substratos que absorvam a água presente para que a mesma não venha a interferir no resultado a ser obtido pelo equipamento (NAKAMOTO; CZERNUSZEWICZ, 1993).

Investigações preliminares das propriedades do muco podal dos gastrópodes através de espectroscopia de Infravermelho tem revelado importantes diferenças e componentes comuns na composição do muco em *Helix aspersa* e *Lymnaea stagnalis* (L.) (SKINGSLEY; WHITE; WESTON, 2000).

2.7.2 A espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman teve origem em 1928, quando Chandrasekhara Vankata Raman publicou um artigo onde descrevia a observação experimental do espalhamento inelástico da luz visível, feito este que lhe rendeu o prêmio Nobel de Física em 1930. Assim como a espectroscopia de absorção (ou emissão) no Infravermelho, a espectroscopia Raman fornece informações sobre níveis de energia vibracionais e sobre a estrutura molecular. Como os processos físicos envolvidos em cada uma dessas duas técnicas são diferentes, com regras de seleção diferentes, as informações fornecidas por elas não são as mesmas, mas complementares (MILLEN; FARIA; TEMPERINI, 2005).

O efeito Raman consiste em uma variação no comprimento de onda que é espalhado por moléculas. Quando um feixe de luz monocromática incide em um dado material, cujas dimensões são menores que o comprimento de onda da luz incidente, ocorre o fenômeno do espalhamento. A maior parte da luz espalhada apresenta o mesmo comprimento de onda da luz incidente e este espalhamento é conhecido como espalhamento Rayleigh (ou espalhamento elástico). Uma pequena parcela desta luz espalhada, no entanto, apresenta um comprimento de onda diferente daquele da luz incidente, perturbando a nuvem eletrônica da molécula (como um processo de excitação do sistema) e a sua existência constitui o efeito Raman (ou espalhamento inelástico) (ALCANTARA JR, 2002; CUNHA, 2003).

A espectroscopia Raman é uma técnica de espectroscopia vibracional usada para determinação de estrutura molecular e para a identificação e quantificação de materiais. As principais aplicações dessa técnica na área químico-farmacêutica têm sido a análise não-destrutiva de produtos acabados sólidos, líquidos e gasosos, e a rápida identificação de amostras (SOUZA et al., 2003).

A natureza da técnica permite que seja empregada tanto na investigação de compostos inorgânicos quanto de orgânicos. Sua principal restrição é a fluorescência que o objeto em estudo (ou alguma impureza presente) possa vir a apresentar; nesse caso, técnicas especiais precisam ser usadas na tentativa de amenizar o problema, uma vez que a emissão é costumeiramente mais intensa do que o espalhamento Raman. Um dos recursos mais freqüentemente usados é a excitação dos espectros na região do Infravermelho próximo (NIR), uma vez que essa radiação (tipicamente 1064 nm) não tem energia suficiente para popular estados excitados a partir dos quais a emissão ocorre. Atualmente, há um crescente interesse por métodos de análise que sejam específicos, confiáveis e não destrutivos, de forma que a espectroscopia Raman vem sendo largamente empregada exatamente por contemplar esses três aspectos (FARIA, 2006).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 A seleção dos caracóis terrestres *Achatina sp*

Os caracóis terrestres utilizados no presente trabalho foram procedentes do Helicário Experimental Prof^a Dr^a Lor Cury da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade de São Paulo, Campus Pirassununga. Foram selecionados 80 caracóis terrestres, baseados em um peso homogêneo, ou seja, média de 49 gramas para cada animal, com idade média de 10 meses para a espécie *Achatina fulica*, e média de 40 gramas para cada animal, com idade média de 19 meses para a espécie *Achatina monochromatica*. (Aprovação Comitê de Bioética, protocolo nº664/2005).

Os animais foram acondicionados em caixas de madeira de 35cm largura X 30cm altura X 60cm comprimento, com piso de terra, adicionado de Carbonato de Cálcio (para fornecer cálcio necessário para o fortalecimento da concha do animal), com densidade populacional de dez animais, sendo as caixas aspergidas com água diariamente, para manter a umidade das mesmas, garantindo o bem estar destes animais, pois necessitam de local úmido para se desenvolverem.

Dos 80 animais selecionados, 40 pertenciam à espécie *Achatina fulica* e os outros 40 à espécie *Achatina monochromatica*, todos acondicionados separadamente, respeitando a densidade populacional pré-determinada de 10 animais por grupo, como mostra a **tabela 1**.

Tabela 1 – Subdivisão dos grupos experimentais das duas espécies estudadas. Pirassununga, 2006

Ração	Controle	Centelha	Papaína	Confrei	Controle	Centelha	Papaína	Confrei
Grupo	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Espécie	<i>A. fulica</i>	<i>A. fulica</i>	<i>A. fulica</i>	<i>A. fulica</i>	<i>A. monoc.</i>	<i>A. monoc.</i>	<i>A. monoc.</i>	<i>A. monoc.</i>
Número animais	10	10	10	10	10	10	10	10

Os grupos foram subdivididos em 8 grupos experimentais, onde cada um deles refere-se a um determinado tipo de ração ofertada aos animais, de forma que tivemos 4 grupos experimentais para cada uma das espécies.

3.2 Preparo das rações a serem utilizadas nos tratamentos propostos

Foi desenvolvida uma ração para os grupos experimentais, de acordo com a ração base (PACHECO; MARTINS, 1996), onde adicionamos extrato seco em pó de plantas medicinais, separadamente: **Centelha asiática**, **Confrei** e **Papaína**, como mostra **figura 1**, as quais foram divididas para cada grupo experimental.

A ração administrada aos animais constituiu a base de todo o experimento, pois dela dependia os resultados que viriam a ser obtidos nos experimentos realizados. A ração base é constituída de: Fubá de Milho; Farelo de Trigo; Farelo de Soja; Carbonato de Cálcio. Adicionamos separadamente, 100g de extrato seco em pó de plantas medicinais para cada 1kg de ração base (10% de extrato seco), onde cada grupo pertencia a um tipo de extrato seco: Centelha asiática, Papaína e Confrei (Tabela 2). Estes extratos secos atuaram como um aditivo na ração dos animais, a fim de observarmos sua contribuição positiva ou negativa quanto à produção de açúcares e proteínas no muco produzido por estes caracóis, além do ganho de peso

e preferência alimentar, contribuindo para estudos com finalidades zootécnicas de nutrição.

Figura 1 – Rações desenvolvidas para o tratamento dos grupos experimentais. Ração 1 (Controle), Ração 2 (Centelha), Ração 3 (Papaína) e Ração 4 (Confrei)

Tabela 2 - Relação dos ingredientes que constituem as diferentes rações (de 1 a 4) ofertadas aos grupos experimentais de I a VIII, das espécies *Achatina fulica* e *Achatina monochromatica*, durante todo o período experimental (150 dias). Pirassununga, 2005/2006

Ingredientes	Fubá Milho (%)	Farelo Soja (%)	Farelo Trigo (%)	Carbonato Cálcio (%)	Centelha (%)	Papaína (%)	Confrei (%)
Ração 1: Grupos I e V	57,0	10,0	13,0	20,0	-	-	-
Ração 2: Grupos II e VI	57,0	10,0	13,0	20,0	10,0	-	-
Ração 3: Grupos III e VII	57,0	10,0	13,0	20,0	-	10,0	-
Ração 4: Grupos IV e VIII	57,0	10,0	13,0	20,0	-	-	10,0

Durante o processo de alimentação, foram retiradas amostras das rações administradas para a realização de análises bromatológicas (Matéria Seca, Proteína Bruta, Extrato Etéreo, Fibra Bruta, Cinzas, Cálcio, Fósforo), conforme AOAC (1995),

no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ/USP/Pirassununga, como mostra a **tabela 3**.

Tabela 3 – Relação da composição bromatológica das diferentes rações ofertadas aos grupos experimentais (Rações de 1 a 4), realizadas no Laboratório de Bromatologia, FMVZ/USP. Pirassununga, 2006

	Controle	Centelha (<i>Centella asiatica</i>)	Papaína (<i>Carica papaya</i>)	Confrei (<i>Symphytum officinale</i>)
Ração	(1)	(2)	(3)	(4)
MS (%)	91,07	91,17	91,74	90,90
MM (%)	21,72	22,56	19,03	22,01
EE (%)	3,51	3,08	2,98	3,07
FB (%)	2,71	3,10	2,35	2,98
PB (%)	13,00	13,71	13,59	13,59
Ca (%)	6,56	6,41	6,15	6,29
P (%)	0,43	0,38	0,39	0,41

* Resultados obtidos com base na matéria seca

A ração dos animais visa fornecer os alimentos capazes de proporcionar energia aos animais, garantindo saúde e bom desempenho dos mesmos em suas atividades e produtividade. A ração deve conter um equilíbrio de nutrientes necessários ao animal, por um período, em geral, de 24 horas. Os animais foram alimentados com água e ração “*ad libitum*”, previamente preparada, de acordo com especificações de Pacheco e Martins (1996).

Os animais foram pesados ao primeiro dia do experimento e novamente a cada trinta dias, perfazendo um total de cinco pesagens: Pi (peso inicial), P₃₀ (peso aos trinta dias), P₆₀ (peso aos sessenta dias), P₉₀ (peso aos noventa dias) e P₁₅₀ (peso aos cento e cinquenta dias).

3.2.1 Efeito da densidade populacional sobre o desenvolvimento de caracóis terrestres

O efeito da densidade, ou seja, o número de animais por uma determinada área, pode ser significativo sobre o crescimento, mortalidade e reprodução dos mesmos. Entre os moluscos, estes efeitos podem ser produzidos pela interação de fatores externos, como competição por alimento, diminuição do suprimento de oxigênio, aumento da quantidade de rastros de muco ou liberação de outros componentes inibitórios. No entanto, interações comportamentais específicas também controlam o desenvolvimento. A densidade de animais em produção animal é fundamental na determinação dos custos de produção. A densidade ótima possibilita a produção de animais em menor tempo com peso elevado, reduzindo custos (tanto de instalação quanto de produção) e aproveitando a maior fase de produção. Em estudos realizados em helicicultura, foram demonstrados que em locais de baixa densidade populacional houve um incremento médio no tamanho dos animais adultos. Em locais de baixa densidade populacional, ocorre um número insignificante de mortes, praticamente zero, enquanto que locais com densidade populacional elevada, podem chegar a 30% de mortalidade. O muco, é fator limitante na atividade dos animais jovens, porém, a presença de animais adultos interfere mais no desempenho dos outros animais. A densidade elevada também afeta a taxa de cópula e reprodução, enquanto que em baixa densidade essas situações são precoces (HELICICULTURA, 2004).

3.3 A obtenção do muco dos caracóis terrestres *Achatina sp*

O muco dos caracóis das espécies *Achatina fulica* e *Achatina monochromatica* foi coletado através de estímulo da glândula podal (MARTINS et al., 1996) em cada um dos animais, seguindo a divisão dos grupos experimentais, obtendo-se então oito amostras de muco de caracóis terrestres (dos grupos de I a VIII).

Figura 2 – Extração do muco dos caracóis *Achatina fulica*

Figura 3 – Extração do muco dos caracóis *Achatina monochromatica*

Figura 4 – Diferença de volume do muco extraído dos caracóis *Achatina fulica*, pertencentes aos grupos experimentais de I a IV, respectivamente

Figura 5 – Diferença de volume do muco extraído dos caracóis *Achatina monochromatica* pertencentes aos grupos experimentais de V a VIII, respectivamente

3.4 Análises colorimétricas do muco dos caracóis terrestres *Achatina fulica* e *Achatina monochromatica*

As análises colorimétricas dos mucos coletados dos caracóis foram realizadas no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP de Ribeirão Preto. Foram realizadas dosagens a partir dos mucos brutos de *Achatina fulica* e de *Achatina monochromatica*. Esses mucos, para cada um dos grupos experimentais, foram diluídos em água Milli-Q, em tubo de ensaio, obedecendo à seguinte diluição:

- Muco bruto *Achatina fulica*: diluição de 1:5 (um volume de muco bruto para quatro volumes de água Milli-Q)
- Muco bruto *Achatina monochromatica*: diluição de 1:10 (um volume de muco bruto para nove volumes de água Milli-Q)

Em seguida, estas soluções foram novamente diluídas, obedecendo a seguinte diluição:

- Solução diluída do muco de *Achatina fulica*: nova diluição de 1:5 (um volume de muco bruto para quatro volumes de água Milli-Q)
- Solução diluída do muco de *Achatina monochromatica*: nova diluição de 1:5 (um volume de muco bruto para quatro volumes de água Milli-Q)

Ou seja, as amostras foram diluídas 25 vezes (*Achatina fulica*) e 50 vezes (*Achatina monochromatica*), devido à alta concentração de açúcares presentes no muco.

A dosagem de açúcares totais foram realizadas por colorimetria a partir da segunda diluição.

3.4.1 Dosagem de açúcares totais

Teste realizado pelo método Fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), utilizando-se padrão de galactose em concentrações de 20, 40, 60 e 80 µg/mL para construção da curva padrão. As leituras foram feitas em comprimento de onda de 490 nm em espectrofotômetro DU®-70⁸.

- Metodologia: (Realizada em tubos de ensaio longos)

Adicionar 2,5 ml de Ácido Sulfúrico Concentrado – Agitar em mixer com cuidado. Aguardar 10 minutos. Leitura em comprimento de onda de 490 nm. (Quando há presença de açúcares, a solução adquire coloração amarelo-alaranjado, variando sua intensidade).

A dosagem de proteínas foi realizada com alíquotas da primeira diluição, ou seja, diluição de 1:5 para *Achatina fulica* e de 1:10 para *Achatina monochromatica*.

3.4.2 Dosagem de proteínas

Teste realizado pelo método Biureto, utilizando-se padrão de BSA em concentrações de 1,0; 2,0; 3,0 e 5,0 mg/mL para construção da curva padrão. As

leituras foram feitas em comprimento de onda de 540 nm no espectrofotômetro DU®-70⁸.

- Metodologia: (Realizada em tubos de ensaio)

2,0 ml da amostra (alíquota da solução (re) diluída)

2,0 ml da Solução de Biureto

Agitar bem e aguardar por 20 minutos. Leitura em comprimento de onda de 540 nm. (Quando há presença de proteínas, a solução adquire coloração púrpura, variando sua intensidade).

3.5 Análise do muco de caracóis terrestres *Achatina sp* através das técnicas de espectroscopia

Primeiramente, as amostras de muco bruto, de cada um dos grupos experimentais, foram liofilizadas em Liofilizador Virtis®, modelo 10-146MR-BA do Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP de Ribeirão Preto.

Foram coletados 10ml de cada um dos mucos, acondicionados em recipientes próprios para o equipamento. Foram congelados em gelo seco e em seguida, levados ao liofilizador, resultando em um material desidratado, que fora pesado (**Tabela 4**) e acondicionado adequadamente para as análises posteriores.

Tabela 4 – Relação de peso e volume do muco de caracóis *Achatina sp* desidratado. Ribeirão Preto, 2006

Grupo	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Vol (ml)	10	10	10	20	10	10	10	10
Peso (g)	0,098	0,125	0,146	0,265	0,219	0,257	0,358	0,232

Na tabela 4, estão relacionados os pesos (g) dos líofilos obtidos no processo de liofilização dos mucos extraídos dos caracóis terrestres, em cada um dos grupos experimentais, de cada uma das 4 diferentes rações.

3.5.1 Espectroscopia em Infravermelho

As análises de espectroscopia em Infravermelho foram realizadas no Laboratório de Química Orgânica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP de Ribeirão Preto. O material liofilizado foi levado ao laboratório para a realização da análise em espectroscópio de Infravermelho FT-IR Nicolet, modelo Protegé 460. Foi preparado um disco prensado com uma mistura de KBr (brometo de potássio) e o pó do muco liofilizado, que em seguida foi colocado na região de leitura do Infravermelho.

3.5.2 Espectroscopia Raman

As análises de espectroscopia Raman foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia Molecular do Instituto de Química da USP de São Paulo.

Parte das amostras liofilizadas foram levadas ao laboratório para a realização da análise em espectroscópio Raman FT-Raman Bruker – RFS 100/S, com resolução de 4cm^{-1} , laser $\text{Nd}^{3+}/\text{YAG}$ = 1064nm, potência laser amostra 70 mWatts.

A análise das oito amostras de muco liofilizadas foi realizada individualmente, onde, inseriu-se o líofilo no orifício do disco metálico pertencente ao equipamento, que em seguida foi colocado no espectroscópio para fazer a leitura da amostra (em comprimento de onda de 1064nm).

3.6 Análise estatística

As análises estatísticas sobre ganho de peso em função do tempo foram realizadas através de análise de regressão por meio do PROC REG do programa Statistics Analysis System (SAS, 1992).

Nestas análises foram utilizados um valor médio de peso dos animais de cada grupo experimental.

Para as análises químicas, adotou-se o modelo que contempla os efeitos principais de espécie (*Achatina fulica* e *Achatina monochromatica*) e de ração (1 a 4), além da interação espécie X ração. Estas análises foram feitas pelo PROC GLM do programa citado acima e, procedendo o desdobramento para interação quando significativa, para verificar o comportamento das espécies dentro de cada ração estudada.

4 RESULTADOS

4.1 Relação do ganho de peso dos grupos experimentais

Os animais foram pesados ao primeiro dia da etapa experimental, e novamente pesados a cada trinta dias, perfazendo um total de cinco pesagens (Pi, P₃₀, P₆₀, P₉₀ e P₁₅₀ dias), como mostra a **tabela 5**.

Tabela 5 – Relação do peso inicial (Pi), P₃₀, P₆₀, P₉₀ e P₁₅₀ dias dos grupos I,II, III, IV, V, VI, VII e VIII dos caracóis da espécie *Achatina fulica* e *Achatina monochromatica*. Pirassununga, 2006

Nº Grupo	Pi (Kg)	P ₃₀ (Kg)	P ₆₀ (Kg)	P ₉₀ (Kg)	P ₁₅₀ (Kg)	Peso médio
GI	0,485	0,505	0,560	0,640	0,650	0,568
GII	0,455	0,485	0,545	0,600	0,680	0,553
GIII	0,475	0,495	0,535	0,572	0,570	0,529
GIV	0,500	0,520	0,590	0,660	0,670	0,588
GV	0,405	0,465	0,540	0,615	0,695	0,544
GVI	0,410	0,460	0,505	0,545	0,665	0,517
GVII	0,400	0,440	0,460	0,485	0,525	0,462
GVIII	0,405	0,490	0,510	0,540	0,640	0,517

A **tabela 5** relaciona os pesos obtidos durante o período experimental, de todos os grupos envolvidos, de ambas as espécies estudadas. Podemos verificar que o maior ganho de peso médio está relacionado aos grupos que receberam a ração 1 (controle): grupo I, e 4 (adicionada de confrei): grupo IV para *Achatina fulica*, para *Achatina monochromatica*, foi o grupo controle (ração 1).

4.2 Retirada do muco dos caracóis terrestres *Achatina sp*

A quantidade total de muco bruto coletado, a partir dos 10 animais de cada um dos grupos experimentais é apresentada na **tabela 6**.

Tabela 06 – Relação volume do muco coletado e o número de animais de cada um dos grupos experimentais das espécies *Achatina fulica* e *Achatina monochromatica*. Pirassununga, 2006

Grupos*	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Nº animais	10	10	10	10	09	10	08	09
Volume (ml)	60	80	40	90	30	40	30	30

* **Grupos: I e V** (alimentados com ração base), **II e VI** (alimentados com ração base adicionada de Centelha), **III e VII** (alimentados com ração base adicionada de Papaína) e **IV e VIII** (alimentados com ração base adicionada de Confrei), onde os quatro primeiros grupos referem-se à espécie *Achatina fulica*, e os outros quatro aos grupos da espécie *Achatina monochromatica*.

Fenotipicamente, a coloração dos mucos coletados dos caracóis *Achatina fulica* alterou, onde se mostrou mais claro no grupo III (ração adicionada de Papaína), esverdeado no grupo IV (ração adicionada de Confrei) e amarelado nos grupos I (Controle) e II (ração adicionada de Centelha), como mostra a **figura 6**. Em relação à viscosidade, observamos um aumento desta no grupo II (ração adicionada de Papaína), bem com uma fragilidade na concha dos animais deste grupo, onde as mesmas apresentaram-se quebradas e extremamente finas.

Em relação a coloração dos mucos coletados dos caracóis *Achatina monochromatica* observou-se uma diferença em relação aos *Achatina fulica*, pois apresentaram uma coloração mais acinzentada, como mostra a **figura 7**. Em relação à viscosidade, mostraram-se menos viscosos do que os mucos do *Achatina fulica*. E observa-se também, claramente, que a produção de muco de caracóis *Achatina*

monochromatica é significativamente inferior aos caracóis *Achatina fulica*, cerca de 50% menos, como foi observado na **tabela 6**.

Figura 6 – Coloração do muco coletado dos grupos de I a IV, respectivamente, espécie *Achatina fulica*

Figura 7 – Coloração do muco coletado dos grupos de V a VIII, respectivamente, espécie *Achatina monochromatica*

4.3 Análise do desempenho das rações em função do período experimental

A estatística descritiva para as duas espécies estudadas ao longo do período experimental encontra-se na **tabela 7** e no **gráfico 1**, logo mais apresentado.

Tabela 7 – Estatística descritiva para o período experimental. Pirassununga, 2006

Espécie					
	Média	Desvio Padrão	Coef. Variação	Mínimo	Máximo
<i>Achatina fulica</i>	56,08	7,12	12,70	45,50	68,00
<i>Achatina monochromatica</i>	52,70	9,47	17,97	40,00	69,50

Nota-se que a média inicial de ganho de peso entre as duas espécies estudadas não diferem significativamente, e possuem os coeficientes de variação muito próximos, isto no período experimental de 150 dias.

Na **tabela 8**, temos os valores das equações de regressão obtidas para ambas as espécies estudadas nas diferentes rações utilizadas.

Tabela 8 – Equações de regressão para a espécie *Achatina fulica* nas quatro diferentes rações avaliadas. Pirassununga, 2006

Ração	Equações	R ² (%)	Pr $\beta_0=0$	Pr $\beta_1=0$
1	$Y_1 = 48,8986 + 0,1227X$	88,22	**	**
2	$Y_2 = 45,3581 + 0,1551X$	98,48	**	**
3	$Y_3 = 48,3675 + 0,0692X$	83,71	**	*
4	$Y_4 = 50,4459 + 0,1265X$	87,89	**	*

Pr < 0,01 ** Pr < 0,05 * Pr > 0,05 N.S.

Rações: **1** (Base), **2** (Adicionada de Centelha), **3** (Adicionada de Papaína) e **4** (Adicionada de Confrei)

As análises de regressão foram desenvolvidas com o intuito de verificar as diferenças existentes quanto ao peso médio, sendo que, a ração 2 (ração adicionada de Centelha) obteve 26,41% de ganho de peso médio superior a ração 1 (ração base). Já a ração 4 (adicionada de Confrei) obteve apenas 3,10% de ganho de peso médio, e a ração 3 (adicionada de Papaína) obteve 43,60% menos de ganho de peso médio. Pelos resultados obtidos, podemos concluir que a ração 2 (adicionada de Centelha) propiciou um maior ganho de peso médio (15,51g). O **gráfico 1** ilustra as diferenças de ganho de peso entre as rações utilizadas nos tratamentos dos caracóis terrestres *Achatina fulica*.

Gráfico 01 – Comportamento da espécie *Achatina fulica* frente às diferentes rações ofertadas aos grupos experimentais

Todas as rações que continham as plantas medicinais com princípio cicatrizante definido promoveram uma resposta ao tratamento da espécie *Achatina fulica*. As diferenças de ganho de peso, foram significativas, segundo o teste *t* de Student, como observadas na **tabela 8**. As rações 1 e 4 apresentaram desempenhos semelhantes e intermediários em relação à ração 2. Os piores desempenhos foram associados à ração 3.

Tabela 09 - Equações de regressão para a espécie *Achatina monochromatica* nas quatro diferentes rações avaliadas. Pirassununga, 2006

Ração	Equações	R ² (%)	Pr β ₀ =0	Pr β ₁ =0
1	$Y_1 = 41,9932 + 0,1970X$	95,98	**	**
2	$Y_2 = 40,6554 + 0,1673X$	99,39	**	**
3	$Y_3 = 43,5202 + 0,0745X$	40,01	**	N.S.
4	$Y_4 = 45,7067 + 0,1495X$	67,91	**	N.S.
Pr < 0,01 ** Pr < 0,05 * Pr > 0,05 N.S.				

Rações: 1 (Base), 2 (Adicionada de Centelha), 3 (Adicionada de Papaína) e 4 (Adicionada de Confrei)

A ração 1 proporcionou um maior ganho de peso médio (19,70g), e sua inclinação na reta mostra que a variação foi mais significativa que as demais, que tiveram o ângulo de inclinação menor, como mostra o **gráfico 2**. No entanto, as rações 3 e 4 não apresentaram ganho de peso médio significativo ao longo do período experimental. A ração 2 obteve 15,08% de ganho de peso médio inferior a ração 1.

Gráfico 2 - Comportamento da espécie *Achatina monochromatica* frente às diferentes rações ofertadas aos grupos experimentais

Nos grupos experimentais das espécies *Achatina monochromatica* podemos observar claramente que sua resposta difere significativamente dos grupos *Achatina fulica* para o ganho de peso médio. As rações 3 e 4 não obtiveram respostas significativamente ao tratamento, enquanto que as rações 1 e 2 proporcionaram uma resposta significativa. Nota-se que a ração 1 apresentou melhor desempenho do que a ração 2. Pela equação da reta (**Tabela 9**), podemos observar a variação no ganho de peso médio por período experimental.

4.4 Análises colorimétricas do muco dos caracóis *Achatina sp*

Depois de realizadas as dosagens de açúcares totais e proteínas nos mucos de cada um dos grupos experimentais, obtivemos os resultados mostrados nas tabelas 10 e 11.

Tabela 10 – Relação das proteínas e dos açúcares totais presentes no muco de caracóis *Achatina fulica* nas diferentes rações ofertadas. Ribeirão Preto, 2006

Grupo	I	II	III	IV
	[]%	[]%	[]%	[]%
Açúcares Totais	7,34	7,74	8,37	8,04
Proteínas	92,66	92,26	91,63	91,96

[]% = proporção da concentração de proteínas e açúcares totais em percentagem.

Grupos: I (ração base), II (ração base adicionada de Centelha), III (ração base adicionada de Papaína) e IV (ração base adicionada de Confrei).

Pela **tabela 10**, podemos comparar a variação da concentração de proteínas e açúcares, dos grupos experimentais de *Achatina fulica*. Considerando que o grupo I (controle) tenha seu valor de proteína equivalente a 100%, podemos observar que, em relação ao grupo controle (grupo I), o grupo II reduziu em 0,44% o teor de proteína, o grupo III em 1,12% e o grupo IV em 0,76%. Em relação ao teor de açúcares totais, comparando-se ao grupo controle (grupo I), o grupo II aumentou em 5,45% o teor de açúcares totais, o grupo III em 14,03% e o grupo IV em 9,53%.

Tabela 11 – Relação das proteínas e dos açúcares totais presentes no muco de caracóis *Achatina monochromatica* nas diferentes rações ofertadas. Ribeirão Preto, 2006

Grupo	V	VI	VII	VIII
	[]%	[]%	[]%	[]%
Açúcares Totais	9,09%	6,37%	6,95%	7,64%
Proteínas	90,91%	93,63%	93,05%	92,60%

[]% = proporção da concentração de proteínas e açúcares totais em percentagem. **Grupos:** V (ração base), VI (ração base adicionada de Centelha), VII (ração base adicionada de Papaína) e VIII (ração base adicionada de Confrei).

Ao se comparar a variação da concentração de proteínas e açúcares totais nos mucos analisados da espécie *Achatina monochromatica*, podemos observar que, em relação ao grupo controle (grupo V), considerando que seu valor de proteína seja equivalente a 100%, o grupo VI aumentou em 3% o teor de proteína, o grupo VII em 2,35% e o grupo VIII em 1,6%. No entanto, o teor de açúcares totais, em relação ao controle, foi reduzido em 30% pelo grupo VI, em 23,5% pelo grupo VII e em 16% pelo grupo VIII.

Nos gráficos abaixo (**Gráficos 3 e 4**), podemos visualizar a variação da relação açúcares totais e proteínas que constituem o muco dos caracóis *Achatina fulica* e *Achatina monochromatica*.

Onde, a ração: **1** (ração base), **2** (ração base adicionada de Centelha), **3** (ração adicionada de Papaína) e **4** (ração base adicionada de Confrei).

Gráfico 3 – Variação das concentrações de açúcares totais e proteínas presentes no muco de caracóis terrestres *Achatina fulica* dos grupos I (Controle), II (Centelha), III (Papaína) e IV (Confrei)

No **gráfico 3**, podemos observar a variação de comportamento quanto ao teor de açúcares totais e proteínas entre os grupos de uma mesma espécie (*Achatina*

fulica). Nota-se que a variação de açúcares totais entre os grupos experimentais não é tão significativa quanto a de proteínas.

Onde, a ração: **1** (ração base), **2** (ração base adicionada de Centelha), **3** (ração adicionada de Papaína) e **4** (ração base adicionada de Confrei).

Gráfico 04 – Variação das concentrações de açúcares totais e proteínas presentes no muco de caracóis terrestres *Achatina monochromatica* dos grupos V (Controle), VI (Centelha), VII (Papaína) e VIII (Confrei).

No **gráfico 4**, podemos observar a variação de comportamento desta espécie difere significativamente da espécie anterior (*Achatina fulica*) quanto ao teor de proteínas entre os grupos, consideravelmente superior. Nota-se que a variação de açúcares totais entre os grupos experimentais também não é tão significativa quanto a de proteínas.

4.5 Análise estatística do teor de açúcares totais presentes no muco de cada um dos grupos experimentais de caracóis *Achatina sp* em relação à ração ofertada

A análise de açúcares totais das espécies estudadas neste experimento mostrou resultados significativos para o efeito da interação entre espécie ($Pr < 0,01$) e ração ($Pr < 0,05$). Não foram verificados resultados significativos ($Pr > 0,05$) para os fatores principais. A espécie *Achatina monochromatica* mostrou teores de açúcares totais (3,07 mg/ml) significativamente superiores em relação à espécie *Achatina fulica* (1,13 mg/ml) ($Pr < 0,01$).

Tabela 12 – Médias das concentrações de açúcares totais do muco de *Achatina fulica* e *Achatina monochromatica* em função das quatro diferentes rações avaliadas. Ribeirão Preto, 2006

Ração	Açúcares Totais
1	2,5183 ^a
2	1,5350 ^b
3	2,5633 ^a
4	1,7933 ^b

* Médias seguidas por pelo menos uma mesma letra são iguais ao nível de 1% pelo teste t de Student.

** Onde, a ração: **1** (ração base), **2** (ração base adicionada de Centelha), **3** (ração adicionada de Papaína) e **4** (ração base adicionada de Confrei).

As rações 1 e 3 obtiveram resultados significativos quanto ao teor de açúcares totais presente no muco, enquanto que as rações 2 e 4 não mostraram diferenças significativas para $Pr < 0,01$. Não houve resultados significativos para a interação entre espécie e ração.

Rações: 1 (ração base), 2 (ração base adicionada de Centelha), 3 (ração adicionada de Papaína) e 4 (ração base adicionada de Confrei).

Gráfico 05 – Diferença do teor de açúcares totais presente no muco dos caracóis terrestres *Achatina sp* pertencentes a cada um dos grupos experimentais

No **gráfico 5**, nota-se a diferença significativa de produção de açúcares totais no muco dos caracóis terrestres estudados. Observa-se uma maior concentração destes açúcares nos grupos de *Achatina monochromatica*.

4.6 Análise estatística do teor de proteínas presente no muco de cada grupo experimental de caracóis *Achatina sp* em relação à ração ofertada

A análise de proteínas das espécies estudadas neste experimento mostrou uma interação significativa ($Pr < 0,01$) entre espécie e ração. O desdobramento da

interação foi realizado visando verificar o comportamento da espécie de caracol terrestre dentro de cada ração avaliada.

Tabela 13 – Médias das concentrações de proteínas do muco de *Achatina fulica* e *Achatina monochromatica* em função das quatro diferentes rações avaliadas. Ribeirão Preto, 2006

Ração	Espécies	
	<i>Achatina fulica</i>	<i>Achatina monochromatica</i>
1	18,3667 ^b	40,4933 ^a
2	13,1000 ^b	33,0900 ^a
3	14,1933 ^b	44,1266 ^a
4	11,4766 ^b	35,4333 ^a

* Médias em uma mesma linha, seguidas por pelo menos uma mesma letra são iguais ao nível de 1% pelo teste *t* de Student.

****Rações:** **1** (ração base), **2** (ração base adicionada de Centelha), **3** (ração adicionada de Papaína) e **4** (ração base adicionada de Confrei).

Observa-se na **tabela 13** que a espécie *Achatina monochromatica* apresentou resultados significativos quanto ao teor de proteínas presente no muco, enquanto que a espécie *Achatina fulica* não mostrou tais diferenças significativas ($Pr < 0,01$). Observou-se uma interação espécie versus ração para a espécie *Achatina monochromatica*, que obteve uma resposta significativa diante das 4 diferentes rações avaliadas em comparação à espécie *Achatina fulica*.

Onde, a ração: **1** (ração base), **2** (ração base adicionada de Centelha), **3** (ração adicionada de Papaína) e **4** (ração base adicionada de Confrei).

Gráfico 06 - Diferença do teor de proteínas presentes no muco dos caracóis terrestres *Achatina sp*, de cada um dos grupos experimentais.

No **gráfico 6**, nota-se a diferença significativa de produção de proteínas no muco dos caracóis terrestres estudados. Observa-se uma maior concentração destas proteínas nos grupos de *Achatina monochromatica*.

4.7 Análises em espectroscopia dos mucos dos caracóis *Achatina sp*

4.7.1 Espectroscopia em Infravermelho

Todos os perfis dos mucos analisados pelo espectro foram absorvidos na região de comprimento de onda de 500 cm^{-1} a 2000 cm^{-1} com subtração de água e vapores d'água obtidos em regiões de 2500 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} . Em todos os grupos

de caracóis analisados há um perfil de bandas principais que se iniciam em torno de 1651 cm^{-1} e 1655 cm^{-1} . Os picos indicam a presença de ligações do tipo amida que ocorrem nos núcleos protéicos de GAGs e moléculas proteoglicanas, como lectina (SKINGSLEY; WHITE; WESTON, 2000).

As faixas entre 1740 cm^{-1} e 1400 cm^{-1} representam diferentes estados de ionização dos grupos carboxilados associados aos derivados ácidos de açúcares e cadeias de aminoácidos ($\text{COOH} \leftrightarrow \text{COO}^- + \text{H}^+$). Faixas em torno de 1450 cm^{-1} (CH_2) e 1380 cm^{-1} (CH_3) representam cadeias de carbono de proteínas, carboidratos e possíveis lipídeos. A presença de uma grande quantidade de ligações OH e O-glicosídicas no final do espectro origina uma série de picos entre 950 cm^{-1} e 1150 cm^{-1} . Esta região pode também incluir bandas associadas a compostos sulfatados, acilados e esterificados. Em regiões entre 1100 cm^{-1} e 1300 cm^{-1} podemos encontrar grupos fosfatados (NAKAMOTO; CZERNUSZEWICZ, 1993).

As bandas entre 1643 cm^{-1} e 1543 cm^{-1} são caracteristicamente representantes de Amida I e Amida II, respectivamente. Bandas entre 930 cm^{-1} e 1445 cm^{-1} representam uma mistura de bandas refletindo a presença de amida II, ácidos carboxílicos (ionizados e não ionizados), CH_3 , CH_2 e OH^- . Entre 1736 cm^{-1} e 1230 cm^{-1} podemos encontrar também alguns açúcares (bandas características de ésteres). Grupos CH_3 podem também estar presentes em faixas de 725 cm^{-1} , ligados a longas cadeias de terminais polares (ácidos, ésteres, amidas). Em bandas entre 774 cm^{-1} e 930 cm^{-1} podemos encontrar açúcares (como alfa e beta piranose) e polissacarídeos. Nas regiões entre 565 cm^{-1} e 815 cm^{-1} também podemos encontrar grupos nitrados, nas formas cis e trans (LINDON, 2000).

Os resultados dos espectros de Infravermelho foram analisados por cada grupo experimental, onde tomou-se por referência o grupo I, considerado grupo

controle da espécie *Achatina fulica* e posteriormente, o grupo V, considerado o grupo controle da espécie *Achatina monochromatica*. O perfil espectral dos grupos analisados indica uma quantidade relativa de moléculas ionizadas e hidratadas e, há uma pequena diferença na proporção entre os grupos experimentais. Entre 600 cm^{-1} e 1500 cm^{-1} há uma gama de faixas relacionando cadeias carbônicas de núcleos protéicos (CH_2 , CH_3) e composição e estado de ionização de cadeias laterais de aminoácidos e de açúcares (COOH , COO^-), presença de glicoproteínas, amidas III de colágeno, traços de lipídeos.

Figuras 08 a 11 – Perfil fenotípico dos espectros das análises realizadas em Infravermelho, dos grupos experimentais I, II, III e IV para o molusco *Achatina fulica*.

Figura 08 – Espectro Infravermelho do Grupo I
– *Achatina fulica* – Controle

Figura 09 – Espectro Infravermelho do Grupo II
– *Achatina fulica* – Centelha asiática

Figura 10 – Espectro Infravermelho do Grupo III – *Achatina fulica* – Papaina

Figura 11 – Espectro Infravermelho do Grupo IV – *Achatina fulica* – Confrei

Figuras 12 a 15 – Perfil fenotípico dos espectros das análises realizadas em Infravermelho, dos grupos experimentais V, VI, VII e VIII para o molusco *Achatina monochromatica*

Figura 12 – Espectro Infravermelho do Grupo V – *Achatina monochromatica* Controle

Figura 13 – Espectro Infravermelho do Grupo VI – *Achatina monochromatica* Centelha asiatica

Figura 14 – Espectro Infravermelho do Grupo VII – *Achatina monochromatica*

Figura 15 – Espectro Infravermelho do Grupo VIII – *Achatina monochromatica* Confrei

Comparando os espectros dos mucos *Achatina fulica* e *Achatina monochromatica* podemos observar que as variações espectrais para as faixas referentes aos grupos de proteínas e carboidratos, 1650 cm^{-1} e 3400 cm^{-1} respectivamente, são mínimas.

4.7.1.1 Relação carboidrato – proteína

Diante dos espectros de Infravermelho, comparamos a variação da concentração de carboidratos e proteínas presentes nos mucos analisados, levando em consideração a espécie e a ração administrada, como mostra o **gráfico 07**, a fim de reafirmar os resultados obtidos nos testes colorimétricos.

Gráfico 7 – Variação da relação carboidratos – proteínas presente no muco de caracóis *Achatina fulica* e *Achatina monochromatica*, frente as diversas rações administradas aos animais

4.7.2 Espectroscopia Raman

Os espectros das amostras analisadas foram obtidos na região de 1800 cm^{-1} a 1200 cm^{-1} , pois dentro desta faixa podemos analisar os espectros referentes às proteínas e aos carboidratos presentes na amostra em questão.

Em todos os grupos analisados houve um perfil de bandas principais nas regiões entre 1700 cm^{-1} a 1600 cm^{-1} e 1400 cm^{-1} a 1300 cm^{-1} , referentes aos grupos protéicos e de açúcares (carboidratos) respectivamente. Os picos na região de 1600 cm^{-1} a 1700 cm^{-1} indicam a presença de ligações do tipo amida que ocorrem nos

núcleos protéicos de GAGs e moléculas proteoglicanas (SKINGSLEY; WHITE; WESTON, 2000).

Os espectros foram comparados entre espécies quanto à relação proteínas e carboidratos presentes nos mucos analisados, onde obtivemos

Os resultados dos espectros Raman foram analisados por cada grupo experimental, onde tomou-se por referência o grupo I, considerado grupo controle da espécie *Achatina fulica* e posteriormente, o grupo V, considerado o grupo controle da espécie *Achatina monochromatica*, de acordo com as **Figuras 16 e 17**.

As análises realizadas por espectroscopia Raman, atuaram como um material complementar aos resultados obtidos por espectroscopia em Infravermelho, uma vez que estas duas técnicas se completam e, os resultados obtidos corroboram com os da espectroscopia em Infravermelho, e conseqüentemente, com as análises colorimétricas.

Figura 16 – Espectros Raman dos grupos experimentais pertencentes à espécie *Achatina fulica* – Grupos de I a IV.

Figura 17 – Espectros Raman dos grupos experimentais pertencentes à espécie *Achatina monochromatica* – Grupos de V a VIII.

Os espectros Raman dos mucos *Achatina fulica* e *Achatina monochromatica* possuem variações espectrais muito semelhantes para as faixas referentes aos grupos de proteínas e carboidratos, 1700 cm⁻¹ e 1600 cm⁻¹, e 1300 cm⁻¹ e 1400 cm⁻¹ respectivamente. Apesar do diferença no início da leitura do espectro do grupo III, pertencente à espécie *Achatina fulica*, as variações presentes no espectro são semelhantes aos outros grupos analisados.

4.7.2.1 Relação proteína–carboidrato

A partir dos espectros Raman, pode-se comparar a variação da concentração de proteínas e carboidratos presentes nos mucos analisados, levando em

consideração a espécie e a ração administrada, como mostra o **gráfico 8**, a fim de reafirmar os resultados obtidos nos testes colorimétricos.

Gráfico 8 – Variação da relação proteínas – carboidratos presente no muco de caracóis *Achatina fulica* e *Achatina monochromatica*, frente as diversas rações administradas aos animais

5 DISCUSSÃO

5.1 Análise do desempenho das rações em função do período experimental

Os animais não mostraram rejeição ao alimento ofertado; porém, não se pode afirmar se houve ou não preferência alimentar por uma ou outra ração; no entanto, observou-se diferença no ganho de peso médio para as diferentes rações estudadas, sendo que a ração adicionada de Centelha asiática propiciou um maior ganho de peso médio para a espécie *Achatina fulica*, sendo que tal resultado não se repetiu para a espécie *Achatina monochromatica*, mostrando diferenças comportamentais frente às rações ofertadas.

5.2 Retirada do muco dos caracóis terrestres *Achatina sp*

A metodologia utilizada neste estudo, para a extração do muco dos caracóis terrestres, considerou os conceitos de bem estar uma vez que se fez o uso de estímulo manual das glândulas podais, o que não ofereceu risco aos animais, de forma que os mesmos retornaram ao sistema de criação antes executado. Este método utilizado vai de encontro ao de pesquisadores como Iguchi et al. (1982), Kubota et al. (1985) e Otsuka-Fuchino et al. (1992) que faziam uso de estímulos elétricos na superfície podal do animal para a retirada do muco, o que causava estresse e até mesmo a sua morte, não preservando o bem estar dos mesmos, assim como o uso do método de “afogamento” realizado por Craze e Barr (2002) no

preparo dos animais para dissecação, onde os caracóis terrestres permaneciam em um recipiente com água durante todo o período da noite.

A alteração na coloração dos mucos coletados de ambas as espécies, tanto o de animais do grupo controle (grupos I e V) quanto os demais que tiveram aditivos em sua ração (grupos II a IV, e VI a VIII), pode indicar a absorção de elementos das plantas medicinais adicionadas na ração base, conforme observado nas **figuras 6 e 7**.

5.3 Análises colorimétricas do muco dos caracóis *Achatina sp*

O muco de caracóis terrestres possui uma textura anisotrópica (fisicamente homogêneo, mas certas propriedades físicas e químicas podem variar) entre as camadas polares, o que indica a fase de um líquido cristalino. Essa observação é consistente com o resultado previsto do muco de lesmas demonstrando que, apesar do fluido secretado (muco) pelos caracóis terrestres ser quimicamente complexo, a secreção superficial de diferentes espécies gastrópodes pode exibir características físicas amplamente comparáveis (STRUTHERS et al., 2002).

A composição dos mucos entre as espécies *Achatina fulica* e *Achatina monochromatica*, apresentou diferenças significativas estatisticamente, conforme as **tabelas 10 e 11** mostradas anteriormente, onde observou-se um aumento no teor de proteínas nos grupos *Achatina monochromatica*, enquanto que nos grupos *Achatina fulica*, houve um aumento no teor de açúcares totais, o que representa um importante dado para o melhor entendimento dos componentes deste muco e até

mesmo da perspectiva de aplicabilidade do mesmo em processos de cicatrização e desenvolvimento de fármacos, constituindo um avanço significativo para prosseguimento desta pesquisa, uma vez que ainda há muito a se conhecer sobre a composição do muco destes caracóis terrestres.

5.4 Análise da espectroscopia em Infravermelho e Raman do muco dos caracóis terrestres *Achatina sp*

O espectro de espalhamento Raman e o espectro de absorção Infravermelho de uma determinada espécie se assemelham muito. Há no entanto, diferenças suficientes entre os tipos de grupos que são ativos no Infravermelho e no Raman para tornar essas técnicas complementares ao invés de competitivas. Uma importante vantagem dos espectros Raman sobre os de Infravermelho está no fato de que a água não causa interferência; de fato, os espectros Raman são semelhantes aos de Infravermelho no sentido em que possuem regiões que são úteis para a detecção de grupos funcionais e regiões características de impressão digital que permitem a identificação de compostos específicos (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

As espectroscopias em Infravermelho e Raman foram utilizadas para detectar características de bandas de absorção de Infravermelho de carboidratos e proteínas. Pequenas diferenças são reportadas entre os grupos experimentais, o que significa que a espectroscopia pode ser potencialmente utilizada para a identificação destes grupos.

O muco dos caracóis terrestres é formado por um complexo de substâncias, as glicoproteínas, que são proteínas essenciais que contêm bandas de carboidratos que contribuem em 1 a 80% do peso da molécula. Constituem principalmente em seis diferentes açúcares: D-galactose, D-manose, L-fucose, D-glucose, D-glucosamina e D-galactosamina além de alguns ácidos siálicos. Esse complexo oligo e polissacarídeo é um importante componente das mucinas animais, do tecido conectivo e da pele. Essas mucinas (produto secretado por glândulas epiteliais) contêm uma mistura de glicoproteínas e mucopolissacarídeos. São constituídas de cerca de 41% de proteínas, 30% de carboidratos neutros, 2% hexosaminas, 13,2% de sulfatos, 10% de água e pouco menos de 5% de cálcio. As glicoproteínas contêm 8% de açúcares neutros, incluindo a galactose, manose, fucose e glucose, bem como 4,5% de galactosamina e glucosamina (FLORKIN; SCHEER, 1972).

Sendo este muco um sistema complexo, é grande a dificuldade de analisá-lo, pelos espectros de Infravermelho e Raman, através de bandas individuais.

5.4.1 Relação carboidrato – proteína (Espectros Infravermelho)

Para a análise dos espectros de Infravermelho obtidos para os oito tratamentos realizados, poderíamos fazê-la através da intensidade, da largura ou da forma das bandas apresentadas. Os espectros dos mucos estudados apresentaram-se muito semelhantes, de tal forma que fizemos sua análise através da intensidade das bandas espectrais nos valores mínimos de transmissão, referentes aos grupos de carboidratos e de proteínas, onde as bandas da região de 3400 cm^{-1} são

características de estiramento de moléculas OH e, conseqüentemente, é a região onde ocorre uma maior contribuição dos carboidratos presentes no muco de caracóis terrestres estudados, enquanto que as bandas da região de 1650 cm^{-1} são características da presença de amida I, o que remete a uma região de maior contribuição de proteínas existentes no muco de caracóis terrestres estudados.

A análise da intensidade das bandas, foi realizada através da relação entre a intensidade das bandas de 3400 cm^{-1} e 1650 cm^{-1} , que são características de carboidratos e proteínas, respectivamente.

5.4.2 Relação proteína – carboidrato (Espectros Raman)

Em relação aos espectros do Raman, as análises dos oito espectros obtidos foram realizadas também através da intensidade das bandas apresentadas, devido a semelhança entre eles, analisando as bandas em seus valores máximos de transmissão, referentes ao grupos de proteínas e carboidratos, onde as bandas da região de 1600 cm^{-1} e 1700 cm^{-1} são características da presença de grupamentos amida, remetendo a uma região de maior contribuição de proteínas existentes no muco de caracóis terrestres estudados. Enquanto que as bandas na região de 1400 cm^{-1} e 1300 cm^{-1} são referentes aos grupos de ligações carbono-oxigênio (C-O) características dos açúcares, conseqüentemente, nos remete a uma maior contribuição dos carboidratos presentes no muco de caracóis terrestres estudados.

A análise da intensidade das bandas foi realizada através da relação entre a intensidade das bandas de 1700 cm^{-1} e 1300 cm^{-1} , que são características de proteínas e carboidratos, respectivamente.

As variações destas metodologias espectroscópicas mostradas neste estudo sinalizam para a relevância de se determinar de forma simples e rápida, a separação dos componentes do muco de caracóis do gênero *Achatina* sp.

Através destas análises em espectroscopia de Infravermelho e Raman, obtivemos valores onde as relações **proteína/carboidrato** para Infravermelho, e **carboidrato/proteína** para Raman, comparando-se o grupo controle de ambos os gêneros (grupos I – *Achatina fulica* e V – *Achatina monochromatica*) com os tratamentos *Achatina fulica* e *Achatina monochromatica* (grupos II a IV e VI a VIII, respectivamente), apresentaram valores maiores e menores para as espécies, respectivamente, o que nos indica que houve maior contribuição de açúcares para o primeiro (*Achatina fulica*) e uma maior contribuição de proteínas para o segundo (*Achatina monochromatica*). Resultados estes que corroboraram com os obtidos nos testes colorimétricos dos mucos analisados, ou seja, dentre as devidas proporções de açúcares e proteínas encontrados nos mucos em questão, os grupos pertencentes à espécie *Achatina fulica* apresentaram uma redução significativa quanto ao teor de proteínas e um aumento no teor de açúcares totais, enquanto que os grupos pertencentes à espécie *Achatina monochromatica* apresentaram uma redução no teor de açúcares totais e um aumento no teor de proteínas.

6 CONCLUSÃO

Apesar de existirem poucos trabalhos na literatura mundial envolvendo estudos com o muco de caracóis *Achatina sp*, esta pesquisa, utilizando plantas medicinais com finalidades cicatrizantes comprovadas, adicionadas à ração base oferecida a eles, indicou a contribuição das plantas na composição do muco destes animais. As metodologias empregadas mostraram-se sensíveis e apropriadas, vindo ao encontro dos objetivos deste estudo.

Outro aspecto a ser considerado é o não sacrifício dos animais por choque elétrico ou metodologias que vão de encontro ao bem estar dos mesmos, utilizadas por alguns autores, pois os animais utilizados nesta pesquisa, foram reintegrados ao sistema de criação utilizado pelo Helicário Experimental.

Este é o primeiro trabalho a fazer uso de espectroscopia Raman para análise do muco de caracóis *Achatina fulica* e *Achatina monochromatica*, podendo ser aplicada à estudos futuros devido a sua facilidade, rapidez e sensibilidade. Além destas observações, o estudo da composição do muco de caracóis necessita de mais pesquisas, uma vez que não há nenhuma outra publicada até o momento, em que envolve o efeito de plantas medicinais com finalidades cicatrizantes comprovadas, adicionadas à ração ofertada aos caracóis terrestres e a análise por espectroscopia de Infravermelho e Raman.

REFERENCIAS

ALCANTARA JR, P. **Espectroscopia molecular**. Curso de física moderna II – Departamento de Física, Universidade Federal do Pará, 2002, p. 1-5.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16th ed. Washington: AOAC, 1995, 1141 p.

BALLANCE, S.; HOWARD, M.; WHITE, K. N.; McCROHAN, C. R.; THORNTON, D. J.; SHEEHAN, J. K. Partial characterisation of high-molecular weight glycoconjugates in the trail mucus of the freshwater pond snail *Lymnaea stagnalis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 137, 2004, p. 475-486.

BARNES, R. S. K.; CALOW, P.; OLIVE, P. J. W. **Os invertebrados**. São Paulo: Atheneu Editora, 1995, 526 p.

BARROSO, I. C. E.; OLIVEIRA, F.; BRANCO, L. H. Z.; KATO, E. T. M.; DIAS, T. G. O gênero *Cordia* L.: botânica, química e farmacologia. **Revista Lecta**, Bragança Paulista, v. 20, n. 1, 2002, p. 15-34.

BONNET, J.C.; AUPINEL, P.; VRILLON, J. L. **L'escargot *Helix aspersa* - biologie-élevage**. Paris: INRA. 1990, 124 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Área Técnica de Dermatologia Sanitária. **Manual de condutas para úlceras neurotróficas e traumáticas**. Série J. cadernos de reabilitação em hanseníase. Brasília: MS, n. 2, 2002. 55 p.

CAETANO, F. A. M. **“Estudo comparativo do aparelho reprodutor do molusco *Achatina fulica* criado em cativeiro e asselvajado”**. 2005. 61 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2005.

CAMPION, M. The structure and function of the cutaneous glands in *Helix aspersa*. **The Quarterly Journal on Microscopical Science**, v. 102, Parte 2, p. 195-216. 1961.

CARMO, C. A. “**Grau de moagem do milho, inclusão de subprodutos agro-industriais e aditivo microbiológico em rações para vacas leiteiras**”. 2005. 105 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

CASTRO, A. H. F. **Aspectos fisiológicos e fitoquímicos de plantas de confrei (*Symphytum officinale* L.)**. 1999. 85 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Lavras. Lavras, MG, 1999.

CHAAR, J. S. “**Estudos analíticos e modificação química por acetilação do linalol contido no óleo essencial da espécie *Aniba duckei* Kostermans**”. 2000. 125 f. Tese (Doutorado em Ciências/Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

CHENG, C. L.; GUO, J. S.; LUK, J.; KOO, M. W. L. The healing effects of Centella extract and asiaticoside on acetic acid induced gastric ulcers in rats. **Life Sciences**, n. 74, p. 2237-2249, 2004.

COBBINAH, J. R. **Snail farming in West Africa**. Wageningen - Netherlands. 1993, 49 p.

COSTA FILHO, P. A.; POPPI, R. J. Aplicação de algoritmos genéticos na seleção de variáveis em espectroscopia no infravermelho médio. Determinação simultânea de glicose, maltose e frutose. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 46-52, 2002.

CRAZE, P. G.; BARR, A. G. The use of electrical-componente freezing spray as a method of killing and preparing snails. **Journal of Molluscan Studies**, v. 68, p. 192–192, 2002.

CUNHA, F. **Espectroscopia raman – fundamentos e aplicações**. Universidade Federal de Sergipe, 2003.

DEYRUP-OLSEN, I.; LUCHTEL, D. L. Secretion of mucous granules and other membrane-bound structures: a look beyond exocytosis. **International Review of Cytology**, v. 183, p. 95-141, 1998.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

EHARA, T.; KITAJIMA, S.; KANZAWA, N.; TAMIYA, T.; TSUCHIYA, T. Antimicrobial action of achacin is mediated by L-amino acid oxidase activity. **FEBS Letters**, v. 531, n. 3, p. 509-512, 2002.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p.35-36, 2003.

ELMSIE, L. J. Strain differences in *Helix pomatia* L. (Gastropoda: Pulmonata): diapause, digging, growth rate and shell fill. **Journal Molluscan Studies**, v. 67, p. 121-124, 2001.

FARIA, D. L. A. **Espectroscopia Raman**: lançando uma nova luz sobre problemas em arte e arqueologia. Instituto de Química da Universidade de São Paulo, Laboratório de Espectroscopia Molecular, 2006.

FERNANDES, J. J. R. **"Farelo de soja em substituição à uréia em dietas para bovinos de corte em crescimento e terminação"**. 2004. 74 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

FISCHER, D. C. H.; KATO, E. T. M.; SCHLEIER, R. Estudo farmacobotânico de *Centella asiática* (L.) Urban (Umbelliferae). **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 31, n. 1, p. 43-48, 1995.

FLORKIN, M.; SCHEER, B. T. Carbohydrates and carbohydrate metabolism. In: _____. **Chemical Zoology: Mollusca**. London: Academic Press 1972. , v. II, p. 221-223.

GLINSKI, Z.; JAROSZ, J. Molluscan immune defenses. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis (Warsz)**, v. 45, n. 2-3, p. 149-55, 1997.

HELICICULTURA. Material didático do curso de Helicicultura, FMVZ/USP, Pirassununga. Pirassununga: FMVZ/USP, 2004.

IBAMA. **Breve histórico do caramujo-gigante africano no Brasil**. Disponível em: < www.ibama.gov.br/sp > Acesso em: 26 mar. 2006.

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

IMAIZUMI, H. “**Suplementação protéica, uso de subprodutos agro-industriais e processamento de milho em dietas para vacas leiteiras em confinamento**”. 2005. 182 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

IYOMASA, M.; MARTINS, M. F.; PACHECO, P.; MIZUSAKI, C. I.[†]; FIGUEIREDO, L. D.; SÍRIO, O. J.; CAETANO, F. A. M. Evaluation of the *Achatina fulica* snail glycoproteic mucus in surgical injury of rabbits. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v.18, n. 2, p. 149, 2002.

JEONG, J.; TOIDA, T.; MUNETA, Y.; KISIICHI, I.; IMANARI, T.; LINHARDT, R. J.; CHOI, H. S.; WU, S. J.; KIM, Y. S. Localization e characterization of acharan sulfate in the body of the giant African snail *Achatina fulica*. **Comparative and Biochemistry and Physiology Part B**, v. 130, p. 513-519, 2001.

KOBAYASHI, A.; YAMAMOTO, I.; AOYAMA, T. Tribology of a snail (terrestrial gastropod). **Tribology Series**, v. 41, p. 429-436, 2002.

KUBOTA, Y.; WATANABE, Y.; OTSUKA, H.; TAMIYA, T.; TSUCHIYA T.; MATSUMOTO J. J. Purification and caracterization of an antibacterial factor from snail mucus. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 82C, n. 2, p. 345-348, 1985.

LINCOLN, B. J.; SIMPSON, T. R. E.; KEDDIE, J. L. Water vapour sorption by the pedal mucus trail of a land snail. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 33, p. 251–258, 2004.

LINDON, J. C. **Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry**. San Diego: Academic Press, 2000. 2581 p.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR., V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAQUART, F. X.; CHASTANG, F.; SIMEON, A.; BIREMBAUT, Ph.; GILLERY, Ph.; WEGROWSKI, Y. Triterpenes from *Centella asiatica* stimulate extracellular matrix accumulation in rat experimental wounds. **European Journal of Dermatology**, v. 9, n. 4, p. 289-296, 1999.

MARTINDALE, W. H. **The extra pharmacopea**. 28. ed. London: Pharmaceutical Press, 1982.

MARTINS, M. F. "A baba que cura". **Revista Super Interessante**, ano 14, n. 6, p. 75, 2000.

MARTINS, M. F.; CAETANO, F. M. A.; SÍRIO, O. J.; IYOMASA, M. M.; MIZUSAKI, C. I.; PACHECO, P. **"Avaliação da eficiência da secreção mucoglicoprotéica do escargot *Achatina fulica* em feridas provocadas em coelhos"**. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Gramado/RS, 2002.

MARTINS, M. F.; PACHECO, P. "Escargot sem preconceito". **Revista Pesquisa. FAPESP**, v. 51, p. 32-34, 2000.

MARTINS, M. F.; PACHECO, P.; MIZUSAKI, C. I.[†]; IYOMASA, M. M.; SILVESTRINI JR, P. I.; FUZETO, A. P. "Avaliação fenotípica e histológica de feridas cirúrgicas de coelhos tratados com secreção mucoglicoprotéica de escargot *Achatina fulica*". **Arquivo do Instituto Biológico**, n. 67, p. 1-145, 2000.

MARTINS, M. F., PACHECO, P., SÍRIO, O. J., TACCHI, V. C. B. **Ação bactericida do muco podal do escargot *Achatina fulica***. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 30, 2003, Manaus, 2003.

MEDINA, J. C. **Mamão**. São Paulo: ITAL, 1980.

MILLEN, R. P.; FARIA, D. L. A.; TEMPERINI, M. L. A. Modelos para dispersão Raman em polímeros conjugados. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 289-295, 2005.

MITRA, D.; SARKAR, M.; ALLEN, A. K. Purification and characterization of an agglutinin from mucus of snail *Achatina fulica*. **Biochimie**, v. 70, n. 12, p. 1821-1829, 1988.

MONETTA, L. A importância da atuação científica do enfermeiro na execução dos curativos feitos com papaína. **Revista Paulista de Enfermagem**. São Paulo, v. 9, n. 3, p. 83-87, 1990.

MONETTA, L. Uso da papaína nos curativos feitos pela enfermagem. **Revista Brasileira de Enfermagem**, Brasília, v. 40, n.1, p. 66-73, 1987.

MONTI, R.; CONTIERO, J.; GOULART, A. J. isolation of natural inhibitors of papain obtained from *Carica papaya* latex. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 5, p. 747-754, 2004.

MORRISON, F. B. **Alimentos e alimentação dos animais**. São Paulo: Edições Melhoramentos, 1955. 921 p.

MUNIZ, E. P. "**Absorção óptica aumentada de elipsóides metálicos cobertos com uma camada orgânica na região do infravermelho**". 2003. 250 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

NAKAMOTO, K.; CZERNUSZEWICZ, R. S. Infrared Spectroscopy. In: RIORDAN, J. F.; VALLEE, B. L. **Methods in Enzymology**. New York: Academic Press, 1993. v. 226, Part C, p. 259-289.

NAKANISHI, K.; SOLOMON, P. H. **Infrared absorption spectroscopy**. 2nd ed. San Francisco: Holden Day Inc., 1977, 287 p.

NOGUEIRA, R. M. B., KITAMURA, E. A., AGUIAR, D. M. Papaína e collagenase. **Revista Nosso Clínico**, ano 8, n. 43, 2005, p. 24-28.

NOVA ENCICLOPÉDIA ILUSTRADA FOLHA. **Folha de São Paulo**, v. 1, 1996, p. 15-16.

OBARA, K.; OTSUKA-FUCHINO, H.; SATTAYASAI, N., NONOMURA, Y.; TSUCHIYA, T.; TAMIYA, T. Molecular cloning of the antibacterial protein of the giant African snail, *Achatina fulica* Férussac. **European Journal Biochemistry**, v. 209, p. 1-6, 1992.

OLIVEIRA, A. M. B. M. S. “**Substituição de fontes protéicas de origem animal por fontes protéicas de origem vegetal em rações para o “black bass” *Micropterus salmoides***”. 2003. 103 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

OTSUKA-FUCHINO, H.; WATANABE, Y.; HIRAKAWA, C.; MATSUMOTO, J. J.; TSUCHIYA, T. Bactericidal action of a glycoprotein from the body surface mucus of giant African snail. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 101, n. 3, p. 607-613, 1992.

PACHECO, P.; MARTINS, M. F. Desempenho ponderal do escargot *Achatina sp* frente a diferentes formulações de ração. **Anais Congresso Brasileiro Medicina Veterinária Goiânia**, v. 8, p. 184, 1996.

PACHECO, P.; MARTINS, M. F. O Escargot. **Higiene Alimentar**, v. 12, n. 55, p. 19-20, 1998.

PEREIRA, E. M. “**Substituição do milho por ingredientes alternativos na dieta de tourinhos confinados na fase de terminação**”. 2005. 85 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

PONS, F.; KOENIG, M.; MICHELOT, R.; MAYER, M.; FROSSARD, N. The bronchorelaxant effect of helicidine, a *Helix Pomatia* extract, involves prosaglandin E2 release. **Pharmaceutical Biology**, v. 36, n. 1, p. 13-19. 1998.

RAMBLA, F. J.; GARRIGUES, S.; LA GUARDIA, M. PLS-NIR determination of total sugar, glucose, fructose and sucrose in aqueous solution of fruit juices. **Analytica Chimica Acta**, v. 344, p. 41- 53, 1997.

RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados**. 6ª ed. São Paulo: Roca, 1996. p. 332-352.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados. Uma abordagem funcional-evolutiva**. 7ª ed. São Paulo: Roca, 2005. p. 323-481.

SANCHEZ NETO, R.; BARONE, B.; TEVES, D. C.; SIMÕES, M. J.; NOVO, N. F.; JULIANO, Y. Aspectos morfológicos e morfométricos da reparação tecidual de feridas cutâneas de ratos com e sem tratamento com solução de papaína a 2%. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 8, n. 1, p. 18-23, 1993.

SANTANA, L. R. R.; MATSUURA, F. C. A. U.; CARDOSO, R. L. Genótipos melhorados de mamão (*Carica papaya L.*): avaliação sensorial e físico-química dos frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 2, p.217-222, 2004.

SAS STATISTICAL ANALISYS SYSTEM. **SAS user's guide: statistics**. release 6.08. Faltal local: SAS, 1992.

SHUKLA, A.; RASIK, A. M.; JAIN, G. K.; SHANKAR, R.; KULSHRESTHA, D. K.; DHAWAN, B. N. In vitro and in vivo wound healing activity of asiaticoside isolated from *Centella asiatica*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 65, p. 1-11, 1999.

SIMKISS, K.; WILBUR, K. M. The molluscan epiderms and its secretions. **Symp.Zool.Soc.Lond**, n. 39, p.35-75, 1977.

SÍRIO, O. J.” **Verificação da potencialização do efeito cicatrizante do muco de caracóis do gênero *Achatina* promovida por dieta à base de confei**”. 2005. 87 f.

Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2005.

SÍRIO, O. J.; FIGUEIREDO, L. D.; IYOMASA, M. M.; PRADO, I. M. R.; RECHIA, C. G. V.; PACHECO, P.; MARTINS, M. F. "Investigation of partial composition of *Achatina fulica* snail mucus and its effects on surgical injuries in rabbits". In: CONGRESS OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, 4., 2003, Ribeirão Preto/SP.

SKINGSLEY, D. R., WHITE, A. J., WEATON, A. Analysis of pulmonate mucus by infrared spectroscopy. **Journal Molluscan Studies**, v. 66, 2000, p. 363-371.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios da análise instrumental**. 5ª ed. São Paulo: Bookman, 2002. 836 p.

SNELL, F. D.; SNELL, C. T. **Colorimetric methods of analysis**. 3ª ed. New York: D. van Nostrand Company, 1941. v. 1, 766 p.

SOUZA, F. B.; PACHECO, M. T. T.; VILAVERDE, A. B.; SILVEIRA JR., L.; MARCOS, R. L.; LOPES-MARTINS, R. A. B. Avaliação do ácido láctico intramuscular através da espectroscopia Raman: novas perspectivas em medicina do esporte. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 9, n. 6, p. 388-395, 2003.

STICKEL, F.; SEITZ, H. K. The efficacy and safety of comfrey. **Public health nutrition**, v. 13, n. 4A, p. 501-508, 2000.

STRUTHERS, M.; ROSAIR, G.; BUCKMAN, J.; VINEY, C. The physical and chemical microstructure of the *Achatina fulica* epiphragm. **Journal of Molluscan Studies**, v. 68, p. 165-171, 2002.

SUGUNA, L.; SIVAKUMAR, P.; CHANDRAKASAN, G. Effects of Centella asiatica extract on dermal wound healing in rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 34, p. 1208-1211, 1996.

VEIGA JR., V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.