

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

ALTERAÇÕES NOS DEPÓSITOS DE GLICOGÊNIO E CONTEÚDO DE GLICOSE NA  
HEMOLINFA DE *ACHATINA FULICA* BOWDICH, 1822 (MOLLUSCA,  
GASTROPODA), HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO DE *ANGIOSTRONGYLUS*,  
EXPOSTA AO LÁTEX DE COROA DE CRISTO *EUPHORBIA SPLENDENS* VAR.  
*HISLOPII*

Camila Silva de Oliveira

2007



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ALTERAÇÕES NOS DEPÓSITOS DE GLICOGÊNIO E CONTEÚDO DE  
GLICOSE NA HEMOLINFA DE *ACHATINA FULICA* BOWDICH, 1822  
(MOLLUSCA, GASTROPODA), HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO DE  
*ANGIOSTRONGYLUS*, EXPOSTA AO LÁTEX DE COROA DE CRISTO  
*EUPHORBIA SPLENDENS* VAR. *HISLOPII***

**CAMILA SILVA DE OLIVEIRA**

Sob a orientação do Professor  
**Jairo Pinheiro da Silva**

E Co-orientação do Professor  
**Maurício Carvalho de Vasconcellos**

Dissertação submetida como  
requisito parcial para obtenção do  
grau de **Mestre em Ciências**, no  
curso de Pós-Graduação em  
Ciências Veterinárias, Área de  
Concentração em Parasitologia  
Animal

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2007

636.089696

O48a

T

Oliveira, Camila Silva de, 1983

Alterações nos depósitos de glicogênio e conteúdo de glicose na hemolinfa de *Achatina fulica* bowdich, 1822 (mollusca, gastropoda), hospedeiro intermediário de *Angiostrongylus*, exposta ao látex de coroa de cristo *Euphorbia splendens* var. *hislopii* / Camila Silva de Oliveira – 2007.

46 f. : il.

Orientador: Jairo Pinheiro da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Veterinária.

Bibliografia: f. 35-46.

1. Parasitologia veterinária - Teses. 2. Molusco - Teses. 3. Glicogênio - Teses. 4. Eufórbia - Fisiologia - Teses. I. Silva, Jairo Pinheiro da, 1969. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Veterinária. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**CAMILA SILVA DE OLIVEIRA**

Dissertação submetida como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências  
curso de Pós-Graduação em Ciências veterinárias, área de concentração em Parasitologia  
Animal.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 16 / 02 / 2007

  
JAIRO PINHEIRO DA SILVA. PhD. UFRRJ  
(Orientador)

  
CLELIA CHRISTINA CORRÊA MELLO-SILVA. PhD. UNIG

  
ELISABETH CRISTINA DE ALMEIDA BESSA. PhD. UFJF

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, primeiramente, que me deu forças para sempre lutar pelos meus objetivos fazendo-me perseverar mesmo diante das maiores dificuldades.

A minha mãe, VANDA, e a meu pai, IVAN, sem os quais não existiria. Agradeço por toda a luta e carinho que sempre tiveram para que eu pudesse chegar até aqui. Vocês sempre serão o meu alicerce onde encontrarei em qualquer momento uma palavra de incentivo e carinho, seja de um jeito mais estimulador, sempre acreditando que serei capaz de tudo como faz a minha mãe, ou seja, de um jeito mais introspectivo e não menos encorajador como o meu pai, quando vejo seus olhos brilhando com as minhas conquistas. PAI e MÃE, amo muito vocês, obrigada.

A meu grande amigo e orientador, JAIRO PINHEIRO, por ter acreditado no meu potencial desde o início, quando éramos simples colegas de laboratório. Muito obrigada por todas as conversas onde você sempre me orientou para que eu pudesse seguir um bom caminho e nunca desistir. Saiba que você sempre foi o meu exemplo, sua dedicação à pesquisa, seu jeito de sempre tirar uma boa lição das peças que a vida nos prega, seu carisma e principalmente o seu jeito prático de ser sempre me inspiraram para lutar e quem sabe um dia poder ser uma profissional tão competente como você é. Poderia escrever um número sem fim de páginas de agradecimento para você, e nem assim conseguiria demonstrar como sou grata por tudo. Muito Obrigada.

A meu co-orientador, MAURÍCIO VASCONCELLOS, que me acolheu em seu laboratório e muito contribuiu com seus conhecimentos para a elaboração dessa dissertação. Obrigada.

A minha irmã que sempre acreditou em mim e apostou no meu futuro, saiba que você é meu exemplo de determinação. Beijos.

A meu cunhado, que foi quem me despertou a vontade de fazer uma faculdade pública e seguir na pós-graduação.

Em especial, a minha prima Adriana que comemorou todas as minhas vitórias fossem elas acadêmicas ou não. Dri, você para mim é um exemplo de força, garra, determinação e profissionalismo. Obrigada pelas palavras de carinho e incentivo.

A todos os parentes, que mais ou menos presentes sempre torciam para que tudo desse certo.

Aos colegas de curso e aos amigos de curso. Renata você foi minha companheira, Bióloga como eu, sempre que possível estávamos juntas conversando sobre os mais diversos assuntos, adorei ter a sua companhia nessa jornada. A todos os outros colegas, Vanessa, Isabele, Marcos, Raquel e Rodney, vocês só vieram a somar na minha formação. Foi muito bom conhecer vocês.

A todos os funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFRRJ e do Departamento de Parasitologia da UFRRJ, que sempre incentivaram e apoiaram na realização das pesquisas.

Em especial, para uma pessoa que mesmo longe durante essa etapa nunca deixou de estar perto de mim em todos os momentos. MAURO, hoje você está aqui mesmo que seja só para aplaudir o último ato do espetáculo. TE AMO!

E a mim, que estudei e batalhei para cumprir todos os créditos necessários, me dividindo entre a Rural e a FIOCRUZ para realizar os experimentos da dissertação. Acho que fiz bem feito!

## RESUMO

OLIVEIRA, Camila Silva. Alterações nos depósitos de glicogênio e conteúdo de glicose na hemolinfa de *Achatina fulica* bowdich, 1822 (mollusca, gastropoda), hospedeiro intermediário de *Angiostrongylus*, exposta ao látex de coroa de cristo *Euphorbia splendens* var. *hislopii*. 2007. 46p Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2006.

Os moluscos são invertebrados de grande importância para a medicina humana e veterinária, pois servem como hospedeiros intermediários de vários parasitos, podem acometer animais ou o homem. O molusco *Achatina fulica* em especial, é hospedeiro intermediário de nematóides do gênero *Angiostrongylus* spp. Estes moluscos, foram introduzidos no Brasil como uma tentativa de substituir o tradicional *escargot*, porém as grandes criações não proporcionaram o lucro esperado e os criadouros foram abandonados. A *Euphorbia splendens* var. *hislopii* é uma planta originária do continente africano e é muito utilizada como planta ornamental, devido ao seu fácil cultivo. Esta planta, porém, é classificada como tóxica pelo SINITOX – Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas. Assim sendo, o presente estudo pretendeu avaliar as consequências do uso do látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii* sobre o metabolismo de carboidratos de *Achatina fulica*. Para a determinação da dose subletal grupos com trinta animais foram expostos ao látex nas concentrações de 1%, 2.5%, 5%, 7.5%, 12.5%, 15%, 20%, 25%, 50%, 75% e 100%, sendo a concentração letal  $_{50}$  (CL<sub>50</sub>) 11,2%. Os valores observados para a concentração de glicogênio na glândula digestiva e na massa cefalopodal demonstraram que houve diferença significativa apenas no primeiro dia após a exposição a CL<sub>50</sub>. A análise de regressão polinomial demonstrou haver uma forte relação positiva ( $r^2=0,95$ ) entre a concentração de glicogênio na massa cefalopodal de moluscos expostos a CL<sub>50</sub> e moluscos do grupo controle ao longo do tempo após a exposição ao látex. Ao comparar os níveis de glicose na hemolinfa de moluscos expostos a CL<sub>50</sub> e de moluscos controles em função do tempo após a exposição em dias, a regressão polinomial evidenciou que esses níveis aumentam conforme o prosseguimento dos dias. A exposição de *A. fulica* à CL<sub>50</sub> do látex de *E. splendens* var. *hislopii* provocou a redução nos depósitos de glicogênio na glândula digestiva, e um efeito tardio sobre os depósitos de glicogênio da massa cefalopodal, e não apresentou variações significativas no conteúdo de glicose na hemolinfa de *A. fulica* exposta ao látex. Embora nos primeiros dias de dissecação tenha sido encontrado um maior nível de glicose livre circulante na hemolinfa. A exposição ao látex de *E. splendens* var. *hislopii* provocou uma significativa redução na concentração de galactogênio na glândula de albúmen de *A. fulica*.

Palavras Chave: *Achatina fulica*, *Euphorbia splendens*, alterações fisiológicas

## ABSTRACT

OLIVEIRA, Camila Silva. **Alterations in the glycogen deposits and glucose content in hemolymph of *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca, Gastropoda), intermediate host of *Angiostrongylus*, displayed to the latex of Crown of Christ *Euphorbia splendens* var. *hislopianii*.** 2007. 46p Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 2007.

Snails are invertebrate of great importance for the human and veterinary medicine, therefore they serve as intermediate host of some parasites, being able to acometer animal or human people. The snail *Achatina Fulica* is an intermediate host of nematodes like *Angiostrongylus* spp. These snails had been introduced in Brazil as an attempt to substitute traditional escargot, however the great creations had not provided the waited profit and the criation had been abandoned. The *Euphorbia splendens* var. *hislopianii* is an originary plant of the African continent and is largely used as ornamental plant. This plant, however, is classified as toxic by the SINITOX – Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas. So the present study intended to evaluate the consequences of the use of the latex of *Euphorbia splendens* var *hislopianii* on the metabolism of carbohydrates of *Achatina fulica*. For the determination of the sublethal Dose groups with thirty animals had been displayed to the latex in the concentrations of 1%, 2,5%, 5%, 7,5%, 12,5%, 15%, 20%, 25%, 50%, 75% and 100%, being Concentration Dose 50 (CL50) 11,2%. The values observed for the concentration of glycogen in the digestive gland and the cefalopodal mass had demonstrated that the exposition after had extremely significant difference only in the first day after displayed. The analysis of polynomial regression demonstrated to have one strong positive relation ( $r^2=0,95$ ) enters the glycogen concentration in the cefalopodal mass of snail displayed to the CL50 and snails of control group after to long of the time the exposition to the latex. When comparing the glucose levels in hemolymph of displayed snails to CL50 and snails of control group in function of the time after the exposition in days, the polynomial regression evidenced that these levels increase as the continuation of the days. The exposition of the *A. fulica* to the CL50 of the latex of *Euphorbia splendens* var. *hislopianii* make a reduction in the deposits of glycogen in digestive gland of the clam, presented in a delayed effect on the deposits of glycogen of the cefalopodal mass of the snails, did not have significant variations in the glucose content in hemolymph of *A. fulica* displayed to the latex. Although in the first dissection day has been found a bigger concentration of free glucose level in hemolymph. The exposition to the latex of *E. splendens* var. *hislopianii* make a significant reduction in the concentration of galactogen in albumen gland of the snail.

Key Words: *Achatina fulica*, *Euphorbia splendens*, physiological alterations



## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	1
REVISÃO DE LITERATURA .....	2
1) <i>Achatina fulica</i> .....	2
1.1) Biologia Geral .....	2
1.2) Distribuição Geográfica .....	2
1.3) Aspectos Parasitológicos .....	4
2) <i>Euphorbia splendens</i> var. <i>hislopii</i> .....	6
2.1) ação moluscicida das plantas .....	8
2.2) <i>Euphorbia splendens</i> var <i>hislopii</i> e sua ação moluscicida .....	9
2.2.1) Toxicologia .....	10
2.3) Principais resultados relacionados a <i>Euphorbia splendens</i> var <i>hislopi</i> ..	11
3) Carboidratos .....	12
3.1) Glicogênio .....	12
3.1.1) Síntese do Glicogênio .....	13
3.1.2) Degradação do Glicogênio .....	14
3.2) Galactogênio .....	14
3.2.1) Síntese do galactogênio .....	15
3.2.2) Degradação do galactogênio .....	16
4) Alterações fisiológicas em Condições de Estresse .....	16
OBJETIVOS.....	20
MATERIAL E MÉTODO.....	21
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
CONCLUSÕES.....	34
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	35
ANEXO A.....	42

## 1 INTRODUÇÃO

Os moluscos são organismos invertebrados de grande importância para a medicina humana e veterinária, pois servem como hospedeiros intermediários de vários parasitos principalmente dos trematódeos digenéticos. Muitos desses helmintos acometem animais e ou o homem causando respectivamente, perdas econômicas principalmente em rebanhos de corte e problemas de saúde pública.

O molusco *Achatina fulica* em especial, é hospedeiro intermediário de nematóides do gênero *Angiostrongylus*. Estes moluscos, no entanto foram introduzidos no Brasil como uma tentativa de substituir o tradicional *escargot*, porém como esse tipo de iguaria gastronômica não faz parte dos hábitos alimentares dos brasileiros, as grandes criações não proporcionaram o lucro esperado e os criadouros foram abandonados. Atualmente, esses moluscos constituem uma praga espalhada por todo o Brasil, o seu apetite voraz provoca a destruição de lavouras e a elevada taxa reprodutiva traz como consequência grande aumento populacional.

Tendo em vista todos os fatores acima apontados e as recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS), que propõem um controle integrado das parasitoses, cresce cada dia mais o número de trabalhos relacionados a diferentes formas de se controlar as populações de moluscos. Uma das principais correntes avalia o uso de plantas tóxicas e sua possível ação moluscicida, havendo várias espécies que já tiveram sua ação moluscicida avaliada. Assim, a Família Euphorbiaceae, que é reconhecidamente tóxica, já teve várias substâncias ativas isoladas e diversos estudos com espécies diferentes de moluscos foram realizados, apresentando doses letais abaixo do que as recomendadas pela OMS.

Os resultados promissores obtidos até então só fazem aumentar o interesse da comunidade acadêmica para essa linha de estudo, fazendo crescer a cada dia o número de trabalhos e o número de espécies de plantas estudadas.

Essas substâncias apontadas como biopesticidas têm apresentado baixa toxidez e rápida degradação quando testadas no ambiente.

Assim sendo, o presente estudo avaliou as consequências do uso do látex de *Euphorbia splendens* var *hislopii* sobre o metabolismo de carboidratos de *Achatina fulica*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 1) *Achatina fulica*

O molusco *Achatina fulica* é classificado zologicamente como, segundo Simone, 1999:

Filo Mollusca  
Classe Gastropoda  
Subclasse Pulmonata  
Ordem Stylommatophora  
Subordem Sigmurethra  
Superfamília Achatinoidea  
Família Achatinidae  
Espécie *Achatina fulica* **Bowdich, 1822**

#### 1.1) Biologia geral

O “Caramujo Gigante Africano”, *Achatina fulica* Bowdich, 1822, é um molusco pulmonado originário do Leste da África. Essa espécie de molusco alcança dimensões consideráveis, em torno de 20 cm de comprimento de concha.

Com relação o seu comportamento, apresenta maior atividade no período noturno e durante o dia vivem enterrados, escondidos ou abrigados em frestas de rochas, muros, montes de lixo, telhas, entulho, árvores, jardins, terrenos baldios ou qualquer outro lugar protegido da exposição direta aos raios solares. Além disso, alimentam-se vorazmente de vegetais e detritos orgânicos, destruindo hortas e plantações.

Já em relação a sua biologia reprodutiva, são hermafroditas e podem viver até seis anos, alcançando a maturidade sexual após o primeiro ano de vida. Cada *A. fulica* pode colocar de 50 a 400 ovos por postura chegando até a 500 por ano, com período de um a 15 dias de incubação.

Em 1992, Sen Mandal & Chowdhury purificaram da hemolinfa de *A. fulica* uma substância denominada AchatininH, uma lectina presa ao ácido siálico, responsável pela regulação endócrina do sistema reprodutor. Para evidenciar o sítio de produção desta substância os autores incubaram vários tecidos do molusco *in vitro* com metionina, um aminoácido precursor, a 25°C por 5 horas, demonstrando que o sítio de produção é a glândula de albúmem que tem a função de secretar o fluido perivitelino dos ovos.

Pouco se sabe sobre a regulação endócrina dos moluscos. Os poucos trabalhos existentes na maioria das vezes discorrem sobre regulação endócrina de sistema reprodutor, visando entender os mecanismos biológicos para controlar a espécie de uma maneira eficaz. Fujisawa *et al.* 2000 avaliaram o efeito da fulicina, um neuropeptídeo contendo D-aminoácido, em *A. fulica* que controla o comportamento copulador masculino no molusco. Em seu estudo, os autores demonstraram que a vagina e o oviduto de *A. fulica* são densamente inervados com fibras neuronais imunoreativas para fulicinas.

Nesse mesmo trabalho, os autores afirmam também que a fulicina demonstrou um efeito excitatório profundo na contração da vagina e do oviduto sugerindo assim possível controle sobre o comportamento de oviposição.

#### 1.2) Distribuição geográfica

Além das informações biológicas vistas acima, outro aspecto importante a ser abordado no estudo dessa espécie é sua dispersão geográfica. Tendo em vista que esta já

está presente em diversas regiões da África, Ásia, Ilhas do Pacífico e, recentemente, foi registrada sua ocorrência isolada no continente americano (WILSON, 1991).

Esses moluscos foram introduzidos no Brasil para a substituição do tradicional “escargot” *Helix aspersa* Müller, 1774, provavelmente, na década de 30. O grande “boom” de *Achatina* no Brasil foi por volta do final da década 80, no Estado do Paraná, após a exposição desse caramujo em uma feira, onde foi apresentado como uma possibilidade para a substituição do tradicional *escargot* visto que o seu grande porte e fácil reprodução gerariam maior rentabilidade aos criadores.

Alguns fatos, portanto, são apontados como motivos para o abandono das criações desses moluscos como a não aceitação desta espécie pela população brasileira, já que sua carne não apresenta uma boa palatabilidade e o fato dos brasileiros não terem hábito de consumir *escargot* extensivamente. Então, o que era uma promessa de enriquecimento rápido e fácil, tornou-se uma grande frustração e motivo de perdas econômicas para muitos. Segundo Teles *et al.* (1822), os moluscos escaparam dos criadouros e se dispersaram na cidade de Itariri, no estado de São Paulo, onde foi registrada sua primeira ocorrência.

Já no Estado do Rio de Janeiro, o seu primeiro relato ocorreu no Vale do Paraíba, no município de Resende por Vasconcellos & Pile (2001). Atualmente, estes animais estão alastrados por todo o Brasil, principalmente no litoral, estabelecendo populações de vida livre e tornando-se verdadeiras pragas agrícolas, por apresentar vantagens no tempo de crescimento individual e populacional, número de proles e resistência às condições ambientais (Fig. 1).



Figura 1- Distribuição dos moluscos *Achatina fulica* e *Helix aspersa* no Brasil

É de grande destaque a importância do “escargot” na alimentação de civilizações antigas. No Brasil, encontramos, entre outras, a espécie *H. aspersa* que foi introduzida pelos portugueses. Contudo, produtores brasileiros de “escargot” importaram *A. fulica* sem a mínima preocupação de possíveis danos à agricultura, às florestas, a competição com as espécies nativas e à saúde pública que caramujos escapados ou abandonados de suas criações pudessem causar.

### 1.3) Aspectos parasitológicos

Segundo Graczyk & Fried (2001), o parasitismo, como uma interação entre dois organismos, hospedeiro e parasito, é exclusivamente dependente do grau de integração fisiológica entre estes organismos e a sincronia fisiológica de seus ciclos biológicos. Assim, segundo a definição de Olsen (1977), o parasitismo é aquela relação na qual o parasito é fisiologicamente dependente do hospedeiro.

Moluscos são organismos de grande importância médica humana e veterinária, pois servem como hospedeiros intermediários de uma ampla faixa de parasitos, predominantemente do grupo dos trematódeos digenéticos, como o *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 e outros; também há nematóides de grande interesse médico em nosso país que têm a participação de moluscos em seus ciclos biológicos, como o *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Céspedes, 1971.

Além disso, um grande número de parasitos, que não afetam a saúde humana ou de animais de criação, hospedam-se em moluscos e participam da complexidade de ciclos e interações que resultam na contínua evolução das espécies.

Os moluscos da espécie *A. fulica* são incriminados como possíveis hospedeiros intermediários do nematóide *Angiostrongylus cantonensis* (= *Parastrongylus cantonensis*), causador da angiostrongilíase meningoencefálica humana (ou angiostrongilose meningoencefálica ou meningite eosinofílica) (TELES & FONTES, 1998). A manutenção dessa zoonose tem potencial importância na medicina veterinária por apresentar também roedores urbanos e silvestres como hospedeiros definitivos.

A infecção por *A. cantonensis* ocorre após o hospedeiro definitivo ingerir as larvas de terceiro estágio (L<sub>3</sub>), as quais emergem do hospedeiro junto com o muco que é eliminado pelo molusco para reduzir o atrito entre a massa cefalopodal e o substrato por onde se desloca. No homem, pode apresentar os seguintes sintomas: febre alta, vômito, irritabilidade, machadura na pele, ausência de reflexos nos tendões, retenção urinária, incontinência anal e meningite, podendo levar crianças à morte. A eosinofilia pode ser constatada no sangue periférico e no líquido pela citologia. Assim como algumas infecções secundárias bacterianas também podem ser observadas

Esses moluscos podem também hospedar o verme *A. costaricensis*, causador da angiostrongilíase abdominal (ou angiostrongilose abdominal), doença grave com centenas de casos já reportados no Brasil, embora nenhum desses casos haja correlação com o molusco *A. fulica* como hospedeiro intermediário. Essa doença pode resultar em óbito por perfuração intestinal, peritonite e hemorragia abdominal.

São vários os trabalhos que existem na literatura tentando elucidar a rota de migração dos estágios larvais de *A. cantonensis* em *A. fulica*, hospedeiro intermediário (BROCKELMEN *et al.* 1976; SAUERLANDER & ECKERT, 1974). Carvalho *et al.* (2003), infectaram experimentalmente alguns exemplares de *A. fulica* com larvas de *A. costaricensis*, demonstrando a susceptibilidade do molusco ao parasito. Concluindo que *A. fulica* pode ser um risco para a urbanização da angiostrongilíase abdominal devido a sua

alta proliferação, dispersão contínua e extraordinária adaptação nas cidades brasileiras. Embora ainda não tenham sido registrados casos de *A. fulica* parasitadas por *A. costaricensis* na natureza.

Com finalidade clara, esses trabalhos se fazem muito importantes para reconhecimento da biologia do hospedeiro quando infectado, visto que para se definir medidas de controle é necessário antes saber como o ciclo e as infecções se processam ao longo deste para se fazer um controle mais eficaz.

Em 1976, Sauerlander infectou experimentalmente moluscos com seis meses de idade. Um grupo recebeu 5000 larvas em primeiro estágio de desenvolvimento ( $L_1$ ) e outro recebeu 2000 larvas também de primeiro estágio de desenvolvimento ( $L_1$ ) de respectivamente, *Angiostrongylus vasorum* Baillet, 1866 e *A. cantonensis*, por exposição à suspensão larval.

Os moluscos foram histologicamente examinados após vários períodos de tempo pós-infecção. Uma hora pós-infecção as larvas foram encontradas na massa cefalopodal dos moluscos, duas horas pós-infecção as larvas também foram encontradas no trato gastrointestinal, doze horas pós-infecção pela primeira vez as larvas foram encontradas no pulmão, para onde estas são levadas através da hemolinfa. Vinte e quatro horas após, de 80 a 90% do total da população de larvas estava concentrada na massa cefalopodal e no pulmão. O autor também relatou ter detectado larvas em vários outros órgãos como manto, glândula digestiva e trato gastrointestinal, porém as larvas dispunham-se sempre próximas aos vasos condutores de hemolinfa. Somente após doze dias de infecção o autor detectou a ativação dos mecanismos de defesa que consiste em envolver o parasita por um grande número de hemócitos.

Bessa *et al.* (2000) avaliou o desenvolvimento biológico de *A. vasorum* em *Subulina octona* Bruguiere, (1789), para tal foram realizadas infecções dos moluscos por diferentes vias como alface, terra, fezes e suspensão aquosa, todos contendo o estágio  $L_1$  do parasito. Após vinte e um dias a autora verificou que todos os quatro meios de infecção testados foram viáveis.

Ainda em seu trabalho Bessa verificou a evolução larval demonstrando que até o 6º dia pós-infecção só havia larvas no estágio  $L_1$ , no 7º dia foi encontrada a primeira larva em estágio  $L_2$  e a partir do 13º dia a primeira em estágio  $L_3$ . A sobrevivência das larvas de estágio  $L_3$  foi testada em diferentes temperaturas, e a maior sobrevivência, 23 dias, ocorreu em temperaturas baixas cerca de 19,33°C.

Apesar de sempre relacionados a situações de aspecto negativo e da busca incessante por medidas de controle cada vez mais eficazes, existem trabalhos, como o de Tella (1979), no qual o autor investiga os possíveis efeitos farmacológicos do fluido corpóreo e de extratos feitos com o tecido do pé de *A. fulica*, demonstrando que nas duas fontes pesquisadas pode haver um agente anti-hipotensivo como os encontrados em moluscos aquáticos.

Medidas de controle para os moluscos, principalmente *A. fulica* no Brasil, são de extrema urgência por vários motivos. Seja por que o molusco foi introduzido indevidamente no país e devido à ausência de predadores naturais se tornou uma verdadeira praga, com reprodução intensa, destruindo lavouras e pequenas plantações. Seja pelo fato do molusco atuar como hospedeiro intermediário de determinados parasitos com sucesso de infecções experimentais já relatadas, ou até mesmo por problemas de saúde pública e controle de epidemias visto que devido ao seu grande porte a concha dos moluscos depois de mortos se não destruídas podem acumular água funcionando perfeitamente como

criadouro de larvas de vários insetos como o mosquito *Aedes aegypti* Linnaeu, 1758 vetor do vírus da dengue, epidemia de difícil controle no estado do Rio de Janeiro (TRIPS 1973).

Em seu estudo, Ments & Graeff-Teixeira (2005) mantiveram quinze duplas (macho/fêmea) de *A. costaricensis in vitro*, em meio de Waymouth durante 3 dias, para observação da quantidade e duração da oviposição. Médias de 321, 24 e 4 ovos em 10 microlitros foram registradas em 24, 48 e 72 horas, respectivamente. A maioria dos ovos foi eliminada nas primeiras 24 horas, sugerindo terem sido expulsos em condições não fisiológicas. Estes resultados indicam que as condições *in vitro* não são adequadas para testes de drogas inibidoras da oviposição, para tratamento da angiostrongilíase abdominal.

Graeff-Teixeira *et al.* (2006) fizeram um estudo longitudinal clínico-sorológico de pacientes parasitados com *A. costaricensis*. Durante os estudos que durou cinco anos os autores avaliaram e acompanharam 179 indivíduos residentes na zona rural do Sul do Brasil com transmissão ativa. Após as coletas de dados os autores evidenciaram resultados que indicam casos de re-infecção, em 32 indivíduos o teste de ELISA acusou reatividade para IgG por pelo menos um ano, ambos os sexos masculino e feminino foram mais afetados na faixa etária dos 30 aos 49 anos. Em algumas residências os autores encontraram moluscos naturalmente infectados com estágio L<sub>3</sub>, apresentando uma prevalência de 16% e baixas cargas parasitárias. Os autores concluem então que a angiostrongilíase abdominal no sul do Brasil pode ser uma infecção freqüente, porém com baixa morbidade e reatividade sorológica de gradual declínio.

## 2) *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (Euphorbiaceae)

A *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B. (Sin. *Euphorbia milii* Des Moulins var. *splendens* (Hook) Ursch & Leandri ) (Carter, 1994) pertence a família Euphorbiaceae. (Fig.2)



**Figura 2-** *Euphorbia splendens* var *hislopii* (coroa-de-cristo) – FIOCRUZ, RJ.

É uma planta originária do continente africano, na Região de Ilseberge, localizada no Planalto Central da Ilha de Madagascar. Tem distribuição cosmopolita e é muito utilizada como planta ornamental, devido ao seu fácil cultivo.

Esta planta, porém, apesar de sua extensa utilização ornamental é classificada como tóxica pelo SINITOX – Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas.

Diferentes espécies da família Euphorbiaceae são conhecidas pela sua atividade moluscicida. No entanto, até pouco tempo essas plantas não se mostravam muito atraentes

para estudos devido aos vários problemas relacionados à sua toxidez. Muitas espécies da família Euphorbiaceae contêm componentes que promovem irritações locais por contato e forbol ésteres, frequentemente encontrados em muitos gêneros dessa família, como por exemplo, os gêneros *Croton* e *Euphorbia* (FARNSWORTH *et al.* 1987). Este último componente toma grande importância por ser reconhecido como potente indutor de crescimento de tumores *in vivo* e aumentar a transformação de células saudáveis em células malignas em situações *in vitro* (WILLIAMS & WEISBURGER, 1986).

Sendo assim, desde que se observou uma ação letal do látex para várias espécies de moluscos do gênero *Biomphalaria* em concentrações menores que 0,5 ppm em condições laboratoriais (VASCONCELOS & SCHALL, 1986), a coroa de cristo - *E. splendens* var. *hislopii*, tornou-se especialmente interessante para os estudos.

O interesse em estudar a planta e sua ação moluscicida começou na década de 90 quando em 1991, Zani e colaboradores identificaram a presença de miliaminas no látex da “coroa de cristo”. O fracionamento fitoquímico do látex revelou a presença de oito substâncias derivadas da fração ativa, uma delas, porém, a miliamina L, apresentou uma dose letal 90 (DL<sub>90</sub>) para os moluscos do gênero *Biomphalaria* de 0.01 ppm (ZANI *et al.* 1989). Número este que é cem vezes mais potente que a niclosamida, o componente utilizado em larga escala na década de 90. A miliamina L teve sua ação letal demonstrada para várias espécies de moluscos, como por exemplo, *Biomphalaria glabrata* Say, 1818, *Biomphalaria tenagophila* Orbigny, 1835, *Biomphalaria straminea* Dunker, 1848, *Biomphalaria pfeifferi* Pfeiffer 1839 e *Bulinus sp.*, com doses letais variando entre 0.13 e 4.0 ppm dependendo da espécie testada (VASCONCELLOS & SCHALL, 1986; SCHALL *et al.* 1998).

Essa substância, porém, foi avaliada em vários estudos juntamente com outras miliaminas não revelando efeitos tóxicos nas concentrações usadas como moluscicidas. (FREITAS *et al.* 1991; SCHALL *et al.* 1991; SOUZA *et al.* 1997; CRUZ *et al.* 1996; OLIVEIRA-FILHO & PAUMGARTTEN, 1997).

Contudo, o fato mais representativo para justificar o número sem fim de estudos com *E. splendens* var. *hislopii* atualmente, é o fato das doses letais encontradas até hoje para várias espécies de moluscos serem muito menores do que a recomendada pela OMS para plantas utilizadas como moluscicida.

Segundo recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS), o controle das parasitoses deve ser integrado. O controle dos moluscos é de extrema importância desde que associados ao tratamento das pessoas doentes, junto com o controle do ambiente e desenvolvimento sócio-econômico e com a participação da comunidade na educação para promoção da saúde.

Entretanto, moluscicidas químicos são muito usados no controle dos caramujos. E na maioria dos casos têm ocorrido rápida recolonização dos sítios de transmissão pelos hospedeiros intermediários (PIERI *et al.* 1995). No Brasil, o uso da niclosamida é freqüente, assim como a recolonização, pelos moluscos, dos sítios de aplicação. Além do problema citado anteriormente de recolonização, há dados na literatura que inferem sobre outros efeitos da ação letal das niclosamidas em seres vivos não alvos, como anfíbios, peixes e plantas aquáticas. (ANDREWS *et al.* 1983).

Por essas razões, são realizados muitos estudos para desenvolver medidas preventivas para o controle de caramujos. A maioria destes é baseado na possibilidade de usar plantas ou derivados de plantas como moluscicida efetivo e com baixa toxicidade. Por que você usa toxicidade para o ambiente e outros animais.



Estudos alternativos que avaliam as propriedades moluscicidas de extratos de plantas têm demonstrado que além de não afetar o ambiente, os extratos são de baixo custo. De acordo com Guia Norte Americano, derivados de plantas moluscicidas são considerados biopesticidas, o que os difere dos produtos sintéticos padronizados para espécies específicas, pois não são tóxicos e devido a sua ocorrência natural causam menos danos ao meio ambiente (KOEMAN, 1987).

### 2.1) Ação moluscicida das plantas

O uso de moluscicidas vem sendo estudado desde 1930 com a perspectiva de que se torne o mais adequado e efetivo método de controle para caramujos que atuam como hospedeiro intermediário de várias parasitoses. As investigações sobre as propriedades moluscicidas das plantas, vêm crescendo ultimamente, com mais de 1.400 espécies já estudadas (KLOOS & Mc COLLOUGH, 1987; JURBERG *et al.* 1989).

Extratos de plantas são investigados como potenciais moluscicidas, o que seria uma estratégia auxiliar no controle principalmente da esquistossomose que é considerada um problema de saúde pública.

Existem vários levantamentos sobre plantas moluscicidas, que fornecem inúmeras informações sobre as plantas testadas, bem como sobre condições de testes realizados. Esses estudos se fazem importantes porque quanto maior for o número de plantas assinaladas, maior será o número de gêneros e conseqüentemente de espécies promissoras.

Em 1982, Kloos & Mccullough publicaram um levantamento com 61 espécies de plantas. Nesse trabalho existe uma revisão bibliográfica sobre listagens de plantas testadas como moluscicidas nos trabalhos de Amorim & Pessoa (1962), Barbosa & Mello (1969), Silva, Souza & Rouquayrol (1971), Sousa E Rouquayrol (1974), Rouquayrol, Sousa & Silva (1972), Rouquayrol, Sousa & Matos (1973) e Rouquayrol *Et Al.* (1980), que identificaram várias plantas Brasileiras com atividade moluscicida em potencial.

Posteriormente, em 1987, novamente Kloos & Mccullough baseados no Banco de Dados do NAPRALERT, listaram 571 plantas estudadas quanto as suas propriedades moluscicidas. Estes mesmos dados foram utilizados no trabalho de Farnsworth *et al.* (1987), em que os autores correlacionam as plantas que apresentam atividades moluscicidas com seus princípios ativos, quando já testados, e sua distribuição geográfica, tornando assim o levantamento mais completo.

Jurberg *et al* (1989) realizaram um levantamento no qual foram analisadas 73 famílias somando um total de 344 espécies. Dentre estas, 26 espécies em 19 famílias com 214 exemplares, apresentaram mortalidade em concentrações inferiores a 100 ppm. As famílias das Euphorbiaceas e Sapindaceas, com duas e uma espécies, respectivamente, apresentaram 100% de mortalidade a concentrações inferiores a 10 ppm. O resumo dos resultados encontrados por esses autores está apresentado na Tabela 1.

**Tabela 1-** Famílias de plantas que apresentaram melhor atividade moluscicida com doses letais menores que 100 ppm e 10 ppm.

<b>Família</b>	<b>Total de espécies</b>	<b>Nº de espécies que matam em dose em inferior a 100 ppm</b>	<b>Nº de espécies que matam 100% em dose inferior a 10ppm</b>
Anacardiaceae	6	1	*
Apocynaceae	6	2	*
Bignoniaceae	2	1	*
Celastraceae	1	1	*
Compositae	92	4	*
Euphorbiaceae	23	5	2
Graminaceae	2	1	*
Lauraceae	6	1	*
Magnoliaceae	1	1	*
Melastomaceae	1	1	*
Rhamnaceae	3	1	*
Rubiaceae	5	1	*
Rutaceae	10	1	*
Sapindaceae	6	1	1
Vochysiaceae	4	1	*
L. Caesalpinoideae	15	1	*
L. Mimosoideae	15	1	*
L. Papilionoideae	14	1	*

## 2.2) *Euphorbia splendens* var *hislopii* e sua ação como moluscicida

A *E. splendens* var *hislopii* é uma planta bem adaptada ao clima do Brasil, amplamente distribuída pelo país e de fácil crescimento. Além disso, a preparação do moluscicida é simples, basta diluir o látex na água.

Resultados prévios demonstraram baixa toxidez do látex da *E. splendens* para pele e olhos de cachorros e ratos e para pele de humanos (RIZZO & PORIFIRO, 1971), para pele e os olhos de coelhos (FREITAS *et al.* 1991) e apresentando letalidade para o molusco hospedeiro intermediário da esquistossomose, fatos estes que ampliam a margem satisfatória para o uso do produto no campo.

Então em 1987, Koeman argumentou que se o produto é baseado num extrato aquoso de planta, os constituintes tóxicos são menos acumulativos através das cadeias alimentares.

O látex mostrou apenas uma pequena variação na potencialidade pelas estações e área geográfica de coletas (SCHALL *et al.* 1992), onde os autores encontraram doses letais (DL<sub>90</sub>) de 1.14 ppm na primavera, 1.02 ppm no outono, 1.09 ppm no inverno, e 1.07 ppm no verão contra *B. tenagophila* no campo. Tais resultados talvez possam ser explicados pela fisiologia da planta que tem todo seu metabolismo alterado, inclusive a produção de látex, em função de aspectos abióticos como temperatura, intensidade luminosa, quantidade de água disponível e outros fatores climáticos que no Brasil sofrem alterações consideráveis ao longo do ano.

Ensaio com látex coletados em Belo Horizonte e Recife produziram valores similares para DL<sub>90</sub>, com os obtidos de látex coletado no Rio de Janeiro, demonstrando estabilidade geográfica para o efeito moluscicida dentro de uma mesma estação do ano.

Outros testes demonstraram que a atividade moluscicida do látex natural permanece inalterada se este for armazenado por até 124 dias em temperatura ambiente e por 736 dias em garrafa fechada (látex liofilizado) em refrigerador com temperatura de 10-12°C (SCHALL *et al.* 1992).

Vasconcellos & Amorim (2003a) demonstraram a ação moluscicida do látex da “coroa-de-cristo” – *E. splendens* var. *hislopii* – contra o molusco *Lymnaea columella* Say, 1817, hospedeiro intermediário de *F. hepatica* em condições de laboratório. Para realização dos testes, os moluscos foram coletados nos tanques da piscicultura da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. O objetivo dos autores era avaliar a ação do látex ao longo das quatro estações do ano, e obtiveram os seguintes resultados observando 100% de mortalidade no verão a uma concentração de 0.6mg/L; 100% de mortalidade no inverno e outono a uma concentração de 1mg/L, enquanto na primavera 100% de mortalidade só foi conseguido a uma concentração de 2mg/L. Evidenciando dessa maneira os fatos acima citados, referentes a pouca estabilidade moluscicida ao longo do ano.

### 2.2.1) Toxicologia

Com a descoberta da ação moluscicida presente na *E. splendens* var. *hislopii*, os resultados promissores apontados pelas baixas doses letais encontradas, e as promessas de controle de doenças endêmicas como a esquistossomose e a fasciolose, fizeram crescer também o número de estudos sobre os possíveis efeitos toxicológicos presentes na planta antes de iniciar o seu uso em larga escala.

Em 1986, Cruz e colaboradores avaliaram o efeito da planta na promoção de crescimento de tumores devido à presença de forbol éster nas plantas da família Euphorbiaceae.

Do ponto de vista da toxicologia ambiental, o látex mostra-se como um moluscicida interessante por ser biodegradável e por ser menos perigoso para os organismos não alvo quando comparado a Niclosamida®, que é o componente moluscicida mais utilizado atualmente (OLIVEIRA-FILHO *et al.* 1995).

Apesar dessas vantagens, é necessário ter cuidado compreender e avaliar todas as questões toxicológicas relacionadas ao látex antes de iniciar o uso do mesmo em programas de controle de moluscos.

São muitos os estudos que mostram a eficiência do látex da “coroa-de-cristo”, como é vulgarmente conhecida, como moluscicida, entretanto, uma avaliação toxicológica ampla do látex se faz necessária antes de cogitar a possibilidade de usar o produto em larga escala, devido à presença de compostos cancerígenos na sua composição.

Visando demonstrar possíveis efeitos, Cruz *et al.* (1996) procuraram determinar se o látex de *Euphorbia milii*, sinônimo de *E. splendens* var., *hislopii*, continha alguma atividade promotora no crescimento de tumores em ensaios de curto período *in vitro*. Amostras do látex liofilizado foram testadas em uma escala de concentração não citotóxica de um, 10, 50 e 100µg/mL em três experimentos independentes. Em todos os três ensaios, o látex de *E. milii* inibiu consideravelmente a cooperação metabólica entre as células V79 em concentrações menores ou iguais a 10µg/mL. Quando analisados conjuntamente os resultados dos três ensaios independentes mostraram que o látex de *E. milii* inibe a cooperação entre mediadores metabólicos da junção GAP das células V79. Indicando assim, que o látex de *E. milii* contém substâncias que promovem o crescimento de tumores,

sugerindo que o uso *in natura* do látex como moluscicida pode ser carcinogênico para as pessoas que ficarem expostas continuamente ao produto.

Outros testes toxicológicos foram realizados, incluindo estudos de irritabilidade (através de filtragem de TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium* e citotoxicidade (através de ensaios com células ovarianas de hamster chinês) (SCHALL *et al.* 1991 e ZAMITH *et al.* 1996), embriofetotoxicidade (usando camundongos Wistar tratado com solução do látex durante o segundo estágio do período embriogênico, do sexto ao 15º dia de gravidez) (SOUZA *et al.* 1997), ecotoxicologia (usando espécies de plâncton, peixes, moluscos e larvas de insetos) (OLIVEIRA-FILHO & PAUMGARTTEN, 1997) e toxicologia sub-crônica (administrando doses subletais a ratos por 90 dias), todos os estudos não revelaram efeitos tóxicos nas concentrações usadas como moluscicida.

Contudo, outros ensaios demonstraram que *E. splendens* var. *hislopii* também possui efeitos medicinais, como citado por Rao & Sussela (1982), quando estes realizaram um estudo químico da planta e isolaram alguns poucos esteróides, e um deles (citrotadienol – Ia) que reconhecidamente possui ação anti-inflamatória. Lee *et. al* (1982) citam o uso do caule, raiz e do látex de *E. splendens* pelos Chineses na medicina popular como remédio natural para hepatite e edema abdominal. Estudos com o extrato clorofórmico do caule e das folhas dessa planta identificaram uma substância, que possui propriedades anticancerígenas, inibindo, por exemplo, o crescimento de linfócitos leucêmicos. Não há referências de efeitos negativos de *E. splendens* var *hislopii* feitos no sistema NAPRALERT (FARNSWORTH *et al.* 1981).

Testes toxicológicos indicaram que a dose de campo recomendada não é prejudicial a outros organismos que não sejam o alvo (SCHALL *et al.* 1998).

### 2.3) Principais resultados relacionados à *Euphorbia splendens* var *hislopii*

Estudos de campo com látex natural em ambientes lênticos e lóticos mataram 100% das *B. glabrata* e *B. tenagophila* nas concentrações de 5 e 12 ppm, respectivamente. (BAPTISTA *et al.* 1992, 1994; MENDES *et al.* 1992, 1997).

Vários estudos já foram realizados para se observar à ação moluscicida de algumas substâncias com várias espécies de moluscos, hospedeiros intermediários, para vários parasitos. Madsen (1990) atesta em seu trabalho que com o advento de novas drogas e técnicas de diagnóstico, a ênfase no controle da esquistossomose mudou do controle do caramujo para a quimioterapia dos indivíduos infectados. Entretanto, essa medida não previne novas infecções permanecendo a necessidade de reduzir a densidade de caramujos nas águas fornecidas aos homens. Já que no passado os tratamentos com moluscicidas eram ineficientes, caros e causavam sérios problemas ambientais.

Paniragrahi & Raut (1993) utilizaram o item alimentar preferido das lesmas *Laevicolis alte* Férussac, 1822 e do caramujo *A. fulica* para preparar iscas tóxicas injetando os pesticidas Rogor® e Nuvan® para matar moluscos. As iscas tóxicas preparadas com *Trichosantes dioica* e *Lycopersicum esculentum* foram aceitas por todos os indivíduos das duas espécies, independentemente do pesticida utilizado. Em todos os casos, as lesmas e caramujos morreram dentro de um tempo considerável após consumir a isca. A importância do uso de iscas tóxicas não está relacionada somente com a certeza do sucesso na morte dos organismos, mas também com o uso seguro de material tóxico a fim de evitar riscos ambientais.

Giovanelli *et al.* 2001 testaram o látex de *E. splendens* var. *hislopii* em *Melanoides tuberculata* Müller, 1774, usado no controle biológico de planorbídeos que são hospedeiros

intermediários de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, na região de Sumidouro no Estado de Rio de Janeiro, Brasil. Como o molusco *M. tuberculata*, encontrado no local, reduz naturalmente por competição exclusiva a população de *B. glabrata*, o uso do látex pode afetar as duas espécies trazendo conseqüências negativas para o controle biológico. Desse modo, o uso do látex só se torna interessante e vantajoso se o *M. tuberculata* for mais resistente à toxina. Após os experimentos, os resultados demonstraram que a DL<sub>90</sub> para *M. tuberculata* é 13,8 vezes maior do que a mesma dose para *B. glabrata*, então o uso do moluscicida na presença do *M. tuberculata* possui um efeito sinérgico na redução da população de *Biomphalaria*, podendo atuar de forma seletiva na eliminação de moluscos hospedeiros de *S. mansoni*, sem, contudo, eliminar outros moluscos presentes no ambiente.

Vascocellos & Amorim (2003b), após estudos laboratoriais preliminares, utilizaram o látex da *E. splendens* var. *hislopii* em ambientes simulados de campo, testando a aplicação de solução aquosa do látex na concentração de 5mg/L em tanques da piscicultura da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Os resultados demonstraram que 24 horas após a aplicação houve uma redução de 97,4% no número de *L. columella* presente nos tanques. Além desse resultado, 100% dos moluscos colocados em gaiolas, usados como sentinelas em três pontos equidistantes do sítio de aplicação, morreram.

Contudo, o látex de *E. splendens* var. *hislopii* é uma substância promissora no uso como moluscicida, visto que ele satisfaz muito dos critérios apontados por Mott (1987) como os recomendados pela OMS para este tipo de utilização, por exemplo, as doses letais encontradas para os moluscos vetores da esquistossomose são muito menores do que as recomendadas pela OMS, pela fácil preparação do extrato que pode ser diretamente manipulado pela população de áreas endêmicas que quase sempre está envolvida em atividades agrícolas.

Assim sendo, devido à grande importância dos moluscos como hospedeiro intermediário de vários parasitos, torna-se fundamental o uso de métodos de controle para o hospedeiro intermediário. Uma vez que na ausência desse hospedeiro o ciclo biológico do parasito não se completa, reduzindo assim a incidência das parasitoses nas quais esses moluscos façam parte do ciclo.

### 3) Carboidratos

#### 3.1) Glicogênio

O glicogênio é um polímero de D-glicose com cadeias lineares apresentando ligações  $\alpha(1,4)$  e grande número de ramificações formadas através de ligações  $\alpha(1,6)$ , apresentando uma grande capa de solvatação. Esta macromolécula pode ser composta apenas por resíduos de glicose ou pode apresentar outros componentes, notadamente, açúcares derivados, como os aminoaçúcares, sendo, então, denominados homopolímeros ou heteropolímeros, respectivamente.

A função básica da molécula de glicogênio é o armazenamento de glicose, o substrato mais prontamente utilizável no processo de obtenção de energia pelos animais. Assim, em momentos de alta demanda energética ou em condições fisiológicas de estresse o metabolismo é acelerado e o glicogênio pode ser degradado por enzimas específicas, para originar glicose livre, da qual é extraída a energia necessária para a manutenção de seus processos vitais, seja por via aeróbia (respiração celular) ou anaeróbia (fermentação).

O glicogênio nos moluscos é encontrado em células especiais que o armazenam na região anterior do manto e entre os ácinos da glândula digestiva e a gônada (MUELEMAN, 1972). Além dos sítios de localização citados acima, o tecido muscular, como aquele

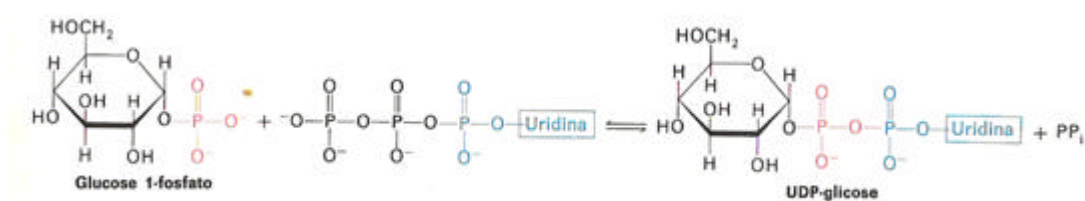
presente na massa cefalopodal, também pode estocar quantidades consideráveis de glicogênio, porém estes depósitos são direcionados (PINHEIRO & AMATO, 1994).

As duas enzimas reguladoras do metabolismo do glicogênio em mamíferos, a glicogênio sintase e a glicogênio fosforilase, tiveram suas propriedades bioquímicas e biofísicas bem caracterizadas e existem nas formas ativa (*a*) e inativa (*b*) sendo diferenciadas pela presença ou ausência do ligante covalente fosfatado, respectivamente (FISHER *et al.*, 1970; STALMAN & HERS, 1973).

Trabalhos, tais como os realizados por More & Gosselin, 1962; Wang & Scheer, 1963, citam que as enzimas glicogênio fosforilase e glicogênio sintase estão presentes em várias espécies de moluscos.

### 3.1.1) Síntese do glicogênio

Em 1957, Luiz Leloir e colaboradores demonstraram que o glicogênio é sintetizado por um caminho diferente nos moluscos. O doador de glicosila é a uridina difosfato glicose (UDP-glicose) e não a glicose-1-fosfato. A UDP-glicose, forma ativada da glicose é sintetizada a partir da glicose-1-fosfato e uridina trifosfato (UTP) em uma reação catalisada pela UDP-glicose pirofosforilase (Fig. 3).



**Figura 3** - Esquema representando a transformação da Glicose-1-fosfato em UDP-glicose pela UTP.

Durante o processo de formação, novas unidades glicosídicas são adicionadas aos resíduos terminais não redutores do glicogênio. A unidade glicosídica ativada da UDP-glicose é transferida para a hidroxila em C-4 de uma extremidade de glicogênio para formar uma ligação  $\alpha(1,4)$ -glicosídica. Esta reação é catalisada pela enzima glicogênio sintetase.

As ramificações, porém, são formadas pela adição de radicais glicosídicos na posição  $\alpha(1,6)$  através da enzima de ramificação, e estas aumentam tanto a solubilidade do glicogênio bem como a sua velocidade de síntese e degradação.

Nos moluscos, a enzima glicogênio sintase *b*, que contém fosfato ligado covalentemente é inativa *in vitro* a não ser na presença de glicose-6-fosfato (G6P). Entretanto, a fosforilase *b* é inativa na ausência de adenosina monofosfato cíclico (AMP) e não contém fosfato. Além disso, *in vivo*, a forma ativa dessas duas enzimas, sintetase *a* e fosforilase *b*, possuem ligações covalentes de fosfato, não requerendo, nessas condições, presença de moduladores. É importante ressaltar também que alguns moluscos como *B. glabrata*, possuem ambas as enzimas na região cefalopodal (CHIANG, 1977), corroborando os resultados encontrados por Pinheiro & Amato (1994).

Apesar da via preferencial de metabolismo dos polissacarídeos ser aeróbia, como visto acima, von Brand *et al.* (1950) demonstraram o consumo de carboidratos por moluscos

aquáticos em condições anaeróbias e a conseqüente produção de dióxido de carbono e ácido láctico.

Assim, de acordo com o trabalho realizado por Menakshi & Scheer (1968), no qual os autores, após terem injetado glicose e maltose marcadas com  $^{14}\text{C}$ , observaram a formação de polissacarídeos marcados na glândula digestiva, no pé e na glândula de albúmen de moluscos terrestres e como o visto por outros autores que obtiveram em experimentos semelhantes à formação de fosfatases, lactato e intermediários do ciclo de Krebs, também, marcados com  $^{14}\text{C}$ , pode-se concluir a existência dos diferentes sítios de reserva dos polissacarídeos e a presença de duas vias metabólicas para utilização do glicogênio.

### 3.1.2) Degradação do glicogênio

O processo de degradação do glicogênio foi elucidado graças aos estudos que mostraram que o glicogênio é cindido pelo ortofosfato para dar origem a uma nova fosforilada, que identificaram como glicose-1-fosfato, através do isolamento e cristalização da glicogênio fosforilase, enzima que catalisa esta reação. Portanto, fica claro que a reação de degradação não é reversa da reação de síntese.

A fosforilase catalisa a remoção sequencial de resíduos glicosídios da extremidade não redutora da molécula do glicogênio. A ligação glicosídica entre o C-1 de um resíduo terminal e o C-4 do resíduo adjacente é cindida pelo ortofosfato. Especialmente, a ligação entre o átomo de carbono C-4 e o átomo de oxigênio é cindida pelo ortofosfato e a configuração a em C-1 é mantida.

A cisão fosforolítica do glicogênio é energeticamente vantajosa porque a ose liberada é fosforilada. Ao contrário, uma cisão hidrolítica originaria uma glicose, que teria que ser fosforilada às custas de ATP para entrar na via glicolítica.

O glicogênio é degradado até uma extensão limitada somente pela fosforilase. As ligações  $\alpha(1,6)$ -glicosídicas nos pontos de ramificação não são suscetíveis de serem rompidas pela fosforilase. Quando a fosforilase atinge o quarto resíduo terminal a partir da ramificação sua atividade cessa, então uma enzima de transferase migra o bloco de três resíduos glicosídicos de um ramo extremo para outro, essa migração expõe o primeiro resíduo a uma terceira enzima, chamada enzima de desramificação ou  $\alpha(1,6)$ -glicosidase, convertendo assim a estrutura ramificada do glicogênio em uma estrutura linear.

### 3.2) Galactogênio

Hammarstein (1885) registrou a presença de uma glicoproteína em extratos de glândula de albúmen de *Helix pomatia* Linnaeus, 1758 e observou que a fração glicídica desta apresentava características semelhantes às do glicogênio, porém possuía propriedades levorrotatórias, ele a chamou de **sinistrina**. Em 1925, Levene, ao trabalhar com extratos obtidos de *H. pomatia* e *H. aspersa* demonstrou que a substância chamada de sinistrina era, na realidade, um polissacarídeo composto por galactose ou por derivados acetilados deste monossacarídeo e que a fração protéica obtida por Hammarstein era, de fato, uma impureza. Mas somente em 1931, May confirmou as observações de Levene e propôs o nome galactogênio para este polissacarídeo. Desde então, o galactogênio, polímero de alto peso molecular descrito como contendo tanto D como L-galactose em uma razão aproximada de 6:1, tem sido citado em várias espécies de moluscos pulmonados. (MAY 1931; McMAHON *et al.*, 1957)

Bioensaios com culturas orgânicas de glândula de albúmen de *H. pomatia* demonstraram que a biosíntese de galactogênio é supostamente acelerada por um neurohormônio secretado pelo molusco (GOUDSMIT, 1975; GOUDSMIT *et al.*, 1984). No entanto, os estudos ainda não foram capazes de provar se a ação deste neurohormônio tem como alvo o processo de síntese de galactogênio ou a atividade das enzimas.

O galactogênio, no entanto, é encontrado exclusivamente na glândula de albúmen, um órgão sexual secundário do sistema reprodutor feminino, e em ovos recém colocados. A glândula de albúmen é uma glândula exócrina que contém somente dois tipos de células: ciliadas e secretoras. Esta última sintetiza o polissacarídeo que posteriormente é armazenado em vesículas membranosas destinadas ao complexo golgiense.

### 3.2.1) Síntese do galactogênio

Até o presente momento, vários estudos foram realizados na tentativa de elucidar os processos que permeiam a síntese do galactogênio. Para tal, os autores utilizam-se de métodos de marcação enzimática que permitem o estudo da síntese do polissacarídeo, em tecido extraído durante as dissecações dos moluscos. Assim, não se pode afirmar que esses resultados correspondam à verdade, pois não necessariamente as situações encontradas nos testes *in vitro* são as mesmas que ocorrem nas situações *in vivo*.

Dessa forma, é possível supor que as enzimas biossintéticas se localizem no sistema endomembranas. Talvez, a galactosiltransferase e a L-galactosidase estejam localizadas no mesmo sub-compartimento do Golgi ou em vesículas ainda não descritas.

A atividade L-galactosidase descrita por Goudsmit *et al.* (1989) pode ser *in vivo*, uma enzima lisossomal a L-fucosidase. Seu papel se houver, na biosíntese de galactogênio requer conhecimentos de localização imunocitoquímica. Os estudos de Goudsmit *et al.* (1989) sobre o acceptor específico, indicaram uma variedade de galactanas que são carentes em L-galactose e podem atuar como aceptores para a 1,6-D-galactosiltransferase. Por outro lado, estudos provam que o galactogênio é formado por ligações tipo  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 3) e  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6).

As moléculas de galactogênio nos moluscos terrestres são usualmente ricas em terminações não redutoras. Aproximadamente, 40% do total de resíduos galactosil estão nesse tipo de terminações, com 14% do total de galactose na forma de L-isômero.

Conjuntamente, a demonstração da presença de glicose-1-fosfato uridiltransferase na glândula de albúmen de *H. pomatia* e a formação de galactogênio a partir da uridina difosfato glicose (UDP-glicose), indicam que a síntese de galactose e do galactogênio são supridas pela glicose fosfatase. Esses conhecimentos fizeram Sawicka & Chojnacki (1968) testar a biossíntese do galactogênio a partir de glicose-1-fosfato (G-1-P) e glicose-6-fosfato (G-6-P), demonstrando dessa maneira que a G-1-P fornece as unidades de galactose usadas na síntese do galactogênio. O processo, porém, depende da presença de UTP e da formação de UDP-glicose como um passo intermediário. De acordo com Goudsmit & Ashwell (1965), a UDP-galactose atua melhor como precursor do galactogênio quando comparado a UDP-glicose. Isso pode ocorrer devido à atividade da UDP-glicose 4-epimerase, presente no estudo de Goudsmit & Ashwell (1965), sendo nesse caso o equilíbrio da reação: UDP-glicose  $\rightleftharpoons$  UDP-galactose deslocado para a esquerda, e consequentemente toda UDP-galactose formada é prontamente utilizada na síntese do galactogênio.

Estudos mais recentes, entretanto, como o realizado por Goudsmit *et al.* (1989) permitiu identificar e obter, através de purificação, 2000 resíduos ativos da enzima presente na glândula de albúmen capazes de transferir D-galactose da UDP-galactose e adicionar



monômeros de D-galactosil através de ligações  $\alpha$  ou  $\beta$ ? (1? 6) ao acceptor de galactogênio em *H. pomatia*. A enzima descrita pelos autores possui uma faixa de pH ótimo entre 6.8 e 7.5 e é ativada pela presença de  $Mg^{2+}$ .

Outras pesquisas demonstraram que apesar do galactogênio ser o melhor acceptor em *H. pomatia*, a enzima também é capaz de utilizar galactanas de fígado de bovinos e galactogênio de *Lymnaea stagnalis*.

Joziase *et al.*, 1987 citam a atividade da UDP-D-galactose: galactosídeo  $\beta$ -(1? 3)-galactosiltransferase em extratos de glândula de albúmen de *L. stagnalis*. Desde então fragmentos não hidrolisados de galactogênio são ditos como bons aceptores, porém o papel fisiológico da enzima na síntese de galactogênio *in vivo* permanece incerto. O pH ótimo da enzima é 6.5 e a mesma é totalmente dependente de  $Mn^{2+}$ , diferenciando-se claramente da 1,6-galactosiltransferase descrita por Goudsmit *et al.* (1989).

### 3.2.2) Degradação do galactogênio

Nos gastrópodes pulmonados, os ovos, assim que fertilizados, descem pelo oviduto e são envolvidos por uma camada de fluido perivitelino secretado pela glândula de albúmen. O único carboidrato presente nesse fluido é o galactogênio. Esse polímero representa 36% do peso seco da massa de ovos colocada por *L. stagnalis* (HORSTMANN, 1956).

Já em 1958, Raven havia descrito a distribuição do fluido perivitelino durante o desenvolvimento de *L. stagnalis*. Segundo o autor, vacúolos contendo fluido perivitelino aparecem no ectoderma durante a gastrulação. Mais tarde, células do estomodeu se tornam ciliadas, e o fluido é conduzido até o meio de intestino, onde é englobado por células ectodérmicas, formando numerosos pequenos vacúolos no seu interior. A depleção nos depósitos de galactogênio tem início ainda no estágio de gástrula, continuando ao longo do desenvolvimento. Valores entre 46 e 78% do galactogênio presente nos ovos são consumidos durante o desenvolvimento embrionário, sendo o restante utilizado nos quatro dias subseqüentes a eclosão.

McMahon *et al.* (1957) encontraram resultados semelhantes quando repetiram o experimento de RAVEN. Comprovando também, a existência de um correspondente aumento nos conteúdos de glicogênio nos tecidos durante o desenvolvimento. Horstmann (1956) demonstrou alterações no conteúdo de lipídeo, havendo um aumento que variou entre 0,15 e 3,85  $\mu g$  por embrião durante 12 dias de desenvolvimento. Concluindo assim, que lipídio e glicogênio são formados à custa do galactogênio.

## 4) Alterações fisiológicas sob condições de estresse

Nos gastrópodes pulmonados, o metabolismo energético é baseado em carboidratos, os quais são armazenados na forma de polissacarídeos. Sendo o glicogênio e o galactogênio, os polissacarídeos de maior importância para o metabolismo energético e à reprodução, respectivamente, e mais abundantemente encontrados nos moluscos (GERAERTS, 1992).

Segundo Dan & Bailey (1982), a densidade populacional pode exercer efeito negativo sobre o crescimento e a reprodução de várias espécies de moluscos, resultando no retardo do crescimento e na baixa fecundidade.

Em 2000, Sidel'nikov & Stepanov avaliaram o efeito da densidade populacional no crescimento de *A. fulica*. Os autores verificaram que a taxa de crescimento estimada pelo peso e tamanho do comprimento da concha decresceram quando os moluscos foram

submetidos a densidades que variaram de 10 até 60 moluscos/m<sup>2</sup> por um período de cinco meses. De acordo com observações visuais feitas pelos autores, no grupo onde a densidade populacional era maior os animais ingeriam menos comida já que a quantidade de alimento que sobrava nesses terrários era maior quando comparada à quantidade dos terrários onde os animais estavam em baixa densidade populacional. Ou seja, a densidade populacional afeta diretamente o apetite dos moluscos.

Os ovos dos gastrópodes pulmonados são ricos em galactogênio e proteína, substâncias essas que são utilizadas pelos embriões como fonte de energia e, conseqüentemente, para a manutenção do metabolismo. A fim de determinar a estratégia reprodutiva de *Bulinus truncatus* Audouin, 1872 em condições de jejum severo, Bayomy *et al.* (1987) desenvolveram um estudo e observaram uma diminuição na postura de ovos, por volta do sexto dia, entretanto, 24 horas após o restabelecimento da alimentação a postura de ovos retornou ao normal. O mesmo foi observado por estes autores para a glândula de albúmem, registrando redução proporcional do peso fresco da glândula com o período de jejum.

Em situações de estresse, como jejum severo (PINHEIRO, 1996c), fotoperíodo, elevadas densidades populacionais, baixa umidade relativa e parasitismo por trematódeos larvais (PINHEIRO & AMATO 1994; AZEVEDO *et al.* 1996), o conteúdo destes polissacarídeos sofre uma redução drástica e os moluscos passam a utilizar outros substratos, como proteínas, para a obtenção de energia, o que pode causar no animal um quadro de intoxicação devido a um aumento do conteúdo de produtos nitrogenados de excreção.

Em 1978, Brockelman avaliou os efeitos do parasitismo por *A. cantonensis* na concentração de proteínas da hemolinfa de *A. fulica*. Após infecções experimentais, os moluscos não apresentaram nenhuma diferença nas concentrações de proteína na hemolinfa. Quando os moluscos infectados foram submetidos à repetidas aspirações de hemolinfa em seqüência, a concentração de proteínas mostrou uma redução significativa. Moluscos infectados mantidos em jejum também foram capazes de manter constante a concentração de proteína. Este mesmo tratamento, entretanto, associado a uma seqüência de aspirações de hemolinfa causa segundo o autor um estresse tamanho ao animal que a sua sobrevivência fica reduzida, pois o número de sobreviventes depende da freqüência de aspirações e do nível de alimentação.

Ao estudar as alterações nas reservas de carboidratos de *A. fulica* quando parasitadas por *A. cantonensis* e sob jejum severo os autores constataram que os níveis de reservas glicídicas na hemolinfa e na glândula digestiva reduziram significativamente após uma semana de infecção. Após um curto período de exposição, porém, os níveis de glicídios em ambos os sítios de estudo voltaram para as concentrações normais, sugerindo assim uma possível adaptação do molusco hospedeiro à condição de infectado. Em estudos paralelos, os autores também constataram que os níveis de glicídios em condição de jejum severo só se alteram significativamente quando os moluscos encontram-se infectados (BROCKELMAN & SITHITHAVORN, 1980).

Registros de alterações no funcionamento da glândula de albúmem de moluscos parasitados por larvas de trematódeos, têm sido encontrados com freqüência na literatura (PINHEIRO, 2003; van ELK & JOOSSE, 1981).

Existem vários estudos na literatura que evidenciam as alterações fisiológicas sofridas pelos moluscos que atuam como hospedeiros intermediários de vários parasitos,

boa parte desses estudos busca entender como se mobilizam as reservas de carboidratos em moluscos infectados.

Estudos dessa natureza se fazem necessário, pois a utilização das reservas de polissacarídeos pelos parasitos pode gerar várias conseqüências no organismo do hospedeiro. Essas, no entanto, estão intimamente relacionadas a outros fatores como a carga parasitária e a idade do hospedeiro, podendo acarretar problemas, como a castração parasitária ou até mesmo a morte do hospedeiro, uma vez que o esgotamento das reservas glicídicas leva a utilização de outras moléculas orgânicas, como as proteínas, que resultam em metabólitos tóxicos para o animal em certas quantidades.

Infecções por larvas de trematódeos são sempre acompanhadas de intensas alterações no metabolismo do molusco hospedeiro intermediário. Vários trabalhos demonstram que a primeira reserva de energia para o desenvolvimento do esporocisto e, conseqüentemente, das cercárias é a glicose, no entanto não é surpresa que haja redução na concentração de glicose de moluscos infectados (CHENG & LEE, 1971; STANISLAWSKI & BECKER, 1979; BECKER, 1980; SCHWART & CARTER, 1982).

A utilização de glicose pelos estágios larvais está diretamente relacionada com a redução de glicose na hemolinfa e com a depleção nas reservas de glicogênio nos tecidos e aumento da glicogenólise na região cefalopodal (SCHWART & CARTER, 1982).

Crews & Yoshino (1990) estudaram os mecanismos moleculares envolvidos na alteração na função reprodutiva dos moluscos hospedeiros intermediários infectados pelas larvas de *S. mansoni* durante o período pré-patente e demonstraram haver reduções na atividade de síntese de carboidratos após um período de 28 dias de infecção.

É sabido que *B. glabrata* atua como hospedeiro intermediário de *S. mansoni* e que após a penetração, na região cefalopodal do molusco, o miracídio se transforma em esporocisto mãe, que, através de processos de poliembrionia, dão origem aos esporocistos filhos que migrarão para a região da glândula digestiva, onde produzirão as cercárias. Em seu trabalho de 1977, Chiang postulou que a maior disponibilidade de glicogênio na glândula digestiva e no complexo do ovotestis pode explicar parcialmente a preferência dos esporocistos filhos por essas regiões quando vão desenvolver as cercárias.

Em 1986, Thompson & Lee observaram que o conteúdo de glicose na hemolinfa de moluscos é precisamente regulado em *B. glabrata*. Assumindo esta idéia como verdadeira, Pinheiro & Amato (1994), em um estudo sobre o modelo *Bradybaena similaris* Férussac, 1821 infectada com larvas de *Eurytrema coelomaticum* Giard & Billet, 1892 (Looss, 1907), propuseram que os esporocistos que ficam aderidos à superfície externa da glândula digestiva do hospedeiro são banhados pela hemolinfa, de onde retiram os monômeros de glicose necessários para a manutenção dos intensos processos plásticos que tem lugar no desenvolvimento larval intramolusco. O desequilíbrio causado na composição glicídica da hemolinfa, leva o molusco a dispor de suas reservas de carboidratos, o que causa a depleção dos seus estoques de glicogênio.

Ishak *et al.* (1975) ao estudarem o metabolismo de carboidratos em *Biomphalaria alexandrina* e *B. tuncatus* infectados e não infectados por trematódeos, comprovaram que os animais infectados sofrem depleção de seus estoques de glicídios.

Em *A. fulica* os níveis de carboidratos totais e glicogênio no músculo da massa corporal, pé e hemolinfa revelaram sua participação na derivação endógena de energia durante o estresse. Os mesmos metabólitos na glândula digestiva revelaram sua importância para a reprodução e desenvolvimento.

Como vários estudos comprovam que sob condições de estresse os depósitos de carboidratos do molusco se alteram, o presente estudo visa observar a ocorrência de alteração(ões) fisiológica(s), utilizando como parâmetro a dosagem dos carboidratos, nos moluscos expostos à dose sub-letal do látex de “coroa-de-cristo” (*Euphorbia splendens* var *hislopii*).

## 2 OBJETIVOS

- 1- Determinar a concentração sub-letal (CL<sub>50</sub>) do látex de *E. splendens* var *hislopii* para *A. fulica*;
- 2- Determinar, quantitativamente, a concentração de galactogênio na glândula de albúmem, e de glicogênio, na massa cefalopodal e glândula digestiva em moluscos expostos a CL<sub>50</sub> do látex de *E. splendens* var *hislopii*;
- 3- Realizar a análise bioquímica da hemolinfa de *A. fulica*, exposta a CL<sub>50</sub> do látex de *E. splendens* var *hislopii*, para determinação do conteúdo de glicose livre.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 1) Coleta e manutenção das colônias de moluscos

Os moluscos foram coletados, no bairro Brito em Campo Grande, no Estado do Rio de Janeiro (22°55'03"S; 43°33'40"W).

Os moluscos foram retirados manualmente da vegetação ou do solo e acondicionados em vasilhames plásticos. Após a coleta, os moluscos foram levados para o laboratório 3 da Área de Biofísica, Departamento de Ciências Fisiológicas (DCFis), Instituto de Biologia (IB), UFRRJ, onde foram contados, lavados e transferidos para um terrário, feito em caixa d'água de amianto com volume de 500L, com fundo coberto por uma camada de terra vegetal de 3 cm de espessura, previamente umedecida com água da torneira, através de um borrifador.

A alimentação dos moluscos foi feita com folhas de repolho (*Brassica sp.*) e alface (*Lactuca sativa L.*) frescas, sendo as folhas lavadas em água de torneira antes de serem oferecidas aos moluscos.

A manutenção do terrário foi realizada em dias alternados e durante o processo de manutenção as folhas oferecidas aos animais foram renovadas, evitando sua fermentação no interior dos terrários. O número de moluscos mortos, assim como a presença de posturas também foram critérios observados.

Os terrários foram cobertos com tecido de *nylon*, permitindo uma boa aeração e impedindo a saída dos moluscos, assim como, a entrada de insetos.

#### 2) Coleta do látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii*

As amostras do látex de *E. splendens* var. *hislopii* foram coletadas de exemplares cultivados em canteiros situados próximos ao Departamento de Biologia na Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, RJ (22°52'33"S; 43°14'46"W), em um mesmo período do ano, durante os meses de maio e junho, correspondendo a uma mesma estação do ano, o outono, evitando possíveis variações metabólicas que pudessem interferir na concentração da substância ativa.

As coletas do látex foram realizadas nos mesmos dias dos testes, através de secionamento transversal, cerca de 10 cm abaixo do meristema apical de cada galho. O látex bruto foi coletado em tubo de ensaio de vidro fechado com tampa rosqueável, para se evitar a coagulação, e transportado ao laboratório imediatamente após a coleta, onde era armazenado sob refrigeração (-10°C) até seu uso para preparo da diluição.

Este método de coleta teve a vantagem de manter a integridade da planta da qual se extraiu o látex mantendo-a viável e produtiva.

#### 3) Determinação da concentração letal (CL<sub>90</sub>) e subletal (CL<sub>50</sub>)

Vários bioensaios foram inicialmente realizados a fim de verificar qual seria a melhor forma de administração do látex para os moluscos, para isso foram usadas doses previamente testadas e comprovadas pelo Núcleo de Biologia e Controle de Endo e Ectoparasitas de Interesse Médico e Veterinário, Departamento de Biologia, Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, RJ.

Foram testadas as seguintes formas de aplicação: a primeira consistia em solução de látex oferecida em placas de Petri aos moluscos, a segunda consistia em aplicar o látex liofilizado sobre a alface que era oferecida aos moluscos como alimento e a terceira forma introduzida neste trabalho, por não ter sido anteriormente testada, foi a pulverização da solução feita com o látex sobre os moluscos.

O experimento piloto foi realizado de acordo com a metodologia descrita para moluscos aquáticos (OMS). Segundo estas, os moluscos sem formação de epifragma foram expostos ao látex por um período de 24 horas, seguidos por mais 24 horas de recuperação. Esse tempo, porém, teve que ser ajustado por causa da falta de parâmetros confiáveis, como ausência de reflexos após estímulos na massa cefalopodal, ausência de movimento ou consistência dos tecidos, para detectar a mortalidade dos moluscos e também pela pequena quantidade e, às vezes, ausência de animais mortos. Então, o tempo foi reajustado para 48 horas de exposição seguidas por mais 48 horas de recuperação.

Ao término do experimento piloto, a avaliação dos resultados, expressos através do número de animais mortos, demonstrou que a melhor forma de aplicação, ou seja, aquela onde houve a maior taxa de mortalidade relacionava-se com o grupo de animais que foram expostos ao látex através da pulverização, como demonstram os protocolos de dados presentes no ANEXO 1.

Findada a etapa preliminar através da definição do melhor método de aplicação do látex, teve início a bateria de testes para determinar a Concentração Letal.

#### a) Preparação das soluções aquosas e Período de exposição

Para a determinação das concentrações letal e subletal foi testada a aplicação do látex da seguinte forma. A partir do látex *in natura*, eram obtidas as soluções de diferentes concentrações a serem analisadas, que eram pulverizadas através de pulverizadores plásticos sobre os moluscos.

Este procedimento de bioensaio está de acordo com a metodologia recomendada pela OMS (WHO, 1983); Mott (1987) e já utilizada por Vasconcellos & Amorim (2003a, b).

A aplicação foi feita em três repetições com grupos de dez moluscos cada, para cada concentração testada: 1%, 2,5%, 5%, 7,5%, 12,5%, 15%, 20%, 25%, 50%, 75%. Outros 30 moluscos foram usados como grupo controle sobre os quais foi pulverizado somente água. Os moluscos ficaram expostos ao látex por um período de 48 horas. Durante este período, a temperatura e a umidade foram observadas antes e após a exposição ao látex.

#### b) Período de recuperação

Após o período de exposição, os moluscos foram retirados dos recipientes, lavados com água destilada para remoção de resíduos da solução na concha e contados o número de animais mortos. Após este procedimento, os moluscos foram transferidos para recipientes contendo terra e alface fresca por mais 48 horas (período de recuperação).

Após 96 horas do início do teste, os animais mortos e sobreviventes foram novamente contados. As mortes dos animais eram constatadas utilizando-se uma pinça de relojoeiro para verificar a ausência de contração muscular, com o auxílio de microscópio estereoscópico, caracterizando-se assim a morte do animal.

Ao final do período de recuperação, os moluscos sobreviventes eram sacrificados, para dissecação anatômica.

Findados os experimentos que determinaram a concentração subletal, uma nova bateria de exposição foi realizada a fim de avaliar aspectos bioquímicos da ação do látex sobre os moluscos. Para tal, foram montados dez grupos com cinco animais cada dispostos em vasilhames plásticos. Do total descrito acima, nove grupos foram expostos, através de pulverização, a 10 mL da diluição do látex congelado a -10°C na CL<sub>50</sub> determinada, o outro grupo foi mantido como controle.

Um animal de cada grupo foi dissecado após 1 dia, 7, 14 e 21 dias da pulverização. Os moluscos sobreviventes selecionados, após os períodos descritos acima, eram sacrificados, para extração da hemolinfa e dissecação anatômica. Dos órgãos dissecados, foram separadas glândula digestiva, massa cefalopodal e glândula de albúmem, para as análises de glicogênio e galactogênio, respectivamente, sendo necessário o congelamento das amostras em freezer (-10°C), devidamente identificadas, para posterior processamento e análise.

#### 4) Extração e dosagem de glicogênio e galactogênio

A extração de glicogênio de glândula digestiva e massa cefalopodal e de galactogênio da glândula de albúmem dos exemplares de *A. fulica* seguiu a técnica de descrita por Pinheiro & Amato (1994) e a dosagem foi realizada segundo a técnica do 3,5 dinitro salicilato (DNS) (SUMNER, 1924).

#### 5) Extração da hemolinfa para análise bioquímica

A hemolinfa foi coletada através da punção da cavidade cardíaca, utilizando-se seringas B-D *Becton Dickinson*<sup>®</sup> e acondicionada em microtubos Eppendorf, mantidos durante a coleta em banho de gelo. Os moluscos tiveram sua hemolinfa puncionada após a quebra da concha que foi realizada sem anestesia prévia. A hemolinfa foi armazenada a -10°C até a sua utilização. A análise bioquímica foi realizada, posteriormente, através de kits para diagnóstico laboratorial de glicose, Doles<sup>®</sup>.

#### 6) Análise Estatística

Os resultados obtidos nas determinações bioquímicas foram expressos como média  $\pm$  desvio-padrão, submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA), teste de Tukey-Kramer para comparação das médias ( $\alpha=5\%$ ) e o teste “t de Student” para dados não-pareados. Os valores das médias e desvio padrão foram submetidos ao teste de regressão polinomial de primeira ordem para verificar a significância da relação entre as alterações observadas e a exposição ao látex de *E. splendens* var *hislopii* (GraphPad Prism<sup>™</sup>, versão 3.00, e GraphPad InStat<sup>™</sup>, versão 2,05<sup>a</sup>, GraphPad Software, Inc.)



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo foram avaliados aspectos bioquímicos, de *A. fulica* exposta à concentração letal 50 (CL<sub>50</sub>) de látex de *E. splendens* var *hislopii*, como os níveis glicídicos em diferentes sítios de localização.

Os carboidratos como o glicogênio, a glicose e o galactogênio são encontrados, respectivamente, na glândula digestiva e massa cefalopodal, na hemolinfa e na glândula de albúmem. Esses carboidratos são de suma importância para manutenção do metabolismo do animal.

Artigos na literatura demonstram que a glicemia nos moluscos é sensivelmente regulada, sendo assim as menores alterações são prontamente corrigidas de forma rápida e eficaz. Os depósitos de glicogênio, também de grande importância, sofrem várias alterações quando os animais são submetidos a diversas condições de estresse, enquanto o conteúdo de galactogênio se faz necessário durante o processo reprodutivo. Assim, estudos provam que alterações nesses depósitos podem causar conseqüências metabólicas prejudiciais aos moluscos na maior parte das vezes.

### 1) Determinação da Concentração Subletal (CL<sub>50</sub>)

A Concentração Subletal 50 (CL<sub>50</sub>) foi de 11,2% com  $P > 0,05$ .

### 2) Dissecção dos animais experimentais

Durante as dissecções para a coleta das partes que seriam posteriormente dosadas foram realizadas observações ao acaso. A Tab. 2 mostra que não foi possível a coleta da hemolinfa de todos os moluscos dissecados, isso não foi possível porque alguns animais apresentavam sua hemolinfa com aspecto aglutinado, impedindo assim que a mesma fosse puncionada.

**Tabela 2.** Relação de material coletado durante as dissecções, por molusco, ao longo do tempo de experimento. \*Indica que o material foi coletado.

	1 dia				7 dias				14 dias				21 dias			
	MCP	GD	GA	HEM	MCP	GD	GA	HEM	MCP	GD	GA	HEM	MCP	GD	GA	HEM
<b>Grupo 1</b>	*	*	*		*	*			*	*		*				
<b>Grupo 2</b>	*	*	*	*	*	*		*								
<b>Grupo 3</b>	*	*		*	*	*		*								
<b>Grupo 4</b>	*	*			*	*		*								
<b>Grupo 5</b>	*	*	*		*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
<b>Grupo 6</b>	*	*	*		*	*		*	*			*	*	*		*
<b>Grupo 7</b>	*	*		*	*	*		*								
<b>Grupo 8</b>	*	*			*	*	*	*	*	*	*	*				
<b>Grupo 9</b>	*	*		*	*	*		*								
<b>Controle</b>	*	*		*	*	*		*	*			*	*	*	*	*

MCP: massa cefalopodal; GD: glândula digestiva; GA: glândula de albúmem; HEM: hemolinfa

3) Extração e dosagem de polissacarídeos da glândula digestiva e da massa cefalopodal de *Achatina fulica* exposta à concentração subletal (CL<sub>50</sub>) do látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii*

Os valores observados para a concentração de glicogênio na glândula digestiva e na massa cefalopodal foram analisados estatisticamente pelo Teste t para dados não pareados. As análises sempre realizadas entre as médias do grupo controle e do grupo exposto ao látex de cada tempo após a exposição demonstrou que houve diferença extremamente significativa apenas no primeiro dia após a exposição a CL<sub>50</sub>, nos intervalos de tempo subsequentes a comparação entre as média não houve diferença significativa. (Tab. 3)

**Tabela 3.** Variação na concentração de glicogênio (mg de glicose/g de tecido, peso fresco) na glândula digestiva dos grupos de *Achatina fulica* expostos e não expostos ao látex de *Euphorbia splendens* var *hislopii* em relação ao tempo após a exposição a DL<sub>50</sub>. X±SD=média ± desvio-padrão.

Concentrações de glicogênio (mg de glicose/g de tecido, peso fresco)		
Tempo após exposição (dias)	Controle	Exposto
	X ± SD	X ± SD
1	6,81 ± 0,08 <sup>a</sup>	1,32 ± 0,67 <sup>b</sup>
7	1,18 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,45 ± 1,19 <sup>a</sup>
14	1,09 ± 0,38 <sup>a</sup>	0,97 ± 0,16 <sup>a</sup>
21	0,72 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,02 ± 0,15 <sup>a</sup>

<sup>a, b</sup> - média seguidas de letras minúsculas diferentes são significativamente diferentes

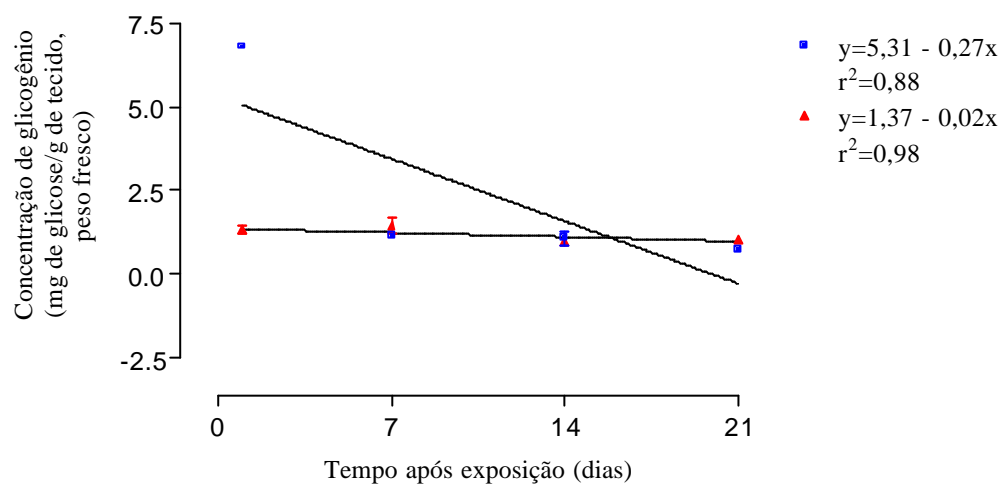
A regressão polinomial demonstrou uma relação negativa entre o tempo após a exposição e conteúdo de glicogênio neste sítio, para os moluscos expostos. Porém, a relação, também negativa, observada entre estes parâmetros, para o grupo de moluscos controle demonstrou ser menos significativa. Além disso, vale ressaltar que os níveis de glicogênio na glândula digestiva dos moluscos do grupo exposto sofrem redução em função do tempo após a exposição, enquanto o grupo controle apresentou pequena variação no conteúdo de glicogênio presente na glândula digestiva (Fig 4).

Quando os valores do conteúdo de glicogênio na glândula digestiva observados para os moluscos controle são somados e expressos através de uma média geral, o teste de regressão polinomial revelou uma forte relação negativa entre o conteúdo de glicogênio e o tempo de após a exposição (Fig 5).

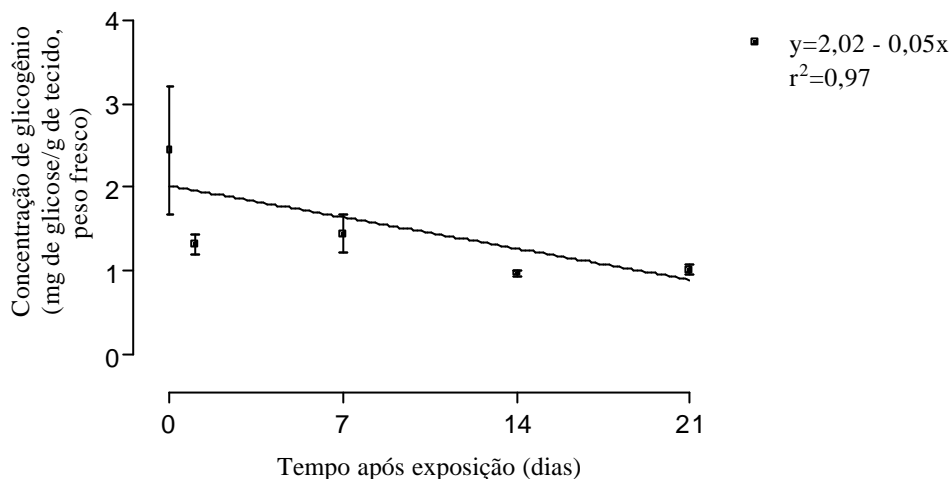
Assim sendo, analisando os resultados expressos nas figuras 4 e 5, observamos que logo após a pulverização do látex os moluscos sofrem alterações nos depósitos de carboidratos, reduzindo as concentrações de glicogênio na glândula digestiva. Esse armazenamento se faz de maneira menos intensa à medida que o tempo de exposição ao látex vai passando, o que pode ser interpretado como um processo de recuperação dos animais expostos ao látex com o passar do tempo. Esse comportamento metabólico se

mostra bastante diferente daquele apresentado pelos moluscos do grupo controle que mantém quase que constante a taxa de glicogênio na glândula digestiva independentemente do período de dissecação.

Mello-Silva *et al.* (2006) não constataram diferenças significativas quando valores médios da concentração de glicogênio presente na glândula digestiva de moluscos aquáticos da espécie *B. glabrata* expostos a diferentes concentrações do látex foram comparados entre si. Ao submeter os resultados ao teste da regressão polinomial, estes autores obtiveram como resultado uma correlação negativa entre a concentração de glicogênio na glândula digestiva e as diferentes concentrações testadas. Esses resultados são semelhantes aos encontrados neste trabalho para o mesmo parâmetro, concentração de glicogênio na glândula digestiva.



**Figura 4.** Relação entre a concentração de glicogênio da glândula digestiva (mg de glicose/g de tecido, peso fresco) de *Achatina fulica* expostos a CL<sub>50</sub> e controle em função do tempo após a exposição a DL<sub>50</sub>, em dias. ? moluscos não expostos ao látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii*, † moluscos expostos ao látex



**Figura 5.** Relação entre a concentração de glicogênio da glândula digestiva (mg de glicose/g de tecido, peso fresco) em *Achatina fulica* expostos e não expostos a DL<sub>50</sub> ao longo do tempo após a exposição a CL<sub>50</sub> do látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii*, em dias.

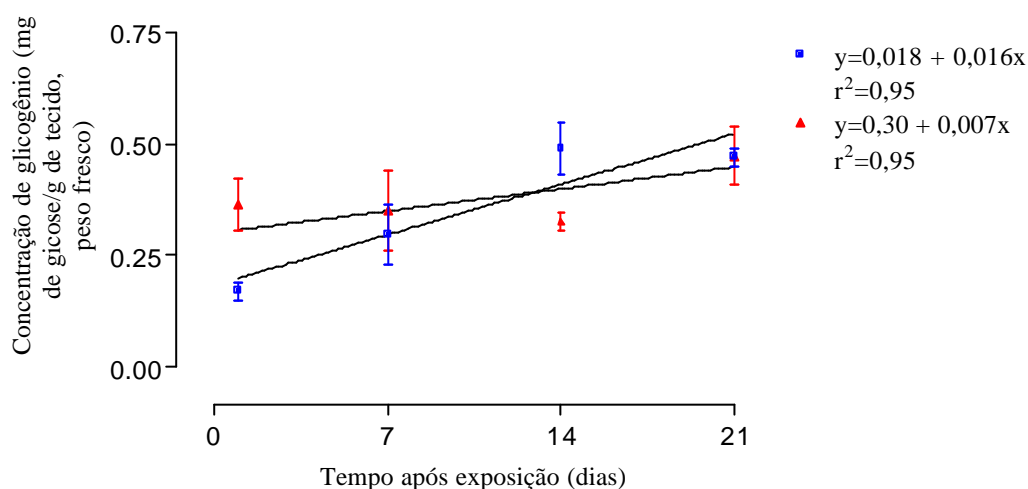
A comparação das médias dos resultados obtidos para a concentração de glicogênio na massa cefalopodal, demonstrou não ter havido diferença significativa entre as médias dos moluscos expostos e do controle para os tempos de 7, 14 e 21 dias após a pulverização. Entretanto, após o primeiro dia de exposição a diferença entre as médias se mostrou muito significativa (Tab 4).

**Tabela 4.** Variação na concentração de glicogênio (mg de glicose/g de tecido, peso fresco) na massa cefalopodal de moluscos expostos e não expostos a CL<sub>50</sub> de *E. splendens* var *hislopii* em função do tempo após a exposição em dias. X±SD=média ± desvio-padrão.

Tempo após exposição (em dias)	Concentrações de glicogênio (mg de glicose/g de tecido, peso fresco)	
	Controle	Exposto
	X ± SD	X ± SD
1	1,17 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,34 ± 0,31 <sup>b</sup>
7	0,30 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,35 ± 0,47 <sup>a</sup>
14	0,49 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,33 ± 0,07 <sup>a</sup>
21	0,47 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,47 ± 0,16 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> - médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem significativamente entre si.

A análise de regressão polinomial demonstrou haver uma forte relação positiva ( $r^2=0,95$ ) entre a concentração de glicogênio na massa cefalopodal de moluscos expostos a CL<sub>50</sub> e moluscos do grupo controle ao longo do tempo após a exposição ao látex. A análise das retas de regressão mostra que as concentrações de glicogênio na massa cefalopodal do grupo controle são menores até próximo ao 14º dia após a exposição, quando comparadas as mesmas concentrações no grupo pulverizado com o látex. No entanto, após o 14º dia de exposição a relação inverte e a concentração de glicogênio na massa cefalopodal dos moluscos do grupo controle são maiores quando comparadas as do grupo de molusco exposto no mesmo período (Fig 6).



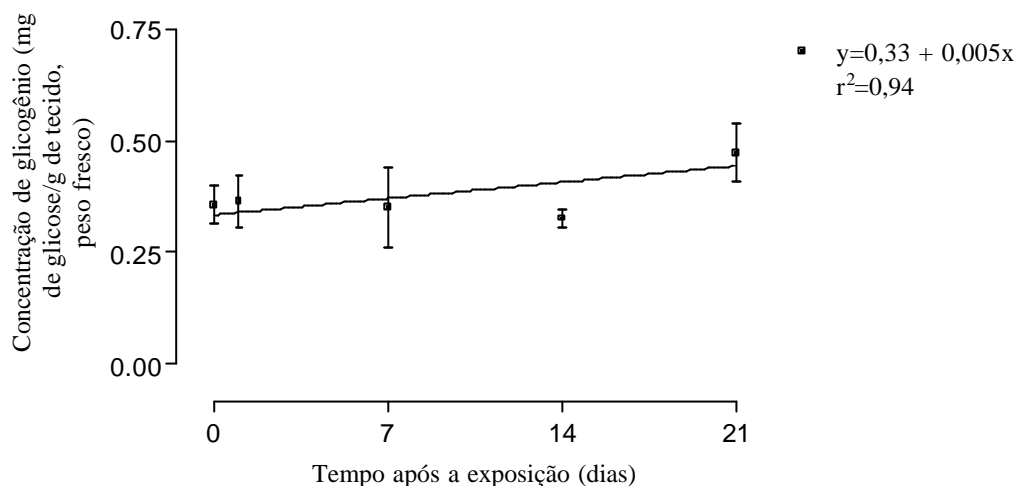
**Figura 6.** Relação entre a concentração de glicogênio na massa cefalopodal (mg de glicose/g de tecido, peso fresco) de *Achatina fulica* expostos e não expostos a CL<sub>50</sub> do látex de *Euphorbia splendens* var *hislopii* em função do tempo após a exposição em dias. ■ moluscos não expostos ao látex, ▲ moluscos expostos ao látex

Observações feitas ao longo do tempo e ao acaso mostram que os moluscos do grupo controle mantiveram-se retraídos ao contrário do observado para os moluscos expostos ao látex, que moviam-se intensamente tanto horizontalmente quanto verticalmente, reforçando assim um possível mecanismo de escape.

Quando os resultados referentes ao grupo de moluscos expostos e não expostos são somados e expressos através da média geral e analisados pela regressão polinomial apresenta forte relação positiva entre os níveis de glicogênio presentes na massa cefalopodal e o tempo de exposição em dias (Fig 7).

Contudo, se analisarmos o conteúdo de glicogênio de maneira geral podemos ressaltar que após a pulverização, os moluscos expostos disponibilizam uma maior quantidade de glicogênio para a região formadora da cabeça e do pé (Fig 6 e 7), enquanto ocorre um decréscimo na mobilização desses mesmos compostos para a glândula digestiva dos referidos moluscos (Fig 4 e 5). Esse fato pode estar correlacionado a uma tentativa de

fuga, ou seja, para se livrar o mais rapidamente possível da situação adversa, os moluscos desviam uma maior quantidade de glicogênio para a massa cefalopodal que é responsável pela locomoção do animal.



**Figura 7.** Relação entre a concentração de glicogênio presente na massa cefalopodal (mg de glicose/g de tecido, peso fresco) de *Achatina fulica* expostos e não expostos a CL<sub>50</sub> do látex de *Euphorbia splendens* var *hislopii* em função do tempo após exposição em dias.

#### 4) Análise bioquímica da hemolinfa

A análise bioquímica da hemolinfa foi realizada com o material proveniente das dissecações, que estavam congelados e armazenados em Eppendorf a -10°C. Durante as dissecações que se procederam no dia seguinte e sete dias após a pulverização não foi possível coletar a hemolinfa de todos os animais, como mostra a Tab. 2, visto que a mesma apresentava-se com um aspecto aglutinado dificultando sua aspensão com a seringa.

As dosagens de glicose livre foram feitas através de método espectrofotométrico enzimático (Doles<sup>®</sup>). A comparação das médias demonstrou só ter havido diferença significativa entre as médias observadas para os moluscos que foram dissecados um dia e vinte e um dias após a exposição (Tab. 5).

**Tabela 5.** Concentração de glicose na hemolinfa (mg de glicose/dL de hemolinfa) de *Achatina fulica* expostos e não expostos a CL<sub>50</sub> do látex de *Euphorbia splendens* var *hislopii* ao longo do período de exposição em dias. X±SD= média±desvio-padrão .

Tempo após exposição (em dias)	Concentração de glicose (mg/dL)	
	Controle	Exposto
	X±SD	X±SD
1 dia	1,09 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,53 ± 0,59 <sup>a</sup>
7 dias	0,10 ± 0,01 <sup>ab</sup>	35,79 ± 51,54 <sup>a,b</sup>
14 dias	0,20 ± 0,01 <sup>ab</sup>	31,08 ± 22,81 <sup>a,b</sup>
21 dias	58,88 ± 17,97 <sup>c</sup>	52,56 ± 14,32 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c</sup>=Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa

A regressão polinomial demonstrou uma forte correlação positiva entre a concentração de glicose ao longo do tempo após a exposição a CL<sub>50</sub> do látex de *E. splendens* var *hislopii* em dias.

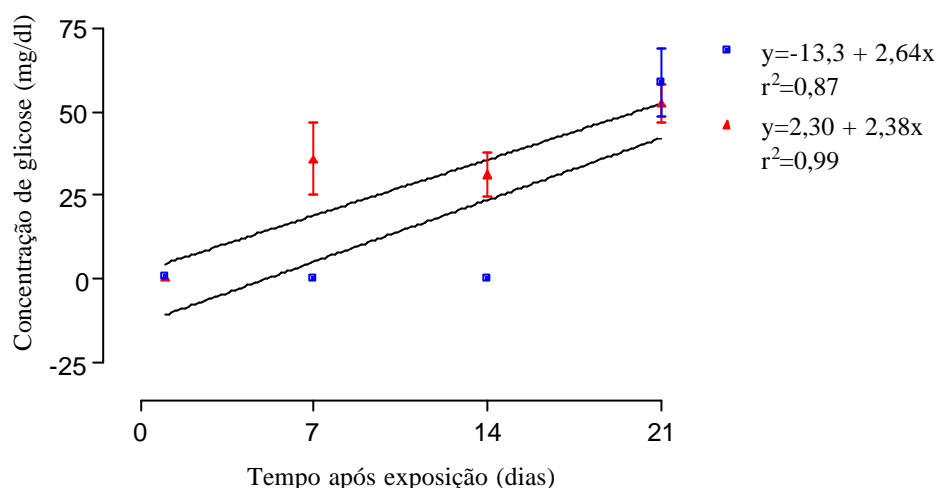
Ao comparar os níveis de glicose na hemolinfa de moluscos expostos a CL<sub>50</sub> e de moluscos controles em função do tempo após a exposição em dias, a regressão polinomial evidenciou que esses níveis aumentam conforme o prosseguimento dos dias, ou seja, após a exposição os níveis de glicose livre na hemolinfa dos moluscos expostos são menores do que as concentrações apresentadas ao final do experimento. Curiosamente, o mesmo comportamento metabólico acontece com os moluscos do grupo controle que não foram expostos ao látex. Entretanto, os níveis de glicose livre na hemolinfa dos animais expostos são menores do que os encontrados nos moluscos não expostos apesar das diferenças não serem significativas (Fig. 8).

Apesar desses resultados não corresponderem as expectativas, evidenciamos que a aplicação do látex de *E. splendens* var *hislopii* provoca reações nos moluscos, alterando o perfil glicídico da sua hemolinfa pelo menos por um curto período de tempo após a aplicação, já que não foi possível coletar a hemolinfa de todos os espécimes de moluscos um dia e sete dias após a pulverização.

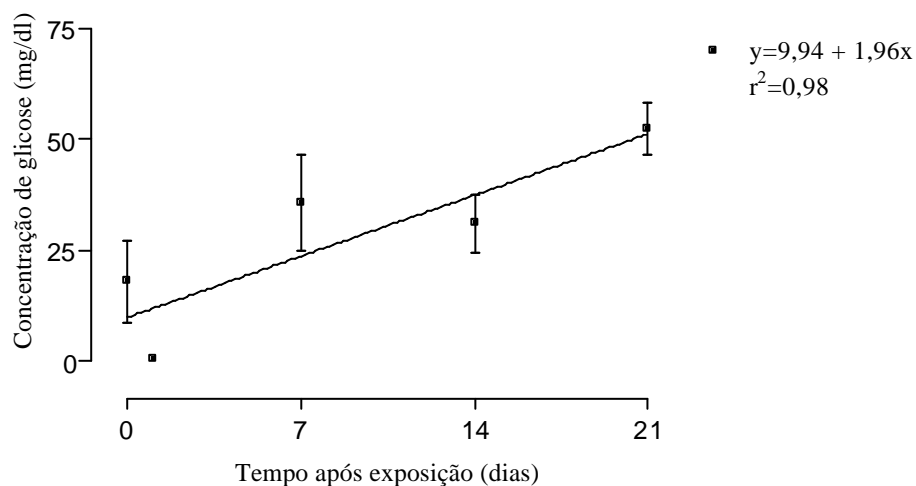
A relação entre a concentração de glicose na hemolinfa (mg de glicose/dL de hemolinfa) de moluscos expostos e não expostos a DL<sub>50</sub> apresentou forte relação positiva ( $r^2=0,98$ ) em função do tempo após a exposição em dias (Fig. 9).

Ao trabalhar com outro gênero de molusco, *Biomphalaria*, Mello-Silva *et al.* (2006) observaram que não houve diferença significativa na quantidade de glicose livre na

hemolinfa em função das diferentes concentrações do látex utilizadas. Para esse trabalho, onde o sistema foi montado com moluscos aquáticos, a regressão polinomial demonstrou relação negativa entre a concentração de glicose e as diferentes concentrações do látex.



**Figura 8.** Relação entre a concentração de glicose na hemolinfa (mg de glicose/dL de hemolinfa) de *Achatina fulica* expostos e não expostos a  $CL_{50}$  do látex de *Euphorbia splendens* var *hislopii* em função do tempo após a exposição, expresso em dias. ■ moluscos não expostos ao látex, ▲ moluscos expostos ao látex



**Figura 9.** Relação entre a concentração de glicose na hemolinfa (mg de glicose/dL de hemolinfa) de *Achatina fulica* expostos e não expostos a  $CL_{50}$  em função do tempo após a exposição ao látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii* em dias.



### 5) Análise bioquímica da glândula de albúmem

A quantidade de galactogênio presente na glândula de albúmem dos moluscos expostos foi analisada em função do tempo de exposição apenas, já que, apesar de utilizar moluscos de tamanhos uniformes, somente durante as dissecações pudemos constatar a maturidade sexual pelo desenvolvimento ou não da referida glândula. Evidenciando que os tamanhos dos moluscos não possuem relação direta com a maturidade sexual.

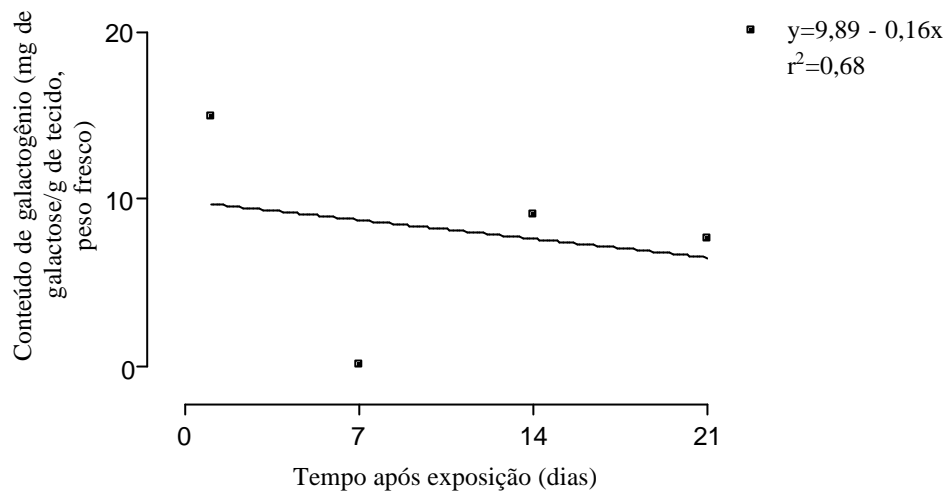
Portanto, as análises da quantidade de galactogênio foram realizadas através do pool das glândulas coletadas durante as dissecações, para que se pudesse obter a massa mínima de 1g de tecido para as dosagens.

A maior e menor quantidade de galactogênio expressa em mg de galactose/g tecido, peso fresco valor foram apresentados para os moluscos dissecados após o primeiro dia de exposição ao látex (14,99) e o sétimo dia de exposição (0,18), respectivamente (Tab. 6)

**Tabela 6** Concentração de galactogênio (mg de galactose/g de tecido, peso fresco) de *Achatina fulica* expostos a CL<sub>50</sub> do látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii* ao longo do tempo após a exposição ao látex, em dias. X±SD= média±desvio-padrão.

Tempo após exposição (dias)	Concentração de galactogênio (mg de galactose/g de tecido, peso fresco)
	Tratados X±SD
1	14,99 ± 0,04
7	0,18 ± 0,03
14	9,08 ± 0,01
21	7,71 ± 0,03

A regressão polinomial por sua vez revelou uma relação negativa  $r^2 = 0.68$  entre a concentração de galactogênio presente na glândula de albúmem dos moluscos expostos a CL<sub>50</sub> em função do tempo após a exposição em dias. Ou seja, a quantidade de galactogênio diminui com o passar dos dias, após a exposição de *A. fulica* ao látex de *E. splendens* var. *hislopii* (Fig. 10).



**Figura 10.** Relação entre a concentração de galactogênio na glândula de albúmem (mg de galactose/g de tecido, peso fresco) de *Achatina fulica* expostos a CL<sub>50</sub> do látex de *Euphorbia splendens* var *hislopii* em função do tempo após a exposição, em dias.

Vários estudos têm sido realizados nos últimos anos, comprovando a ação moluscicida de algumas plantas ou de produtos extraídos destas. Rao & Singh (2003) compararam o efeito de tratamentos simples e binários de derivados de plantas moluscicidas sobre a atividade de diferentes enzimas: acetilcolinesterase, lactato desidrogenase e fosfatases ácida e alcalina, no tecido nervoso de *A. fulica*. Em seus experimentos, os moluscos foram expostos a doses sub-letais de óleo de *Azadirachta indica*, *Cedrus deodara*, *Allium sativum* e *Nerium indicum* comprovando que algumas combinações como, *A. sativum* + *C. deodara* e *C. deodara* + *A. indica* alteraram significativamente a atividade das enzimas no tecido nervoso de *A. fulica*.

Contudo fica evidente que quando se pensa em controle de moluscos através do uso de plantas com ação moluscicida, o habitat do molusco torna-se importante por que faz diferir não só a forma de aplicação como também a concentração que deve ser aplicada.

Entretanto, fica evidente que *A. fulica* sofre alterações no metabolismo de carboidratos após a exposição a CL<sub>50</sub> do látex de *E. splendens* var *hislopii*, fato este que pode estar associado à mortalidade dos moluscos. No entanto, mais estudos se fazem necessários, avaliando outros parâmetros metabólicos como lipídios, ácidos nucleicos e compostos nitrogenados para que se possa afirmar com maior seguridade a respeito da relação entre a aplicação do látex e a mortalidade dos moluscos.

## 5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, podemos concluir que:

- 1 - A Concentração Sub-Letal ( $CL_{50}$ ), ou seja, a concentração necessária para levar a letalidade metade da população testada encontrada foi igual a 11,2%, para solução pulverizada sobre *A. fulica*.
- 2 - A exposição de *A. fulica* à  $CL_{50}$  do látex de *E. splendens* var. *hislopü* provocou uma significativa redução na concentração de galactogênio na glândula de albúmen.
- 3 - A exposição de *A. fulica* à  $CL_{50}$  de *E. splendens* var. *hislopü* apresentou em um efeito tardio sobre os depósitos de glicogênio da massa cefalopodal do molusco, os quais apresentaram-se significativamente reduzidos no 14º dia após a exposição.
- 4 - A exposição ao látex de *E. splendens* var. *hislopü* provocou uma redução nos depósitos de glicogênio na glândula digestiva de *A. fulica*.
- 5 - Somente houve variação significativa no conteúdo de glicose na hemolinfa de *A. fulica* exposta à  $CL_{50}$  do látex de *E. splendens* var. *hislopü*, após 21 dias da exposição, quando comparados ao grupo controle. Embora nos primeiros dias de dissecação tenha sido encontrado um maior nível de glicose livre circulante na hemolinfa.

## 6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- AMORIM, J. P. & PESSOA, S. B. Experiência de alguns vegetais como moluscicida. Rev. Bras. Malar. Doen. Trop. v.14. p.255-260. 1962.
- ANDREWS, P.; THYSSEN, J. & LORKE, D. The biology and toxicology of molluscicide, Bayluscide®. Pharmacol. Ther. v.19. p.245-295. 1983.
- AZEVEDO, V.P.B. DE., PINHEIRO, J., GOMES, E.M., AND CHAGAS, G.M. Determinação do conteúdo de galactogênio na glândula de albúmen de *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Mollusca, Gastropoda). Revta. Univ. Rural – série ciências da vida. v.18, n1-2, p.95-99. 1996.
- BAPTISTA, D. F.; VASCONCELLOS, M. C.; LOPES, F. E. F.; SILVA, I. P. & SCHALL, V. T. Evaluation of the molluscicidal properties of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (N.E.B) (Euphorbiaceae)-2. Investigation in lottic habitat. Mem Inst Oswaldo Cruz. v.87. p.549-553. 1992.
- BAPTISTA, D. F.; VASCONCELLOS, M. C.; LOPES, F. E. F.; SILVA, I. P. & SCHALL, V. T. Perspectives of using *Euphorbia splendens* as a molluscicide in schistosomiasis control programs. Southeast Asian J Trop. Health. v.25. p.419-424. 1994.
- BARBOSA, F. S. & MELLO, D. A. Ação moluscicida de plantas. Ver. Bras. Pesq. Med. Biol. v.2. p.364-366. 1969.
- BAYOMY, M. F.; VAN ELK, R. & JOSÉ, J. The effects of starvation and refeeding on egg laying and the synthetic activity of the albumen gland in *Bulinus truncatus*, vector of urinary schistosomiasis. Comp. Biochem. Physiol. v.87a. p.607-612. 1987.
- BECKER, W. Metabolic interrelationships of parasitic trematodes and mollusc, especially *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. Z. Parasiten. V.63. p.101-111. 1980.
- BESSA, E. C. A. ; ARAUJO, J. L. B. ; PINTO, Erik Daemon de Souza . Desenvolvimento biológico de *Angiostrongylus vasorum* (Baillet,1866) Kamensky,1905 (Nematoda,Protostrongylidae) em *Subulina octona* (Bruguier,1789) (Mollusca, Subulinidae) em condições de laboratório.. Revista Brasileira de Zoologia, Curitiba, v. 17. n. 1. p. 29-41, 2000.
- BROCKELMAN, C. R. Effects of parasitism and stress on hemolymph protein of the African giant snail, *Achatina fulica*. Z. Parasitenkd. v.57. n.2. p.137-144. 1978.
- BROCKELMAN, C.CR., CHUSATAYANOND, W. & BAIDIKUL, V. Growth and localization of *Angiostrongylus cantonensis* in the molluscan host, *Achatina fulica*. Southeast Asian J. Top. Med. Public Health. v.1. p.30-37. 1976.

- BROCKELMAN, C. R. & SITHITHAVOM, P. Carbohydrate reserves and hemolymph sugars of the African giant snail, *Achatina fulica* in relation to parasitic infection and starvation. *Z. Parasitenkd.* v.62. n.3. p.285-291. 1980.
- CARVALHO ODOS, S., TELES, H. M., MOTA, E. M., LAFETA, C., de MENDONÇA, G. F. & LENZI, H. L. Potenciality of *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca: Gastropoda) as intermediate host of the *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Céspedes, 1971. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v.36. n.6. p.743-745. 2003.
- CHENG, T. C. & LEE, F. O.. Glucose levels in the mollusc *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*. *J. Invert. Pathology.* v.18. p. 395-399. 1971
- CHIANG, P. K.. Glycogen metabolism in the snail *Biomphalaria glabrata*. *Comp. Biochem. Physiol.* v.58B. p. 9-12. 1977.
- CREWS, A. E. & YOSHINO, T. P. Influence of larval schistosomes on polysaccharide synthesis in albumen glands of *Biomphalaria glabrata*. *Parasitology.* v.101. p.351-359. 1990.
- CRUZ, C. M.; KASPER, P.; CATALDO, A. ZAMITH, H. P. S. & PAUMGARTTEN, F. J. R. Tumor promoter-like activity of the molluscicidal latex of "Crown-of-Thorns" (*Euphorbia milli* var. *hislopii*) in V79 metabolic cooperation assay. *Braz. J. Med. Biol. Res.* v.29. p.1519-1523. 1996.
- DAN, N. & BAILEY, S. E. R. Growth, mortality, and feeding rates of the snail *Helix aspersa* at different population densities in the laboratory, and the depression of activity of helioid snails by other individuals, on their mucus. *Jour. Moll. Stud.* v.48. p.257-265. 1982..
- FARNSWORTH, N. R.; LOUB, W. D.; SOEJARTO, D. D. & CORDELL, G. A. Computer services for research on plant for fertility regulation. *Korean J of Pharmacog.* v.12. p. 98-110. 1981.
- FARNSWORTH, N. R.; HENDERSON, T. O. & SOEJARTO, D. D. Plants with potencial molluscicide activity. In: McKE (Editor), *Plant Molluscicide*. UNDP/World Bank/WHO, John Wiley & Sons, New York, p.131-201. 1987.
- FISCHER, E. H; POCKER, A. & SAARI, J. C. The structure, function and control of glycogen phosphorylase. *Essays in Biochem.* v.6. p.23-68. 1970.
- FREITAS, J.C.B.R., PRESGRAVE, O. A. F., FINGOLA, F.F., MENEZES, M.A.C., VASCONCELLOS, M. C., SCHALL, V.T. & PAUMGARTTEN, F. J. R. Toxicological study of the molluscicidal latex of *Euphorbia splendens*. Irritant action on skin and eye. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* v.86. suppl II. p. 87-88. 1991.

- FUJISAWA, Y., MASUDA, K. & MINAKATA, H. Fulicin regulates the female reproductive organs of the snail, *Achatina fulica*. Peptides. v.21. n.8. p.1203-1208. 2000.
- GERAERTS, W. P.. Neurohormonal control of growth and carbohydrate metabolism by the light green cells in *Lymnaea stagnalis*. Gen Comp Endocrinol. V.86. p. 433-44. 1992
- GIOVANELLI, A., SILVA, C. L. P. A. C. da., MEDEIROS, L. & VASCONCELLOS, M. C. The molluscicidal activity of the latex fo *Euphorbia splendens* var. *hislopii* on *Melanoides tuberculata* (thiaridae), a sanil associated with habitats of *Biomphalaria glabrata* (Planorbidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. v.96. n.1. p.123-125. 2001.
- GOUDSMIT, E. M. & ASHWELL, G. Enzimic synthesis of galactogen in the snail, *Helix pomatia*. Biochem. Biophys. Res. Commun. v.4. p. 417-422. 1965.
- GOUDSMIT, E. M. Galactogen catabolism by embryos of the freshwater snails, *Bulinnaea megasoma* and *Lymnaea stagnalis*. Comp. Biochem. Physiol. v.53B. p. 439-442. 1975.
- GOUDSMIT, E. M.; KETCHUM, P. A.; GROSSENS, M. K. & BLAKE, D.A. Byosynthesis of galactogen: identification of a  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 6)- D-galactosyltransferase in *Helix pomatia* albumen glands. Bioch. Bioph. Acta. v.992. p. 289-297. 1989.
- GOUDSMIT, E. M; MATSUURA, F, & BLAKE, D. A. Substrate specificity of D-galctose oxidase. J. Biol. Chem. v.259. n.5. p. 2875-2878. 1984.
- GRAEFF-TEIXEIRA, C.; GOULART, A. H.; BRUM, C. O.; LAITANO, A. C.; SIEVERS-TOSTES, C.; ZANINI, G. M.; BERED, P. L.; MORASSUTTI, A.; GEIGER, S. M.; ABRAHAMSSANDI, E.; OLIVEIRA, F. T. S.; MAURER, R. L.; AGUIAR, L. F.; GARRIDO, C.T.; SILVA, A. C. A.; RODRIGUEZ, R.; SCHULZKEY, H.; AGOSTINI, A. A. Longitudinal clinical and serological survey of abdominal angiostrongyliasis in Guaporé, southern Brazil, from 1995 to 1999. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, MG, v. 38. n. 4. p. 310-315. 2005.
- HAMMARSTEIN, O. Studies über Mucin and mucinähnliche Substazen. Pflüger. Arch ges Physiol. p.36-373. 1885.
- HORSTMANN, H. J.. Der galactogengehalt der Eier von *Lymnaea stagnalis* während der Embryonal Entwicklung, Biochem. Z. v.328. p.342-247. 1956.
- ISHAK, M. M.; MOHAMED, A. M. & SHARAF, A. A. Carbohydrate metabolism in uninfected and trematode-infected snails *Biomphalaria alexandrina* and *Bulinus truncatus*. Comp. Biochem. Physiol. v.51B. p. 499-505. 1975.
- JOZIASSE, D. H.; DAMEN, H. C. M.; De JONG-BRINK, M.; EDZES, H. T. & Van den EIJNDEN, D. H. FEBS Lett. v.221. p.139-144. 1987.

- JURBERG, P.; VASCONCELLOS, M. C. & MENDES, N. M. Plantas empregadas como moluscicida: uma visão crítica. Mem Inst Oswaldo Cruz. v.84. Suppl I. p.76-83. 1989.
- KOEMAN, J. H. Toxologic screening of moluscicidal plant products, p. 245-249. In K. E. Mott, Plant Molluscicide. UNDP/ World Bank/WHO. 1987.
- KLOOS, H. & McCULLOUGH, F. S. Plant Molluscicides. Planta Medica. v.46. p.195-209. 1982.
- KLOOS, H. & McCULLOUGH, F. S. Plants with recognized moluscicide activity. Mott, K. E., ed. Plant Molluscicides. Chicester: John Wiley & Sons and Geneva: UNDP/ World Bank/ WHO: 45-108. 1987.
- LEE, K. H.; HAYASSHI, N.; OKANO, M.; HALL, I. H.; WU, R. Y. & MEPHAIL, A. Lasiodiplodin, a potent antileukemic macrolide from *Euphorbia splendens*. Phytochemistry. v.21. p.1119-1121. 1982.
- LEVENE, P. A. The mucoproteins of the snail *Helix aspersa* and *Helix pomatia*. J. Biol. Chem. v.65. p.368. 1925.
- MAY, F. Beitrage zur Kenntnis des tierschen Swinistrins. Z. Biol. v.91. p.265. 1931.
- McMAHON, P.; VON BRAND, T. & NOLAN, M. O. Observations ojn the polissacrides of aquatic snails. Cell. Comp. Physiol. v.50. p.2219-240. 1957.
- MEENASKSHI, V. R. & SCHEER, B. T. Studies on the carbohydrates of the slug *Arilimax columbians* with special reference to their distribution in the reproductive system. Comp. Biochem. Physiol. v.26. p.1091- 1097. 1968.
- MENDES, N. M.; BAPTISTA, D. F., VASCONCELLOS, M. C. & SCHALL, V. T. Evaluation of the moluscicidal properties of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (N.E.B.) (Euphorbiaceae) – 1. Experimental test in a lentic habitat. Mem Inst Oswaldo Cruz. v.87. p.21-23. 1992.
- MENDES, N. M.; VASCONCELLOS, M. C.; BAPTISTA, D. F.; ROCHA, R. S. & SCHALL, V. T. Evaluation of the moluscicidal properties of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (N.E.B.) latex: experimental test in na endemic área in state of Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. v.92. p.719-724. 1997.
- MELLO-SILVA, C. C, VASCONCELLOS, M. C.; PINHEIRO, J, & RODRIGUES, M. L. de A. Physiological changes in *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Pulmonata:

- Planorbidae) caused by sub-lethal concentrations of the látex of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B (Euphorbiaceae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. v.10. n.1. p.3-8. 2006.
- MOORE, K. E. & GOSSELIN, R. E. Effects of 5-hydroxy-triptamine on the anaerobic metabolism and phosphorylase activity of lamelibranch gill. J. Pharmac. Exp. Ther. v.138. p. 145-153. 1962.
- MOTT, K. E. Plant Molluscicide, UNDP/World Bank/WHO. John Wiley & sons. New York. 326pp. 1987.
- MUELEMAN, E. A. Host-parasite interrelationships between the freshwater pulmonate *Biomphalaria pfeifferi* and the trematode *Schistosoma mansoni*. Neth J Zool. v.22. p.355-427. 1972.
- OLIVEIRA-FILHO, E.; OTTO, S. S. & PAUMGARTTEN, F. J. R. Ecotoxicity of the molluscicidal látex of Crown-of-Thorns (*Euphorbia milli* var. *hislopii*). Proceeding of the V International symposium on Schitossomiasis. Salvador, BA, Brazil, September, p.10-13. 1995.
- OLIVEIRA-FILHO, E. C. & PAUMGARTTEN, F. J. R. Photodegradation of the molluscicida látex of Crown-of-Thorns (*Euphorbia milii* var. *hislopii*). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. v.92. p.657-659. 1997.
- OLSEN, O. W. Parasitologia Animal. I. El Parasitismo y los Protozoa. Editorial AEDOS. Barcelona, España. 248p. 1977.
- PANIGRAHI, A. & RAUT, S. K. On the safe use of pesticides in controlling the terrestrial mollusc pest. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. v.88. n.2. p.293-298. 1993.
- PIERI, O., GONÇALVES, J.F., SARQUIS, O. Repeated focal mollusciciding for snail control in sugar-cane area of northeast Brzil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. v.90. p.535-536. 1995.
- PINHEIRO, J. & AMATO, S.B. *Eurytrema coelomaticum* (Digenea, Dicrocoeliidae): the effect of infection on carbohydrates contentes of its intermediate snail host, *Bradybaena similares* (Férussac, 1821) (Mollusca, Gastropoda). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. v.89. p.407-410. 1994.
- PINHEIRO, J.. Influence of starvation on the glycogen and galactogen content in the snail *Bradybaena similares* (Férussac, 1821) (Mollusca, Gastropoda). Arq. Biol. Tecnol. v.39. p.349-357. 1996c
- PINHEIRO, J. ; MALDONADO JUNIOR, A. ; LANFREDI, R. M. . Light and Scanning Electron Microscopy of the Miracidium of *Echinostoma paraensei* (Lie & Basch, 1967) (Trematoda, Echinostomatidae).. Veterinary Parasitology, Estados Unidos, v. 26. n. 121. p. 265-275, 2004.



- RAO, C. B. & SUSSELA, K. Chemical examination of *Euphorbia splendens* Boj. Indian J. Chem v.21 B. p.495-496. 1992.
- RAO, I. G. & SINGH, D. K. Effect os Single and Binary combinations of Plant-Derived moluscicides on reproduction and Survival of the snail *Achatina fulica*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. v.39. p. 486-493. 2000.
- RAVEN, C. P. Morphogenesis. The Analysis of Molluscan Development. Pergamon Press, New York. 1958.
- RIZO, J. A. & PORFÍRIO, T. A. Latex das Euphorbiaceas. Rev. Goiana Med. v.17. p.155-162. 1971.
- ROUQUAYROL, M. Z.; FONTES, M. C.; ALENCAR, J. E.; ABREU-MATOS, F. J. & CRAVEIRO, A. A. Atividade moluscicida de óleos essenciais de plantas do Nordeste brasileiro. Rev. Bras. Pesq. Med. Biol. São Paulo. v.13. p.135-143. 1980.
- ROUQUAYROL, M. Z.; SOUSA, M. P. & MATOS, F. J. A. Atividade moluscicida de *Pithecelobium multiflorum*. Rev. Soc. Bras. Med. Trop.v.7. p.11-19. 1973.
- ROUQUAYROL, M. Z.; SOUSA, M. P. & SILVA, M. J. M Atividade moluscicida de plantas do Nordeste brasileiro (III). Ver. Bras. Fram. v.53. p.215-220. 1972.
- SAUERLANDER, R. & ECKERT, J. The African giant snail (*Achatina fulica*) as experimental intermediate host of *Angiostrongylus vasorum* (Nematoda). Z. Parasitenkd. v.44. n.1. p.59-72. 1974.
- SAUERLANDER, R. Histological studies of the African giant snail (*Achatina fulica*) experimentally infected with *Angiostrongylus vasorum* or *Angiostrongylus cantonensis*. Z. Parasitenkd. v.49. n.3. p.263-280. 1976.
- SAWICKA, T. & CHOJNACKI, T. Formation of galactogen from glucose phosphates in albumen gland of *Helix pomatia*. Comp. Biochem. Physiol. v.26. p.707-713. 1968.
- SCHALL, V. T., VASCONCELLOS, M. C., VALENT, G. U., SANTO, M. I. Z., FURIAN, E. V. & SANCHEZ, P. S. Evaluation of the genotoxic activity and acute toxicity of *Euphorbia splendens* latex, a molluscicide for the control of schistosomiasis. Braz. J. Med. Biol. Res. v.24. p.573-582. 1991.
- SCHALL, V. T., VASCONCELLOS. M.C., VILLAÇA-COELHO, A. L.; FERREIRA-LOPES, F.E. & SILVA, I. P. Evaluation of temporal, seasonal ang geographic stability of the moluscicidal properties of *Euphorbia splendens* látex. Rev Inst Med Trop São Paulo. v.34. p.183-191. 1992.

- SCHALL, V.T.; VASCONCELLOS, M. C.; SOUZA, C. P. & BAPTISTA, D.F. The molluscicidal activity of crown of Christ (*Euphorbia splendens* var. *hislopii*) latex on snails acting as intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium*. Am. J Trop. Med. Hyg. v.58. p.7-10. 1998.
- SCHWART, C. F. & CARTER, C.E. Effect of *Schistosoma mansoni* on glycogen synthase and phosphorylase from *Biomphalaria glabrata* (Mollusca). J Parasitol. v.68. p. 236-242. 1982.
- SEN, G., MANDAL, C. & CHOWDHURY, M. Albumen gland of the snail *Achatina fulica* is the site for synthesis of AchatininH, a sialic acid binding lectin. Mol. Cell. Biochem. v.117. n.2. p.133-138. 1992.
- SIDEL'NIKOV, A. P. & STEPANOV, I. I. Effect of the population density on growth and regeneration in the snail *Achatina fulica*. Izv. Akad. Nauk. Ser. Biol. v.5. p.525-532. 2000.
- SILVA, M. J. M.; SOUSA, M. P. & ROUQUAYROL, M. Z. Atividade moluscicida de plantas do Nordeste brasileiro (II). Ver. Bras. Fram. v.52. p.117-123. 1971.
- SOUSA, M. P. & ROUQUAYROL, M. Z. Atividade moluscicida de plantas do Nordeste brasileiro. Rev. Bras. Pesq. Med. Biol. v.7. p.388-393. 1974..
- SOUZA, C. A. M., CARVALHO, R. R., KURYIARNA, S. N., ARAUJO, I. B., RODRIGUES, R. P., VOLLMER, R. S., ALVES, E. N. & PAUMGARTTEN, F. J. R. Study of the embryofeto-toxicity of Crown-of-Thorns (*Euphorbia milli*) látex, a antural molluscicide. Braz. J. Med. Biol. Res. v.30. n.11. p.1325-1332. 1997.
- STANISLAWSKI, E. & BECKER, W. Alterations of the free amino acid content in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata) in starvation and after infection with *Schistosoma mansoni* (Trematoda). Comp. Biochem. Physiol. v.63B. p. 477-482. 1979.
- STALMANS, W. & HERS, H. G. Glycogen synthesis from UDP. In The enzymes, P. D. Boyer (ed.). Academic Press, New York. Vol IX, p. 309-361. 1973.
- SUMNER, J. B. A method for colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem. v.133. p.593. 1924.
- TELLA, A. Pharmacological effects of the giant African snail *Achatina fulica*. Trop. Geogr. Med. v.31. n.3. p.409-414. 1979.
- TELES, H. M. S.; VAZ, J. F.; FONTES, L. R. & DOMINGOS, M. D. Occurrence of *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca, gastropoda) in Brazil: Intermediate snail host of angiostrongyliasis. Rev. Saúde Pública. v.31. p.310-312. 1997.
- TELES, H. M. S. & FONTES, L. R. Angiostrongilíase e escargot: nova ameaça a saúde pública. Secretário de Saúde. v.30. p.24-26. 1998.

- THOMPSON, S. N & LEE, R. K. W. Comparison of starvation and infection by *Schistosoma mansoni* on tissue viability and the <sup>31</sup>P NMR spectrum of *Biomphalaria glabrata*. Z Parasitenkd. v.72. p. 417-421. 1986.
- TRIPS, M. Ecological studies on the breeding of *Aedes aegypti* and other mosquitos in shells of the ginat African snail *Achatina fulica*. Bull. World Health Organ. v.48. n4. p.447-453. 1973.
- VASCONCELLOS, M. C. & SCHALL, V. T. Latex of “Coroa de Cristo” (*Euphorbia splendens*): na effective molluscicide. Mem Inst Oswaldo Cruz. v.81. p.475-476. 1986.
- VASCONCELLOS, M. C. & PILE, E. Ocorrência de *Achatina fulica* no Vale do Paraíba, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Ver. Saúde Pública. v.35. n.6. p.582-584. 2001.
- VASCONCELLOS, M. C. & AMORIM, A. Activity of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B. (Euphorbiaceae) latex against *Lymnaea columella* (Say, 1817) (Pulmonata: Lymnaeidae), Intermediate host of *Fasciola hepatica*, Linnaeus, 1758 (trematoda: Fasciolidae). 1: Test in Laboratory. Mem Inst Oswaldo Cruz. v.98. n.4. p.557-563. 2003a.
- VASCONCELLOS, M. C. & AMORIM, A. Activity of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B. (Euphorbiaceae) latex against *Lymnaea columella* (Say, 1817) (Pulmonata: Lymnaeidae), Intermediate host of *Fasciola hepatica*, Linnaeus, 1758 (trematoda: Fasciolidae). 2: Limited Field-testing. Mem Inst Oswaldo Cruz. v.98. n.7. p.981-985. 2003b.
- van ELK & JOOSSE, J. The UDP-galactose 4-epimerase of the albumen gland of *Lymnaea stagnalis* and the effects of photoperiod, starvation and trematodes infection on its activity. Comp. Biochem. Physiol. v.70b. p. 45-52. 1981.
- VON BRAND, T; BAERNSTEIN, H. D. & MEHLMAN, B. Studies on the anaerobic metabolism and the aerobic carbohydrate consumption of some fresh water snails. Biol. Bull. v.98. p. 266-276. 1950.
- WANG, D. H. & SCHEER, B. T. UDP-glycogen transglucosylase and a natural inhibitor in crustacean tissues. Comp. Biochem. Physiol. v.9. p. 263-274. 1963.
- WILLIAMS, G. M. & WIESBURGER, J. H. Chemical carcinogens, p. 99-173. In C. D. Hlaassen et al., Casarett and Doull’s (eds) Toxicology. Macmillan Publishing Co., New York. 1986.
- WILSON, M. E. A world guide to infections: diseases, distribution, diagnosis. New York: Oxford University Press. 1991.
- WHO- World Health Organization. Report of scientific working group on plant molluscicide and guidelines for evaluation of plant molluscicide. (TDR/SCH – SWE (4)/83.3). Geneva. 1983.

ZAMITH, H. P. S.; PAUMGARTTEN, F. J. R. & SPEIT, G. Evaluation of mutagenicity of the molluscicidal latex of Christ's Crown (*Euphorbia milli* var. *hisloppi*) in mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *Mutat. Res.* v.368. p.15-20. 1996.

ZANI, C. L.; PASSOS, L. K. L.; SOUZA, C. P. & OLIVEIRA, A. B. Bioassay guided phytochemical study of the látex from *Euphorbia splendens* (Euphorbiaceae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* v.84. Suppl.1. p254. 1989.

## ANEXO A

### PROTOCOLO DE TESTES COM MOLUSCICIDA EXPERIMENTO 1: FORMA DE APLICAÇÃO DO LÁTEX

Responsável: Camila Silva de Oliveira

Data de início: 18/07/2005

Data do término: 22/07/2005

Produto testado: Látex de *E. splendens* var *hislopii*

Local de coleta: FIOCRUZ

Espécie testada: *Achatina fulica*

Forma de aplicação: Diluição em placas

Biometria média 5,8cm

Alimentação: Alface fresca

Amostra por concentração: 5 moluscos

Amostra total: 55 moluscos

Concentração	Exposição 48 horas		Recuperação 48 horas	
	moluscos vivos	moluscos mortos	moluscos vivos	moluscos mortos
1% (A)	5	0	5	0
1% (B)	5	0	5	0
12,5% (A)	5	0	5	0
12,5% (B)	5	0	5	0
25% (A)	5	0	5	0
25% (B)	5	0	5	0
50% (A)	4	1	4	0
50% (B)	5	0	5	0
75% (A)	5	0	5	0
75% (B)	5	0	5	0
Controle	5	0	5	0

PROTOCOLO DE TESTES COM MOLUSCICIDA  
EXPERIMENTO 1: FORMA DE APLICAÇÃO DO LÁTEX

Responsável: Camila Silva de Oliveira

Data de início: 18/07/2005

Data do término: 22/07/2005

Produto testado: Látex de *E. splendens* var *hislopii*

Local de coleta: FIOCRUZ

Espécie testada: *Achatina fulica*

Forma de aplicação: Pulverização

Biometria média 5,8cm

Alimentação: Alface fresca

Amostra por concentração: 5 moluscos

Amostra total: 55 moluscos

Concentração	Exposição 48 horas		Recuperação 48 horas	
	moluscos vivos	moluscos mortos	moluscos vivos	moluscos mortos
1% (A)	4	1	4	0
1% (B)	5	0	5	0
12,5% (A)	4	1	4	0
12,5% (B)	4	0	5	0
25% (A)	4	0	3	1
25% (B)	4	0	5	0
50% (A)	3	1	4	0
50% (B)	3	0	4	1
75% (A)	1	2	2	1
75% (B)	4	0	5	0
Controle	5	0	5	0

PROTOCOLO DE TESTES COM MOLUSCICIDA  
EXPERIMENTO 1: FORMA DE APLICAÇÃO DO LÁTEX

Responsável: Camila Silva de Oliveira

Data de início: 18/07/2005

Produto testado: Látex de *E. splendens* var *hislopii*

Espécie testada: *Achatina fulica*

Biometria média 5,8cm

Amostra por concentração: 5 moluscos

Data do término: 22/07/2005

Local de coleta: FIOCRUZ

Forma de aplicação: Liofilizado

Alimentação: Alface fresca

Amostra total: 55 moluscos

Concentração	Exposição 48 horas		Recuperação 48 horas	
	moluscos vivos	moluscos mortos	moluscos vivos	moluscos mortos
1% (A)	5	0	5	0
1% (B)	5	0	5	0
12,5% (A)	4	1	4	0
12,5% (B)	5	0	5	0
25% (A)	5	0	5	0
25% (B)	5	0	5	0
50% (A)	5	0	5	0
50% (B)	5	0	4	1
75% (A)	5	0	5	0
75% (B)	5	0	5	0
Controle	5	0	5	0