

**UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO**

**HUDSON MOGGIONI MUNHOZ**

**ESTUDO DA AÇÃO MOLUSCICIDA DO LÁTEX DA  
*EUPHORBIA SPLENDENS* VAR. *HISLOPII* N.E.B. (COROA-  
DE-CRISTO) (EUPHORBIACEAE) NO COMBATE AO  
*ACHATINA FULICA* BOWDICH, 1822 (CARAMUJO GIGANTE  
AFRICANO) (STYLOMMATOPHORA:ACHATINIDAE):  
TESTE EM LABORATÓRIO**

BAURU  
2010

**HUDSON MOGGIONI MUNHOZ**

**ESTUDO DA AÇÃO MOLUSCICIDA DO LÁTEX DA  
*EUPHORBIA SPLENDENS* VAR. *HISLOPII* N.E.B. (COROA-  
DE-CRISTO) (EUPHORBIACEAE) NO COMBATE AO  
*ACHATINA FULICA* BOWDICH, 1822 (CARAMUJO GIGANTE  
AFRICANO) (STYLOMMATOPHORA:ACHATINIDAE):  
TESTE EM LABORATÓRIO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências Biológicas e Profissões da Saúde como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, sob orientação da Profa. Dra. Rosângela Aparecida Marques Martinez.

BAURU  
2010

Munhoz, Hudson Moggioni

M9251e

Estudo da ação moluscicida do látex da *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B. (coroa-de-Cristo) (Euphorbiaceae) no combate ao *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (caramujo gigante africano) (Stylommatophora : Achatinidae) : teste em laboratório / Hudson Moggioni Munhoz -- 2010.  
45f.

Orientadora: Profa. Dra. Rosângela Aparecida Marques Martinez

Co-orientador: Dorival Roberto Rodriguez.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas) - Universidade Sagrado Coração - Bauru - SP.

1. *Achatina fulica*. 2. *Euphorbia splendens*. 3. Moluscicida. I. Martinez, Rosângela Aparecida Marques. II. Rodriguez, Dorival Roberto. III. Título.

Dedico este ao meu pai, por me imbuir do verdadeiro conhecimento, à minha mãe pela dedicação incontestável e à minha eterna namorada Renata, por me apoiar incondicionalmente e acreditar no meu potencial.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por iluminar meus caminhos e me mostrar que não importa o quão difícil seja nossa trajetória, Seu tempo é diferente do meu e sempre haverá respostas para nossos questionamentos.

À minha mãe por sua ternura e pelo colo acalentador, por sempre me receber de braços abertos e com o coração transbordando de amor.

Ao meu pai, meu herói. Portador de um saber inigualável e um coração dantesco, responsável por semear a paixão e o respeito pela vida em mim enraizada.

À Renata por acreditar no meu potencial e me guiar, mostrando que sou capaz e que não há limites para o que podemos conquistar, mesmo que para isso tenhamos que abrir mão do nosso convívio diário.

Agradeço aos meus irmãos, Helder e Priscyla, por me ensinar o verdadeiro significado da palavra “irmão”.

À Maricê por guiar-me dentro da USC e por enxergar o que havia por trás do brilho dos meus olhos.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Rosângela, por me indagar tão propriamente a cada etapa da pesquisa e dividir sua atenção comigo.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Dorival Roberto Rodriguez, pelo auxílio durante a fase laboratorial e no preparo das soluções.

Agradeço ao meu amigo Amilton Souza de Mello Junior, Ph.D, que foi além da análise estatística ao me ensinar como utilizá-la corretamente.

À Ana, Assistente Social, pelo empenho e auxílio; à Ciça pela paciência; à Josiane e à Lú da PRPPG e a todas as bibliotecárias pela atenção durante a pesquisa.

Agradeço à cada um dos mestres da USC que, mesmo através de uma conversa informal nos intervalos ou no caminho para a sala dos professores, me apoiaram e dividiram sua sabedoria comigo.

Agradeço novamente à Deus, por proporcionar-me o convívio junto a cada uma dessas pessoas maravilhosas, agraciadas de sabedoria e humanidade.

“Imagine uma nova história para sua vida e acredite nela”.  
(Paulo Coelho)

## RESUMO

O caramujo gigante africano *Achatina fulica* é uma espécie invasora capaz de sobreviver sob condições climáticas adversas encontradas em biomas brasileiros. A comunidade científica mostrou que esse molusco causa efeitos negativos sobre a malacofauna nativa, devido à perda de biodiversidade. Infestações urbanas de *Achatina fulica* requerem medidas especiais de prevenção das agências de Saúde nacionais e internacionais. Estudos envolvendo o efeito moluscicida do látex da *Euphorbia splendens* var. *hislopilii* apresentaram resultados importantes sobre o controle dos moluscos aquáticos e anfíbios. Além disso, pesquisas atuais estudaram os níveis de toxicidade, os métodos de aplicação, os efeitos sobre os outros animais em laboratório, fotodegradação, e outras importantes questões sugeridas pela Organização Mundial de Saúde, que precisam ser elucidados, a fim de usar o látex no ambiente. No presente estudo, os efeitos de quatro diferentes concentrações (01, 05, 10 e 15%) do látex foram estudados em quatro classes de idade de *A. fulica* (filhote, jovem, jovens-adultos e adultos), coletados em Bauru, São Paulo. Os resultados mostraram que a concentração de 05% do látex determinou maior mortalidade dos moluscos filhotes ( $P \leq 0,0001$ ), um resultado muito importante, pois os animais desta idade são muito difíceis de visualizar durante a catação manual. Os filhotes são muito importantes devido à sua capacidade de re-colonização. Efeitos da *Euphorbia splendens* em outras classes etárias sugerem que a propriedade moluscicida do látex pode afetar a biologia dos animais, levando a vulnerabilidade a fatores bióticos e abióticos.

**Palavras-chave:** *Achatina fulica*. *Euphorbia splendens*. Moluscicida.

## ABSTRACT

The giant African land snail *Achatina fulica* is an invasive species capable to survive under adverse climatic conditions found in Brazilian biomes. The scientific community showed that this snail causes detrimental effects on native malacofauna due to biodiversity loss. Urban infestations by *Achatina fulica* required special preventative measures from Brazilian and international Health agencies. Studies involving the molluscicide effect of the latex of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* showed important results regarding the control of aquatic and amphibians mollusks. Additionally, current researchs also studies levels of toxicity, methods of application, effects on other animals in laboratory, photodegradation, and other important issues suggested by the World Health Organization which is needed to be elucidated in order to use the latex in the environment. In this study, the effects of four different concentrations (01, 05, 10, and 15%) of the latex were studied on 4 age classes of *A. fulica* (very-young, young, young-adults, adults) harvested in Bauru, Sao Paulo. Results showed that 05% of the latex determined higher mortality of very-young snails ( $P \leq 0,0001$ ), a very important result since animals of this age are very difficult to visualize and hand collect. Very-young animals are very important due to their capacity of re-colonization. Effects of the *Euphorbia splendens* on other age classes suggested that the molluscicide properties of the latex may affect the biology of the animals leading to vulnerability to biotic and abiotic factors.

**Key-words:** *Achatina fulica*. *Euphorbia splendens*. Molluscicide.

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Mortalidade (%) de <i>A. fulica</i> (N = 10) submetidos aos bioensaios com o látex da <i>E. splendens</i> até 24h após aplicação.....	24
TABELA 2 – Mortalidade (%) acumulada de <i>A. fulica</i> (N = 10) submetidos aos bioensaios com o látex da <i>E. splendens</i> até 48h após aplicação.....	24
TABELA 3 – Mortalidade (%) obtida até 24 horas da aplicação 1 do látex da <i>E. splendens</i> var. <i>hislopilii</i> diluído em solução aquosa, vaporizada nas quatro classes de tamanho de <i>A. fulica</i> .....	26
TABELA 4 – Mortalidade (%) acumulada obtida até 48 horas da aplicação 1 do látex da <i>E. splendens</i> var. <i>hislopilii</i> diluído em solução aquosa, vaporizada nas quatro classes de tamanho de <i>A. fulica</i> .....	26
TABELA 5 – Mortalidade (%) obtida até 24 horas da aplicação 2 do látex da <i>E. splendens</i> var. <i>hislopilii</i> diluído em solução aquosa, vaporizada nas quatro classes de tamanho de <i>A. fulica</i> .....	27
TABELA 6 – Mortalidade (%) acumulada obtida até 48 horas da aplicação 2 do látex da <i>E. splendens</i> var. <i>hislopilii</i> diluído em solução aquosa, vaporizada nas quatro classes de tamanho de <i>A. fulica</i> .....	28
TABELA 7 – Mortalidade (%) obtida até 24 horas da aplicação 3 do látex da <i>E. splendens</i> var. <i>hislopilii</i> diluído em solução aquosa, vaporizada nas quatro classes de tamanho de <i>A. fulica</i> .....	29
TABELA 8 – Mortalidade (%) acumulada obtida até 48 horas da aplicação 3 do látex da <i>E. splendens</i> var. <i>hislopilii</i> diluído em solução aquosa, vaporizada nas quatro classes de tamanho de <i>A. fulica</i> .....	29

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	18
2.1	OBJETIVO GERAL.....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	19
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	24
4.1	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO LETAL (CL <sub>90</sub> ).....	25
4.2	BIOENSAIOS.....	25
4.2.1	APLICAÇÃO 1.....	25
4.2.2	APLICAÇÃO 2.....	27
4.2.3	APLICAÇÃO 3.....	28
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	31
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	32
	APÊNDICE A - Protocolo de bioensaio da aplicação 1.....	38
	APÊNDICE B - Protocolo de bioensaio da aplicação 2.....	40
	APÊNDICE C - Protocolo dos bioensaios da aplicação 3-A, B, C e D.....	42

## 1 INTRODUÇÃO

A espécie *Achatina fulica* (Bowdich, 1822), popularmente conhecida como “caramujo gigante africano”, “caramujo africano” ou “caramujo gigante” pertence ao Filo Mollusca, Classe Gastropoda, Subclasse Pulmonata, Ordem Stylommatophora. Das oito classes do Filo Mollusca, a única que invadiu o ambiente terrestre foi a Classe Gastropoda (SIMONE, 1999).

A espécie é originária da África, ocorre de Natal e Moçambique no sul e do Kênya à Somália italiana ao norte. *A. fulica* faz parte das espécies que se diferenciaram no oeste e centro africano, principalmente nas margens de florestas, contrastando com outras espécies do gênero que se originaram em florestas tropicais úmidas no leste da África ou em florestas temperadas de altitude (RAUT; BARKER, 2002). Fischer e Colley (2005) levantam a hipótese de que seu hábito generalista surgiu como resposta à necessidade de estratégias adaptativas nesse ambiente instável.

A Subclasse Pulmonata recebe essa designação graças à modificação da cavidade palial em um pulmão, altamente vascularizado, quase todo fechado, em contato com o meio externo através de um orifício denominado pneumóstoma. Nessa subclasse todos os representantes são hermafroditas e, em geral, apresentam cruzamento simultâneo. No caso dos Stylommatophora, caracterizam-se por viver exclusivamente no ambiente terrestre em todas as fases de seu desenvolvimento e por apresentar um único orifício genital por onde exteriorizam o pênis e a vagina no momento da cópula (SIMONE, 1999).

Alguns outros caracteres morfológicos estão geralmente presentes em todos os ramos dos gastrópodes terrestres, resultantes das adaptações ao ambiente. Os principais são modificações que evitam a perda da água através do tegumento e do muco, que auxiliam na economia da mesma pelo incremento substancial do rim e nas trocas gasosas diretamente do ar, característica obtida pela perda de brânquias e o desenvolvimento de uma rede anastomosada de vasos sanguíneos no teto da cavidade do manto, denominada pulmão, que, encerrado em uma câmara mais fechada, deve diminuir a perda de água e aumentar a pressão do ar dentro dele, facilitando as trocas gasosas (SIMONE, 1999).

Conforme o autor citado acima, isso poderia explicar, em parte, a maior diversidade dos pulmonados em relação aos demais táxons terrestres. Em relação

ao habitat, a maior parte dos moluscos terrestres vive no solo e na vegetação perto dele, alimentando-se de serrapilheira ou folhas tenras e durante períodos adversos do clima costumam entrar em estivação, enterrando-se no solo por meses e dificultando a sua localização.

A espécie *A. fulica* possui concha cônica marrom ou mosqueada de tons mais claros; adultos podem atingir mais de 20 centímetros de comprimento de concha e peso que varia de 200 a 500 gramas. Alcança a maturidade sexual entre 4 e 5 meses de vida, fazendo até quatro posturas anuais contendo 180 a 500 ovos cada, com taxa de eclosão de aproximadamente 90% (IBAMA, 2004).

Apresenta metabolismo mais ativo durante o período chuvoso e quando as temperaturas encontram-se elevadas; durante seu deslocamento, move-se lentamente sobre o muco secretado pela glândula pedal através de ondas de ação muscular no lado ventral do pé. No período mais seco, recolhe-se e desenvolve uma cobertura temporária constituída de muco e cálcio denominada epifragma, responsável por selar a abertura da concha, evitando sua dessecação (RUPPERT; FOX; BARNES, 2005)

Classificado como uma das cem piores espécies exóticas invasoras de ocorrência mundial (LOWE et al., 2004) e a segunda pior espécie disseminada pelo mundo (INVASIVE SPECIES SPECIALIST GROUP, 2004), o *A. fulica* foi introduzido no Brasil na década de 80 através de helicicultores no Estado do Paraná para fins gastronômicos e descartado indevidamente após a frustração dos criadores (COLLEY; FISCHER, 2009).

A Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB) tem, entre outras atribuições, o objetivo de orientar a gestão para conservação e utilização sustentável da biodiversidade, sendo geradora de importantes marcos legais e políticos em todo o mundo, entre eles o grupo de trabalho intitulado “Controle e Erradicação de Espécies Exóticas Invasoras” (BRASIL, 2006).

A CDB define espécies exóticas invasoras como àquelas resultantes da introdução intencional ou acidental oriundas de atividades antrópicas, com alta capacidade reprodutiva, capazes de adaptar-se e alastrar-se sobre uma área considerável (McGEOCH; CHOWN; KALWIJ, 2006).

O Panorama da Biodiversidade Global 2, organizado pelo Secretariado da CDB enfatiza que, dentre as cinco principais ameaças comumente reconhecidas nos programas de trabalho da Convenção, as espécies exóticas invasoras ainda figuram

como grandes responsáveis pela perda da biodiversidade, podendo causar impactos devastadores sobre a biota nativa, provocando extinções e causando impacto sobre ecossistemas naturais e cultivados.

A Comissão Nacional de Biodiversidade (CONABIO) mantém uma Câmara Técnica Permanente sobre Espécies Exóticas Invasoras no Brasil, criada através da Deliberação CONABIO nº 49, de 30 de agosto de 2006, resultado dos compromissos assumidos pelo país no âmbito da Convenção sobre a Diversidade Biológica (BRASIL, 2006).

São listadas, dentre suas diretrizes e prioridades para conhecimento da biodiversidade, as propostas de inventariar, listar, revisar e elaborar mapas de distribuição para espécies exóticas, invasoras e espécies-problema, com prioridade muito alta, com prazo contínuo e viabilidade de custo muito alta, além de elencar os potenciais executores. No mesmo documento é possível avaliar o compromisso do Brasil para com as Metas Nacionais para a Biodiversidade 2010 e as suas correspondências com as Metas Globais aprovadas pela Conferência das Partes da CDB, o que demonstra a preocupação no que se refere às espécies exóticas invasoras (BRASIL, 2006).

Distribuído por 23 Estados brasileiros e em diferentes ecossistemas (TELES et al., 1997; VASCONCELLOS; PILE, 2001; FISCHER; COLLEY, 2005), a espécie *A. fulica* tornou-se praga em quase todo território brasileiro, alimentando-se de frutas e legumes em áreas de cultivo e competindo com moluscos nativos por alimentação e sítios de repouso, podendo levá-los a extinção; sua presença é observada em áreas florestais, especialmente na borda, na margem de brejos, em áreas de preservação ambiental e em Unidades de Conservação (IBAMA, 2004; FISCHER; COLLEY, 2005).

Das medidas adotadas para controle do caramujo gigante africano, a mais difundida ainda é a coleta e a destruição dos moluscos, devendo ser realizada periodicamente. Durante a coleta é muito importante saber diferenciar a espécie invasora de outras espécies de moluscos nativas. Como complemento das medidas estratégicas do plano de ação elaborado, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis disponibiliza em seu sítio eletrônico todas as instruções necessárias, iniciativa amparada na Lei nº 9.605 de Crimes Ambientais e na Instrução Normativa nº 73 do mesmo instituto (IBAMA, 2004).

Em Bauru, estado de São Paulo, a intensa proliferação do molusco *A. fulica* motivou a Secretaria do Meio Ambiente do município a publicar a Resolução nº 08/2007, no ano de 2007 onde estabelece as Estratégias de Implementação do Plano de Manejo do caramujo gigante africano, além de incluí-lo na lista oficial de espécies exóticas invasoras ou com potencial de invasão do município (NEVES et al., 2005; BAURU, 2009).

A dificuldade de acesso a informações concisas sobre o caramujo exótico invasor evidencia o despreparo e dificulta o conhecimento da biologia da espécie e como combatê-la. O método mais utilizado no Brasil para o combate ou controle do *A. fulica* ainda é rudimentar, oneroso e pouco eficiente. A catação manual depende de um trabalho intenso, focado e com estratégias de ação contínua para evitar a recolonização mais vigorosa após a retirada dos indivíduos mais velhos (ZILLER, 2004; COLLEY; FISCHER, 2009).

A população do caramujo gigante africano passa por três fases durante seu estabelecimento: a primeira é de crescimento exponencial, caracterizada por indivíduos grandes e vigorosos; a segunda trata do estabelecimento da população com duração variável, aumento populacional e homozigoze; a terceira é a fase de declínio, caracterizada por uma população de pequenos indivíduos, com conchas fracas e mais susceptíveis às doenças. Todo o processo parece envolver de forma clara o esgotamento das fontes de nutrientes, caso notório é o do cálcio, imprescindível para a formação da concha e do epifragma (CIVEYREL; SIMBERLOFF, 1996).

Dada sua notável capacidade de adaptação, reprodução e dispersão, o caramujo gigante africano também é objeto de estudos relativos à saúde pública, pois desempenha um importante papel no ciclo de vida de algumas helmintoses de interesse médico-veterinário causadas pelos nematódeos do gênero *Angiostrongylus* que necessitam de um molusco como hospedeiro intermediário para se desenvolver até o terceiro estágio (forma larval e infectante).

*Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) é causador de parasitose pulmonar em ratos urbanos e silvestres e angiostrongilíase meningoencefálica em humanos, também denominada meningoencefalite ou meningite eosinofílica, enquanto que *Angiostrongylus costaricensis* (Morera e Céspedes, 1971) é responsável pela angiostrongilíase abdominal, com casos registrados nas regiões Sul, Sudeste e no Distrito Federal (TELES et al., 1997; SIMONE, 1999).

Em 2003, pesquisadores do Centro de Pesquisas Renée Rachou da Fundação Oswaldo Cruz, da Superintendência de Controle de Endemias de São Paulo (SUCEN), do Departamento de Patologia do Instituto Oswaldo Cruz e da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais promoveram a infecção experimental da espécie *A. fulica* utilizando larvas do *Angiostrongylus costaricensis*, com o objetivo de detectar a potencialidade do molusco no papel de hospedeiro intermediário. Os resultados foram positivos em 32% das amostras e demonstram que, apesar dos altos índices de exposição a que foram submetidos, há suscetibilidade e real possibilidade de urbanização da angiostrongilíase devido à grande dispersão e notável adaptação da espécie *A. fulica* em ambientes urbanos (CARVALHO et al., 2003).

Em estudos parasitológicos promovidos na área rural de Vargem Pequena, no município do Rio de Janeiro, pesquisadores relataram a presença de larvas de nematóides não identificados, registrados em indivíduos de *A. fulica* (BERTO; BOGÉA, 2007).

Em 2007, ocorreu o primeiro registro no Brasil e na América do Sul de *A. fulica* e *Rattus Norvegicus* naturalmente infectados por *Angiostrongylus cantonensis*, à partir da investigação no peridomicílio de pacientes com suspeita de infecção, no município de Cariacica, estado do Espírito Santo e em São Vicente, litoral de São Paulo. Ambos os casos ocorreram em região portuária, sugerindo que os ratos infectados chegaram em navios ao Brasil, onde desembarcaram e infiltraram-se na população local de roedores (CALDEIRA et al., 2007).

Em 2008, um estudo realizado em nove bairros do município de Campos dos Goytacazes, no Estado do Rio de Janeiro, incluiu *A. fulica* na cadeia epidemiológica da criptosporidíase, após promover a análise das fezes dos espécimes coletados, encontrando grande variabilidade de amostras de *Cryptosporidium spp.*, patógeno intestinal de distribuição mundial, que acomete indivíduos imunossuprimidos e imunocompetentes (SHIFFLER et al., 2008).

Vários trabalhos científicos são desenvolvidos com a intenção de controlar o crescimento exacerbado de moluscos que desempenham o papel de hospedeiros intermediários ou vetores, dentre eles o estudo de novos moluscidas de origem vegetal como alternativa ao uso dos moluscidas sintéticos disponíveis no mercado, que apresentam alto custo e necessitam de mão-de-obra mais especializada para manuseio (WHO, 1965; KLOSS; McCULLOUGH, 1982).

As pesquisas com extratos de plantas que apresentam ação moluscicida datam de 1930 e desde então mais de mil plantas foram testadas para determinar, dentre outros aspectos, a melhor metodologia de cultivo, manutenção, extração do princípio ativo para utilização, preparo da solução e reflexo na fauna e flora local, delineando assim um protocolo de pesquisa baseado em documentos da Organização Mundial da Saúde (WHO, 1965; KLOSS; McCULLOUGH, 1982; JURBERG; VASCONCELLOS; MENDES, 1989).

No Brasil, Jurberg, Vasconcellos e Mendes (1989) analisaram 73 famílias num total de 344 espécies de plantas. Dentre estas, 26 espécies em 19 famílias com 214 exemplares apresentaram índice de mortalidade com uma concentração muito abaixo da utilizada até o momento. Destacam-se as Euphorbiaceas, mais especificamente a *Euphorbia splendens* variedade *hislopii* N.E.B. (sinônimo de *Euphorbia milii* Des Moul variedade *splendens*, Hook), conhecida popularmente como “coroa-de-Cristo”, “coroa-de-espinhos”, “bem-casado”, “coroa-de-Nossa-Senhora” ou “colchão de noiva” originária da região de Inselberge, localizada no Platô central de Madagascar, África.

Classificada como exótica no Brasil, é largamente utilizada como planta ornamental e cerca viva em residências, com distribuição cosmopolita (RAUH, 1983), de cultivo simples, fácil adaptação, que não requer o uso de fertilizantes, pesticidas ou enriquecimento de solo (BATISTA et al., 1997).

Estudos realizados por pesquisadores do Núcleo de Biologia e Controle de Endo e Ectoparasitas de Interesse Médico e Veterinário, do Departamento de Biologia e do Centro de Pesquisas René Rachou do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) utilizando o látex da *E. splendens* diluído em solução aquosa tem apresentado ótimos resultados no combate a moluscos aquáticos e anfíbios.

O látex da *E. splendens* destaca-se por apresentar alta taxa de mortalidade na ação contra os moluscos *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila*, vetores e hospedeiros do *Schistosoma mansoni* (MELLO-SILVA et al., 2006; MENDES, et al., 1997), seus reflexos na população de *Melanooides tuberculata*, caramujo não-alvo associado à habitats de *Biomphalaria glabrata* e responsável pelo controle natural deste (GIOVANELLI et al., 2001) e contra o *Lymnaea columella*, hospedeiro da *Fasciola hepática*, causador da fasciolose hepática (PILE et al., 2001; ARAÚJO et al., 2002; VASCONCELLOS; AMORIM, 2003) apresentou mortalidade de 90% dos moluscos, em concentrações inferiores a 20 mg/L e em até 24 horas de

exposição, portanto, dentro dos critérios estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1965; VASCONCELLOS; SCHALL, 1986; VASCONCELLOS; AMORIM, 2003; WHO, 2006).

Tais critérios, estabelecem ainda a investigação acerca da atividade moluscicida do produto testado, a baixa toxicidade a mamíferos, a alta especificidade à moluscos e a facilidade na operação e aplicação, dentre outros aspectos (WHO, 1965).

Além da facilidade no plantio, manejo, extração do látex e aplicação da solução, características que corroboram com as desejáveis em plantas moluscicidas (KLOSS; McCULLOUGH, 1982), o látex de *E. splendens in natura* demonstra estabilidade durante as quatro estações do ano, mas, após preparada, a solução aquosa é instável e demonstra queda no efeito moluscicida após o 13º dia de seu preparo (SCHALL et al., 1992). Estudos para avaliar o efeito da variação do pH na concentração letal também foram promovidos por Vasconcellos et al. (2003).

Com o objetivo de determinar a influência da luminosidade na solução preparada com o látex da *E. splendens*, estudos apontam que o princípio ativo é fotodegradável. Os resultados demonstram que, se aplicada em campo, pode promover uma ação biocida muito curta quando exposta à luz, particularmente em áreas com elevada incidência solar (OLIVEIRA-FILHO; PAUMGARTTEN, 1997).

Para determinar a ação do látex em mamíferos e possíveis riscos à saúde, a toxicidade embriofetal em ratos Wistar foi pesquisada (SOUZA et al., 1997), assim como estudos toxicológicos relativos à promoção de tumores e a ação irritante nos olhos e na pele de coelhos albinos Nova Zelândia, demonstrando que o látex da *E. splendens* não provoca irritabilidade na pele nas concentrações abaixo de 0,5% (5.000 ppm), assim como para os olhos em concentrações abaixo de 0,35% (3.500 ppm), mas ressalva que o manuseio do látex puro deve ser procedido com equipamentos de segurança, como óculos de proteção e luvas (FREITAS et al., 1991).

Resultados preliminares de bioensaios com o látex da *E. splendens* var. *hislopii*, liofilizado e *in natura*, em diferentes concentrações e em diferentes formas de dieta oferecida ao *A. fulica*, demonstraram sua ótima ação como moluscicida no combate ao molusco terrestre. Taxas de mortalidade entre 5% e 60% foram observadas nos testes com as soluções aquosas do látex *in natura* e entre 10% e

26,6% de mortalidade quando administrado na forma liofilizada (SZABÓ; VASCONCELLOS, 2004).

Em se tratando de um gastrópode terrestre altamente adaptado, o *A. fulica* desenvolveu várias estratégias de proteção contra fatores bióticos e abióticos, dentre eles a rápida formação do epifragma devido à pré-produção e co-deposição da fase inorgânica de reforço na matriz do muco (STRUTHERS et al., 2002), a capacidade de enterrar-se e estivar por longos períodos e a detecção de alterações na umidade relativa do ar, fator que determina o melhor período para sair da estivação, desenterrar-se e dispersar. Tais estratégias dificultam as ações de controle, quando conduzidas em desacordo com o comportamento do molusco, facilitando a re-colonização das áreas em questão (FISCHER, 2009).

A escolha de sítios de repouso que ajudem a minimizar a área corporal exposta às intempéries, a retração da massa cefalopodal no interior da concha e a imobilização são comportamentos relacionados à economia de água e energia e precedem as modificações ao nível fisiológico e bioquímico que caracterizam a estivação. Durante a estivação os moluscos pulmonados terrestres mantêm os níveis de reservas energéticas e de água corporal compatíveis com sua sobrevivência (STOREY, 2002).

Outra importante estratégia utilizada pelo caramujo *A. fulica* é verificada em relação aos filhotes que, após eclodirem, permanecem protegidos sob o substrato por períodos que variam de cinco a 15 dias para só depois iniciarem a dispersão, comportamento descrito como grande responsável pela re-colonização após a intervenção utilizando o método de controle através da catação manual (RAUT; BARKER, 2002).

Colley e Fischer (2009) relatam que a ampla dispersão do *A. fulica*, principalmente em ambientes urbanos, facilita o transporte passivo de indivíduos de uma localidade para outra, através da movimentação de terra utilizada na construção civil e que os planos de manejo e controle devem observar a importância desse fator.

D'Ávila et al. (2004) ressaltam a necessidade de se conhecer a biologia e o comportamento dos moluscos, bem como a influência de fatores bióticos e abióticos que os regem. Informações sobre a época do ano e o fotoperíodo mais favorável para a aplicação de moluscidas, assim como as estratégias biológicas e

comportamentais responsáveis por garantir a sobrevivência e o restabelecimento da população são de fundamental importância.

O presente estudo, visando colaborar no processo de combate e/ou controle da espécie exótica invasora, testou a ação moluscicida do látex *in natura* de *E. splendens* em diferentes classes de tamanho do caramujo *A. fulica*, considerando a influência do comportamento da espécie durante os testes em laboratório.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação moluscicida do látex *in natura* da planta *Euphorbia splendens* var. *hislopilii* diluído em solução aquosa, no combate ao molusco terrestre *Achatina fulica* Bowdich, 1822.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar a eficiência da ação moluscicida do látex em diferentes concentrações nos diferentes grupos de tamanhos do caramujo gigante africano (filhotes, jovens, jovens-adultos e adultos);

Analisar a influência do comportamento, da temperatura do ambiente e da umidade relativa do ar na eficiência da ação moluscicida.

### 3 METODOLOGIA

Os bioensaios foram realizados em área externa, anexa ao biotério, protegida da incidência solar direta, nas dependências da Universidade Sagrado Coração em Bauru (22°18'53" de latitude sul e 49°03'38" de longitude oeste), estado de São Paulo, no período de 01 de dezembro de 2009 a 20 de maio de 2010. A área externa utilizada para os experimentos apresentava cobertura para proteção das caixas de polipropileno, nas quais os espécimes de *A. fulica* foram acondicionados durante todo o período do estudo.

Testes-pilotos foram conduzidos para definir padrões metodológicos, como utilização de substrato nas caixas, o número de indivíduos por caixa, distância para pulverização, além dos horários de coleta de látex, preparo das soluções, separação dos moluscos e aplicação.

Imediatamente após a separação dos moluscos e antes das aplicações, foi necessário pulverizar água na superfície, o que mantinha os moluscos em atividade ou incitava o forrageio, de acordo com o preconizado por Cook (2001), que descreve a reidratação por contato, mecanismo utilizado pelos gastrópodes terrestres para a manutenção da homeostase. A capacidade de retenção de água do substrato fornece a reidratação adequada aos gastrópodes terrestres em períodos desfavoráveis, sem a qual afetaria a osmorregularidade da hemolinfa, o que implicaria sobre o controle do batimento cardíaco, na alimentação e na locomoção.

A adoção da camada de 30 mm de substrato arenoso típico do município, caracterizado por Cavaguti (1994) como Latossolo vermelho-escuro de textura média ou solo glei húmico a pouco húmico com acentuado horizonte gleizado e predominantemente arenoso, visa a obtenção de parâmetros que reflitam as condições da realidade em campo, em especial no próprio município.

O uso do substrato colaborou para evitar o contato ininterrupto dos moluscos com a solução acumulada no fundo da caixa. Esse contato influenciou significativamente na mortalidade durante um dos testes-piloto e descaracterizava a pesquisa. Ao adotar o substrato, foi observado que, após a pulverização, o látex foi drenado, apresentou cobertura superficial regular e não acumulou na superfície.

O número de indivíduos por caixa também foi pré-avaliado. De acordo com Cook (2001), quando há adensamento populacional de gastrópodes terrestres num

pequeno espaço, pode-se observar um notório retardo no crescimento, mesmo que haja alimento disponível, caracterizando o estresse.

Para tanto, observou-se o comportamento de forrageio e possível oviposição das quatro classes de tamanho (N = 10) separadas em quatro caixas distintas, com substrato e alimentadas em dias alternados com alface e água *ad libitum*.

A fase de testes-piloto demonstrou que os moluscos não refletiram sinais de estresse pela situação de confinamento e/ou número de indivíduos por caixa, pois continuavam se alimentando normalmente, locomoviam-se por toda caixa, além de não apresentar indivíduos estivado ou com sinais de formação de epifragma. A oviposição nas caixas ocorreu normalmente nos moluscos da classe adulto (acima de 70 mm).

Para determinar o horário dos bioensaios, os aspectos comportamentais do molusco foram respeitados, ficando estabelecido o horário das aplicações entre as 22:00 e 23:00 da noite.

O método de aplicação foi definido baseado na pesquisa bibliográfica (SZABÓ; VASCONCELLOS, 2004; OLIVEIRA, 2007), onde as lacunas ou a inespecificidade presente em outros métodos foi discutida. Além de possibilitar a reprodução do bioensaio em ambiente de campo, em uma escala superior, a maior infestação ocorre em ambiente urbano, sendo a utilização de pulverizador costal economicamente viável, quando não disponível.

Na pulverização durante os bioensaios, foi adotada a distância de 400 mm entre o pulverizador e o molusco, após observação do ângulo de dispersão da solução quando ejetada do pulverizador, garantindo maior ação, menor perda da solução e menor impacto mecânico do líquido nos moluscos, evitando o recolhimento da massa cefalopodal na concha, fator que inviabiliza a aplicação. Para efetividade da ação do látex, a vaporização foi realizada nos moluscos em plena atividade de locomoção, com a massa cefalopodal parcial ou completamente exposta.

Os moluscos foram separados 24 horas antes da aplicação em cinco caixas contendo 10 indivíduos cada (filhote, jovem, jovem-adulto ou adulto). O grupo controle foi composto por 10 indivíduos de classes diferentes, acondicionado sob as mesmas condições (local, temperatura e umidade relativa do ar).

A coleta do látex foi realizada no período entre 16:00 e 17:00 no dia da aplicação e logo após, a solução foi preparada em laboratório e reservada em balão

volumétrico sob temperatura ambiente. A alimentação dos moluscos foi suspensa às 18:00 horas do dia da aplicação.

Antes de cada aplicação, foi verificado se as caixas apresentavam rastros de muco, o que demonstrava atividade anterior, a presença de algum indivíduo enterrando-se, a presença ou ausência de epifragma, a morte ocasionada pelo manuseio ou a presença de algum inseto nas caixas.

Além da mortalidade, foi possível acompanhar as alterações morfológicas e comportamentais, a capacidade de formação do epifragma após as aplicações e a capacidade do molusco enterrar-se para abrigo do efeito do látex e/ou das variações climáticas, sob efeito da solução empregada.

Foram utilizados como resposta e confirmação da morte a ausência de reflexo muscular na massa cefalopodal (MCP) e/ou enrijecimento da MCP e/ou MCP distendida. O procedimento foi executado com o auxílio de pinça e estereoscópio.

A metodologia que foi utilizada durante os bioensaios ficou definida como descrita a seguir:

**Planta usada:** *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B. (sin. *Euphorbia milii* Des Moul var. *splendens*, Hook), pertencente a família das Euphorbiaceas. A identificação da planta foi realizada no Herbário BAUR da Universidade Sagrado Coração, e depositada sob registro nº 4947.

**Coleta do látex:** as amostras do látex foram coletadas nas proximidades do Campus da Universidade Sagrado Coração, local que proveu material durante todo o trabalho para evitar variações de metabolismo de uma planta para outra, fator que provavelmente influenciaria a concentração das substâncias ativas (LUGT, 1987). O procedimento para coleta do látex se deu através de cortes transversais cerca de 100 mm abaixo do meristema apical de cada tronco. O látex extraído foi coletado através de um tubo de ensaio e imediatamente vedado com tampa rosqueável para evitar sua coagulação. Após a coleta foi transportado ao laboratório e utilizado para bioensaios no mesmo dia (VASCONCELLOS; AMORIM, 2003).

**Preparo da solução aquosa:** os valores referentes às concentrações usadas foram baseados nas utilizadas em pesquisas do Núcleo de Biologia e Controle de Endo e Ectoparasitas de Interesse Médico e Veterinário e do Núcleo de Biologia da

Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) do Rio de Janeiro. As concentrações 1, 5, 10 e 15% com volume final de 200 mL cada foram utilizadas nos bioensaios e obtidas através da diluição volume/volume do látex em água destilada, preparadas no mesmo dia da pulverização nos moluscos. Para o grupo controle de cada teste, foi utilizada água pura, destilada, sem látex com o mesmo volume da solução (VASCONCELLOS; AMORIM, 2003). A temperatura em graus Celsius da solução, do ambiente, assim como a umidade relativa do ar foi aferida nos bioensaios.

**Coleta dos moluscos:** os moluscos da espécie *Achatina fulica* (Bowdich, 1822), foram coletados na área urbana de Bauru, Estado de São Paulo, seguindo as orientações do IBAMA e transportados em caixas de polipropileno medindo 350x160x490 mm até o laboratório de Zoologia da Universidade Sagrado Coração. Foi coletado um total de 1.200 indivíduos, de acordo com a necessidade durante os bioensaios, os quais foram identificados (MALEK, 1985), medidos e classificados em quatro classes de tamanho que pressupõe a faixa etária: filhotes (até 10 mm), jovens (10 a 40 mm), jovens-adultos (40 a 70 mm) e adultos (maiores que 70 mm) (CRAZE; MAUREMOOTO, 2002). Após a divisão em classes, foram acondicionados em caixas de polipropileno forradas com 30 mm de substrato e alimentados com folhas de alface (*Lactuca sativa* L.) *ad libitum* para aclimatação (VASCONCELLOS; PILE, 2001) em área externa, protegida da incidência de luz solar direta com tela Sombrite® referência 1007 (70% de sombreamento).

**Testes com os moluscos:** baseado na metodologia descrita pela Organização Mundial da Saúde para testes utilizando moluscos aquáticos ou anfíbios e substâncias moluscidas (WHO, 1965, 2006).

**Período de exposição e recuperação:** Para os bioensaios, cada concentração de látex (1, 5, 10 e 15%) foi testada nas quatro classes (filhotes, jovens, jovens-adultos e adultos). Os moluscos, separados por classe de tamanho (N = 10), foram acondicionados nas caixas de polipropileno forradas com substrato onde receberam a pulverização da solução. Cada classe de tamanho foi pulverizada com 50 mL da concentração pré-estabelecida usando um pulverizador com reservatório dotado de gatilho (Guarany®, modelo Multi sprayer, código 0321.04.00) enquanto o grupo controle recebeu a pulverização de 50 mL de água destilada. Todos os grupos foram

mantidos sob efeito da solução pelo período de exposição de até 24 horas, em caixas devidamente tampados com tela de *nylon* do tipo mosquiteiro para evitar a fuga. Após o período de exposição, os moluscos mortos e vivos foram removidos. Os moluscos mortos foram contabilizados e descartados. Os moluscos vivos foram colocados em caixas isentas da solução, forradas com substrato, por outro período de 24 horas para recuperação e acompanhamento do efeito da solução empregada. Foi oferecida alface *ad libitum* durante esse período. Os moluscos vivos e mortos decorrentes do período de exposição (até 24 horas) e de recuperação (até 48 horas) foram contabilizados, especificando o número e classe de tamanho para cada solução empregada, inclusive para os grupos controle (VASCONCELLOS; AMORIM, 2003). A ocorrência de formação de epifragma, estivação, forrageio, dispersão e oviposição também foram registrados.

**Bioensaios para determinar a concentração letal:** Os bioensaios realizados para estabelecer a concentração letal ( $CL_{90}$ ), seguiram todas as etapas descritas. Os animais do grupo controle, expostos somente à água destilada, passaram igualmente por todo procedimento. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística (VASCONCELLOS; AMORIM, 2003).

**Análise estatística:** Para a avaliação dos dados de mortalidade, foi utilizado o procedimento GLIMMIX do programa SAS<sup>®</sup> (Versão 9.1, Cary, N.C., 2002) através da análise de variância. Resultados significativos foram considerados quando  $P \leq 0.05$ .

Utilizou-se o modelo experimental  $Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_k + (\alpha\beta)_{ik} + \varepsilon_{ijk}$  onde:  $Y_{ijk}$  = mortalidade de moluscos obtida sob influência ou não da concentração de látex  $i$  e sob influência ou não do tamanho  $k$ ,  $\mu$  = média total,  $\alpha_i$  = valor adicional determinado pela concentração  $i$ ,  $\beta_k$  = valor adicional determinado pelo tamanho do molusco  $k$ ,  $(\alpha\beta)_{ik}$  = valor adicional da interação concentração  $i$  x tamanho  $k$  e  $\varepsilon_{ijk}$  = erro total do experimento.

Quando as médias foram significativas, as mesmas foram separadas utilizando as funções LSMEANS, DIFF, e LINES. Interações foram identificadas e as médias foram separadas através das funções SLICE e SLICEDIFF.

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 são apresentadas as médias de mortalidade nas diferentes classes de tamanho em todas as concentrações testadas e valores de mortalidade entre as diferentes classes de tamanhos na mesma concentração, mostrando valores que apresentaram diferença estatística na aplicação até 24 horas.

Tabela 1 - Mortalidade (%) de *A. fulica* (N = 10) submetidos aos bioensaios com o látex da *E. splendens* até 24h após aplicação

Tamanho <sup>1</sup>	Concentração (%)				
	Controle	1	5	10	15
Filhote	0 <sup>C</sup>	77 <sup>Ba</sup>	97 <sup>Aa</sup>	93 <sup>Aa</sup>	100 <sup>Aa</sup>
Jovem	0 <sup>B</sup>	17 <sup>ABb</sup>	27 <sup>Ab</sup>	0 <sup>Bb</sup>	7 <sup>Bb</sup>
Jov. adulto	0	0 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
Adulto	0	0 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

<sup>1</sup>Controle = misto; Filhote= até 10 mm ; Jovem= 10 a 40 mm; Jovem adulto = 40 a 70 mm ; Adulto = maiores que 70 mm.

<sup>A,B,C</sup> Letras maiúsculas iguais na mesma linha indicam não haver diferença estatística na mortalidade dos moluscos.

<sup>a,b,c</sup> Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam não haver diferença estatística na mortalidade dos moluscos.

Na Tabela 2 são apresentadas as médias de mortalidade nas diferentes classes de tamanho em todas as concentrações testadas e valores de mortalidade entre as diferentes classes de tamanhos na mesma concentração, mostrando valores que apresentaram diferença estatística na aplicação até 48 horas.

Tabela 2 - Mortalidade (%) acumulada de *A. fulica* (N = 10) submetidos aos bioensaios com o látex da *E. splendens* até 48h após aplicação

Tamanho <sup>1</sup>	Concentração (%)				
	Controle	1	5	10	15
Filhote	0 <sup>C</sup>	90 <sup>Ba</sup>	97 <sup>ABa</sup>	100 <sup>Aa</sup>	100 <sup>Aa</sup>
Jovem	0 <sup>B</sup>	17 <sup>ABb</sup>	43 <sup>Ab</sup>	23 <sup>ABb</sup>	30 <sup>ABb</sup>
Jov. adulto	0 <sup>C</sup>	7 <sup>BCb</sup>	13 <sup>ABc</sup>	20 <sup>Ab</sup>	10 <sup>ABCb</sup>
Adulto	0 <sup>C</sup>	0 <sup>Cb</sup>	0 <sup>Cc</sup>	13 <sup>Bb</sup>	23 <sup>Ab</sup>

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

<sup>1</sup>Controle = misto; Filhote= até 10 mm ; Jovem= 10 a 40 mm; Jovem adulto = 40 a 70 mm ; Adulto = maiores que 70 mm.

<sup>A,B,C</sup> Letras maiúsculas iguais na mesma linha indicam não haver diferença estatística na mortalidade dos moluscos.

<sup>a,b,c</sup> Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam não haver diferença estatística na mortalidade dos moluscos.

#### 4.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO LETAL (CL<sub>90</sub>)

A concentração letal <sub>90</sub> (CL<sub>90</sub>) para a classe de tamanho filhote, com indivíduos de até 10 mm foi 5%  $P \leq 0,05$ .

#### 4.2 BIOENSAIOS

Para determinar a concentração letal <sub>90</sub> (CL<sub>90</sub>), foram feitas três repetições dos bioensaios: aplicação 1, aplicação 2 e aplicação 3. Nas aplicações 1 e 2 todas as classes de tamanho foram submetidas a vaporização de todas as concentrações no mesmo dia. A aplicação 3 foi dividida em quatro fases: 3-A para concentração a 1%, 3-B para 5%, 3-C para 10% e 3-D para 15%, a fim de avaliar como as variantes influíam na mortalidade.

A mortalidade decorrente do período exposição (até 24 horas) e recuperação (até 48 horas) das três aplicações foi submetida à análise estatística.

##### 4.2.1 APLICAÇÃO 1

A aplicação 1 foi realizada em 22 de fevereiro de 2010, às 22:00; a temperatura ambiente verificada foi 24°C, temperatura da solução 26°C e umidade relativa do ar 92%, executada conforme os procedimentos estabelecidos nos testes-piloto. Foi verificado que os moluscos apresentavam comportamento de forrageio e intensa atividade no interior das caixas de aclimação, comportamento mantido quando acondicionados nas caixas para aplicação da solução.

Durante a vaporização da solução, a massa cefalopodal foi rapidamente recolhida na concha; esse comportamento foi observado em todas as classes de tamanho, seguido de total inatividade.

Ao término do período de exposição, as caixas foram verificadas, assim como a mortalidade, a temperatura, a umidade relativa do ar e o comportamento (APÊNDICE A).

A presença de muco com aspecto coagulado, de coloração alaranjada, secretado em grande quantidade por indivíduos das quatro classes de tamanho demonstra a interferência do látex na capacidade de formação do epifragma, ausente em todos animais que apresentavam reflexos na MCP, ou ainda uma

reação da espécie para evitar a dessecação, já que a temperatura máxima verificada para o período foi de 30°C.

Os moluscos que responderam ao teste de reflexo na MCP foram transferidos para caixas contendo substrato úmido e alface *ad libitum*, arranjados nas caixas de modo a facilitar a visualização de qualquer atividade até o término do período de recuperação. A classe de tamanho jovem apresentou mortalidade somente para os indivíduos menores, com medidas entre 13 e 21 mm. A taxa de mortalidade observada na aplicação 1 consta na Tabela 3.

Tabela 3 - Mortalidade (%) obtida até 24 horas da aplicação 1 do látex da *E. splendens* var. *hislopilii* diluído em solução aquosa, vaporizada nas quatro classes de tamanho de *A. fulica*

Tamanho <sup>1</sup>	Concentração (vol/vol)				
	Controle	1%	5%	10%	15%
Filhote	0	70	100	90	100
Jovem	0	0	30	0	0
Jovem adulto	0	0	0	0	0
Adulto	0	0	0	0	0

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

<sup>1</sup>Controle = misto; Filhote= até 10 mm ; Jovem= 10 a 40 mm; Jovem adulto = 40 a 70 mm ; Adulto = maiores que 70 mm.

O grupo controle apresentou comportamento de forrageio e tentativa de dispersão, acumulando-se na porção superior da caixa. Assume-se a hipótese de que esse comportamento reflete o verificado em condições naturais, sob influência da umidade do solo e temperatura ótima (COOK, 2001). Após a verificação, o grupo controle foi transferido para caixas contendo substrato úmido e alface *ad libitum*.

Ao término do período de recuperação, sob temperatura ambiente de 24°C; as caixas foram verificadas e a mortalidade novamente aferida, conforme exposto na Tabela 4.

Tabela 4 - Mortalidade (%) acumulada obtida até 48 horas da aplicação 1 do látex da *E. splendens* var. *hislopilii* diluído em solução aquosa, vaporizada nas quatro classes de tamanho de *A. fulica*

Tamanho <sup>1</sup>	Concentração (vol/vol)				
	Controle	1%	5%	10%	15%
Filhote	0	90	100	100	100
Jovem	0	0	30	10	40
Jovem adulto	0	10	10	20	0
Adulto	0	0	0	10	20

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

<sup>1</sup>Controle = misto; Filhote= até 10 mm ; Jovem= 10 a 40 mm; Jovem adulto = 40 a 70 mm ; Adulto = maiores que 70 mm.

O grupo controle demonstrou ampla atividade, alimentando-se vorazmente da alface oferecida, apresentando comportamento uniforme para todas as classes de tamanho (APÊNDICE A). Os moluscos remanescentes das classes de tamanho filhote e jovens ainda apresentavam inatividade e secretavam muco de aspecto coagulado.

As classes de tamanho jovem-adulto e adulto do grupo controle demonstraram atividade de forrageio e dispersão, posicionando-se na porção superior da caixa. A atividade dos indivíduos da classe jovem-adulto era notoriamente maior que a dos adultos, com intensa movimentação no interior das caixas.

#### 4.2.2 APLICAÇÃO 2

A aplicação 2 foi executada em 01 de março de 2010, às 22: 00; a temperatura ambiente aferida foi 24°C, umidade relativa do ar 92% e temperatura da solução 26°C. Ao término do período de exposição a mortalidade foi verificada e os valores constam na Tabela 5. Os indivíduos da classe jovem afetados pela ação do látex foram os menores da classe, com tamanho entre 19 e 24 mm,

O comportamento dos moluscos foi idêntico aos descritos na aplicação 1, mas a temperatura máxima, 36°C e a umidade relativa a 77% para o período sugerem interferência no comportamento e na mortalidade observada após o período de recuperação (APÊNDICE B).

Tabela 5 - Mortalidade (%) obtida até 24 horas da aplicação 2 do látex da *E. splendens* var. *hislopii* diluído em solução aquosa, vaporizada nas quatro classes de tamanho de *A. fulica*

Tamanho <sup>1</sup>	Concentração (vol/vol)				
	Controle	1%	5%	10%	15%
Filhote	0	90	100	90	100
Jovem	0	20	10	0	20
Jovem adulto	0	0	0	0	0
Adulto	0	0	0	0	0

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

<sup>1</sup>Controle = misto; Filhote= até 10 mm ; Jovem= 10 a 40 mm; Jovem adulto = 40 a 70 mm ; Adulto = maiores que 70 mm.

Assume-se a hipótese de que os valores das temperaturas máximas e a oscilação na umidade relativa do ar desde a aplicação até a recuperação tenham

influenciado na mortalidade das classes jovem, jovem-adulto e adulto durante esse bioensaio, presentes na Tabela 6.

O comportamento observado após o período de recuperação reforça essa hipótese: nenhuma atividade foi observada após a vaporização. Os moluscos mortos apresentavam a massa cefalopodal enrijecida e muco de consistência líquida, diferente do muco coagulado verificado na aplicação anterior.

Tabela 6 - Mortalidade (%) acumulada obtida até 48 horas da aplicação 2 do látex da *E. splendens* var. *hislopilii* diluído em solução aquosa, vaporizada nas quatro classes de tamanho de *A. fulica*

Tamanho <sup>1</sup>	Concentração (vol/vol)				
	Controle	1%	5%	10%	15%
Filhote	0	100	100	100	100
Jovem	0	20	40	30	50
Jovem adulto	0	10	20	20	10
Adulto	0	0	0	20	30

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

<sup>1</sup>Controle = misto; Filhote= até 10 mm ; Jovem= 10 a 40 mm; Jovem adulto = 40 a 70 mm ; Adulto = maiores que 70 mm.

#### 4.2.3 APLICAÇÃO 3

Diante dos resultados obtidos nos bioensaios anteriores, na aplicação 3 o objetivo também foi observar o comportamento de cada classe de tamanho diante das concentrações utilizadas e a influência da temperatura e umidade relativa do ar, seguindo a mesma metodologia, mas dividindo o bioensaio em quatro aplicações, onde as quatro classes eram submetidas à pulverização de apenas uma concentração por aplicação

Esse procedimento objetivou aferir com maiores detalhes como o caramujo *A. fulica* responde às alterações de temperatura e umidade relativa associada à pulverização do látex.

Aplicação 3-A foi realizada no dia 15 de março de 2010, às 22:30; a temperatura ambiente aferida foi 24°C, temperatura da solução 24°C e umidade relativa do ar 92%. A concentração da solução para essa aplicação foi 1% de látex *in natura* diluído em solução aquosa.

A pulverização foi realizada e o comportamento dos moluscos refletiu o observado nas duas aplicações anteriores.

O grupo controle apresentou atividade compatível com o observado nas aplicações anteriores e ausência de comportamento diferenciado.

Ao término do período de exposição, as caixas foram verificadas, a mortalidade e o comportamento apontados (APÊNDICE C). A mortalidade, assim como o comportamento descritos foram compatíveis com os observados durante a aplicação 2, que ocorreu sob condições muito parecidas de temperatura e umidade relativa do ar.

Na aplicação 3-B utilizando a concentração de 5% de látex, a espécie demonstrou reação sutil diante da variação de temperaturas, observada na mortalidade da classe de tamanho jovem (APÊNDICE D).

A hipótese de influência da variação de temperatura foi reforçada durante as aplicações 3-C e 3-D, onde foi utilizado as concentrações de 10 e 15% de látex, respectivamente. As aplicações foram realizadas sob condições de temperatura e umidade lineares, com pequenas variações que, possivelmente, influenciaram na mortalidade observada conforme ilustrado nas tabelas 7 e 8.

Tabela 7 - Mortalidade (%) obtida até 24 horas da aplicação 3 do látex da *E. splendens* var. *hislopilii* diluído em solução aquosa, vaporizada nas quatro classes de tamanho de *A. fulica*

Tamanho <sup>1</sup>	Concentração (vol/vol)				
	Controle	1%	5%	10%	15%
Filhote	0	70	90	100	100
Jovem	0	30	40	0	0
Jovem adulto	0	0	0	0	0
Adulto	0	0	0	0	0

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

<sup>1</sup>Controle = misto; Filhote= até 10 mm ; Jovem= 10 a 40 mm; Jovem adulto = 40 a 70 mm ; Adulto = maiores que 70 mm.

Tabela 8 - Mortalidade (%) acumulada obtida até 48 horas da aplicação 3 do látex da *E. splendens* var. *hislopilii* diluído em solução aquosa, vaporizada nas quatro classes de tamanho de *A. fulica*

Tamanho <sup>1</sup>	Concentração (vol/vol)				
	Controle	1%	5%	10%	15%
Filhote	0	80	90	100	100
Jovem	0	30	60	30	0
Jovem adulto	0	0	10	20	20
Adulto	0	0	0	10	20

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

<sup>1</sup>Controle = misto; Filhote= até 10 mm ; Jovem= 10 a 40 mm; Jovem adulto = 40 a 70 mm ; Adulto = maiores que 70 mm.

Os moluscos sob efeito do látex ficaram expostos à baixa temperatura, possivelmente acarretando a mortalidade observada nos indivíduos da classe jovem-adulto e adulto.

Durante as aplicações 3-C e 3-D o comportamento do grupo controle demonstrou a influência das baixas temperaturas aferidas durante as aplicações, motivando-os a procurar abrigo, enterrando-se e iniciando a formação de epifragma, comportamento verificado ao término do período de recuperação.

Os resultados do presente estudo demonstram a letalidade do látex da *E. splendens* quando aplicada em filhotes, indivíduos de diminuto tamanho e comportamento diferenciado, de difícil localização nas coletas manuais, salientado por Fischer (2009) e preconizado por Cook (2001).

A incapacidade de formação do epifragma, a perda de fluído corporal e a imobilidade dos indivíduos demonstram que, mesmo quando a concentração do látex é admitida como sub-letal (WHO, 1965; 2006), é capaz de promover alterações morfofisiológicas nas classes de tamanho jovem, jovem-adulto e adulto após 24 horas da aplicação, interferir no comportamento da espécie e prejudicar a reidratação por contato, a formação de epifragma, a capacidade de forrageio, a capacidade de locomoção para alcançar sítios de repouso e estivação, ou seja, atuar diretamente em estratégias-chave de sobrevivência do molusco frente aos fatores bióticos e abióticos.

A nulidade desses mecanismos é refletida na mortalidade observada nos períodos após 24 horas, onde é possível relacionar a resistência da espécie *A. fulica* de acordo com seu estágio de desenvolvimento (COOK, 2001; RAUT; BARKER, 2002; STOREY, 2002; FISCHER, 2009), confrontando com os resultados da ação da solução de acordo com a classe de tamanho e a concentração utilizada ( Tabelas 4, 6 e 8).

A preocupação gerada pela infestação de *A. fulica*, principalmente na zona urbana, amplamente publicada na área de Saúde Pública (TELES et al., 1997; SIMONE, 1999; CARVALHO et al., 2003; BERTO; BOGÉA, 2007; CALDEIRA et al., 2007; SHIFFLER, 2008), sua presença registrada em vários estados e ecossistemas brasileiros (TELES et al., 1997; VASCONCELLOS; PILE, 2001; FISCHER; COLLEY, 2005) e em Unidades de Conservação (IBAMA, 2004; ZILLER, 2004; FISCHER; COLLEY, 2005) elegem fatores consistentes para o presente estudo, dado o risco iminente para a saúde humana e para a manutenção da biodiversidade.

## 5 CONCLUSÃO

O presente estudo foi norteado pela metodologia proposta pela WHO, originalmente redigida para estudos envolvendo substâncias moluscidas de origem vegetal utilizadas no combate a moluscos anfíbios e aquáticos, haja visto a lacuna existente em relação a metodologias para aplicações em gastrópodes terrestres.

O delineamento da metodologia utilizada nesse estudo procurou apoiar cada aspecto descrito da biologia do *A. fulica* na literatura disponível, a fim de excluir ou controlar variáveis potencialmente influentes nos resultados obtidos, tais como contato com a solução após a aplicação e estresse oriundo do número de indivíduos por caixa.

A separação dos moluscos em quatro classes de tamanho, preconizado por Craze e Mauremootoo (2002) possibilitou a observação dos resultados obtidos durante os bioensaios, determinando o caráter diferencial do presente estudo ao relacionar aspectos biológicos e comportamentais com o estágio de desenvolvimento da espécie (COOK, 2001; RAUT; BARKER, 2002; FISCHER, 2009)

Estudos envolvendo o *Achatina fulica* e o látex da *E. splendens* var. *hislopilii* (SZABÓ; VASCONCELLOS, 2004; OLIVEIRA, 2007) apresentam a média de mortalidade aferida até 48 horas maior do que a constatada até 24 horas, além das concentrações utilizadas apresentarem valores muito acima do estabelecido, descaracterizando a atual metodologia e protocolos da WHO, que admite como concentração letal aquela capaz de matar 90% dos moluscos em até 24 horas após a aplicação, com limite de concentração de 20 mg/L de látex.

Definições para concentração letal, sub-letal, período de exposição e recuperação, assim como outros parâmetros certamente merecem ser discutidos quando o objeto de estudo tratar-se de um gastrópode terrestre.

Assim, após definição de nova metodologia, futuros estudos são necessários para amparar a utilização segura do látex da *E. splendens* em campo, bem como possíveis riscos à população e à fauna local se aplicada na área urbana ou em ambientes legalmente protegidos, como Unidades de Conservação.

## REFERÊNCIAS

ARAÚJO, S.; PILE, E. A. M.; SÃO LUIZ, J. B.; SANTOS, J. A. A.; VASCONCELLOS, M. C. Alterações histológicas em *Lymnaea columella* provocadas pelo látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopilii*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 157-159, 2002.

BAPTISTA, D. F. et al. Vegetative development and seed germination of *Euphorbia splendens* var. *hislopilii* – a biomoluscicidal species. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 40, p. 435-441, 1997.

BAURU. Decreto Municipal nº 10987. **Diário Oficial de Bauru**, SP, n. 1690, p. 2-3, 16 jul. 2009.

BAURU. Resolução da Secretaria do Meio Ambiente nº 08/2007. Plano de ação caramujo gigante africano. **Diário Oficial de Bauru**, SP, n. 1449, p. 10-11, 22 nov. 2007.

BERTO, B.; BOGÉA, T. Ocorrência de nematode larvae in *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Gastropoda: Achatinidae) snails in Vargem Pequena, Rio de Janeiro, Brazil. **Revista de Patologia Tropical**, vol. 36, n. 2, p. 171-177, maio-ago, 2007.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Comissão Nacional de Biodiversidade: CONABIO 05 anos**. Brasília: MMA, 2008. (Série Biodiversidade, n. 32).

BRASIL. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis - IBAMA. **Plano de ação caramujo gigante africano**. Brasília, DF, 2004. Disponível em: <[www.ibama.gov.br/sp/download.php?id\\_download=229](http://www.ibama.gov.br/sp/download.php?id_download=229)>. Acesso em: 20 ago. 2008.

BRASIL. Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 31, seção 1, p. 1, 1998.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instrução Normativa nº 73, de 18 de Agosto de 2005. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 161, seção 1, anexo 11, p. 163. 2005.

CALDEIRA, R. L. et al. First record of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda: Metastrongylidae) in Brazil.

**Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, short communication, v. 102, n. 7, nov. 2007.

CARVALHO, O. S. et al. Potentiality of *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca: Gastropoda) as intermediate host of the *Angiostrongylus costaricensis*, Morera & Céspedes 1971. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vl. 36, n. 6, p. 743-745, nov./dez. 2003.

CAVAGUTI, N. **Erosões Lineares e solos urbanos: Estudos, caracterização e análise da degradação do meio físico em Bauru, SP**. 1994. 548 f. Dissertação (Tese de Livre Docência) – Universidade do Estado de São Paulo, Faculdade de Engenharia e Tecnologia, Bauru, São Paulo.

COLLEY, E.; FISCHER, M. L. Avaliação dos problemas enfrentados no manejo do caramujo gigante africano *Achatina fulica* (Gastropoda: Pulmonata) no Brasil. **Zoologia**, v. 26, n. 4, p. 674-683, dez. 2009.

COOK, A. Behavioural ecology: on doing the right thing, in the right place at the right time. In: BARKER, G. M. (Ed.). **The biology of terrestrial molluscs**. Wallingford: CAB International, 2001. p. 447-487.

CRAZE, P. G.; MAUREMOOTO, J. R. A test of methods for estimating population size of the invasive land snail *Achatina fulica* in dense vegetation. **Journal of Applied Ecology**, v. 39, p. 653-660, 2002.

D'ÁVILA, S. et al. Resistência à dessecação em três espécies de moluscos terrestres: aspectos adaptativos e significado para o controle de helmintos. **Revista Brasileira de Zoociências**, Juiz de Fora, v. 6, n. 1, p. 103-114, jul. 2004.

FISCHER, M. L. Reações da espécie invasora *Achatina fulica* (Mollusca: Achatinidae) à fatores abióticos: perspectivas para o manejo. **Zoologia (Curitiba, Impr.)**, Curitiba, v. 26, n. 3, set. 2009. Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1984-46702009000300001&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-46702009000300001&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em: 28 jan. 2010.

FISCHER, M. L.; COLLEY, E. Espécie invasora em reservas naturais: caracterização da população de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca-Achatinidae) na Ilha Rasa, Guaraqueçaba, Paraná, Brasil. **Biota Neotropica**, São Paulo, v. 5, n. 1, p. 127-144, 2005. Disponível em: <<http://biotaneotropica.org.br/v5n1/pt/abstract?article+BN03305012005>>. Acesso em: 15 jul. 2008.

FREITAS, J. C. B. R. et al. Toxicological study of the molluscicidal latex of *Euphorbia splendens*: irritant action on skin and eye. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 86, suppl. 2, p. 87-88, 1991.

GIOVANELLI, A. et al. The molluscicidal activity of the latex of *Euphorbia splendens* var. *hislopilii* on *Melanoides tuberculata* (Thiaridae), a snail associated with habitats of *Biomphalaria glabrata* (Planorbidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 1, p. 123-125, jan. 2001.

INVASIVE SPECIES SPECIALIST GROUP - ISSG. **Global Invasive Species Database**. Auckland, New Zealand, 2004. Disponível em: <<http://www.issg.org/database/species/ecology.asp?si=64&fr=1&sts=sss&lang=EM>>. Acesso em: 22 ago. 2008.

JURBERG, P. ; VASCONCELLOS, M. C.; MENDES, N. M. Plantas empregadas como moluscicidas: uma visão crítica. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 84, suppl. 1, p. 76-83, out. 1989.

KLOSS, H.; McCULLOUGH, F. S. Plant molluscicides. **Planta medica**, v. 46, p. 195-209, 1982.

LOWE, S. et al. M. 100 of the World's Worst Invasive Alien Species: a selection from the Global Invasive Species Database. **The Invasive Species Specialist Group (ISSG)**, Auckland, New Zealand, 2000. 12p. Disponível em: <<http://www.issg.org/booklet.pdf>>. Acesso em: 22 ago. 2008.

LUGT, C. B. Feasibility of growth and production of molluscicidal plants. In: \_\_\_\_\_. MOTT, K. E. (Ed.). **Plant molluscicides**. New York: UNDP/WORLD BANK/WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1987. p. 231-244.

MACGEOCH, M. A.; CHOWN, S. L.; KALWIJ, J. M. A global indicator for biological invasion. **Conservation Biology**, v. 20, n. 6, p. 1635-1646, dez. 2006.

MALEK, E. **Snails hosts of schistosomiasis and other snail-transmitted diseases in tropical America: a manual**. Washington (DC): Pan American Health Organization, 1985. 478 p.

MELLO-SILVA, C. C. et al. Physiological changes in *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Pulmonata: Planorbidae) caused by sub-lethal concentrations of the latex of

*Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B (Euphorbiaceae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n.1, p. 3-8, fev. 2006.

MENDES, M. N. et al. Evaluation of the molluscicidal properties of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (N.E.B.) latex: experimental test in a endemic area in the State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 92, n. 5, p. 719-724, set./out. 1997.

NEVES, M. P. et al. **Viabilidade da destinação do caramujo gigante africano (*Achatina fulica*) em aterros sanitários: estudo de caso no município de Bauru, SP.** [S.l.: s.n.].

OLIVEIRA, C. S. **Alterações nos depósitos de glicogênio e conteúdo de glicose na hemolinfa de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca: Gastropoda), hospedeiro intermediário de *Angyostrongylus*, exposta ao látex de coroa de Cristo *Euphorbia splendens* var. *hislopii*.** 16 fev. 2007. 46 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia animal) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Veterinária, Seropédica, Rio de Janeiro.

OLIVEIRA-FILHO, E. C.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Photodegradation of the molluscicidal latex of “crown of thorns” (*Euphorbia milii* var. *hislopii*). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 92, n. 5, p. 657-659, set./out. 1997.

PILE, E. et al. Fasciolose bovina: controle com látex da “coroa de Cristo” (*Euphorbia splendens* var. *hislopii*), **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 38, n. 6, p. 288-289, 2001.

RAUH, W. Madagascan euphorbias: life & growth forms. **Euphorbia Journal**, n. 3, p. 19-45, 1983.

RAUT, S. K.; BARKER, G. M. *Achatina fulica* Bowdich and other Achatinidae as pests in tropical agriculture, p. 55-114. In: G.M. BARKER (Ed.). **Molluscs as Crop Pests**. New Zealand: Ed. CAB Publishing, 2002. 576p.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva**. 4. ed. São Paulo: Roca, 2005.

SCHIFFLER, C. L. et al. *Achatina fulica*, Bowdich (1822) um novo hospedeiro de espécies de *Cryptosporidium* (Apicomplexa, Cryptosporidiidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, Supl. 1, 273-276, 2008.

SCHALL, V. T. et al. Evaluation of temporal, seasonal and geographics stability of the molluscicidal property of *Euphorbia splendens* latex. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 183-191, maio/jun. 1992.

SECRETARIADO DA CONVENÇÃO SOBRE DIVERSIDADE BIOLÓGICA (2006) **Panorama da Biodiversidade Global 2**. Montreal: [s.n.], 2006. p. 34-37.

SIMONE, L. R. L. Mollusca terrestres. In:\_\_\_\_\_. **Gastropoda terrestres**. São Paulo: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 1999. p. 1-5. Disponível em: <<http://www.biota.org.br/pdf/v5cap01.pdf>>. Acesso em: 30 set. 2008.

SOUZA, C. A. M. et al. Study of the embryofeto-toxicity of Crown-of-Thorns (*Euphorbia milii*) latex, a natural molluscicide, **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 30, p. 1325-1332, 1997.

STOREY, K. B. Life in slow lane: molecular mechanisms of estivation. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 133, Part A, p. 733-754, 2002.

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

SZABÓ, R. B.; VASCONCELLOS, M. C. Estudo da biologia e avaliação da ação do látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (coroa-de-Cristo), sobre o molusco terrestre *Achatina fulica*, hospedeiro intermediário de *Angiostrongylus cantonensis*. In: JORNADA DE VOCAÇÃO CIENTÍFICA - AVANÇADO, 9., 2004, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2004. p. 16-16.

TELES, H. M. S. et al. Registro de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca,Gastropoda) no Brasil: caramujo hospedeiro intermediário de Angiostrongilíase. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 310–312, 1997. Disponível em: <<http://www.scielosp.org/pdf/rsp/v31n3/2294.pdf>>. Acesso em: 21 jun. 2008.

VASCONCELLOS, M. C.; AMORIM, A. Molluscicidal action of the latex of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B.(“Christ's Crown”) (Euphorbiaceae) against *Lymnaea columella* (Say, 1817) (Pulmonata: Lymnaeidae), intermediate host of *Fasciola hepatica*, Linnaeus, 1758 (Trematode: Fasciolidae). 1- Test in laboratory. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 4, p. 557-563, jun. 2003.

\_\_\_\_\_. Activity of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B. ("Christ's Crown") (Euphorbiaceae) latex against *Lymnaea columella* (Say, 1817) (Pulmonata: Lymnaeidae), intermediate host of *Fasciola hepatica*, Linnaeus, 1758 (Trematode: Fasciolidae). 2: Limited field testing. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 7, p. 981-985, out. 2003.

VASCONCELLOS, M. C.; PILE, E. Ocorrência de *Achatina fulica* no Vale do Paraíba, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 35, n. 6, p. 582-584, 2001. Disponível em: <[http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-89102001000600013&lng=pt&nrm=isso](http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102001000600013&lng=pt&nrm=isso)>. Acesso em: 9 set. 2008.

VASCONCELLOS, M. C. et al. Molluscicidal activity of crown of Christ (*Euphorbia splendens* var. *hislopii*) (Euphorbiaceae) latex submitted to pH variation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, n. 3, p. 415-420, jun. 2003.

VASCONCELLOS, M. C.; SCHALL, V. T. Latex of coroa de Cristo (*Euphorbia splendens*): an effective molluscicide. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 81, n. 4, p. 475-476, out./dez. 1986.

VASCONCELLOS, M. C.; SZABÓ, R. B. Caramujo gigante africano: um caso de saúde pública. **Revista Vetores & Pragas**, ed. 14, p. 20-23, set. 2004.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. Molluscicide screening and evaluation. **Boletim WHO**, Gênova, v. 33, p. 567-581, 1965.

\_\_\_\_\_. **Pesticides and their application for the control of vectors and pests of public health importance**. 6. ed. [S.l.]: WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDPP, 2006.

ZILLER, S. R. Espécies exóticas e invasoras em Unidades de Conservação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE UNIDADES DE CONSERVAÇÃO, 4., 2004, Curitiba. **Anais...** Curitiba: Fundação O Boticário de Proteção da Natureza. 2004, v. 2. p. 74-77.

## APÊNDICE A – Protocolo de bioensaio da aplicação 1

### Período de Exposição – Aplicação 1

**Responsável:** Dra. Rosângela Ap. M. Martinez; Hudson Moggioni Munhoz

**Data do início/aplicação:** 22/02/2010

**Horário da observação:** 22:00

**Umidade Relativa do Ar:** 83%

**Temperatura máxima:** 30°C

**Substância testada:** Látex de *E. splendens* var. *hislopii*

**Espécie testada:** *Achatina fulica*

**Amostra por caixa:** 10 moluscos

**Data da observação:** 23/02/2010

**Alimentação:** s/ alimentação

**Temperatura ambiente:** 22°C

**Temperatura mínima:** 22°C

**Método de aplicação:** Vaporização

**Amostra total:** 200 moluscos

<b>FILHOTES (até 10mm)</b>					
<b>CONCENTRAÇÕES (vol/vol)</b>					
<b>COMPORTAMENTO</b>	Controle	1%	5%	10%	15%
Morte	Não	7	10	9	10
Dispersão	Sim	Não	Não	Não	Não
Estivação	Não	Não	Não	Não	Não
Epifragma	Não	Não	Não	Não	Não
Oviposição	Não	Não	Não	Não	Não
Forrageio	Sim	Não	Não	Não	Não

<b>JOVENS (DE 10 a 40mm)</b>					
<b>CONCENTRAÇÕES (vol/vol)</b>					
<b>COMPORTAMENTO</b>	Controle	1%	5%	10%	15%
Morte	Não	0	3	0	0
Dispersão	Sim	Não	Não	Não	Não
Estivação	Não	Não	Não	Não	Não
Epifragma	Não	Não	Não	Não	Não
Oviposição	Não	Não	Não	Não	Não
Forrageio	Sim	Não	Não	Não	Não

<b>JOVENS-ADULTOS (DE 40 a 70mm)</b>					
<b>CONCENTRAÇÕES (vol/vol)</b>					
<b>COMPORTAMENTO</b>	Controle	1%	5%	10%	15%
Morte	Não	0	0	0	0
Dispersão	Sim	Não	Não	Não	Não
Estivação	Não	Não	Não	Não	Não
Epifragma	Não	Não	Não	Não	Não
Oviposição	Não	Não	Não	Não	Não
Forrageio	Sim	Não	Não	Não	Não

<b>ADULTOS (acima 70mm)</b>					
<b>CONCENTRAÇÕES (vol/vol)</b>					
<b>COMPORTAMENTO</b>	Controle	1%	5%	10%	15%
Morte	Não	0	0	0	0
Dispersão	Sim	Não	Não	Não	Não
Estivação	Não	Não	Não	Não	Não
Epifragma	Não	Não	Não	Não	Não
Oviposição	Não	Não	Não	Não	Não
Forrageio	Sim	Não	Não	Não	Não

Período de Recuperação – Aplicação 1

**Responsável:** Dra. Rosângela Ap. M. Martinez; Hudson Moggioni Munhoz

**Data de início/aplicação:** 22/02/2010

**Horário da observação:** 22:00

**Umidade Relativa do Ar:** 92%

**Temperatura máxima:** 33°C

**Substância testada:** Látex de *E. splendens* var. *hislopii*

**Espécie testada:** *Achatina fulica*

**Amostra por caixa:** 10 moluscos

**Data da observação:** 24/02/2010

**Alimentação:** Alface fresca *ad libitum*

**Temperatura ambiente:** 24°C

**Temperatura mínima:** 22°C

**Método de aplicação:** Vaporização

**Amostra total:** 200 moluscos

<b>FILHOTES (até 10mm)</b>					
<b>CONCENTRAÇÕES (vol/vol)</b>					
<b>COMPORTAMENTO</b>	Controle	1%	5%	10%	15%
Morte <sup>1</sup>	Não	9	10	10	10
Dispersão	Sim	Não	Não	Não	Não
Estivação	Não	Não	Não	Não	Não
Epifragma	Não	Não	Não	Não	Não
Oviposição	Não	Não	Não	Não	Não
Forrageio	Sim	Não	Não	Não	Não

<b>JOVENS (de 10 a 40mm)</b>					
<b>CONCENTRAÇÕES (vol/vol)</b>					
<b>COMPORTAMENTO</b>	Controle	1%	5%	10%	15%
Morte <sup>1</sup>	Não	0	3	1	4
Dispersão	Sim	Não	Não	Não	Não
Estivação	Não	Não	Não	Não	Não
Epifragma	Não	Não	Não	Não	Não
Oviposição	Não	Não	Não	Não	Não
Forrageio	Sim	Não	Não	Não	Não

<b>JOVENS-ADULTOS (de 40 a 70mm)</b>					
<b>CONCENTRAÇÕES (vol/vol)</b>					
<b>COMPORTAMENTO</b>	Controle	1%	5%	10%	15%
Morte <sup>1</sup>	Não	1	1	2	0
Dispersão	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Estivação	Não	Não	Não	Não	Não
Epifragma	Não	Não	Não	Não	Não
Oviposição	Não	Não	Não	Não	Não
Forrageio	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim

<b>ADULTOS (acima 70mm)</b>					
<b>CONCENTRAÇÕES (vol/vol)</b>					
<b>COMPORTAMENTO</b>	Controle	1%	5%	10%	15%
Morte <sup>1</sup>	Não	0	0	1	2
Dispersão	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Estivação	Não	Não	Não	Não	Não
Epifragma	Não	Não	Não	Não	Não
Oviposição	Não	Sim	Não	Não	Não
Forrageio	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim

<sup>1</sup>Morte=exposição+recuperação.

## APÊNDICE B - Protocolo de bioensaio da aplicação 2

Período de Exposição – Aplicação 2**Responsável:** Dra. Rosângela Ap. M. Martinez; Hudson Moggioni Munhoz**Data do início/aplicação:** 01/03/2010**Data da observação:** 02/03/2010**Horário da observação:** 22:00**Alimentação:** não oferecida**Umidade Relativa do Ar:** 77%**Temperatura ambiente:** 24°C**Temperatura máxima:** 36°C**Temperatura mínima:** 24°C**Substância testada:** Látex de *E. splendens* var. *hislopil***Espécie testada:** *Achatina fulica***Método de aplicação:** Vaporização**Amostra por caixa:** 10 moluscos**Amostra total:** 200 moluscos

<b>FILHOTES (até 10mm)</b>					
<b>CONCENTRAÇÕES (vol/vol)</b>					
<b>COMPORTAMENTO</b>	Controle	1%	5%	10%	15%
Morte	Não	9	10	9	10
Dispersão	Sim	Não	Não	Não	Não
Estivação	Não	Não	Não	Não	Não
Epifragma	Não	Não	Não	Não	Não
Oviposição	Não	Não	Não	Não	Não
Forrageio	Sim	Não	Não	Não	Não

<b>JOVENS (de 10 a 40mm)</b>					
<b>CONCENTRAÇÕES (vol/vol)</b>					
<b>COMPORTAMENTO</b>	Controle	1%	5%	10%	15%
Morte	Não	2	1	0	2
Dispersão	Sim	Não	Não	Não	Não
Estivação	Não	Não	Não	Não	Não
Epifragma	Não	Não	Não	Não	Não
Oviposição	Não	Não	Não	Não	Não
Forrageio	Sim	Não	Não	Não	Não

<b>JOVENS-ADULTOS (de 40 a 70mm)</b>					
<b>CONCENTRAÇÕES (vol/vol)</b>					
<b>COMPORTAMENTO</b>	Controle	1%	5%	10%	15%
Morte	Não	0	0	0	0
Dispersão	Sim	Não	Não	Não	Não
Estivação	Não	Não	Não	Não	Não
Epifragma	Não	Não	Não	Não	Não
Oviposição	Não	Não	Não	Não	Não
Forrageio	Sim				

<b>ADULTOS (acima 70mm)</b>					
<b>CONCENTRAÇÕES (vol/vol)</b>					
<b>COMPORTAMENTO</b>	Controle	1%	5%	10%	15%
Morte	Não	0	0	0	0
Dispersão	Sim	Não	Não	Não	Não
Estivação	Não	Não	Não	Não	Não
Epifragma	Não	Não	Não	Não	Não
Oviposição	Não	Não	Não	Não	Não
Forrageio	Sim	Não	Não	Não	Não

## Período de Recuperação – Aplicação 2

**Responsável:** Dra. Rosângela Ap. M. Martinez; Hudson Moggioni Munhoz

**Data do início/aplicação:** 01/03/2010

**Horário da observação:** 22:00

**Umidade Relativa do Ar:** 83%

**Temperatura máxima:** 36°C

**Substância testada:** Látex de *E. splendens* var. *hislopii*

**Espécie testada:** *Achatina fulica*

**Amostra por caixa:** 10 moluscos

**Data da observação:** 03/03/2010

**Alimentação:** Alface fresca *ad libitum*

**Temperatura ambiente:** 22°C

**Temperatura mínima:** 21°C

**Método de aplicação:** Vaporização

**Amostra total:** 200 moluscos

<b>FILHOTES (até 10mm)</b>					
<b>CONCENTRAÇÕES (vol/vol)</b>					
<b>COMPORTAMENTO</b>	Controle	1%	5%	10%	15%
Morte <sup>1</sup>	Não	10	10	10	10
Dispersão	Sim	Não	Não	Não	Não
Estivação	Não	Não	Não	Não	Não
Epifragma	Não	Não	Não	Não	Não
Oviposição	Não	Não	Não	Não	Não
Forrageio	Sim	Não	Não	Não	Não

<b>JOVENS (de 10 a 40mm)</b>					
<b>CONCENTRAÇÕES (vol/vol)</b>					
<b>COMPORTAMENTO</b>	Controle	1%	5%	10%	15%
Morte <sup>1</sup>	Não	2	4	3	5
Dispersão	Sim	Não	Não	Não	Não
Estivação	Não	Não	Não	Não	Não
Epifragma	Não	Não	Não	Não	Não
Oviposição	Não	Não	Não	Não	Não
Forrageio	Sim	Não	Não	Não	Não

<b>JOVENS-ADULTOS (de 40 a 70mm)</b>					
<b>CONCENTRAÇÕES (vol/vol)</b>					
<b>COMPORTAMENTO</b>	Controle	1%	5%	10%	15%
Morte <sup>1</sup>	Não	1	2	2	1
Dispersão	Sim	Sim	Sim	Não	Não
Estivação	Não	Não	Não	Não	Não
Epifragma	Não	Não	Não	Não	Não
Oviposição	Não	Não	Não	Não	Não
Forrageio	Sim	Não	Não	Não	Não

<b>ADULTOS (acima 70mm)</b>					
<b>CONCENTRAÇÕES (vol/vol)</b>					
<b>COMPORTAMENTO</b>	Controle	1%	5%	10%	15%
Morte <sup>1</sup>	Não	0	0	2	3
Dispersão	Sim	Sim	Sim	Não	Não
Estivação	Não	Não	Não	Não	Não
Epifragma	Não	Não	Não	Não	Não
Oviposição	Não	Não	Não	Não	Não
Forrageio	Sim	Não	Não	Não	Não

<sup>1</sup>Morte=exposição+recuperação.

## APÊNDICE C – Protocolo dos bioensaios da aplicação 3-A, B, C e D

### Aplicação 3-A – Concentração da solução: 1%

#### Período de exposição

**Responsável:** Dra. Rosângela Ap. M. Martinez; Hudson Moggioni Munhoz

**Data do início/aplicação:** 15/03/2010

**Horário da observação:** 22:30

**Umidade Relativa do Ar:** 77%

**Temperatura máxima:** 36°C

**Substância testada:** Látex de *E. splendens* var. *hislopii*

**Espécie testada:** *Achatina fulica*

**Amostra por caixa:** 10 moluscos

**Data da observação:** 16/03/2010

**Alimentação:** s/ alimentação

**Temperatura ambiente:** 24°C

**Temperatura mínima:** 24°C

**Método de aplicação:** Vaporização

**Amostra total:** 50 moluscos

<b>CONCENTRAÇÃO: 1%</b>					
<b>COMPORTAMENTO</b>	<b>CONTROLE</b>	<b>FILHOTE</b>	<b>JOVEM</b>	<b>J. ADULTO</b>	<b>ADULTO</b>
Morte	0	7	3	0	0
Dispersão	Sim	Não	Não	Não	Não
Estivação	Não	Não	Não	Não	Não
Epifragma	Não	Não	Não	Não	Não
Oviposição	Não	Não	Não	Não	Não
FORAGEIO	Sim	Não	Não	Não	Não

#### Período de recuperação

**Data do início/aplicação:** 15/03/2010

**Horário da observação:** 22:30

**Umidade Relativa do Ar:** 83%

**Temperatura máxima:** 36°C

**Substância testada:** Látex de *E. splendens* var. *hislopii*

**Espécie testada:** *Achatina fulica*

**Amostra por caixa:** 10 moluscos

**Data da observação:** 17/03/2010

**Alimentação:** Alface fresca *ad libitum*

**Temperatura ambiente:** 22°C

**Temperatura mínima:** 22°C

**Método de aplicação:** Vaporização

**Amostra total:** 50 moluscos

<b>CONCENTRAÇÃO: 1%</b>					
<b>COMPORTAMENTO</b>	<b>CONTROLE</b>	<b>FILHOTE</b>	<b>JOVEM</b>	<b>J. ADULTO</b>	<b>ADULTO</b>
Morte <sup>1</sup>	0	8	3	0	0
Dispersão	Sim	Não	Não	Sim	Sim
Estivação	Não	Não	Não	Não	Não
Epifragma	Não	Não	Não	Não	Não
Oviposição	Não	Não	Não	Não	Não
FORAGEIO	Sim	Não	Não	Não	Não

<sup>1</sup>Morte=exposição+recuperação

Aplicação 3-B – Concentração da solução: 5%Período de exposição

**Data do início/aplicação:** 27/04/2010  
**Horário da observação:** 23:00  
**Umidade Relativa do Ar:** 83%  
**Temperatura máxima:** 32°C  
**Substância testada:** Látex de *E. splendens* var. *hislopii*  
**Espécie testada:** *Achatina fulica*  
**Amostra por caixa:** 10 moluscos

**Data da observação:** 28/04/2010  
**Alimentação:** s/ alimentação  
**Temperatura ambiente:** 20°C  
**Temperatura mínima:** 23°C

**Método de aplicação:** Vaporização  
**Amostra total:** 50 moluscos

<b>CONCENTRAÇÃO: 5%</b>					
<b>COMPORTAMENTO</b>	<b>CONTROLE</b>	<b>FILHOTE</b>	<b>JOVEM</b>	<b>J. ADULTO</b>	<b>ADULTO</b>
Morte	0	9	4	0	0
Dispersão	Sim	Não	Não	Não	Não
Estivação	Não	Não	Não	Não	Não
Epifragma	Não	Não	Não	Não	Não
Oviposição	Não	Não	Não	Não	Não
Forrageio	Sim	Não	Não	Não	Não

Período de recuperação

**Data do início/aplicação:** 27/04/2010  
**Horário da observação:** 23:00  
**Umidade Relativa do Ar:** 91%  
**Temperatura máxima:** 27°C  
**Substância testada:** Látex de *E. splendens* var. *hislopii*  
**Espécie testada:** *Achatina fulica*  
**Amostra por caixa:** 10 moluscos

**Data da observação:** 29/04/2010  
**Alimentação:** Alface fresca *ad libitum*  
**Temperatura ambiente:** 20°C  
**Temperatura mínima:** 19°C

**Método de aplicação:** Vaporização  
**Amostra total:** 50 moluscos

<b>CONCENTRAÇÃO: 5%</b>					
<b>COMPORTAMENTO</b>	<b>CONTROLE</b>	<b>FILHOTE</b>	<b>JOVEM</b>	<b>J. ADULTO</b>	<b>ADULTO</b>
Morte <sup>1</sup>	0	9	6	1	0
Dispersão	Sim	Não	Não	Sim	Sim
Estivação	Não	Não	Não	Não	Não
Epifragma	Não	Não	Não	Não	Não
Oviposição	Não	Não	Não	Não	Não
Forrageio	Sim	Não	Não	Não	Não

<sup>1</sup>Morte=exposição+recuperação

Aplicação 3-C – Concentração da solução: 10%Período de exposição

**Data do início/aplicação:** 09/05/2010  
**Horário da observação:** 23:15  
**Umidade Relativa do Ar:** 90%  
**Temperatura máxima:** 20°C  
**Substância testada:** Látex de *E. splendens* var. *hislopii*  
**Espécie testada:** *Achatina fulica*  
**Amostra por caixa:** 10 moluscos

**Data da observação:** 10/05/2010  
**Alimentação:** s/ alimentação  
**Temperatura ambiente:** 17°C  
**Temperatura mínima:** 16°C

**Método de aplicação:** Vaporização  
**Amostra total:** 50 moluscos

<b>CONCENTRAÇÃO: 10%</b>					
<b>COMPORTAMENTO</b>	<b>CONTROLE</b>	<b>FILHOTE</b>	<b>JOVEM</b>	<b>J. ADULTO</b>	<b>ADULTO</b>
Morte	0	10	0	0	0
Dispersão	Sim	Não	Não	Não	Não
Estivação	Sim	Não	Não	Não	Não
Epifragma	Não	Não	Não	Não	Não
Oviposição	Não	Não	Não	Não	Não
Forrageio	Sim	Não	Não	Não	Não

Período de recuperação

**Data do início/aplicação:** 09/05/2010  
**Horário da observação:** 23:00  
**Umidade Relativa do Ar:** 81%  
**Temperatura máxima:** 20°C  
**Substância testada:** Látex de *E. splendens* var. *hislopii*  
**Espécie testada:** *Achatina fulica*  
**Amostra por caixa:** 10 moluscos

**Data da observação:** 11/05/2010  
**Alimentação:** Alface fresca *ad libitum*  
**Temperatura ambiente:** 16°C  
**Temperatura mínima:** 15°C

**Método de aplicação:** Vaporização  
**Amostra total:** 50 moluscos

<b>CONCENTRAÇÃO: 10%</b>					
<b>COMPORTAMENTO</b>	<b>CONTROLE</b>	<b>FILHOTE</b>	<b>JOVEM</b>	<b>J. ADULTO</b>	<b>ADULTO</b>
Morte <sup>1</sup>	0	10	3	2	1
Dispersão	Não	Não	Sim	Sim	Sim
Estivação	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
Epifragma	Sim	Não	Não	Não	Não
Oviposição	Não	Não	Não	Não	Não
Forrageio	Não	Não	Não	Não	Não

<sup>1</sup>Morte=exposição+recuperação

Aplicação 3-D- Concentração da solução: 15%Período de exposição

**Data do início/aplicação:** 15/05/2010  
**Horário da observação:** 22:00  
**Umidade Relativa do Ar:** 82%  
**Temperatura máxima:** 24°C  
**Substância testada:** Látex de *E. splendens* var. *hislopii*  
**Espécie testada:** *Achatina fulica*  
**Amostra por caixa:** 10 moluscos

**Data da observação:** 16/05/2010  
**Alimentação:** s/ alimentação  
**Temperatura ambiente:** 20°C  
**Temperatura mínima:** 16°C

**Método de aplicação:** Vaporização  
**Amostra total:** 50 moluscos

<b>CONCENTRAÇÃO: 15%</b>					
<b>COMPORTAMENTO</b>	<b>CONTROLE</b>	<b>FILHOTE</b>	<b>JOVEM</b>	<b>J. ADULTO</b>	<b>ADULTO</b>
Morte	0	10	0	0	0
Dispersão	Sim	Não	Não	Não	Não
Estivação	Não	Não	Não	Não	Não
Epifragma	Sim	Não	Não	Não	Não
Oviposição	Não	Não	Não	Não	Não
Forrageio	Não	Não	Não	Não	Não

Período de recuperação

**Data do início/aplicação:** 15/05/2010  
**Horário da observação:** 22:30  
**Umidade Relativa do Ar:** 91%  
**Temperatura máxima:** 23°C  
**Substância testada:** Látex de *E. splendens* var. *hislopii*  
**Espécie testada:** *Achatina fulica*  
**Amostra por caixa:** 10 moluscos

**Data da observação:** 17/05/2010  
**Alimentação:** Alface fresca *ad libitum*  
**Temperatura ambiente:** 20°C  
**Temperatura mínima:** 19°C

**Método de aplicação:** Vaporização  
**Amostra total:** 50 moluscos

<b>CONCENTRAÇÃO: 15%</b>					
<b>COMPORTAMENTO</b>	<b>CONTROLE</b>	<b>FILHOTE</b>	<b>JOVEM</b>	<b>J. ADULTO</b>	<b>ADULTO</b>
Morte <sup>1</sup>	0	10	0	2	2
Dispersão	Não	Não	Não	Não	Não
Estivação	Sim	Não	Não	Não	Não
Epifragma	Sim	Não	Não	Não	Não
Oviposição	Não	Não	Não	Não	Não
Forrageio	Não	Não	Não	Não	Não

<sup>1</sup>Morte=exposição+recuperação