

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**DESENVOLVIMENTO DE UM PRODUTO MOLUSCICIDA DO LÁTEX
EXTRAÍDO DE *Euphorbia milii* var. *hislopii* PARA APLICAÇÃO NO CONTROLE
DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI**

por

Cynthia de Paula Andrade

Belo Horizonte

Agosto/2019

TESE

DCS – IRR C. P. ANDRADE

2019

Cynthia de Paula Andrade

**DESENVOLVIMENTO DE UM PRODUTO MOLUSCICIDA DO LÁTEX
EXTRAÍDO DE *Euphorbia splendens* var. *hislopii* PARA APLICAÇÃO NO
CONTROLE DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, do Instituto René Rachou, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciência.

Área de concentração: Doenças Infecto-parasitárias e crônicas não transmissíveis - DIP/DCNT

Orientadores: Dr^a Virgínia Torres Schall (*in memoriam*)
Dr Paulo Marcos Zech Coelho

Coorientadores: Dr Edward Oliveira
Dr^a Denise Nacif Pimenta

Belo Horizonte
Agosto/2019

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do IRR
CRB/6 1975

A553d Paula-Andrade, Cynthia.
2019

Desenvolvimento de um produto moluscicida do látex extraído de *Euphorbia milii* var. *hislopii* para aplicação no controle da esquistossomose mansoni / Cynthia de Paula Andrade. – Belo Horizonte, 2019.

XIX, 92 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 70 - 81

Tese – Tese para obtenção do título de Doutor(a) em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Doenças infecto-parasitárias e crônicas não transmissíveis/ DIP- DCNT

1. Biomphalaria 2. Esquistossomose mansoni/prevenção e controle 3. *Euphorbia milii*/efeitos da radiação 4. Moluscicida I. Título. II. Coelho, Paulo Marcos Zech (Orientação). III. Oliveira, Edward (Coorientação) IV. Pimenta, Denise Nacif (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.963

Cynthia de Paula Andrade

**DESENVOLVIMENTO DE UM PRODUTO MOLUSCICIDA DO LÁTEX
EXTRAÍDO DE *Euphorbia splendens* var. *hislopii* PARA APLICAÇÃO NO
CONTROLE DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, do Instituto René Rachou, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciência.

Área de concentração: Doenças Infecto-parasitárias e crônicas não transmissíveis - DIP/DCNT

Banca Examinadora:

Dr Paulo Marcos Zech Coelho – Instituto René Rachou – Fiocruz Minas (Presidente)

Dr Naftale Katz – Instituto René Rachou – Fiocruz Minas (Titular)

Dra Roberta Lima Caldeira – Instituto René Rachou – Fiocruz Minas (Titular)

Dra Débora Aparecida Negrão-Corrêa – Universidade Federal de Minas Gerais (Titular)

Dra Florence Mara Rosa – Universidade Federal de Juiz de Fora (Titular)

Dra Cristiane Lafetá de Mendonça – Instituto René Rachou – Fiocruz Minas (Suplente)

Tese defendida e aprovada em Belo Horizonte, 26/08/2019

Dedico esse trabalho à professora Virgínia Torres Schall (*in memoriam*), idealizadora do trabalho e que me permitiu fazer parte deste sonho.

Dedico à minha família que sempre esteve ao meu lado me ajudando a trilhar o meu caminho.

"Queria saber mais sobre as pessoas que transformavam o mundo, que estão presentes em cada minuto do nosso cotidiano, desde o momento em que nos levantamos e acendemos uma luz até quando temos a vida ameaçada e a ciência nos ampara."

Virgínia Torres Schall

Contos de Fatos: histórias de Manguinhos

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, **Neli** e **Cláudio** e a minha irmã **Claudinha** (para mim Clau) que sempre me apoiaram, incentivaram e nunca mediram esforços para me ajudar. Vocês são extremamente importantes para mim. Muito obrigada por todo o amor, carinho, paciência e suporte! Amo vocês!

À minha orientadora **Virgínia Torres Schall** (*in memoriam*) que me convidou para ser sua aluna de doutorado. Infelizmente tivemos pouco tempo juntas, mas o suficiente para entender o que significa ser um Ser Humano incrível! Considero um presente da vida poder participar de um dos seus sonhos científicos.

Ao professor **Paulo Marcos Zech Coelho** que aceitou me coorientar por meio do convite da Dra Virgínia e passou a ser o meu orientador após o seu falecimento. Sempre muito disponível a ajudar, conversar sobre o projeto e sobre a vida. Não tem preço ir ao seu gabinete para uma reunião e sair de lá com um conhecimento enorme sobre história da ciência. Muito obrigada, Professor!

Ao professor **Edward de Oliveira**, pela orientação e ensinamentos com relação à inovação científica, uma área de conhecimento nova para mim. Muito obrigada pela disponibilidade e paciência que teve comigo durante esses anos de trabalhos juntos. À professora **Denise Nacif Pimenta**, sempre muito atenciosa, carinhosa e empática. Muito obrigada por toda a sua ajuda e pelas boas conversas.

Ao meu querido amigo, companheiro de trabalho e agora afilhado, **Paulo Ricardo Silva Coelho**. Pessoa imprescindível na minha jornada acadêmica e de extrema importância na realização desse trabalho de doutorado. Muito obrigada por todo o carinho, cuidado, incentivo e atenção. Agradeço a ajuda da **Karine Ferreira Lopes**, que na reta final do trabalho ajudou bastante nos experimentos de campo e bancada.

Agradeço aos professores **Ricardo Aurélio Nascimento** e **Pedro Moacyr Mota**, diretores do LANAGRO MG, que permitiram usarmos um pedaço do terreno para o cultivo de *E. milii*. Agradeço ao **Alexandre Henrique dos Santos “Baxinho”**, sempre muito prestativo e dedicado, juntamente à sua equipe de jardinagem, pelos cuidados com a plantação e pela construção dos tanques para os testes em condições semi-naturais do moluscicida.

Aos responsáveis pelo Moluscário Lobato Paraense, **Liana Jannotti Passos**, **Paula Enéias** e **Lângia Colli Montresor** e aos técnicos **Delza de Moura Soares**, **Dílcia Maria**

Repetição, Kleiton Esteves Costa, Túlio Henrique Viana. Obrigada por toda a atenção e ajuda.

Agradeço todo o suporte oferecido pelas servidoras **Ana Paula Granado e Cristiana Carrara** do Núcleo de Inovação Tecnológica – NIT/IRR.

Ao **Kevin Alvarenga** e toda a equipe do Laboratório de Neurociência da Faculdade de Medicina da UFMG, pela disponibilidade, paciência e ensinamentos sobre Zebrafish.

Aos queridos do LESQ, IBESQ e recentemente DATA, **Rafaella Fortini, Lucélia Coutinho, Jéssica Assis, Áureo Almeida, Hélio Babá, Wander Jeremias, Sueleny Silva, Maria Luysa Pedrosa, Alana Karen Oliveira, Natália Custódio, Caroline Pereira e Patrícia Martins Parreiras.** Em especial à **Jussara Martins** por todo o apoio e disponibilidade, e ao **Fábio Ribeiro Queiroz**, que teve paciência em me passar um pouco do seu vasto conhecimento sobre estatística.

Não poderia deixar de agradecer à querida **Aline Sodré**, secret ria do antigo LAESA, que me deu toda a aten o necessária nos meus primeiros anos de IRR. Agradeço a toda a equipe do LAESA com a qual convivi durante os primeiros anos.

Ao amigo **Ant nio Mendes** que mesmo distante está sempre presente me apoiando e incentivando.   amiga **Grazielle Veiga de Brito**, que foi minha professora de biologia no cursinho e grande influenciadora na escolha do meu curso. Ao **Brener Cunha Carvalho** pela amizade, pelos enormes ensinamentos, por toda a ajuda e pelo incentivo. Obrigada pelo carinho, aten o e conselhos que vocês sempre me deram.

  **Andrea Dias Silva e Patrícia Concei o Parreiras**, secret rias das Pás-Gradua o em Ciências da Saúde e Saúde Coletiva. Sempre muito prestativas e acessíveis.   **Nuzia Pereira Santos**, auxiliar de gestão da Biblioteca Professor Zigman Brener, por toda a sua paciência e disponibilidade em me ajudar com as configura es finais da tese.

Aos professores do curso de Pós-gradua o em Ciências da Saúde, nas pessoas dos seus coordenadores, professoras **Andréa Teixeira de Carvalho e Roberta Lima Caldeira** pelos ensinamentos.

  **FAPEMIG** e ao **Instituto René Rachou/Fiocruz Minas** pelo suporte financeiro e por toda a contribui o para a minha forma o profissional.

Agradeço a todas as pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram durante a realiza o desse trabalho.

Muitíssimo Obrigada!!!!

RESUMO

O uso de moluscicida é uma das medidas de controle da transmissão do parasito *Schistosoma mansoni*, causador da esquistossomose mansoni, que atua na eliminação de seus hospedeiros intermediários, caramujos do gênero *Biomphalaria*. No Brasil, as espécies *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea* são encontradas naturalmente infectadas, mantendo a transmissão do parasito. O látex de *Euphorbia milii* tem mostrado bons resultados como moluscicida natural contra espécies de *Biomphalaria*. Dessa forma, o objetivo principal deste trabalho foi desenvolver um kit protótipo de moluscicida a base do látex de *E. milii*. Para isso, o cultivo de *E. milii* foi aprimorado visando a produção em maior escala. Após a coleta, o látex foi processado, aliquotado e liofilizado. O produto liofilizado foi reidratado com duas soluções aquosas (“Diluyente” 1 e “Diluyente” 2) definidas neste estudo. Após a prova de conceito, um kit protótipo foi produzido e denominado de MoluSchall, em homenagem à Dr^a Virgínia Torres Schall. O produto foi testado, em triplicata, nas diluições de 1; 2; 4; 8 e 12 µL/L de água contra *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*, com o objetivo de determinar a diluição letal para 100% (DL₁₀₀) dos caramujos de cada espécie. Testes com *B. glabrata* infectadas com *S. mansoni* também foram realizados nas mesmas diluições. A estabilidade do produto foi avaliada, a cada dois meses, pela atividade moluscicida de protótipos armazenados em temperaturas de 2–8°C (geladeira), 22–26°C (ambiente) e 37°C (estufa). Alevinos de *Danio rerio* (Zebrafish) foram submetidos às diluições de 8; 16; 32; 64 e 128 µL/L de meio E2 para avaliação da toxicidade do produto. O produto também foi avaliado em condições semi-naturais contra *B. glabrata* em tanques, tratados com o moluscicida nas diluições de 8 e 12 µL/L. As DL₁₀₀ encontradas para os caramujos foram de 4µL/L para *B. tenagophila* e 8 µL/L para *B. glabrata* e *B. straminea*. Já no teste toxicológico, as diluições 8 e 16 µL/L não foram letais para *D. rerio*. Com relação ao teste de estabilidade, o produto manteve-se estável durante 24 meses, independente da temperatura de armazenamento. Nos tanques, foi observado 100% de mortalidade de *B. glabrata* expostas às diluições de 8 e 12 µL/L, resultado similar ao encontrado nos testes de laboratório. O MoluSchall foi eficaz na mortalidade das três espécies de *Biomphalaria*, com baixa toxicidade para *D. rerio* e estabilidade por um período de 24 meses. A DL₁₀₀ definida em laboratório para *B. glabrata* se manteve quando o produto foi usado em condições semi-naturais. Assim, cada kit protótipo permite tratar 12.500 litros de água. MoluSchall é um moluscicida natural promissor e poderá contribuir para o controle da transmissão de *Schistosoma mansoni*.

Palavras Chave: *Biomphalaria* spp.; esquistossomose mansoni; *Euphorbia milii*; moluscicida.

ABSTRACT

The use of molluscicides is one of the control measures for *Schistosoma mansoni* transmission, which causes schistosomiasis mansoni. This molluscicide acts in the elimination of intermediate hosts, snails of the genus *Biomphalaria*. In Brazil, the species *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* and *Biomphalaria straminea* are found naturally infected, maintaining the transmission cycle of the parasite. Latex of *Euphorbia milii* has shown good results as a natural molluscicide against *Biomphalaria* species. Thus, the main goal of this work was to develop a prototype molluscicide kit based on *E. milii* latex. For this, *E. milii* cultivation has been improved for larger scale production. After collection, the latex was processed, aliquoted and lyophilized (-55°C, 0.022 mbar, 24 hours). The lyophilized product was rehydrated with two aqueous solutions ("Diluent" 1 and "Diluent" 2) defined in this study. After proof of concept, a prototype kit was produced and named MoluSchall, in honor of Dr. Virginia Torres Schall. The product was tested, in triplicate, at the dilutions of 1; 2; 4; 8 and 12 µL/L of water against *B. glabrata*, *B. tenagophila* and *B. straminea*, with the objective of determining the lethal dilution to 100% (LD₁₀₀) of the snails of each species. Tests with *B. glabrata* infected with *S. mansoni* were also performed at the same dilutions. The stability of the product was evaluated every two months by the molluscicidal activity prototypes stored at temperatures of 2-8° C (refrigerator), 22-26° C (ambient) and 37° C (stove). *Danio rerio* (Zebrafish) fingerlings were submitted to dilutions of 8; 16; 32; 64 and 128 µL/L in E2 medium to evaluate the toxicity of the product. The product was also evaluated in semi-natural conditions against *B. glabrata* in tanks, treated with molluscicide at 8 and 12 µL/L dilutions. The LDs₁₀₀ found for snails were 4 µL/L for *B. tenagophila* and 8µL/L for *B. glabrata* and *B. straminea*. In the toxicological test, dilutions of 8 and 16 µL/L were not lethal for *D. rerio*. Regarding the stability test, the product remained stable for 24 months, regardless of storage temperature. In the tanks, 100% of *B. glabrata* mortality was observed exposed to dilutions of 8 and 12 µL/L, a result similar to that found in laboratory tests. Thus, MoluSchall proved effective in eliminating the three species of *Biomphalaria*, presented low toxicity to *D. rerio* and stability for a period of 24 months. The DL100 defined in the laboratory for *B. glabrata* was retained when the product was used under semi-natural conditions. Thus, each prototype kit allows to treat 12,500 liters of water. MoluSchall is a promising natural molluscicide and may contribute to the control of *Schistosoma mansoni* transmission.

Key word: *Biomphalaria* spp.; schistosomiasis mansoni; *Euphorbia milii*; molluscicide.

APRESENTAÇÃO

Antes mesmo de ingressar na UFMG para cursar Ciências Biológicas, eu já almejava estudar zoologia. Assim que entrei para universidade procurei um laboratório para iniciar o meu envolvimento com a pesquisa científica, e assim, conheci a Dra Teofânia Vidigal que me orientou durante 8 anos. No Laboratório de Malacologia do ICB, realizei a minha iniciação científica onde aprendi sobre a manutenção e criação de gastrópodes terrestres e aquáticos, realizei coletas de moluscos em diversos locais, aprendi sobre anatomia interna, um pouco sobre embriologia e estudei algumas interações parasitárias.

O meu primeiro contato com parasitologia ocorreu devido ao encontro de metacercarias, durante a prática de dessecação de exemplares de *Omalonyx*. A partir desse achado, iniciei diversos estudos com o professor Alan Lane de Melo, que me ensinou muito sobre parasitologia. Em 2007, um dos nossos trabalhos, *Caracterização das larvas de trematódeos provenientes de moluscos dulciaquícolas coletados na Estação Ecológica da Universidade Federal de Minas Gerais*, foi selecionado como relevância acadêmica na XVI semana de iniciação científica da UFMG. Essa seleção me incentivou ainda mais a continuar traçando meu caminho pela pesquisa. A minha paixão por parasitologia aumentou ainda mais quando, em uma tarde de trabalho, um colega de laboratório percebeu algo estranho em um exemplar de *Omalonyx* (gastrópode). Esse gastrópode estava com o tentáculo inchado e pulsando, e quando eu percebi se tratar de um trematódeo do gênero *Leucochloridium*, fiquei muito emocionada. Eu sabia que se tratava desse trematódeo, porque durante as minhas aulas de zoologia eu havia apresentado um trabalho clássico do Dr Adolf Lutz (1921), relatando a presença desse parasito infectando exemplares de *Omalonyx* coletados na Fiocruz.

Iniciei o mestrado em 2010, no Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da UFMG trabalhando com *Leucochloridium*. Depois de realizar algumas coletas em Curitiba e não encontrar mais espécimes do gastrópode infectados, precisei mudar o meu projeto de mestrado. Dessa forma, iniciei os meus trabalhos com *Angiostrongylus vasorum* sob orientação do professor Walter Lima, que me recebeu muito bem em seu laboratório. Defendi o mestrado em 2012 e posteriormente trabalhei com a criação de mexilhão dourado na Escola de Engenharia da UFMG.

Em 2014, recebi o convite da professora Virgínia para desenvolver o projeto de elaboração de moluscicida a partir do látex de coroa-de-cristo. Infelizmente, logo que entrei para o Instituto René Rachou - IRR a professora Virgínia descobriu a sua doença e iniciou os

tratamentos. Não tivemos muito tempo para definir e organizar detalhadamente os passos do meu projeto.

Assim que eu passei na seleção do doutorado, a Dra Virgínia convidou o professor Paulo Marcos Coelho para ser o coorientador deste trabalho e o professor Edward Oliveira para colaborar no projeto, uma vez que o mesmo possuía experiência com liofilização e com inovação científica. Logo no início do projeto, o aluno Paulo Ricardo Coelho, que havia acabado de ingressar no IRR, passou a fazer parte do projeto e participou de todas as etapas do estudo. Após o falecimento da professora Virgínia, Denise Pimenta que havia chegado do Rio de Janeiro, assumiu algumas responsabilidades e orientações de alunos de pós-graduação. Como inicialmente o projeto contava com a participação da população para o teste do moluscicida, Denise foi convidada para me coorientar.

Na minha primeira visita à plantação de coroa-de-cristo, localizada na Fazenda Modelo da UFMG, em Pedro Leopoldo, a professora Virgínia fez questão de me acompanhar e apresentar o local. Infelizmente a plantação estava toda tomada por capim e, além disso, havia uma terrível infestação de carrapatos, que dificultava a realização das coletas do látex. Um jardineiro foi contratado para realizar a limpeza do lote e a fertilização do solo. O projeto não possuía financiamento e por isso ficou inviável manter a plantação na Fazenda Modelo da UFMG. Então, a professora Virgínia entrou em contato com o professor Pedro Mota do LANAGRO em Pedro Leopoldo, informando o nosso interesse em iniciar uma parceria. Dessa maneira, conseguimos estabelecer uma colaboração com o LANAGRO, que nos cedeu um espaço no terreno para podermos manter a plantação de forma segura, com irrigação e fertilização. Após a confirmação da parceria, alguns exemplares de coroa-de-cristo foram transferidos da Fazenda Modelo da UFMG para o LANAGRO. Tivemos que aguardar um período para que as plantas se adaptassem ao novo local e passasse a produzir uma maior quantidade de látex.

Durante o período de adaptação do cultivo, estávamos no laboratório realizando diversos testes na tentativa de conseguir solubilizar o látex liofilizado em água. Nós observamos que a solubilização do látex liofilizado em água não era completa, e apresentava diversos grumos que flutuavam na água ou se sedimentavam no fundo dos frascos. Após vários testes conseguimos encontrar dois diluentes que se mostram adequados e, a partir daí desenvolvemos todos os outros passos que serão descritos no decorrer desta tese.

A professora Virgínia faleceu em abril de 2015, nos deixando extremamente abalados. Conseguimos avisá-la, sobre a nossa conquista de parceria com o LANAGRO, antes do seu

falecimento. Seguir com o projeto do moluscicida e tentar realizar um pouco do sonho da Virgínia, passou a ser uma das formas de mantê-la viva. Quando nosso trabalho foi selecionado para apresentação oral no Simpósio Internacional de Esquistossomose (2018) e no Congresso de Medicina Tropical (2018), ou para participação de eventos, como foi o caso do Inova Minas Fapemig (2016), fiquei muito emocionada por estarmos dando continuidade a um trabalho iniciado por ela, ainda na década de 80. Segue abaixo um pouco de sua história com a cora-de-cristo como forma de contextualizar este estudo e sua empreitada.

Mineira de Montes Claros, Virgínia Schall (1954-2015) foi pioneira em diversas áreas do conhecimento. Seu principal legado é a integração de práticas e olhares multi e interdisciplinares nas áreas de Educação em Saúde, Divulgação Científica e Saúde no Brasil. Na Medicina Tropical e Educação em Saúde, Virgínia desempenhou importante papel na divulgação de metodologias, estratégias e materiais informativos/educativos que relacionassem as problemáticas das doenças infecto-prasitárias aos seus determinantes sociais (Pimenta, Struchiner & Monteiro, 2017). Ao longo de quarenta anos de vida acadêmica, Virgínia desenvolveu pesquisas sobre diferentes aspectos da esquistossomose e teve um papel importante para o conhecimento sobre esta endemia e para os avanços em seu controle. Sua contribuição nesse campo está organizada sob a forma de cinquenta artigos científicos, três livros, sete capítulos e 33 resumos de trabalhos apresentados em eventos científicos (Favre & Massara, 2018).

Virgínia sempre se interessou pelo comportamento. Primeiro de animais e, posteriormente, de seres humanos. Foi por seu interesse pelo comportamento humano que chegou à saúde e à educação. Virgínia graduou-se em Psicologia em 1978 pela Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Em função do interesse pelos aspectos biológicos e fisiológicos do comportamento, foi bolsista de Iniciação Científica do CNPq de Fernando Pimentel de Souza, que utilizava caramujos como modelo experimental para estudo do cérebro humano. Em 1975, ganhou o Prêmio Jovem Cientista do Instituto Brasileiro de Educação, Ciência e Cultura com o trabalho sobre o comportamento do caramujo *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro do *Schistosoma mansoni*. Seguiu estudando o tema no Mestrado em Fisiologia e Biofísica na UFMG (1978-1980). Mudou-se para o Rio de Janeiro em 1980, quando passou a dar aulas no Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ). No ano seguinte, foi trabalhar no Instituto Oswaldo Cruz (IOC) a convite de Pedro Jurberg, professor da UERJ e pesquisador da

Fiocruz, que também estudava o comportamento do caramujo *B. glabrata* (Pimenta, Struchiner & Monteiro, 2017).

Em 1984, durante férias no Nordeste, observou a presença da planta Avelós, da família Euphorbiaceae, em solo árido. Ao ser informada por um taxista sobre a toxicidade da planta, coletou o material para estudá-lo. Dedicou muitos anos ao estudo do látex e mais tarde da coroa-de-cristo, também da família Euphorbiaceae, que apresentou resultado positivo como molusticida para o caramujo transmissor da esquistossomose. Em 1988, o processo de obtenção do látex da coroa-de-cristo (*Euphorbia splendens* var. *hisloppi*) e sua aplicação no combate aos moluscos vetores da esquistossomose foi patenteado pela Fiocruz. Os primeiros estudos, realizados em condições de laboratório, mostraram que o látex da coroa-de-cristo tinha efeito letal sobre *B. tenagophila*, *B. glabrata* e *B. straminea*, espécies hospedeiras de *S. mansoni* no Brasil (Vasconcellos & Schall, 1986). Schall e equipe mostraram, pela primeira vez, a atividade letal do látex natural sobre as espécies hospedeiras africanas *B. pfeifferi* e *Bulinus* sp., sugerindo seu potencial para uso em condições naturais, inclusive no continente africano, de onde a planta é originária (Pimenta, Struchiner & Monteiro, 2017).

Paralelamente às pesquisas sobre o comportamento da *Biomphalaria* e o uso da coroa-de-cristo como molusticida natural, foi em 1985, a partir de uma pesquisa de campo e experiência com escolares numa comunidade carioca, que seu universo se transmutou e nasceu outra paixão, a educação em saúde. Em 1985, em seu primeiro artigo autoral “*Esquistossomose mansoni autóctone e outras parasitoses intestinais em escolares do bairro Alto da Boa Vista, RJ*” (Schall et al., 1985), Virgínia analisa a presença da esquistossomose mansoni e outras parasitoses intestinais em escolares do bairro do Alto da Boa Vista no Rio de Janeiro. Em entrevistas, familiares da autora relataram que essa experiência a marcou profundamente, pois nela vivenciou e compreendeu os aspectos sociais e as relações de desigualdade da sociedade brasileira subjacentes à transmissão e manutenção de doenças endêmicas.

Dois anos depois, ela publica seu primeiro artigo que envolve sujeitos humanos no ambiente escolar na revista *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Esse artigo, intitulado “*Health education for children in the control of Schistosomiasis*” (Schall, 1987) foi um dos primeiros a focalizar o tema da educação em saúde na revista Memórias. Nele, Virgínia destaca a relevância do trabalho com crianças na prevenção e controle da doença. A partir dessa experiência, misturou ciência e literatura, inaugurando uma linha de pesquisa voltada para a produção e a avaliação do uso de coleções literárias para o público infanto-juvenil –

Ciranda da Saúde (1986), Ciranda do Meio Ambiente (1989), Ciranda da Vida (1994). Estas ganharam diversos prêmios e abordam, de forma lúdica, o ensino de questões de saúde, ambiente e ciência, possibilitando o trabalho pedagógico integrado em escolas e outros ambientes não formais de ensino. A partir de então, o controle e a prevenção da esquistossomose por meio de estudos sociais e de educação em saúde estiveram presentes ao longo de toda a sua vida e trajetória profissional (Monteiro & Pimenta, 2019).

Segundo o capítulo de Favre & Massara (2018) que fazem apanhado sobre a contribuição de Virgínia para as pesquisas sobre esquistossomose no Brasil, outros estudos com o látex da *E. splendens* obtiveram os seguintes resultados: 1) as espécies hospedeiras diferiram quanto à suscetibilidade à ação do látex, porém, para todas elas o valor da DL₉₀ foi de 4 ppm, bem inferior à dose letal recomendada pela OMS (20 ppm) (Vasconcellos & Schall, 1986); 2) o princípio ativo da planta não apresentou atividade mutagênica e nem tóxica em camundongos (Schall et al., 1991); 3) os testes de laboratório demonstraram a estabilidade sazonal e geográfica da planta no Brasil (Mendes et al., 1992); 4) a concentração de 12 ppm do látex produziu 100% de mortalidade de *B. glabrata* e *B. tenagophila* em coleções lólicas e lenticas naturais (Mendes et al., 1992); 5) a adequação e emprego da planta em programas de controle integrados da esquistossomose irá depender de estudos sobre modelos operacionais de cultivo nas comunidades envolvidas (Baptista et al., 1994); 6) a dose letal (DL₉₀) obtida para embriões de *B. glabrata* foi similar à obtida para animais adultos (0,2 ppm), ao passo que a literatura registra 100% de mortalidade com 1.500 ppm para outros produtos testados (Schall et al., 1998); 7) o uso do látex pelas comunidades rurais, associado a programas de educação em saúde, pode ser uma estratégia para manter a esquistossomose em níveis baixos (Schall et al., 1998). Segundo os autores, na época não havia perspectivas de melhoria nas condições de saneamento e moradia nas áreas rurais endêmicas do Brasil e era necessário buscar soluções alternativas para o seu controle (Favre & Massara, 2018).

Como se pode observar, o grande sonho de Virgínia era que o látex da coroa-de-cristo pudesse ser utilizado pelas comunidades rurais que, em conjunto com ações e políticas de educação em saúde, pudessem se concretizar como uma eficiente e sustentável estratégia para a prevenção e controle da esquistossomose no mundo. Desta forma, esta tese vem nesta direção e tradição. Uma ideia, um projeto que começou na década de 1980 e que hoje em 2019, dá mais um passo para se tornar realidade.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1: Esquema representativo do ciclo biológico de <i>Schistosoma mansoni</i> nos hospedeiros intermediário e definitivo.....	24
Figura 2: <i>Biomphalaria glabrata</i>	28
Figura 3: Distribuição espacial de <i>Biomphalaria glabrata</i> no Brasil.....	28
Figura 4: <i>Biomphalaria tenagophila</i>	29
Figura 5: Distribuição espacial de <i>Biomphalaria tenagophila</i> no Brasil.....	29
Figura 6: <i>Biomphalaria straminea</i>	30
Figura 7: Distribuição espacial de <i>Biomphalaria straminea</i> no Brasil.....	30
Figura 8: <i>Euphorbia milii</i> var. <i>hislopii</i>	40
Figura 9: Peixe <i>Danio rerio</i> adulto e alevino.....	41
Figura 10: Plantação de <i>Euphorbia milii</i> var. <i>hislopii</i> , LANAGRO/MG.....	44
Figura 11: Fluxograma da metodologia.....	45
Figura 12: Coleta do látex de <i>Euphorbia milii</i> var. <i>hislopii</i>	46
Figura 13: Processo de filtração do látex <i>in natura</i> , transferência para frascos do tipo penicilina e liofilização do látex de <i>Euphorbia milii</i> var. <i>hislopii</i>	47
Figura 14: Protótipo de kit moluscicida MoluSchall	49
Figura 15: Ilustração do procedimento para determinação da dose letal (DL ₁₀₀) de MoluSchall em caramujos do gênero <i>Biomphalaria</i>	52
Figura 16: Ilustração do procedimento para realizar a avaliação da taxa de mortalidade do MoluSchall em alevinos de <i>Danio rerio</i>	54
Figura 17: Tanques tratados com MoluSchall nas diluições de 8 µL/L e de 12 µL/L, e sem tratamento (controle).....	56

Figura 18: Resultados de parte dos experimentos realizados para reidratação do látex de <i>E. milii</i> liofilizado.....	59
Figura 19: Dose letal (DL ₁₀₀) de MoluSchall contra moluscos adultos de <i>B. glabrata</i> (A), <i>B. straminea</i> (B) e <i>B. tenagophila</i> (C), analisados após 48 horas de exposição ao MoluSchall.....	61
Figura 20: Dose letal (DL ₁₀₀) de MoluSchall contra <i>B. glabrata</i> infectados (A) e (B) não infectados com <i>S. mansoni</i> , analisados após 48 h de exposição	63
Figura 21: Representação da mortalidade de alevinos de <i>Danio rerio</i> (Zebrafish), expostos a diferentes diluições de MoluSchall, após 72 horas.	64
Figura 22: Representação da mortalidade de <i>Biomphalaria glabrata</i> , expostos às diluições de 8 e 12 µL/L de MoluSchall, após 48 horas, em dias diferentes.....	65

TABELAS

Tabela 1: Grupos das espécies de <i>Biomphalaria</i>	50
Tabela 2: Grupos de espécies de <i>Biomphalaria</i> , A (<i>B. glabrata</i>), B (<i>B. tenagophila</i>) e C (<i>B. straminea</i>)	50
Tabela 3: Grupos de <i>Biomphalaria glabrata</i> infectados e não infectados por <i>Schistosoma mansoni</i>	51
Tabela 4: Grupos de <i>Biomphalaria glabrata</i> submetidos ao MoluSchall, armazenado em diferentes temperaturas.....	53
Tabela 5: Grupos de <i>Danio rerio</i> e número de alevinos usados por diluição de MoluSchall.....	55
Tabela 6: Grupos de <i>Biomphalaria glabrata</i> de diferentes tamanhos, utilizados nos experimentos de campo e submetidos a diferentes diluições do MoluSchall.....	55
Tabela 7: Relação entre o peso do látex líquido (5mL) e após liofilização.....	58

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	Esquistossomoses	20
1.2	Esquistossomose mansoni.....	22
1.2.1	Agente etiológico e ciclo biológico	22
1.2.2	Patologia da esquistossomose mansoni	24
1.2.3	Hospedeiros intermediários de <i>S. mansoni</i>	25
1.2.4	Controle da esquistossomose mansoni.....	30
1.2.4.1	Controle dos hospedeiros intermediários.....	33
1.2.4.1.1	Métodos biológicos	33
1.2.4.1.2	Métodos físicos	35
1.2.4.1.3	Métodos químicos	36
1.3	Moluscidas naturais	38
1.4	<i>Euphorbia milii</i> var. <i>hislopii</i>	39
2	OBJETIVOS	43
3	MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1	Área de cultivo de <i>Euphorbia milii</i> var. <i>hislopii</i>	44
3.2	Obtenção do látex de <i>Euphorbia milii</i> var. <i>hislopii</i>	46
3.3	Liofilização do látex de <i>Euphorbia milii</i> var. <i>hislopii</i>	46
3.4	Reidratação do látex de <i>Euphorbia milii</i> var. <i>hislopii</i> liofilizado.....	47
3.5	Prova de conceito do látex liofilizado.....	48
3.6	Elaboração do kit protótipo do moluscida.....	48
3.7	Determinação da dose letal (DL ₁₀₀) de MoluSchall em espécies de <i>Biomphalaria</i>	49
3.7.1	Caramujos utilizados: <i>Biomphalaria glabrata</i> , <i>Biomphalaria tenagophila</i> e <i>Biomphalaria straminea</i>	49
3.7.2	Determinação da dose letal (DL ₁₀₀) em <i>B. glabrata</i> , <i>B. tenagophila</i> e <i>B. straminea</i>	50
3.7.3	Determinação da dose letal (DL ₁₀₀) em <i>B. glabrata</i> infectados por <i>S. mansoni</i>	50
3.8	Avaliação da estabilidade térmica do MoluSchall.....	52

3.9	Avaliação da toxicidade de MoluSchall em alevinos de <i>Danio rerio</i>	53
3.10	Avaliação do MoluSchall em condição semi-natural.....	55
3.11	Análise dos dados.....	56
4.	RESULTADO	57
4.1	Obtenção do látex de <i>Euphorbia milii</i> var. <i>hislopii</i>	57
4.2	Reidratação do látex liofilizado de <i>Euphorbia milii</i> var. <i>hislopii</i>	58
4.3	Determinação da dose letal (DL ₁₀₀) do MoluSchall para <i>B. glabrata</i> , <i>B. straminea</i> e <i>B. tenagophila</i>	59
4.4	Determinação da dose letal (DL ₁₀₀) do MoluSchall para <i>B. glabrata</i> infectadas com <i>S. mansoni</i>	61
4.5	Avaliação da estabilidade térmica de MoluSchall, em função do tempo.....	62
4.6	Avaliação da toxicidade de MoluSchall em alevinos de <i>Danio rerio</i>	63
4.7	Avaliação do MoluSchall em condições semi-naturais.....	63
4.8	Estudo de Viabilidade Patentária	64
5.	DISCUSSÃO	65
6.	CONCLUSÃO	69
7.	BIBLIOGRAFIA	70
8.	ANEXOS	82
	Carta do Ministério da Saúde	82
	Anexo 2 - Folha de rosto Parecer EVP 02/2018.....	84
9.	APÊNDICE	85

1. Introdução

1.1 Esquistossomoses

As esquistossomoses são doenças infecto parasitárias, causadas por trematódeos do gênero *Schistosoma* Weiland, 1858. Das seis espécies de *Schistosoma* que infectam humanos (*Schistosoma mansoni* Sambon, 1907), *Schistosoma hematobium* (Bilharz, 1852), *Schistosoma japonicum* Katsurada, 1904, *Schistosoma intercalatum* Fischer, 1934, *Schistosoma mekongi* Voge, Brickner e Bruce, 1978 e *Schistosoma malayensis* Greer, Ow-Yang & Yong, 1988, apenas o *S. mansoni* mantém seu ciclo biológico no continente americano (Ministério da Saúde, 2014). As esquistossomoses apresentam grande impacto na saúde pública mundial, afetando mais 249 milhões de pessoas em 78 países, além de representar uma ameaça para mais de 650 milhões de indivíduos que vivem em áreas endêmicas (WHO, 2019).

As esquistossomoses estão na lista das Doenças Tropicais Negligenciadas (NTD – Neglected Tropical Disease), doenças que prevalecem em condições tropicais e subtropicais em 149 países, afetando mais de um bilhão de pessoas (WHO, 2019). O número de pessoas afetadas por estas enfermidades é mais elevado em regiões de maior pobreza, existindo uma relação direta entre a prevalência destas doenças e o índice de desenvolvimento humano (IDH) (Lindoso & Lindoso, 2009; Utzinger et al., 2011).

Em 1990, as esquistossomoses ocupavam o sétimo lugar entre as doenças negligenciadas do mundo. Hoje elas ocupam o terceiro lugar com uma alta taxa de morbidade, 3,3 milhões *disability-adjusted life years* (DALYs), segundo o *Global Burden of Disease Study*, realizado em 2010 (Murray et al., 2012).

Programas de controle adotados no Egito, China, Filipinas, Brasil e alguns países da África tem demonstrado sucesso no controle da doença, estando alguns desses próximos da eliminação (Rollinson et al., 2013).

Para que os programas de controle da esquistossomose tenham sucesso é necessário que se execute medidas integradas tais como: associação do uso de quimioterápicos e moluscicidas; educação e promoção da saúde; melhoria no saneamento básico com o suprimento de água tratada; e busca ativa de casos por meio de um diagnóstico confiável (Sarvel et al., 2011; Rollinson et al., 2013). Com essas medidas seria possível alcançar uma diminuição da prevalência, da morbidade e mortalidade, bem como a interrupção da expansão

da parasitose para áreas não endêmicas. Entretanto, essas medidas profiláticas são dificultadas devido ao precário padrão sócio econômico dos países endêmicos para a doença, e a falta de interesse político em relação à adoção destas medidas.

Atualmente, a estratégia largamente empregada para controlar a esquistossomose é o tratamento em massa (Fenwick & Webster, 2006; Gray et al., 2010), sendo o uso de praziquantel recomendado pela OMS. Ele é ativo contra todas as espécies de *Schistosoma* e é administrado por via oral em dose única, tanto em nível populacional quanto individual. O praziquantel tem se tornado o medicamento exclusivo devido ao seu baixo custo e eficácia contra formas adultas (Liu et al., 2013). É importante considerar que o praziquantel é pouco efetivo contra formas imaturas do parasito, fazendo com que essas formas não sejam eliminadas após o tratamento podendo atingir a maturidade e ocasionar manifestações clínicas tardias (Couto et al., 2011; Silva-Moraes et al., 2013).

Conforme mencionado acima, o tratamento em massa, sem diagnóstico prévio para controle da morbidade em áreas de alta prevalência é preconizado pela OMS. A quimioterapia é realizada em crianças e adolescentes em idades escolares devido à elevada intensidade de infecção. Em áreas com alta endemicidade (prevalência > 50%), todas as crianças e adultos sob risco devem receber tratamento anualmente (WHO, 2013). Em áreas de moderada endemicidade (prevalência 10-50%), todas as crianças em idade escolar devem ser tratadas uma vez a cada dois anos. Em áreas de baixa endemicidade (prevalência <10%), crianças em idade escolar devem ser tratadas duas vezes durante o período escolar; no primeiro e último ano (WHO 2006, 2012 b).

No entanto, dificuldades logísticas e financeiras, além da possibilidade de desenvolvimento de resistência ao medicamento, são problemas relacionados a este tipo de intervenção. Em 2014, foi estimado que 1,6 milhões de crianças em idade escolar, no Brasil e na Venezuela, necessitassem de terapia preventiva (WHO, 2016). O Ministério da Saúde no Brasil adota diretrizes próprias afirmando que, quando a prevalência está abaixo de 15%, apenas os casos positivos são tratados; quando a prevalência é 15-25%, os casos positivos são tratados juntamente com os membros da casa; e locais onde a prevalência está acima de 25%, o tratamento em massa é realizado com crianças em idade escolar (Ministério da Saúde, 2019; WHO, 2016).

Apesar do suporte financeiro na distribuição de praziquantel na África pela empresa Merck e a fabricação própria pela Farmanguinhos (Fiocruz) no Brasil, foram medicadas em 2014, apenas 20,7% da população global que necessitam de tratamento (WHO, 2016).

1.2 Esquistossomose mansoni

A esquistossomose mansoni é uma doença de ocorrência tropical, sendo encontrada em 54 países, principalmente na África, Leste do Mediterrâneo e América. Na América do Sul, ocorrem na região do Caribe, Venezuela e Brasil, e na África e Leste do Mediterrâneo, atinge as regiões do Delta do Nilo e países como Egito e Sudão. No Brasil, estima-se que aproximadamente 1,5 milhão de pessoas estejam infectadas por *S. mansoni*, sendo endêmica nos estados de Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Maranhão, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Sergipe. Focos de transmissão são relatados no Pará, Ceará, Piauí, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Goiás e Rio Grande do Sul (Ministério da Saúde, 2019). A doença apresenta baixa letalidade e os óbitos estão relacionados às formas clínicas graves. Entre 2006 e 2015, foram registrados, em média, cerca de 508 óbitos anuais pela doença no país (Ministério da Saúde, 2019).

As medidas de controle no Brasil têm alcançado redução nos indicadores de morbidade da infecção por *S. mansoni*. No último Inquérito Nacional de Esquistossomose e Infecções por Helminhos (INPEG), realizado entre 2010 e 2015 a prevalência no Brasil foi estimada em 1% (Katz, 2018).

1.2.1 Agente etiológico e ciclo biológico

O parasito *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 pertence ao filo Platyhelminthes, classe Trematoda, família Schistosomatidae, são animais dióicos com nítido dimorfismo sexual. Os parasitos apresentam coloração esbranquiçada e habitam as vênulas do sistema porta, particularmente nas veias mesentéricas superiores e inferiores onde normalmente se encontram acasalados, machos e fêmeas. A fêmea normalmente se encontra dentro do canal ginecóforo do macho onde acontece a fecundação. Os ovos maduros possuem cerca de 150 micrometros de comprimento e 60 micrometros de largura, apresentam formato oval e uma espícula lateral. Nos ovos maduros são encontrados os miracídios. Os ovos se tornam maduros em sete dias, após o desenvolvimento nos tecidos do hospedeiro. O tempo de vida dos miracídios nos tecidos é de aproximadamente 12 dias, caso a eliminação dos ovos pelas fezes não ocorra, os miracídios morrem.

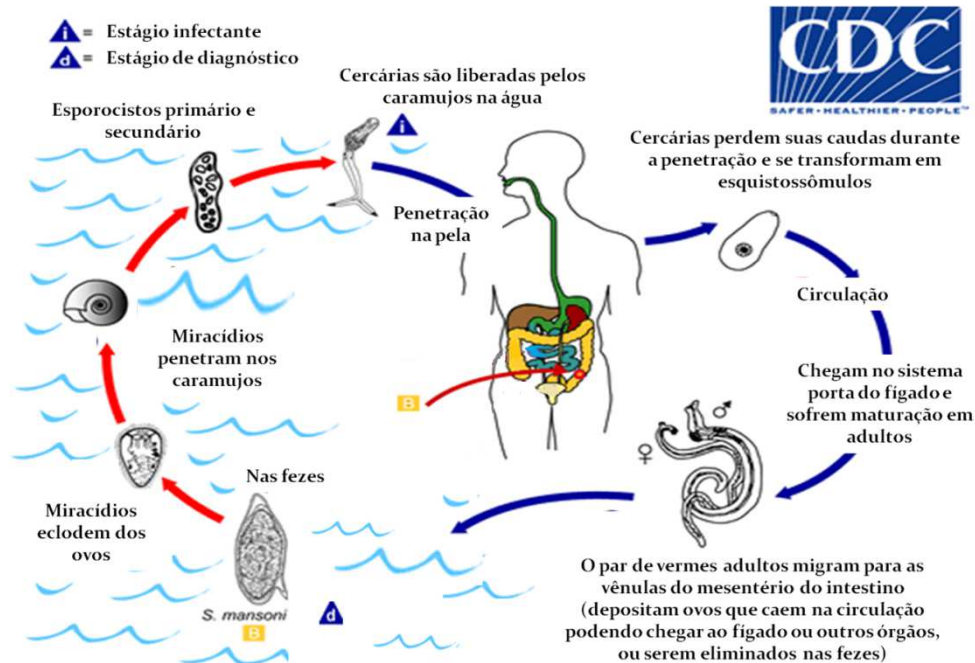
Os ovos que são eliminados junto às fezes do hospedeiro vertebrado no meio aquático liberam os miracídios, os quais irão penetrar nos moluscos. Os miracídios dentro dos ovos no

meio externo podem sobreviver 24 horas em fezes diarréicas e de 2 a 5 dias em fezes de consistência sólida e úmida. A exposição direta das fezes ao sol provoca a morte dos miracídios dentro de 48 horas. As fezes depositadas no meio ambiente podem ser carregadas pela chuva para alguma coleção hídrica. O contato com a água promove a dissolução das fezes e o miracídio, com estímulos de temperatura e luminosidade, rompe a casca do ovo e ganha o meio aquático, onde pode infectar o caramujo susceptível. O miracídio apresenta inúmeros cílios que auxiliam em sua locomoção aquática, quando encontram o caramujo eles penetram através dos tecidos. Essa penetração ocorre a partir de enzimas histolíticas secretadas por glândulas cefálicas da larva. Após 48 horas, inicia-se a reprodução assexuada, com o miracídio perdendo a mobilidade e se transformando em esporocisto primário, que por poliembrionia dão origem aos esporocistos secundários. Dentro desses esporocistos secundários células germinativas multiplicam-se dando origem às cercárias de cauda bifurcada, após 25 a 30 dias.

Os estímulos necessários para a liberação de cercárias, a partir dos caramujos, são a luz solar e a temperatura da água. Por isso, na natureza a liberação ocorre preferencialmente entre as 11 e 15 horas, devido à luminosidade e temperatura adequadas. Após a liberação, as cercárias nadam até encontrar o hospedeiro humano ou qualquer mamífero suscetível e penetram ativamente pela pele ou mucosa por meio de ação combinada da secreção lítica das glândulas anteriores e dos movimentos vibratórios. A penetração da cercária na pele produz uma dermatite alérgica no local de entrada, podendo em alguns casos desenvolver um *rash* cutâneo, principalmente nas reinfecções. Durante a penetração na pele, as cercárias perdem a cauda e transformam-se em esquistossômulos, que se alojam na pele por cerca de três dias e depois penetram nos vasos sanguíneos periféricos, pelos quais atingem a aurícula direita do coração e depois os pulmões. Através da circulação sistêmica, atingem o sistema porta hepático, onde ocorre a maturação dos vermes. Nas veias portais, os vermes adultos se acasalam, migram para veia mesentérica inferior, e a fêmea inicia a postura dos ovos entre 4 a 6 semanas após a penetração cercariana. Parte desses ovos ganha a circulação e depositam-se em órgãos como o fígado, levando ao desenvolvimento de uma reação inflamatória granulomatosa que resulta na formação dos granulomas, enquanto outros ovos podem depositar-se nas paredes intestinais também produzindo granulomas e, parte destes, alcança a luz intestinal sendo eliminados junto as fezes, dando continuidade ao ciclo (Lutz, 1919, Faust & Hoffmann, 1934, Maldonado & Acosta- Matienzo, 1947, Oliver & Mao, 1949, Gordon & Griffiths, 1951, Coelho, 1957, Boros & Warren, 1970, Valle et al., 1971, Chernin, 1970 e 1974,

Jourdane et al. 1980, Valadares et al., 1981, Pereira et al., 1984, Coelho, 1995, Jenkins-Holick & Kaul et al., 2013). O ciclo biológico de *Schistosoma mansoni* está esquematizado na figura 1.

Figura 1: Esquema representativo do ciclo biológico de *Schistosoma mansoni* nos hospedeiros intermediário e definitivo



Fonte:

adaptado de CDC: <https://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.html>

1.2.2 Patologia da esquistossomose mansoni

A sintomatologia clínica corresponde ao estágio de desenvolvimento do parasito no hospedeiro e varia dependendo da intensidade do parasitismo e da resposta imunológica do indivíduo. Desse modo, a esquistossomose pode se apresentar sob uma forma aguda, seguindo-se uma forma crônica (Colley & Secor, 2014).

A fase clínica aguda ocorre, normalmente, em indivíduos não residentes em áreas endêmicas, que entram em contato com águas contaminadas por cercárias de *S. mansoni* pela primeira vez. Após a penetração das cercárias, através da pele do hospedeiro definitivo, ocorre a migração do esquistossômulos e vermes adultos pelos tecidos do hospedeiro e o início da oviposição. Os sinais e sintomas que aparecem durante essa fase estão associados à carga parasitária e ao desenvolvimento de uma resposta imune exacerbada, sendo comum a presença de febre, mal-estar, diarreia, vômitos, anorexia, cefaleia, dor abdominal, perda de

peso, tosse seca, acompanhados por eosinofilia acentuada e leucocitose (Gryseels et al., 2006; Manzella et al., 2008; Lambertucci et al., 2010). Esses sinais e sintomas podem se manifestar dias após a exposição cercariana ou, mais frequentemente, após um mês, coincidindo com o começo da eliminação de ovos nas fezes. A fase aguda pode ser assintomática e desencadear um quadro invasivo com distribuição sistêmica de ovos. Após aproximadamente quatro meses, inicia-se a fase crônica (Prata & Coura, 2008).

Os indivíduos que vivem em área endêmica, em sua maioria, são portadores da infecção crônica. Esse quadro acomete diferentes órgãos, incluindo intestino, fígado, baço e até mesmo o sistema nervoso central e está associada à retenção de um grande número de ovos nos tecidos e à formação de granulomas. O granuloma é uma consequência da reação inflamatória aos ovos nos tecidos do hospedeiro. As lesões no fígado podem levar a um quadro de fibrose periportal (Andrade, 2009). Em torno de 90% dos residentes desenvolvem a forma crônica branda, muitas vezes assintomática. A forma branda geralmente está relacionada com baixa carga parasitária e apresenta reação inflamatória granulomatosa de menor intensidade no fígado e intestino. Uma pequena porcentagem evolui para formas crônicas mais graves; hepatointestinal e hepatoesplênica (Caldas et al., 2008). Os sintomas mais comuns da forma intestinal são dores abdominais crônicas ou intermitentes, perda de apetite e diarreia. As formas hepáticas estão associadas às infecções duradouras, de alta intensidade, com fibrose severa e com consequente oclusão da veia porta, hipertensão-portal, esplenomegalia, circulação venosa colateral e varizes gastrointestinais, podendo levar o paciente à morte (Gryssels et al., 2006). As lesões do sistema nervoso central são devidas à localização ectópica dos ovos, sendo a mielorradiculopatia esquistossomótica a forma mais grave (Ferrari et al., 2011).

No Brasil a maioria das pessoas com esquistossomose mansoni não apresentam as formas graves da doença, e sim as mais brandas (Katz, 2018).

1.2.3 Hospedeiros intermediários

No Brasil, o trematódeo *S. mansoni* possui como hospedeiros intermediários moluscos da família Planorbidae, do gênero *Biomphalaria* (Preston, 1910). Espécies desse gênero são amplamente distribuídas na África, América do Sul, Caribe, sudoeste da Ásia (Arábia Saudita e Iêmen), na América Central e sul dos Estados Unidos (Malek & Cheng, 1974; Paraense, 1975; Bandoni et al, 1995).

As espécies de *Biomphalaria* vivem em coleções hídricas de água doce naturais, artificiais e temporários, do tipo lântico ou lótico, ao nível do mar ou em grandes altitudes. Os planorbídeos são encontrados junto às margens de coleções hídricas de pequeno porte, podendo também serem encontrados em ambientes hídricos de diferentes tamanhos e profundidades (Teles & Carvalho, 2008).

As espécies de *Biomphalaria* possuem habilidades e adaptações importantes que facilitam a sua sobrevivência em ambientes não favoráveis. Sabe-se que esses animais apresentam resistência ao dessecamento temporário das coleções hídricas, sobrevivem às variações de temperatura, superam a inanição e são resistentes às mudanças das características biológicas e da qualidade físico-química da água (Teles & Carvalho, 2008). Barbosa & Barbosa (1994) reforçam a importância das chuvas, dos fatores climáticos e da temperatura na influência da distribuição, do tamanho e na densidade populacional dos caramujos.

Esses caramujos são capazes de obter oxigênio a partir do ar e oxigênio dissolvido na água, a partir das estruturas chamadas pseudobrânquias. Essas estruturas permitem que o caramujo fique imerso por longos períodos, conferindo uma proteção contra possíveis predadores. Outra estrutura encontrada nos caramujos pulmonados é o pneumostomo, que permite as trocas gasosas na superfície da água, sendo uma estratégia de sobrevivência em ambientes pobres em oxigênio ou poluídos por matéria orgânica (Teles & Carvalho, 2008).

Com relação a sua estratégia reprodutiva, os caramujos do gênero *Biomphalaria* são hermafroditas e podem realizar as fecundações cruzada e autofecundação. A fecundação cruzada é preferencial entre as espécies, porém, apesar de diminuir a variabilidade genética da população, a autofecundação é importante, pois a partir de apenas um indivíduo é possível ocorrer a recomposição populacional de uma área (Paraense, 1955).

No Brasil são encontradas onze espécies do gênero *Biomphalaria*: *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818); *Biomphalaria peregrina* (Orbigny, 1835); *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835); *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848); *Biomphalaria schrammi* (Crosse, 1864); *Biomphalaria kuhniana* (Clessin, 1883); *Biomphalaria intermedia* (Paraense & Deslandes, 1962); *Biomphalaria amazonica* Paraense, 1966; *Biomphalaria cousini* Paraense, 1966; *Biomphalaria oligoza* Paraense, 1974; e *Biomphalaria occidentalis* Paraense, 1981 (Paraense, 1970, 1972, 1975, 1981, 1986, Lima et al., 1993). Dessas espécies, as de maior importância são *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* por serem encontradas naturalmente infectadas por *S. mansoni*, enquanto *B. amazonica*, *B. peregrina* e *B. cousini* são hospedeiras em potencial por terem sido infectadas em condições laboratoriais (Corrêa &

Paraense, 1971; Paraense & Corrêa, 1973; Teodoro et al., 2010). A compatibilidade à infecção por *S. mansoni*, a distribuição pelo território brasileiro e importância epidemiológica, variam com a espécie de molusco e a região em que são encontrados (Carvalho et al., 2008).

Os estudos e o conhecimento sobre a distribuição geográfica dos hospedeiros intermediários de *S. mansoni* são importantes para o planejamento e execução dos programas de controle da doença (Teles et al., 1991). Lobato Paraense em 1970, produziu o primeiro mapa de distribuição das três espécies hospedeiras de *S. mansoni* no Brasil, atualizando-o ao longo dos anos (Paraense, 1972, 1975, 1986, 2001). O Ministério da Saúde, em 2008, redefiniu os dados de distribuição geográfica dos moluscos hospedeiros tendo o foco de transmissão da parasitose como tema de relevância para o Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (Carvalho et al., 2018). Segundo Carvalho et al. (2018), a distribuição geográfica das três espécies de hospedeiros intermediários de *S. mansoni* vem sendo progressivamente atualizada nos estados brasileiros.

Biomphalaria glabrata (Figura 2) é a espécie mais importante na transmissão da parasitose na região neotropical por apresentar ampla distribuição geográfica e alto grau de susceptibilidade (Paraense, 2008). A distribuição de *B. glabrata* está quase sempre associada à distribuição da esquistossomose (Carvalho et al., 2018) e o seu registro de ocorrência está delimitado pelos paralelos 0°53'S (Quatipuru, PA), 29°51'S (Esteio, RS), 53°44'S (Toledo, PR) e linha costeira (Carvalho et al., 2018), (Figura 3).

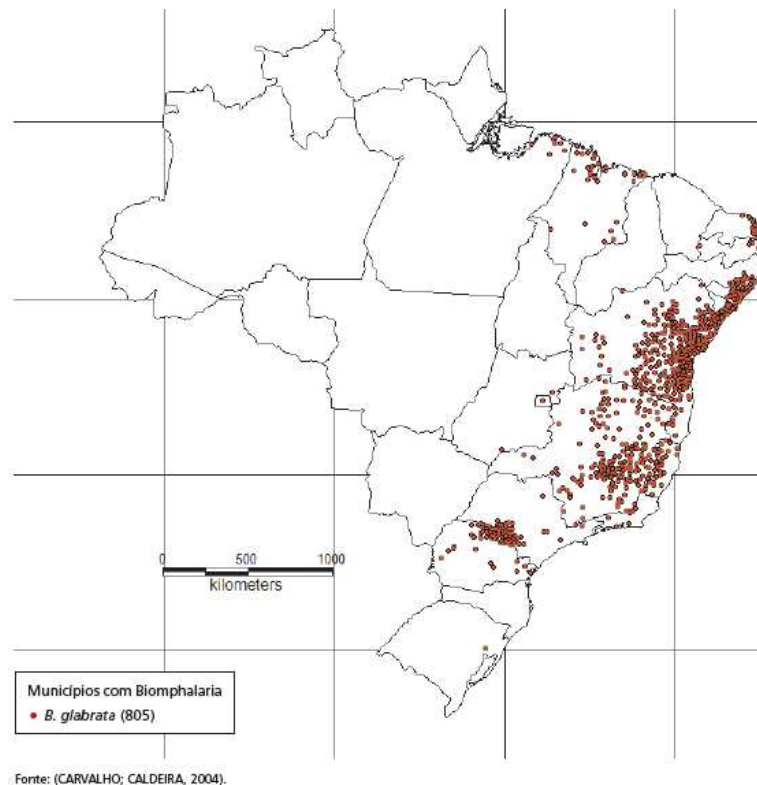
A concha de um caramujo adulto pode variar de 20 a 30 mm de diâmetro e largura de 5 a 8 mm. Em ambientes com condições mais favoráveis, como observado em Mascarenhas e Itarana no Espírito Santo, a concha de um indivíduo adulto pode chegar a medir 40 mm de diâmetro (Paraense, 2008).

Figura 2: *Biomphalaria glabrata*



Fonte: Carvalho et al, 2005

Figura 3: Distribuição espacial de *Biomphalaria glabrata* no Brasil



Biomphalaria tenagophila (Figura 4) apresenta importância epidemiológica na transmissão da doença nas regiões Sul e Sudeste. Essa espécie é a maior responsável pela transmissão do parasita no estado de São Paulo e, conseqüentemente, na ocorrência dos casos autóctones de esquistossomose mansoni nessa região. A ocorrência de *B. tenagophila*, está delimitada entre os paralelos 10°12'S e 33°41'S, meridiano 57°05'W e linha litorânea (Carvalho et al. 2018), (Figura 5).

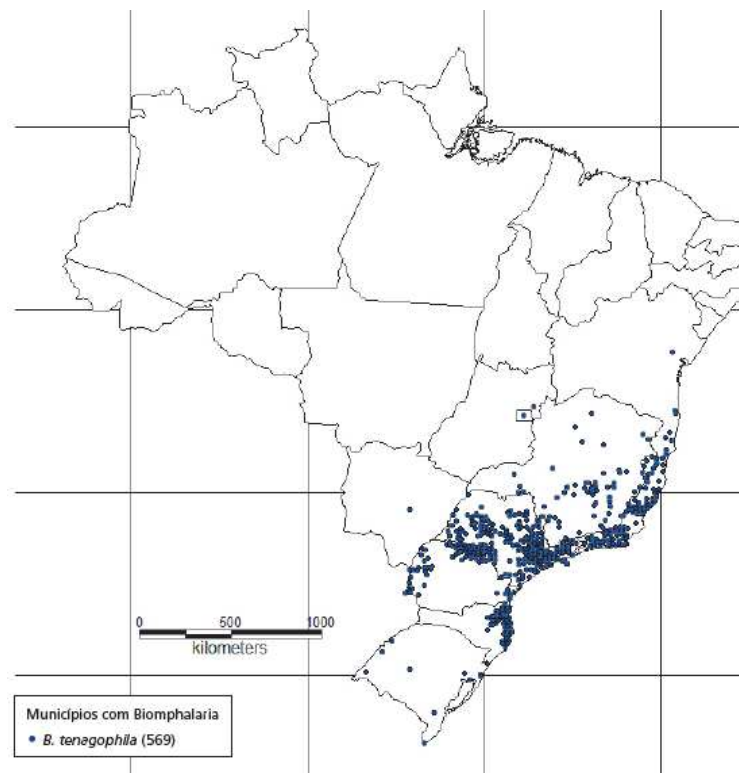
A concha de um indivíduo adulto pode chegar a 35 mm de diâmetro, porém o mais comum nas populações são animais com conchas de 25 mm de diâmetro.

Figura 4: *Biomphalaria tenagophila*



Fonte: Carvalho et al, 2005

Figura 5: Distribuição espacial de *Biomphalaria tenagophila* no Brasil



Fonte: (CARVALHO; CALDEIRA, 2004).

Biomphalaria straminea (Figura 6) é a espécie que apresenta uma boa adaptação às condições climáticas, sendo encontrada em quase todas as bacias hidrográficas do país. Mesmo possuindo uma baixa taxa de infecção natural ao *S. mansoni*, inferior a 1%, essa espécie é capaz de manter a transmissão do parasito com altas taxas de infecção humana em algumas áreas do Nordeste (Paraense & Corrêa, 1963). *Biomphalaria straminea* apresenta a mais abrangente distribuição entre as demais espécies de *Biomphalaria*, sendo encontrada entre os paralelos 02°54'S e 31°00'S, meridiano 44°43'W e litoral (Figura 7).

Os adultos podem apresentar concha com até 16,5 mm de diâmetro, mas geralmente não passam de 12 mm de diâmetro.

Figura 6: *Biomphalaria straminea*



Fonte: Carvalho et al, 2005

Figura 7: Distribuição espacial de *Biomphalaria straminea* no Brasil



Fonte: (CARVALHO; CALDEIRA, 2004).

1.2.4 Controle da esquistossomose mansoni

Em reuniões anteriores, o Comitê de Especialistas da OMS sobre a bilharziose recomendou o uso de moluscidas como uma medida importante para o controle da

esquistossomose na África (Coelho & Caldeira, 2016). O primeiro relatório da OMS de 1953 (WHO, 1953) recomendou o uso de moluscicidas com outras medidas de controle tradicionalmente usadas, como quimioterapia, provisão de saneamento básico, tratamento de água e educação sanitária.

Barbosa et al. (2008) fizeram um compilado histórico sobre as reuniões do Comitê de Especialistas da OMS abordando as pautas e suas recomendações aos longos dos anos, como exposto a seguir.

O segundo relatório, publicado em 1961, concluiu que a aplicação de moluscicida no combate aos hospedeiros intermediários era a medida isolada mais eficiente para controlar a esquistossomose (WHO, 1961). Dessa forma, foram feitas recomendações sobre os aspectos operacionais do uso dos moluscicidas, sob diferentes condições ecológicas na tentativa de ampliar a eficiência desse método de controle (Barbosa et al., 2008). Porém, associado ao uso de moluscicidas, também foi recomendado o uso de outras medidas, tais como, tratamento de pessoas infectadas, redução ou prevenção de contaminação de água através do saneamento e redução ou completa prevenção do contato humano com água contaminada. O Comitê reconhecia as dificuldades encontradas nessas medidas, uma vez que as drogas quimioterápicas ainda eram pouco eficientes e caras, a instalação de latrinas e saneamento não eram de fácil instalação e que evitar o contato humano com água contaminada seria complicado nas áreas de clima quente (Barbosa et al., 2008).

No terceiro relatório (WHO, 1965A), o Comitê reconhecia a importância das pesquisas realizadas em países endêmicos, inclusive as do Brasil. Contudo, o Comitê chamou a atenção sobre a expansão da doença com o desenvolvimento de esquemas de irrigação e outros recursos hídricos, e recomendava, para realização de inquéritos parasitológicos, a amostragem por localidade e residência, abrangendo todas as faixas etárias (Barbosa et al., 2008).

No relatório de 1967 (WHO, 1967), foi mencionado o contraste entre os avanços em pesquisas e a sua aplicação prática no controle da doença, recomendando que as descobertas fossem testadas em campo e avaliadas sob diferentes condições epidemiológicas. Além disso, voltaram a chamar a atenção sobre a expansão da doença em vários países, incluído o Brasil, nos estados do Sul e Maranhão (Barbosa et al., 2008).

Na década de 70, o Comitê relata a baixa aplicação dos programas de controle devido a deficiências de infra-estrutura, deficiência de pessoal qualificado e de orçamentos que impediam a continuidade das ações por períodos prolongados (WHO, 1973). O Comitê

não recomendava o desenvolvimento de novos quimioterápicos, devido ao alto custo das pesquisas clínicas e as exigências quanto à segurança dos fármacos. Reconhecia que o tratamento dos pacientes diagnosticados como positivos, juntamente com o controle dos caramujos apresentavam resultados mais rápidos sobre a incidência, prevalência e intensidade da infecção do que o uso de moluscicida isoladamente.

No relatório de 1980 (WHO, 1980), o Comitê registrou uma alteração significativa na abordagem do controle, passando a enfatizar a quimioterapia e as ações preventivas. Recebeu o nome de Controle Integrado e colocava o ser humano como o principal hospedeiro de *S. mansoni*, reconhecendo a importância do seu papel na continuação do ciclo de vida do parasito. Dessa forma, o uso de moluscicida passou a ser considerado medida auxiliar no controle. Os principais motivos para essa mudança foram o investimento da indústria farmacêutica em medicamentos mais eficazes e seguros, o custo crescente dos moluscicida, o desenvolvimento de técnicas diagnósticas quantitativas simples e rápidas e o sucesso inicial dos programas nacionais de controle.

Em 1985, houve uma mudança nas prioridades e abordagens operacionais e o controle da morbidade passou a ser o objetivo imediato. O uso de medidas integradas estava além dos recursos financeiros e humanos, encontrados na maioria dos países endêmicos.

No único relatório da década de 90 (WHO, 1993), foi reforçada a importância das diretrizes apresentadas no relatório de 1985, ressaltando os avanços obtidos pelos programas de controle da morbidade. Além disso, recomendava a integração do controle da esquistossomose com as geo-helmintoses para melhor custo benefício dos programas.

Em 2002 (WHO, 2002), o Comitê de Especialistas recomendou o controle conjugado da esquistossomose aos das geo-helmintoses e o tratamento de grupos de alto risco sem diagnóstico individual prévio. Os principais alvos para o tratamento periódico e sistemático passam a ser as crianças em idade escolar e grupos ocupacionais com alta frequência de contato com os criadouros (plantadores de cana, pescadores e mulheres em tarefas domésticas).

Após o início da terapia preventiva em conjunto com o desenvolvimento sócio econômico e com as mudanças ambientais no mundo, foi possível observar o controle da morbidade, além da interrupção da transmissão da doença em alguns países (WHO, 2013). A partir dessas mudanças, a Organização Mundial de Saúde (OMS) anunciou na resolução WHA65.21 de 2012 a eliminação da doença até 2025 em países do continente africano, e até 2020 para os demais (WHO, 2012 a; b). Essas metas foram estabelecidas levando em

consideração o perfil epidemiológico de cada país, sendo que para o Brasil, a determinação foi intensificar o controle da morbidade até 2019 e eliminar a transmissão em 2020 (WHO, 2014). No Brasil, a transmissão continua concentrada nas regiões Sudeste e Nordeste, afetando principalmente populações de baixa renda, com precariedade de saneamento básico. Entre 2011-2014, Minas Gerais e Pernambuco foram as áreas mais afetadas (WHO, 2014).

1.2.4.1 Controle dos hospedeiros intermediários

Os métodos de controle dos caramujos, hospedeiros intermediários podem ser classificados em biológico, físico e químico. O método biológico ocorre através da introdução de organismos com ação predadora, competidora, parasitária ou patogênica sobre os moluscos hospedeiros. O método físico consiste na alteração do meio, capaz de impedir o desenvolvimento e a manutenção das populações dos moluscos. O método químico se dá através da aplicação de moluscicida, produtos tóxicos aos caramujos, nos criadouros. Como as três modalidades implicam ações de maior ou menor impacto ambiental, sua implementação depende de estudos prévios, tendo em vista a legislação ambiental local (Ministério da Saúde, 2008).

1.2.4.1.1 Métodos biológicos

O controle a partir do método biológico consiste na introdução de outras espécies animais, sejam competidoras ou predadoras, dos caramujos hospedeiros intermediários. Os estudos sobre o controle biológico têm sido realizados desde a década de 50, principalmente em caráter experimental, em especial a interação competitiva entre caramujos (Ministério da Saúde, 2008). Em 1957, Michelson publicou uma revisão, compilando 148 citações bibliográficas, sobre os competidores predadores e parasitos dos caramujos. Contudo, a introdução de espécies exóticas sem a devida avaliação pode ser extremamente nociva ao equilíbrio ambiental e ferir a legislação ambiental (Ministério da Saúde, 2008).

Os animais comumente conhecidos como predadores de planorbídeos são as planárias, sanguessugas, insetos, crustáceos e peixes.

A utilização de peixes no controle, demonstraram efetividade e eficácia na predação de caramujos planorbídeos. Vários autores têm demonstrado a ação malacófaga de algumas

espécies de peixes. (Anderson & Gobert, 1924; Oliver-González, 1946; Hora, 1952; Weinzett & Jurberg, 1990; Chimbari et al., 1997)

Cichlasoma ocellatum foi capaz de eliminar planorbídeos com mais de 3 cm de diâmetro e *Astronotus ocellatus* impediu o crescimento de populações de *B. glabrata* através da ingestão de massa de ovos depositados em paredes de aquário e de caramujos recém-eclodidos. (Ministério da Saúde, 2008)

Espécies de camarões do gênero *Macrobrachium* e sanguessugas do gênero *Helobdella*, têm sido utilizadas em pesquisas no laboratório e no campo como prováveis competidores e predadores de *Biomphalaria* spp. (Brumpt, 1941). Sabe-se que alguns dípteros do gênero *Sciomyza* (Berg, 1953), as larvas de *Luciola cruciata* (Maria et al., 1967), o Ostracoda *Cyprretta kawatai* (Sohn & Kornicker, 1972) e hemípteros *Limnogeton fieberi* (Belostomatidae) (Voelker, 1968), são predadoras de *Biomphalaria* spp.

Coelho et al. (1975), mostraram que o quelônio sul americano, *Chrysemys (Trachemys) dorbignii* possui potencial no combate à *B. glabrata*. Os autores observaram que em poucas horas esses répteis predaram um número considerável de caramujos.

Com relação aos moluscos, o caramujo *Marisa cornuarietis* (Linnaeus, 1758) foi a espécie mais estudada até a década de 60 no controle de populações naturais de *B. glabrata* em Porto Rico. *Marisa cornuarietis* além de competir por alimento, preda acidentalmente indivíduos jovens e ovos de *Biomphalaria*, dessa forma, como já observado em alguns locais, podem eliminar as populações dos caramujos hospedeiros de *S. mansoni* (Freitas & Santos, 1995).

Nos anos de 1970, o caramujo *Pomacea haustrum* (Reeve, 1856), foi introduzido em diques, lagos e rios de Minas Gerais e São Paulo com o objetivo de competir e eliminar os indivíduos de *Biomphalaria* (Paulinyi & Paulini 1972). Contudo, essas espécies coexistiram por aproximadamente dez anos sem alterações das densidades populacionais dos caramujos hospedeiros (Paraense, 1987).

Já o molusco *Melanooides tuberculata* (Müller, 1774), demonstrou uma efetiva redução das populações de *Biomphalaria* em Santa Lúcia, Martinica, Porto Rico (Pontier & Jourdane, 2000).

Diversas desvantagens do uso de espécies de moluscos competidores são observadas. A introdução de espécies exóticas pode reduzir ou eliminar a biodiversidade nativa e algumas espécies são hospedeiras intermediárias de trematódeos e nematódeos

podendo ocorrer a introdução de parasitos em novas regiões. Além disso, várias espécies de moluscos podem coexistir com os planorbídeos (Abílio, 2002).

Uma forma de driblar as desvantagens da introdução de caramujos competidores ou predadores é a introdução de caramujos que possuem resistência à infecção do parasito. Hubendick (1958) chamou a atenção sobre a possibilidade do desenvolvimento de um método de controle biológico entre cepas resistentes e suscetíveis a *Schistosoma mansoni*. Alguns estudos já demonstraram que uma linhagem de *B. tenagophila*, encontrada na Reserva Biológica do Taim no Rio Grande do Sul, é completamente resistente à infecção pelo *S. mansoni* (Santos et al., 1979). Além disso, esta resistência à infecção parasitária é uma característica dominante e é transferida após o cruzamento desses indivíduos com caramujos *B. tenagophila* susceptíveis à infecção (Santos et al., 1979; Freitas et al., 1985). Dessa forma, indivíduos de *B. tenagophila* resistentes foram introduzidos em locais onde haviam apenas indivíduos de *B. tenagophila* suscetível ao parasita. Quatorze meses após a introdução dos caramujos resistentes foi observado que a suscetibilidade dos moluscos à infecção por *S. mansoni* diminuiu de 38,6–26,5% para 2,1% (Marques et. al, 2014).

1.2.4.1.2 Métodos físicos

Como métodos de controle físico podem ser realizados saneamento hídrico e manejo ambiental. Consistem, principalmente, na eliminação de criadouros pelo aterramento de coleções hídricas, sempre que a medida for tecnicamente recomendada. Também podem ser realizados a drenagem e a retificação de leitos, o revestimento e a canalização dos cursos d'água. Algumas vezes, soluções de baixo custo, como a limpeza e a remoção da vegetação aquática, são suficientes (Ministério da Saúde, 2008).

Na década de 50, quando os medicamentos não eram tão eficazes e seguros no tratamento da população e quando os moluscicidas químicos tinham ação limitada e pouco seletiva, os métodos físicos representavam a única alternativa de controle possível (Ministério da Saúde, 2008).

Atualmente, pequenas obras de saneamento ambiental, como o aterro, a drenagem e a retificação de coleções hídricas podem representar a solução permanente para o controle da esquistossomose em uma determinada localidade. Essas medidas devem ser selecionadas por critérios epidemiológicos e sua implementação, viabilizada por meio da pactuação entre diferentes órgãos do governo (Ministério da Saúde, 2008).

1.2.4.1.3 Métodos químicos

O método químico consiste na aplicação de moluscicidas, substâncias químicas sintéticas ou de origem natural que matam caramujos. Após a realização do inquérito malacológico e seleção dos criadouros que devem ser tratados, deve-se elaborar o plano para aplicação do moluscicida. Os melhores resultados são obtidos quando o moluscicida é aplicado em áreas relativamente livres de vegetação densa (Ministério da Saúde, 2008).

Recentemente, a OMS publicou um manual operacional para facilitar a reintrodução de práticas e protocolos de uso de moluscicidas em campo, nos programas de controle da esquistossomose, reafirmando a importância do uso de moluscicidas. De acordo com o manual, as operações químicas de controle do caramujo podem ser divididas em três fases: Fase 1 (planejamento), fase 2 (intervenção) e fase 3 (monitoramento e avaliação) (WHO, 2017).

Para que um produto seja usado como moluscicida, é necessário apresentar algumas propriedades indispensáveis, a exemplo do que ocorre com outros defensivos: deve ser eficaz contra os moluscos, mesmo quando empregado em baixas concentrações; deve ter baixo custo, propriedade que nem sempre depende da primeira; não pode ser tóxico aos seres humanos, aos animais aquáticos ou às plantas; não pode ter efeitos acumulativos nos tecidos de humanos e dos animais aquáticos; deve ser de fácil manipulação. No passado, diversos produtos com propriedades moluscicidas foram testados e utilizados em campo. No entanto, apenas a niclosamida é aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) (CAS n.º 50-65-7) para uso em programas de controle (Ministério da Saúde, 2008).

Na China, antes da década de 1950, alguns moluscicidas sintéticos, como o pentaclorofenato de sódio (NaPCP), eram amplamente utilizados, porém foram proibidos devido às preocupações com segurança e poluição ambiental causadas por ele (Chen, 2003). Após a proibição, o governo chinês iniciou programas de controle de doenças generalizadas usando quimioterapia em massa em regiões altamente endêmicas e quimioterapia seletiva em áreas de baixa e média endemicidade associada ao controle de caramujos através de moluscicidas e modificações ambientais, como canais de cimento, reajuste de sistemas de irrigação, etc. (Zhou et al., 2005). Isso resultou na redução da prevalência e morbidade da doença, atingindo seus níveis mais baixos entre 1989 e 1995 de quase 50% em humanos e 32% em animais como gado bovino e búfalo (Zhou et al., 2005; Yuan et al., 2000).

Atualmente, o moluscicida utilizado na China é a niclosamida, recomendada pela OMS desde a década de 1960 (WHO, 1961). Yang et al. (2010) conduziram uma revisão sistemática e meta-análise para avaliar os efeitos moluscicidas de uma combinação que atualmente é recomendada composta de niclosamida etanolamina sal em pó molhável 50% e niclosamida etanolamina sal em pó a 4% desenvolvido por He et al. (2007). Eles concluíram que a combinação desses sais de niclosamida, é eficiente para obtenção de bons resultados quando usados em programas de controle da esquistossomose (Yang et al., 2010).

King et al., 2015 mostraram a partir da meta-análise de 35 estudos de prevalência de infecção que houve redução de 77% após o uso de moluscicida, com diminuição da prevalência se combinada com terapia medicamentosa. Assim, concluíram que a aplicação regular de moluscicida focal contra *Bulinus* e *Biomphalaria* spp. contribuíram para a eliminação da esquistossomose em áreas de alto risco. Sokolow et al., 2016 avaliaram as tentativas de controle da esquistossomose em larga escala identificando fatores que predizem o sucesso do programa de controle. Eles compilaram informações históricas sobre táticas de controle e seus resultados quantitativos para 83 países. Os autores observaram que nos programas que usam o controle de caramujos, a prevalência da doença foi reduzida em 92% e nos programas que usaram pouco ou nenhum controle dos hospedeiros intermediários, a prevalência reduziu apenas 37%. Esses estudos mostram que o controle de caramujos tem sido a maneira mais eficaz de reduzir a prevalência de esquistossomose. Assim, combinar programas de controle baseados no tratamento dos indivíduos infectados com controle dos hospedeiros intermediários parece ser a melhor estratégia para controlar a esquistossomose.

No Brasil o controle dos caramujos foi realizado até 2001 com a aplicação do moluscicida sintético Bayluscide® (niclosamida), produto importado e comprovadamente tóxico para os demais organismos do ambiente aquático (Andrews et al., 1983). Devido à comprovada toxicidade da niclosamida, a partir de 2002 o Ministério da Saúde não recebeu mais registros para a utilização do Bayluscide® (Coelho & Caldeira, 2016). Além disso, atualmente não há estoque do moluscicida no Ministério da Saúde para uso em áreas endêmicas (comunicação pessoal, Jeann Marie R. Marcelino, Assessora Técnica/MSc Saúde Pública in Coelho & Caldeira, 2016).

1.3 Moluscidas naturais

A busca por moluscidas derivados de produtos naturais, em especial de plantas, acompanha a tradição milenar da humanidade de utilizar a natureza para suprir suas necessidades básicas como a alimentação, a habitação e o tratamento de suas enfermidades. Há numerosos relatos de uso de produtos naturais medicinais desde milênios antes de Cristo e parte deles estão registrados na London Pharmacopoeia, datada de 1618 (Kloos & McCullough, 1987).

A partir do desenvolvimento dos métodos científicos de isolamento de substâncias, iniciado nos séculos XVIII e XIX, foram obtidos alguns produtos naturais puros como a morfina, a estriquinina, colchicina e quinino dentre outros. Tais descobertas impulsionaram o desenvolvimento da indústria farmacêutica e a morfina é o exemplo de um primeiro produto natural puro comercializado, lançado pela companhia E. Merck em 1826 (Kloos & McCullough, 1987).

No século XX, intensificou-se a busca pelos produtos derivados das plantas, seja por interesse acadêmico ou industrial, destacando-se uma crescente atividade de bioprospecção da rica biodiversidade do planeta. A necessidade de moluscidas eficientes e ecologicamente aceitáveis acompanhou a tendência de pesquisa de produtos naturais na busca por substâncias ativas para o desenvolvimento de produtos alternativos (Kloos & McCullough, 1987).

Os moluscidas de origem vegetal foram testados pela primeira vez no ano de 1930 (Mozley, 1939). Na mesma década, foi sugerido o plantio de uma árvore típica do deserto, a espécie *Balanites aegyptiaca* L. (Balanitaceae), nas margens dos focos de transmissão de esquistossomose, no Sudão. Como descrito por Archibald (1933), seus frutos, ao caírem das árvores, diminuía a densidade populacional de caramujos. Desde a década de 30, pesquisas envolvendo espécies vegetais com potencial moluscida vêm sendo realizadas. Aproximadamente 1.100 espécies vegetais já foram descritas (Lemma & Yau, 1974; Kloos & McCullough, 1987; Farnsworth et al., 1987), sendo que aproximadamente 360 espécies foram identificadas no Brasil (Jurberg et. al., 1989). Dentre as primeiras espécies testadas no Brasil, estão os extratos aquosos de caules de *Serjania* spp. (cipó-timbó) e de frutos de *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae) (saboneteira, sabão), cuja atividade foi avaliada utilizando-se *B. glabrata*. A ação moluscida observada nessas plantas foi associada às saponinas presentes nas mesmas (Pinto & Almeida, 1944).

Diversas plantas foram testadas no Brasil e algumas estão referidas nos trabalhos de Amarin & Pessoa, 1962; Mendes et al., 1984; Rouquayrol et al., 1972; Silva et al., 1971; Schall et al., 1998. Na extensa revisão de Mott (1987), cerca de 20 espécies foram descritas como tendo alto potencial letal para os hospedeiros intermediários da esquistossomose. Entretanto, nenhuma delas atende a todos os requisitos referidos pelo comitê de especialistas da OMS (Mott, 1987), como essenciais para que uma planta possa vir a ser usada em larga escala como moluscicida.

De todas as plantas referidas na literatura, *Euphorbia milii* (syn. *splendens*) var. *hislopii*, apresenta a menor dose letal já referida, e atende ao primeiro requisito colocado pela OMS, que estabelece em até 20 ppm, o valor das DL₉₀, para que uma planta seja considerada efetiva (Vasconcellos & Schall, 1986).

Atualmente, existe um crescente interesse no desenvolvimento de tecnologias apropriadas que permitam o uso de produtos naturais com propriedades moluscicidas. Esse interesse se ressalta, tendo em vista o alto custo dos moluscicidas sintéticos, sua toxicidade generalizada para a flora e fauna dos ambientes tratados, e dificuldades operacionais de transporte e aplicação, o que os torna proibitivos para esta finalidade.

1.4 *Euphorbia milii* var. *hislopii*

Euphorbia milii var. *hislopii* (NEBr.) Ursch & Leandri 1955 (Sin. *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B.) (The Plant List, 2013) (figura 8), conhecida popularmente como "coroa-de-Cristo", é uma planta ornamental, originária de Madagascar e introduzida no Brasil e comumente usada como cerca viva (Corrêa, 1984). Essa euforbiácea produz uma grande quantidade de látex durante todo o ano (Baptista et al., 1994), sendo esse um dos mais potentes moluscicidas naturais encontrados dentre as mais de mil espécies de plantas já estudadas (Mott, 1987). O látex de *E. milii* é composto por diferentes substâncias apolares, com pouca solubilidade e sua propriedade moluscicida provavelmente deve-se ao princípio ativo denominado miliaminas (substâncias tóxicas responsáveis pela ação irritante do látex), identificadas por Zani et al. (1993).

Figura 8: *Euphorbia milii* var. *hislopii*



Fonte: Cynthia de Paula Andrade

Nos ensaios de laboratório realizados inicialmente, as doses letais para 90% dos caramujos (DL_{90}), da solução aquosa do látex da espécie *E. milii* foram menores que 0,5 ppm para *B. glabrata* e *B. tenagophila* criadas em laboratório e 4,00 ppm para *B. tenagophila* trazida do campo (Vasconcellos & Schall, 1986). Em estudo posterior, as DL_{90} obtidas, variaram de 0,13 ppm para *B. glabrata* (látex liofilizado) a 4,00 ppm para *B. pfeifferi*, com o látex “in natura” (Schall et al., 1998). Neste estudo, foram também estabelecidas as DL_{90} para as espécies *B. straminea* e *Bulinus* sp. Por meio deste trabalho, foi demonstrada a ação letal para os moluscos *B. pfeifferi* e *Bulinus* sp., hospedeiros intermediários de *S. haematobium*, causador da esquistossomose vesical na África, abrindo perspectivas para futuros estudos de campo nesse continente onde a esquistossomose apresenta altas taxas de prevalência em vários países.

Testes toxicológicos utilizando o látex integral foram concluídos com resultados encorajadores, tais como: ausência de irritabilidade cutânea e ocular (Freitas et al., 1991), ausência de mutagenicidade e citotoxicidade (Schall et al., 1991; Zamith et al., 1996), ausência de embriofetotoxicidade (Souza et al., 1997). Todos os estudos não revelaram efeitos tóxicos nas concentrações usadas como moluscicida. Além disso, estudos mostram que os extratos de *E. milii* contêm compostos com atividade anti-inflamatória bem como compostos anticancerígenos (Rao & Sussela 1982). Lee et. al (1982) relatam que a planta é usada pelos chineses na medicina popular no tratamento de hepatite e edema abdominal.

O látex é um moluscicida fotodegradável (Oliveira-Filho & Paumgarten, 1997), significativamente menos tóxico do que a niclosamida para peixes, microcrustáceos, oligoqueta, larvas de mosquitos. Além disso, o látex de *E. milii* não inibiu o crescimento das algas clorofíceas (*Selenastrum capricornutum* e *Chlorella vulgaris*) e não apresentou efeito inibitório para as bactérias (*Echerichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *P. putida*) (Oliveira-Filho & Paumgarten, 2000).

O peixe *Danio rerio* (Hamilton, 1822), conhecido popularmente como zebrafish ou paulistinha (Figura 9), é um teleósteo de água doce da classe Actinopterygii e família Cyprinidae considerado um importante modelo animal utilizado nas áreas da ciência (Grunwald, 2002). As bases moleculares da neurobiologia e o genoma similar ao dos humanos proporcionam o seu uso em diversos tipos de estudos, que incluem toxicológicos, genéticos e patológicos (Streisinger et al., 1981; Howe et al., 2013). *Danio rerio* é um modelo animal que apresenta grande sensibilidade quando exposto a produtos químicos, pois apresenta capacidade de absorver de forma rápida os compostos que são adicionados na água e acumulá-los em diferentes tecidos, principalmente no Sistema Nervoso Central (Grossel & Wood, 2002).

Figura 9: Peixe *Danio rerio* adulto e alevino.



Fonte: cdn.theconversation.com/files/23124/area14mp/j2d37jyj-1367449393.jpg

Schall et al. (1992) avaliaram a variação da ação moluscicida do látex de *E. milii* com relação às estações do ano e áreas geográficas de coletas. Nesse estudo o látex apresentou apenas uma pequena variação na sua potencialidade, com doses letais (DL₉₀) 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. Em contraste, Vasconcellos & Amorim (2003) ao testarem o látex

contra *L. columella* observaram que existem variações entre as estações do ano no que diz respeito à atividade moluscicida nesse caramujo. Além disso, foi demonstrado que a atividade moluscicida do látex natural permanece inalterada, quando o mesmo foi armazenado por até 124 dias em temperatura ambiente e por 736 dias em frascos fechados (látex liofilizado) em refrigerador (Schall et al., 1992).

Schall et al. (2001) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a eficiência do moluscicida em condições de campo. A aplicação do látex foi realizada em um riacho na área rural endêmica em Minas Gerais, na cidade de Comercinho. Os autores observaram que houve uma redução da densidade de caramujos no riacho tratado com látex em comparação com o riacho não tratado. Além disso, os autores realizaram coletas de acompanhamento até o 14º mês após as aplicações, não sendo encontrados caramujos durante esse período.

Dessa maneira, considerando a comprovada importância do uso de moluscidas no controle da esquistosomose, a necessidade de um produto menos tóxico para os demais organismos que coabitam o ambiente aquático onde vivem os caramujos, um produto com custo reduzido e que seja ecologicamente aceitável, o objetivo desse trabalho de doutorado foi a elaboração de um kit protótipo moluscicida, produzido a partir do látex liofilizado de *E. milii*.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Desenvolver um produto moluscicida do látex extraído da planta *Euphorbia milii* var. *hislopii*, para aplicação em ambientes aquáticos, como medida de controle da esquistossomose.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Estabelecer o cultivo de *Euphorbia milii* var. *hislopii* para obtenção do látex;

2.2.2 Desenvolver o processo de liofilização e reidratação do látex extraído de *E. milii*;

2.2.3 Elaborar um kit protótipo do moluscicida;

2.2.4 Determinar a dose letal de 100% (DL₁₀₀) do kit protótipo sobre os caramujos *B. glabrata* (infectados e não infectados com *S. mansoni*); *B. tenagophila* e *B. straminea*;

2.2.5 Avaliar a estabilidade térmica do kit protótipo em função do tempo;

2.2.6 Avaliar os efeitos toxicológicos do kit protótipo em alevinos de *Danio rerio*;

2.2.7 Avaliar a atividade do kit protótipo em condição semi-natural.

3. Material e Métodos

A representação das etapas de desenvolvimento do trabalho está ilustrada na figura 11, através do fluxograma.

3.1 Área de cultivo de *Euphorbia milii* var. *hislopii*

Em 2010 foi estabelecido um acordo entre o Instituto Renê Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (IRR-FIOCRUZ), através da doutora Virgínia Schall, e a Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), que cedeu um espaço para o cultivo de *E. milii* na Fazenda Modelo da UFMG, localizada na cidade de Pedro Leopoldo. Porém, a plantação não se desenvolveu de maneira satisfatória no local devido à falta de manutenção básica, tais como limpeza do lote, irrigação, fertilização, proteção contra animais de grande porte, além da característica do solo argiloso. Outro problema encontrado no local do cultivo, foi a infestação por carrapatos que dificultava as coletas e colocava em risco a saúde da equipe.

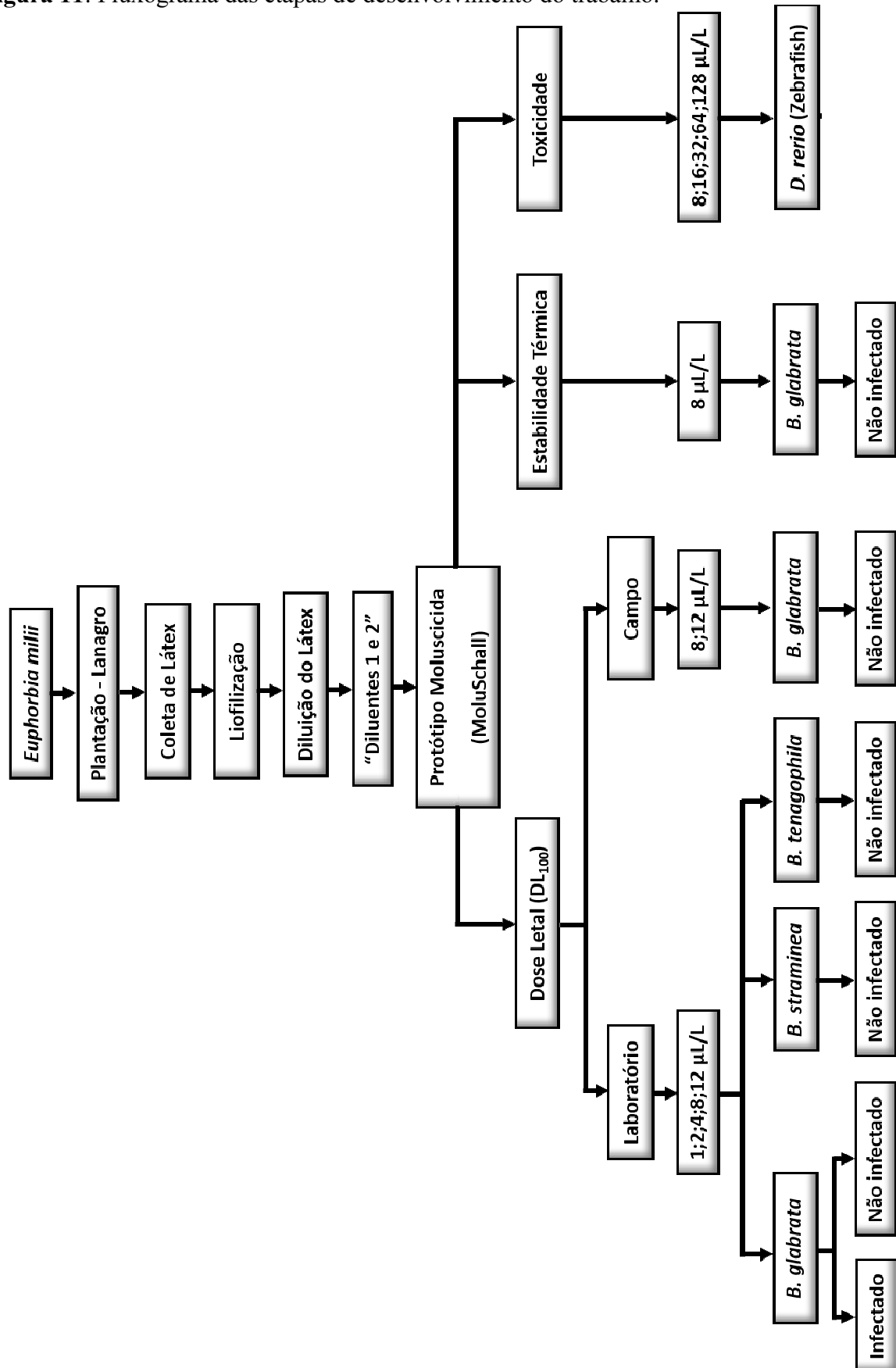
Em fevereiro de 2016 foi firmada uma parceria entre o IRR-FIOCRUZ e o Laboratório Nacional Agropecuário do Ministério da Agricultura e Abastecimento (LANAGRO/MG) que possibilitou a transferência dos exemplares de *E. milii* cultivados na Fazenda Modelo da UFMG para uma área de aproximadamente 1.350 m² nas dependências do LANAGRO em Pedro Leopoldo, Minas Gerais (latitude 19°38'01.9"S longitude 44°02'42.3"W), figura 10.

A plantação possui irrigação e recebe manutenção incluindo o controle de ervas daninhas, por meio de capinas com enxada, alternadas com utilização de aplicações de herbicida Roundup®²ultra. A adubação é realizada utilizando-se fertilizante nitrogenado de fórmula NPK 20-05-20 e adubo orgânico (esterco de curral). Além disso, na área existe uma proteção contra animais de grande porte e aplicações periódicas de carrapaticida.

Figura 10: Plantação de *Euphorbia milii* var. *hislopii*, LANAGRO/MG.



Figura 11: Fluxograma das etapas de desenvolvimento do trabalho.



Fonte: Elaborado por Paulo Ricardo Silva Coelho e Cynthia de Paula Andrade

3.2 Obtenção do látex de *Euphorbia milii* var. *hislopii*

O látex de *E. milii* utilizado nos experimentos descritos a seguir, foi obtido a partir de exemplares cultivados na plantação estabelecida no LANAGRO. O látex bruto foi extraído manualmente através da incisão do caule da planta, com o auxílio de canivete e recolhido por gotejamento em frascos do tipo Falcon® de 50 mL, (Figura 12). Estes frascos foram armazenados e transportados em caixa térmica até o laboratório do Grupo de Pesquisas Públicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias (PCPP/IRR). Para evitar o contato com o látex *in natura*, durante as coletas foram utilizados equipamentos de proteção individual (EPI) como luvas, botas e óculos de proteção.

Figura 12: Coleta do látex de *Euphorbia milii* var. *hislopii*.



Fonte: Cynthia de Paula Andrade e Paulo Ricardo Silva Coelho

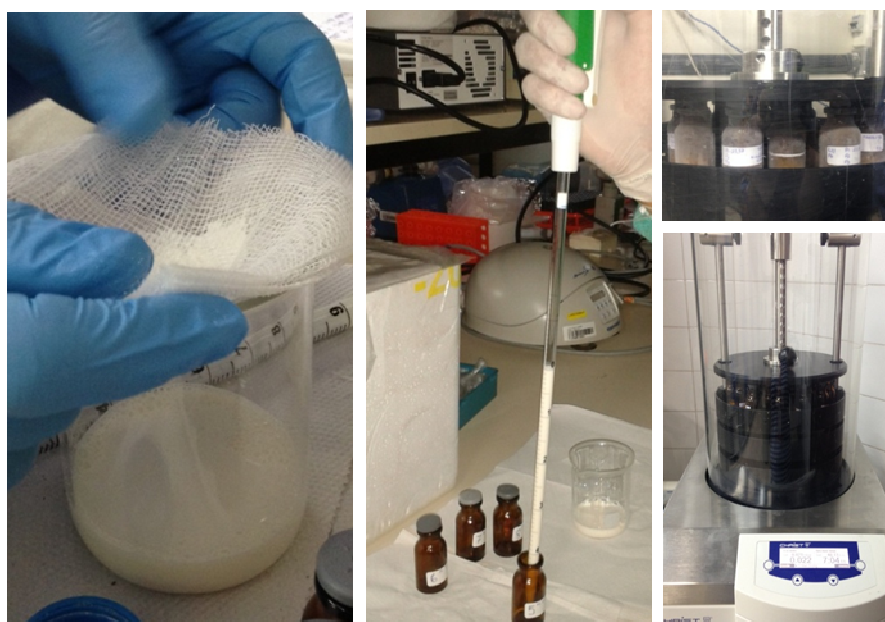
3.3 Liofilização do látex de *Euphorbia milii* var. *hislopii*

No laboratório PCPP/IRR, o látex *in natura* foi filtrado através de gaze cirúrgica e o pH verificado através de pHmetro (Hanna Instruments, Woonsocket, Rhode Island, USA). Uma alíquota de 5 mL do látex filtrado foi transferida para frascos do tipo penicilina de cor âmbar, pesados em balança analítica antes e após a adição do produto. O látex alíquotado foi congelado a -80°C e liofilizado durante 24 horas em liofilizador Alpha2-4LDplus, (Martin

Christ GmbH, Osterode am Harz, GE), estabilizado em temperatura de -55°C e 0,020 milibares de pressão, (Figura 13).

Ao final do processo os frascos foram lacrados sob vácuo, retirados do liofilizador e pesados em balança analítica. O cálculo de rendimento do produto final foi realizado a partir da relação entre o peso do látex líquido e o peso do látex liofilizado.

Figura 13: Processo de filtração do látex *in natura*, transferência para frascos do tipo penicilina e liofilização do látex de *Euphorbia milii* var. *hislopii*.



Fonte: Cynthia de Paula Andrade e Paulo Ricardo Silva Coelho

3.4 Reidratação do látex de *Euphorbia milii* var. *hislopii* liofilizado

Em experimentos anteriores, observamos que a água não reidratou completamente o látex de *E. milii* liofilizado, permanecendo alguns agregados de látex após ressuspensão. A fim de melhorar a reidratação do látex liofilizado de *E. milii*, uma série de reagentes aditivos foram testados. Os reagentes foram adicionados ao látex, contidos em frascos do tipo penicilina. A mistura foi homogeneizada, congelada a -80°C e liofilizada durante 24 horas em liofilizador Alpha2-4LDplus, estabilizado em temperatura de -55°C e 0,020 milibares de pressão. Dessa forma, foram testados trealose 5%, trealose 5% + manitol 10%, trealose 5% + betaina 10%, manitol 5% e 20%, N- carboximetilcelulose (CMC) 5% e 10%, CMC 0,5% +

manitol 15%, manitol 5% + dodecil sulfato de sódio (SDS) 2%, N-acetilcisteína (NAC) 0,16 M, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 2mg/mL.

Após o processo de liofilização, o produto final foi reidratado com água e a dissolução do látex foi avaliada visualmente. Após vários testes, adicionando os reagentes ao látex antes do processo de liofilização, foi desenvolvida uma formulação composta por dois diluentes, denominados neste trabalho como "Diluyente 1" e "Diluyente 2". É importante ressaltar que os "Diluentes 1 e 2" foram adicionados diretamente ao látex liofilizado, para reidratar o látex em pó. Depois de adicionar o "Diluyente 1" seguido do "Diluyente 2" foi possível obter uma reidratação completa do látex de *E. milii* liofilizado.

3.5 Prova de conceito do látex liofilizado

Na fase de prova de conceito, o látex liofilizado foi reidratado com "Diluyente 1" e "Diluyente 2" e testado contra *B. glabrata*. Para isso, foram utilizados 30 exemplares de *B. glabrata* não infectados, com conchas de 10 a 12 mm de diâmetro, criados no Moluscário Lobato Paraense, IRR / FIOCRUZ. Os caramujos foram submetidos às diluições do látex de 0,1 µL/L e 10 µL/L. A taxa de mortalidade foi de 80% na concentração de 0,1 µL/L e de 100% na concentração de 10 µL/L, confirmando a atividade moluscicida do látex após o processo de liofilização.

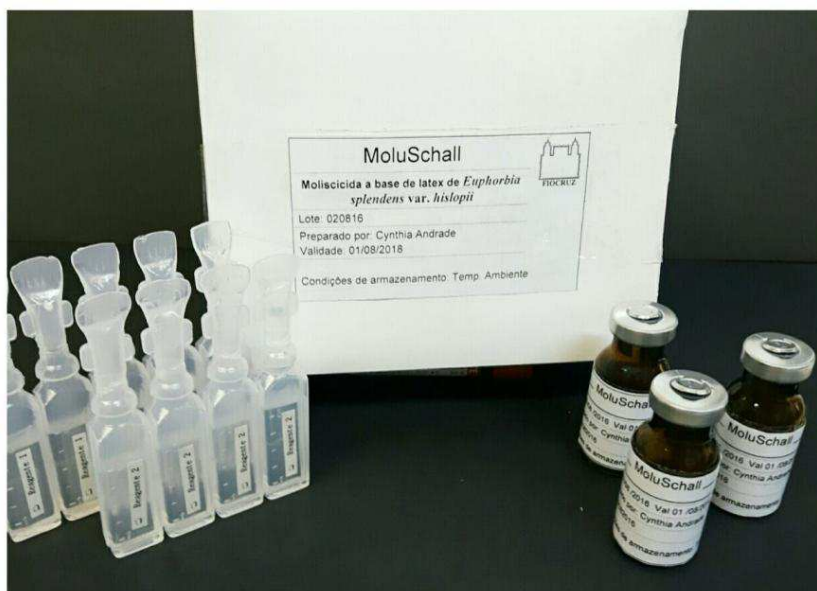
3.6 Elaboração do kit protótipo do moluscicida

O kit protótipo foi composto por 10 frascos de látex liofilizado, 10 frascos de "Diluyente 1" (5 mL) e 10 frascos de "Diluyente 2" (5 mL), (Figura 14).

O kit protótipo moluscicida foi nomeado de MoluSchall em homenagem a Dr^a Virgínia Torres Schall (*in memoriam*), a pesquisadora que idealizou o moluscicida em seu trabalho pioneiro de 1986 (Vasconcellos & Schall, 1986; Schall et al., 1991; Schall et al., 1992; Schall et al., 1998). Além disso, em 1988 e 1990, com base nos resultados promissores obtidos pela equipe da Dra Virgínia Torres Schall, o Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil) depositou duas patentes para coleta e uso do látex contra moluscos, hospedeiros intermediários de *S. mansoni* (PI 8805556-6 A2; PI 9005535-7 B1). Já em 2010, o Ministério da Saúde mostrou interesse na elaboração desse moluscicida através de uma carta endereçada à Dra. Virginia Torres Schall (Anexo 2).

Após a elaboração do kit protótipo MoluSchall, foi solicitado junto ao Núcleo de Inovação Tecnológica do IRR– NIT, o Estudo de Viabilidade Patentária – EVP.

Figura 14: Protótipo de kit moluscicida MoluSchall



Fonte: Edward Oliveira

3.7 Determinação da dose letal (DL_{100}) de MoluSchall em espécies de *Biomphalaria*

A determinação da dose letal de 100% dos caramujos (DL_{100}) foi realizada como recomendada por WHO (1965 B; 1983) e descrita por Schall et al. (1998). Exemplos do gênero *Biomphalaria*, provenientes do Moluscário Lobato Paraense (IRR) foram utilizados nos experimentos.

3.7.1 Caramujos utilizados: *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea*

Neste estudo, foram utilizados os seguintes caramujos: 600 *B. glabrata*, não infectadas, medindo de 3 a 6 mm de diâmetro; 2.430 *B. glabrata*, não infectadas, medindo de 10 a 12 mm de diâmetro; 180 *B. glabrata*, não infectadas, medindo de 12 a 17 mm de diâmetro e 180 *B. glabrata*, com 39 dias de infecção por *S. mansoni* (linhagem LE), medindo de 12 a 17 mm de diâmetro. Também foram utilizadas 180 *B. tenagophila*, não infectadas,

medindo de 10 a 12 mm de diâmetro e 180 *B. straminea*, não infectadas, medindo de 5 a 10 mm de diâmetro.

Todos os caramujos utilizados neste estudo foram cedidos pelo Moluscário Lobato Paraense, IRR / FIOCRUZ.

3.7.2 Determinação da dose letal (DL_{100}) em *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*

Neste experimento foram utilizados 540 moluscos separados nos seguintes grupos, como ilustrado nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1: Grupos das espécies de *Biomphalaria*

Grupo	Espécies de <i>Biomphalaria</i>	Quantidade de caramujos utilizados
A	<i>B. glabrata</i>	180 adultos (10-12 mm)
B	<i>B. tenagophila</i>	180 adultos (10-12 mm)
C	<i>B. straminea</i>	180 adultos (5-10 mm)

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 2: Grupos de espécies de *Biomphalaria*, A (*B. glabrata*), B (*B. tenagophila*) e C (*B. straminea*), e a quantidade de caramujos usados por diluição de MoluSchall.

Grupos	Controle	1 µl/L	2 µl/L	4 µl/L	8 µl/L	12 µl/L
A	30	30	30	30	30	30
B	30	30	30	30	30	30
C	30	30	30	30	30	30

Fonte: Elaborado pela autora.

3.7.3 Determinação da dose letal (DL₁₀₀) em *B. glabrata* infectadas por *S. mansoni*

Para este experimento foram utilizados 360 exemplares de *B. glabrata* separados em grupos como ilustrado na tabela 3.

Tabela 3: Grupos de *Biomphalaria glabrata* infectadas e não infectadas por *Schistosoma mansoni* e a quantidade de caramujos usados por diluição de MoluSchall

Grupos	Controle	1 µl/L	2 µl/L	4 µl/L	8 µl/L	12 µl/L
Infectado	30	30	30	30	30	30
Não Infectado	30	30	30	30	30	30

Fonte: Elaborado pela autora.

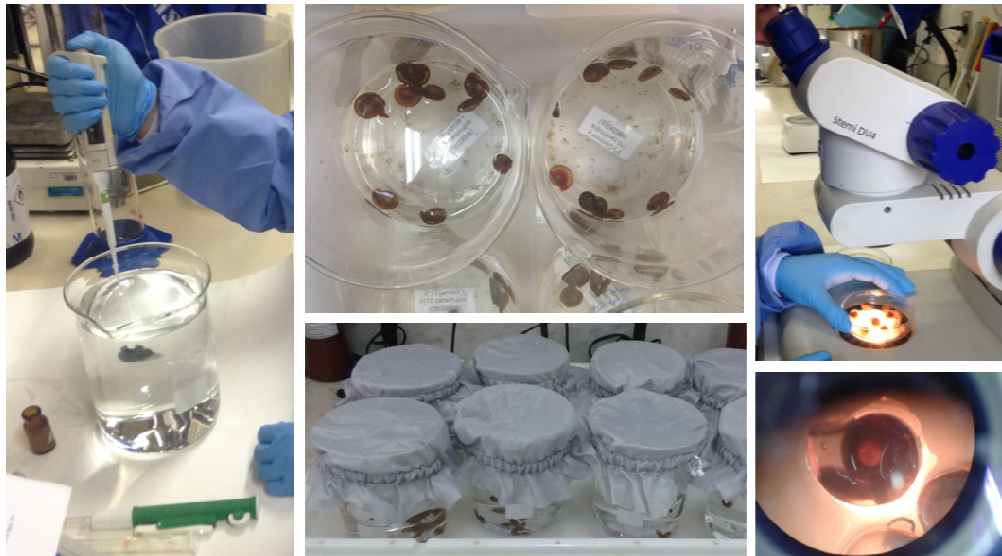
A infecção dos caramujos foi realizada segundo Jannotti-Passos et al. (2008). Os animais foram criados nas mesmas condições laboratoriais para que não houvesse diferença entre os tamanhos dos indivíduos não infectados e infectados por *S. mansoni*.

Todos os grupos foram separados em subgrupos de 10 caramujos e colocados em béqueres de um litro contendo 500 mL de água sem cloro. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Passado o período de adaptação, os moluscos foram submetidos por 24 horas a diferentes diluições do moluscicida. Foram preparadas soluções de moluscicida nas diluições de 1; 2; 4; 8; 12 µL /L de água. Como grupo controle, 10 caramujos foram mantidos em água sem cloro contendo 12 µL/L do “Diluyente 1” e 12 µL/L do “Diluyente 2” para verificar a influência dos diluentes na mortalidade dos moluscos.

Após a exposição, os caramujos foram então retirados dos béqueres, lavados e os caramujos mortos foram retirados e contabilizados e os sobreviventes foram transferidos para béqueres contendo 500 mL de água sem cloro. Pedacos de alface foram adicionados aos béqueres e os moluscos foram observados por mais 24 horas para avaliar a mortalidade e recuperação após a exposição ao moluscicida. Os bioensaios foram realizados no Moluscário Lobato Paraense (IRR) com temperatura ambiente variando entre 22 e 27°C. A observação dos caramujos foi realizada 24 e 48 horas após o início do experimento. A avaliação dos caramujos foi realizada através da observação da movimentação dos animais no béquer, bem como o batimento do coração e a retração muscular, com o auxílio de microscópio

estereoscópico. A mortalidade (número de animais mortos/número total de animais) foi definida pela perda de contração muscular e batimento cardíaco, descoloração da concha, deterioração da massa cefalopodal e liberação da hemolinfa. A figura 15 ilustra alguns dos procedimentos realizados.

Figura 15: Ilustração do procedimento para determinação da dose letal (DL_{100}) de MoluSchall em caramujos do gênero *Biomphalaria*.



Fonte: Cynthia de Paula Andrade e Paulo Ricardo Silva Coelho

3.8 Avaliação da estabilidade térmica do MoluSchall

O teste de estabilidade térmica foi realizado durante 24 meses, utilizando kits protótipos armazenados em geladeira (2 a 8 °C), a temperatura ambiente (22 a 26 °C) e estufa (37 °C). A cada dois meses, um frasco do kit, armazenado em cada temperatura, foi escolhido aleatoriamente e sua aparência física foi avaliada visualmente. Posteriormente, o látex foi reidratado com o "Diluyente 1" e "Diluyente 2" para avaliação da atividade biológica. Nestes ensaios, a cada dois meses, 120 caramujos foram separados em grupos, como apresentado na tabela 4.

Tabela 4: Grupos de *Biomphalaria glabrata* submetidos ao MoluSchall na diluição de 8 µL/L, armazenados em diferentes temperaturas

Grupo	Quantidade de <i>B. glabrata</i>	Diluição de MoluSchall
Controle	30	Sem moluscicida
Geladeira (2–8°C)	30	8 µL/L
Ambiente (22–26°C)	30	8 µL/L
Estufa (37°C)	30	8 µL/L

Fonte: Elaborado pela autora.

Os caramujos foram expostos ao MoluSchall, diluído a 8 µL/L, em triplicata. No grupo controle, 30 caramujos foram subdivididos em subgrupos de 10 animais mantidos em água desclorada contendo “Diluyente 1” e “Diluyente 2”. Os animais foram mantidos em béqueres contendo 500 mL das soluções por 24 horas à temperatura ambiente. Após a exposição, os caramujos foram retirados dos béqueres, lavados e os animais sobreviventes foram transferidos para béqueres com 500 mL de água desclorada. Pedacos de alface foram adicionados aos béqueres e os moluscos foram observados por mais 24 horas para avaliar a mortalidade. Após 48 horas, os animais mortos e sobreviventes foram contabilizados. A mortalidade foi considerada conforme critérios descritos no item 3.7.3.

3.9 Avaliação da toxicidade de MoluSchall em alevinos de *Danio rerio*

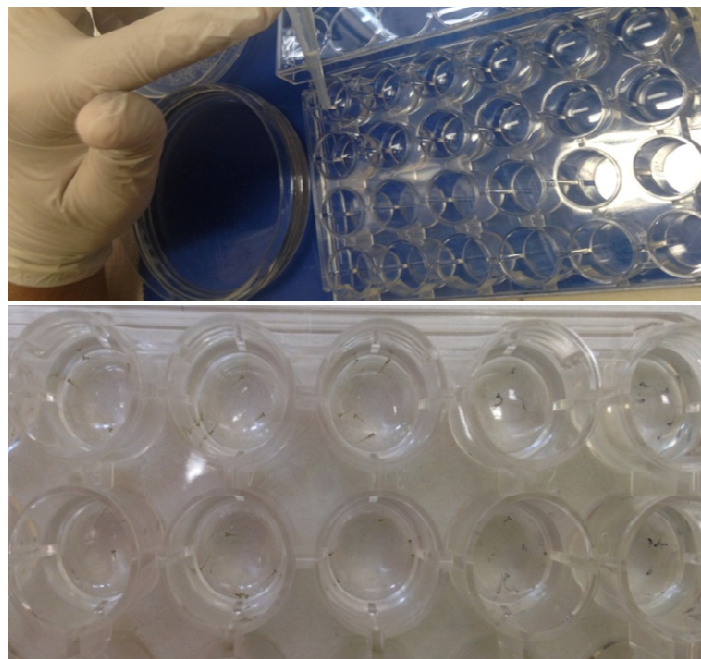
Os ensaios de toxicidade do MoluSchall em alevinos de *D. rerio* foram realizados no Núcleo de Experimentação Animal, Centro de Pesquisa da Faculdade de Medicina, UFMG. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), Protocolo N° 9/2012.

Para a realização dos testes de toxicidade de MoluSchall em *D. rerio*, foram utilizados alevinos de três dias pós-fertilização (dpf) obtidos da instalação de criação de animais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. Os alevinos foram

coletados após desova natural como descrito por Kimmel et al. (1995). Os alevinos foram criados em meio de embrião E2 (15 mM NaCl, 0.5 mM KCl, 0.49 mM MgSO₄.7H₂O, 0.15 mM KH₂PO₄, 0.042 mM Na₂PO₄, 0.1 mM CaCl₂ e 0.07 mM NaHCO₃, pH 7.2) a 28 ° C de acordo com procedimentos padrão em uma densidade de 60 alevinos/placa de Petri (Westerfield, 2007).

Sessenta alevinos de *D. rerio* foram obtidos e separados em dois grupos de cinco indivíduos por diluição do moluscicida, como apresentado na tabela 5. Os animais foram colocados em placas de cultura contendo MoluSchall nas diluições de 8; 16; 32; 64 e 128 µL/L. Como grupo controle, 10 alevinos separados em dois grupos de cinco indivíduos foram mantidos em uma placa de cultura contendo apenas meio E2. A toxicidade do MoluSchall foi avaliada a cada 24 horas, com troca das soluções, durante 72 horas de exposição (Figura 16). Após esse período, os peixes sobreviventes foram transferidos para poços contendo meio E2, para avaliar a recuperação após a exposição ao moluscicida. Durante todo o ensaio não houve adição de alimento e nem de aeração. No final do experimento, o número de animais mortos foi contabilizado.

Figura 16: Ilustração do procedimento para realizar a avaliação da taxa de mortalidade do MoluSchall em alevinos de *Danio rerio*.



Fonte: Cynthia de Paula Andrade

Tabela 5: Grupos de *Danio rerio* e a quantidade de alevinos usados por diluição de MoluSchall

Grupos	Controle	8 µL/L	16 µL/L	32 µL/L	64 µL/L	128 µL/L
Alevinos de <i>Danio rerio</i>	10	10	10	10	10	10

Fonte: Elaborado pela autora.

3.10 Avaliação do MoluSchall em condição semi-natural

A atividade moluscicida do MoluSchall em condições semi-naturais foi avaliada em três tanques com 1.000 litros de água, construídos na área do LANAGRO, figura 17. Para este experimento, dois testes foram realizados nos tanques em dias diferentes. Para isso foram utilizados 1.800 exemplares de *B. glabrata* não infectados, separados em grupos, como apresentado na tabela 6.

Tabela 6: Grupos de *Biomphalaria glabrata* de diferentes tamanhos utilizados nos experimentos em condições seminaturais e submetidos a diferentes diluições do MoluSchall

Grupos	3-6 mm	7-9 mm	10-12 mm
Tanque A (8µL/L)	100	100	100
Tanque B (12µL/L)	100	100	100
Tanque C (Controle)	100	100	100

Fonte: Elaborado pela autora.

A água contida nos tanques foi tratada com MoluSchall na diluição de 8 µL/L (Tanque A) e de 12 µL/L (Tanque B), além de um tanque sem tratamento usado como controle (Tanque C). Os experimentos foram realizados em duplicata. As instruções de segurança fornecidas pela WHO (2017) foram seguidas em todas as etapas da aplicação para evitar contato direto do produto com a pele e olhos dos pesquisadores.

Após 24 horas da aplicação do MoluSchall, uma amostra de 10% dos caramujos de cada tamanho e de cada tanque foi coletada e observada com o auxílio de microscópio estereoscópio. Os animais mortos foram retirados e os sobreviventes foram recolocados nos tanques de origem. Passadas 48 horas da aplicação do moluscicida, todos os caramujos foram coletados, observados com o auxílio de microscópio estereoscópio e os animais sobreviventes e mortos foram contabilizados. Da mesma forma, a mortalidade foi calculada seguindo os critérios descritos no item 3.7.3.

Figura 17: Tanques contendo água tratada com MoluSchall nas diluições de 8 $\mu\text{L/L}$ e de 12 $\mu\text{L/L}$, e sem tratamento (controle).



Fonte: Cynthia de Paula Andrade.

3.11 Análise dos dados

Os resultados foram expressos como número total de caramujos utilizados nos bioensaios e submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA), ao teste de Comparação Múltipla de Tukey e ao teste t de Student (Mann-Whitney) utilizando o programa Graph-Pad Prism 5.0.

4. Resultados

4.1 Obtenção do látex de *Euphorbia milii* var. *hislopii*

No total, 29 lotes de látex foram coletados durante o período de coleta, sendo 22 obtidos do cultivo da Fazenda Modelo da UFMG e 08 obtidos do cultivo do LANAGRO. Em média, o rendimento por coleta foi de 60 mL por hora. Após a pesagem dos frascos, a relação de peso médio entre o látex líquido e o látex liofilizado mostrou que 5 mL de látex líquido resultam em aproximadamente 1g de látex liofilizado. Entretanto, essa equivalência não foi constante, pois o peso variou de 1,02 a 1,24 gramas, com média de 1,09 gramas por frasco (Tabela 7).

Tabela 7: Relação entre o peso do látex líquido (5 mL) e após liofilização.

Peso látex <i>in natura</i>	Densidade líquido /volume	Peso látex liofilizado
5,01 g	1,000 g/mL	1,02 g
5,10 g	1,020 g/mL	1,04 g
5,03g	1,006 g/mL	1,02 g
5,17 g	1,034 g/mL	1,06 g
5,10 g	1,020 g/mL	1,06 g
5,12 g	1,024 g/mL	1,06 g
5,12 g	1,024 g/mL	1,05 g
5,04 g	1,008 g/mL	1,04 g
5,05 g	1,010 g/mL	1,05 g
5,12 g	1,024 g/mL	1,05 g
5,02 g	1,004 g/mL	1,04 g
5,11 g	1,022 g/mL	1,19 g
5,20 g	1,040 g/mL	1,21 g
4,99 g	0,998 g/mL	1,16 g
5,09 g	1,018 g/mL	1,19 g
5,17 g	1,034 g/mL	1,24 g

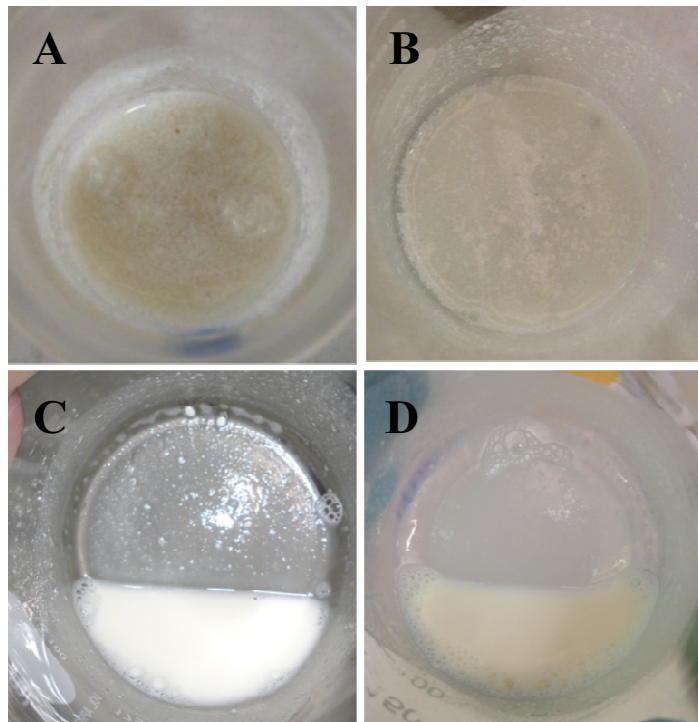
Fonte: Elaborado pela autora.

4.2 Reidratação do látex liofilizado de *Euphorbia milii* var. *hislopilii*

O látex *in natura* coletado apresentou pH ácido com média de 4,83. Em experimentos prévios foi possível constatar que a reidratação do látex com água não foi eficiente. Mesmo após forte agitação, foi observado a presença de agregados de látex, formados a partir do látex que não se dissolveram. (Figuras 18 A e B). Diante disso, diferentes substâncias e formulações foram adicionadas ao látex, no momento da coleta, na tentativa de conseguir a solubilização do material após o processo de liofilização.

Após vários testes pilotos, foi desenvolvida uma formulação composta por dois diluentes, denominados nesse estudo como “Diluyente 1” e “Diluyente 2”. Adicionando-se 5 mL do “Diluyente 1” e em seguida 5 mL do “Diluyente 2” ao látex liofilizado, foi possível obter uma reidratação completa (figuras 18 C e D).

Figura 18: Resultados de parte dos experimentos realizados para reidratação do látex de *E. milii* liofilizado. Figuras A e B: resultado da reidratação do látex com água tipo I; Figuras C e D: resultado da reidratação do látex com “Diluyente 1” seguido do “Diluyente 2”.

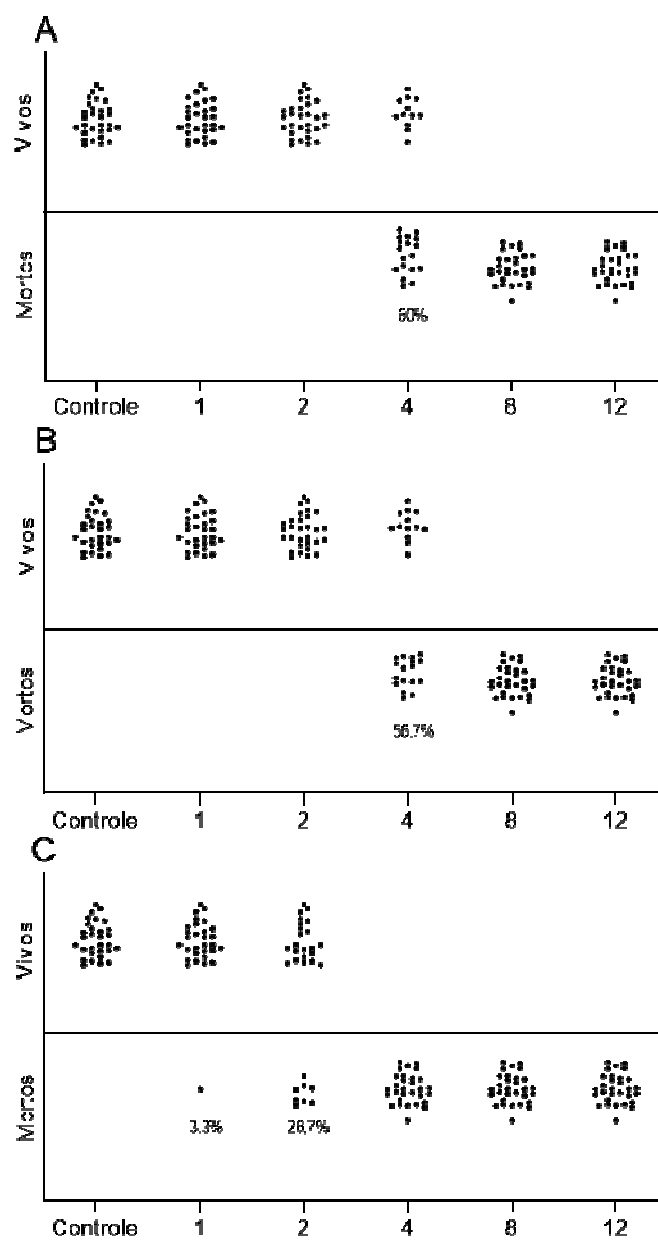


Fonte: Cynthia de Paula Andrade.

4.3 Determinação da dose letal (DL₁₀₀) do MoluSchall para *B. glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*

A atividade moluscicida do kit protótipo, após 48 horas de exposição contra exemplares adultos de *B. glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila* está demonstrada na figura 19. Para os exemplares de *B. tenagophila* foi observada uma DL₁₀₀ de 4 µL/L, e para as espécies *B. glabrata* e *B. straminea* a DL₁₀₀ encontrada foi de 8µL/L. Houve diferença estatística entre as DL₁₀₀ de *B. tenagophila* e as duas espécies, *B. glabrata* e *B. straminea*, na diluição de 4 µL/L ($p = 0,031$). Não houve mortalidade nos grupos controles, expostos à água desclorada contendo apenas “Diluyente 1” e “Diluyente 2”. A morte dos caramujos foi verificada através de avaliação visual e com o auxílio de um microscópio estereoscópico. Nos grupos controles foi observado que os indivíduos permaneceram ativos, forrageando durante o período de recuperação. Esses moluscos foram avaliados e aqueles com o mínimo de batimento cardíaco e retração muscular foram considerados vivos.

Figura 19: Dose letal (DL_{100}) de MoluSchall contra moluscos adultos de *B. glabrata* (A), *B. straminea* (B) e *B. tenagophila* (C), analisados após 48 horas de exposição. Para cada diluição, 30 caramujos adultos foram colocados em três béqueres (10 caramujos/béquer), contendo 1; 2; 4; 8 ou 12 $\mu\text{L/L}$ de MoluSchall diluídos em 500 mL de água desclorada. Como grupo controle, 30 caramujos *B. glabrata*, 30 *B. straminea* e 30 *B. tenagophila* foram distribuídos em béqueres (10 caramujos/béquer) e expostos a água desclorada contendo 12 μL de “Diluyente 1” e “Diluyente 2” nas mesmas condições. Houve diferença entre o DL_{100} contra *B. glabrata* e *B. straminea* e contra *B. tenagophila*, $p = 0,031$.

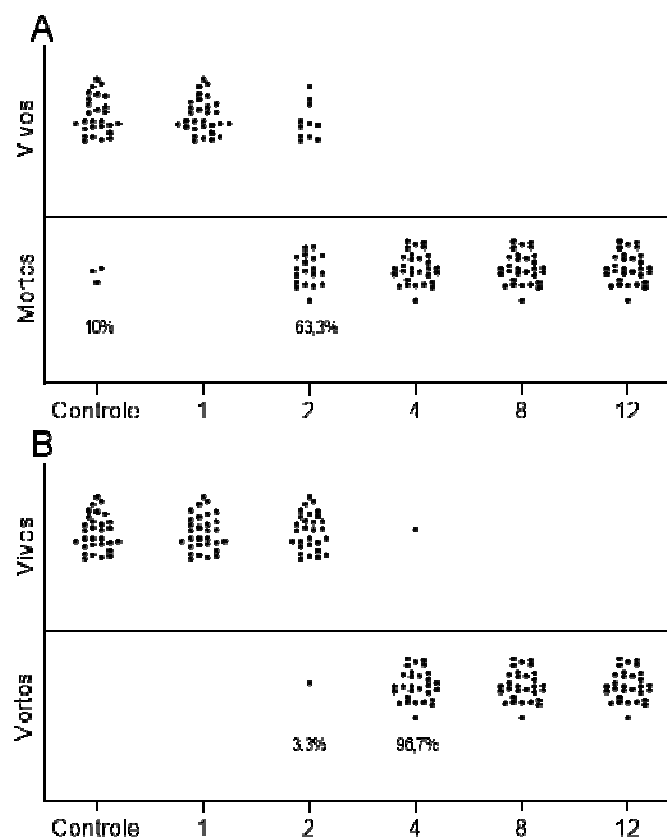


Fonte: Elaborado pela autora.

4.4 Determinação da dose letal (DL_{100}) do MoluSchall para *B. glabrata* infectadas com *S. mansoni*

A atividade moluscicida do MoluSchall foi avaliada a partir de exemplares adultos de *B. glabrata* infectadas com *S. mansoni* e os resultados estão demonstrados na figura 20. O MoluSchall eliminou 63% dos caramujos infectados e 10% dos caramujos não infectados expostos à diluição de 2 $\mu\text{L/L}$, após 48 horas de exposição ($p = 0.038$). Na diluição 4 $\mu\text{L/L}$, foi observada uma mortalidade de 100% dos moluscos infectados e 96,7% dos caramujos não infectados, sem diferença estatística significativa ($p > 0,05$). No grupo controle de caramujos infectados, exposto apenas a água desclorada, contendo “Diluyente 1” e “Diluyente 2”, foi observada mortalidade de 10% dos caramujos, sem diferença estatística significativa ($p = 0,098$) em comparação com o grupo controle de caramujos não infectados.

Figura 20: Dose letal (DL_{100}) de MoluSchall contra *B. glabrata* infectados (A) e não infectados (B) com *S. mansoni*, analisados após 48 horas de exposição. Os resultados correspondem ao número total de caramujos (30) distribuídos em três béqueres (10 caramujos/béquer) contendo 1; 2; 4; 8 ou 12 $\mu\text{L/L}$ de MoluSchall diluídos em água desclorada. Como grupo controle, 30 caramujos *B. glabrata* infectados e 30 caramujos não infectados foram distribuídos em béqueres e expostos à água desclorada contendo 12 μL de “Diluyente 1” e “Diluyente 2” nas mesmas condições. Houve diferença entre *B. glabrata* infectadas (A) e não infectadas (B), $p = 0,038$.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.5 Avaliação da estabilidade térmica de MoluSchall, em função do tempo

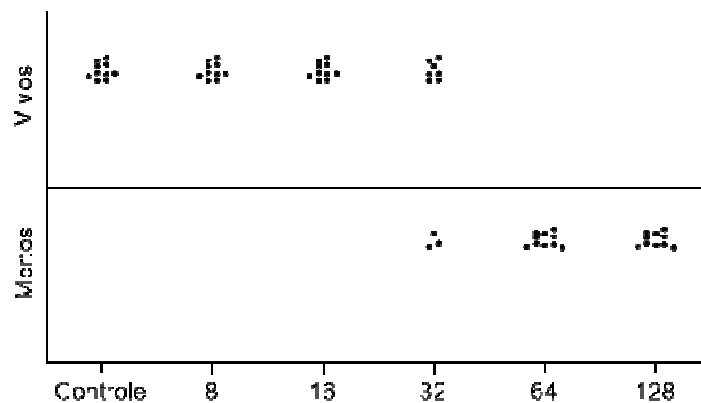
MoluSchall demonstrou estabilidade térmica por 24 meses, independente da temperatura de armazenamento, geladeira (2-8°C), ambiente (22-26°C) e estufa (37°C). A mortalidade dos moluscos foi de 100% após 48 horas de exposição ao produto em todos experimentos realizados para avaliar sua atividade moluscicida contra *B. glabrata*. Durante o

período avaliado não houve mortalidade no grupo controle, exposto somente à água desclorada contendo “Diluyente 1” e “Diluyente 2”.

4.6 Avaliação da toxicidade de MoluSchall em alevinos de *Danio rerio*

As diluições de 8 $\mu\text{L/L}$ e 16 $\mu\text{L/L}$ de MoluSchall não foram letais para os alevinos de *D. rerio*, após 72 horas de exposição. Já a diluição de 32 $\mu\text{L/L}$ eliminou 30% dos alevinos e as diluições de 64 $\mu\text{L/L}$ e 128 $\mu\text{L/L}$ eliminaram 100% dos alevinos após 24 horas de exposição, como mostra a figura 21.

Figura 21: Representação da mortalidade de alevinos de *Danio rerio* (Zebrafish) expostos em diferentes diluições de MoluSchall, após 72 horas. Os resultados correspondem ao total de indivíduos (10) sobreviventes e mortos em cada diluição de MoluSchall.



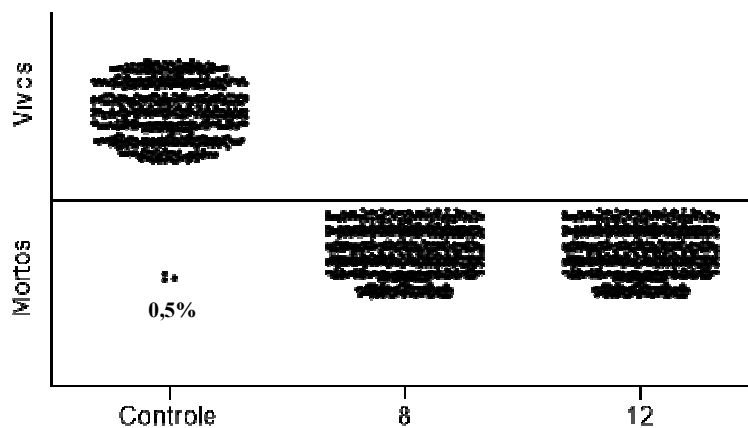
Fonte: Elaborado pela autora.

4.7 Avaliação do MoluSchall em condições semi-naturais

A atividade moluscicida do MoluSchall em condições semi-naturais foi avaliada em poços artificiais contendo exemplares de *B. glabrata* apresentando três faixas de tamanhos e os resultados estão apresentados na figura 22. Nos poços artificiais tratados com MoluSchall nas diluições de 8 $\mu\text{L/L}$ e 12 $\mu\text{L/L}$ foram observados 100% de mortalidade dos caramujos, após 48 horas de exposição, independentemente do tamanho dos indivíduos. No poço sem tratamento houve 0,5 % de mortalidade, sem diferença estatisticamente significativa em relação ao esperado 0% ($p > 0,05$). Assim como nos testes em laboratório, os caramujos foram

avaliados, após a exposição ao moluscicida, quanto à mortalidade através da inspeção visual e com o auxílio de um microscópio estereoscópico usando os mesmos critérios.

Figura 22: Representação da mortalidade de *Biomphalaria glabrata* expostas às diluições de 8 e 12 $\mu\text{L/L}$ de MoluSchall, após 48 horas, em dias diferentes. Os resultados correspondem ao total de indivíduos sobreviventes e mortos em cada diluição de MoluSchall. O grupo controle foi mantido somente em água desclorada em um tanque, nas mesmas condições.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.8 Estudo de Viabilidade Patentária

O Parecer EVP 02/2018 (Anexo 2) conclui que não foi identificado em um único documento todos os aspectos técnicos que caracterizam a metodologia apresentada nesta tese. Dessa forma, a tecnologia apresenta características de Novidade. O MoluSchall, também atende ao requisito de patenteabilidade, Aplicação Industrial.

Quando MoluSchall é avaliado com relação à Atividade Inventiva, considerando as diretrizes de exame de pedidos de patente do Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI, o efeito biológico obtido já era esperado, sem que houvesse um efeito técnico surpreendente. Dessa forma, o desenvolvimento de MoluSchall não atendeu a esse requisito de patenteabilidade.

5. Discussão

Neste trabalho, foi desenvolvido um kit protótipo de moluscicida, chamado MoluSchall, produzido a partir do látex liofilizado de *Euphorbia milii* e usando diluentes apropriados. Este protótipo tem o potencial de ser usado como parte de um programa integrado de controle e eliminação da esquistossomose. Estes kits protótipos foram testados em relação à sua estabilidade, toxicidade e atividade moluscicida em condições semi-naturais. A identificação e utilização combinada de substâncias para o processo de reidratação do látex liofilizado (“Diluyente 1” e “Diluyente 2”) foi um passo importante na preparação do kit protótipo. Dificuldades de reidratação do látex já foram relatadas anteriormente por Mendes et al. (1992) ao usar o látex liofilizado em campo. Os autores associaram a baixa taxa de mortalidade à menor solubilidade do produto. Neste trabalho, também foi observado dificuldades em reidratar o látex de *E. milii* liofilizado, acrescentando somente água ou outras substâncias.

Apesar da conclusão do Parecer do Estudo de Viabilidade Patentária - EVP 02/2018, ter sido negativo com relação à patenteabilidade do produto, é importante ressaltar que a metodologia de diluição do látex liofilizado pode se configurar em um know-how importante e um diferencial competitivo da tecnologia. Dessa forma, é sugerido pelas autoras do parecer que o sigilo do detalhamento da metodologia deva ser mantido até que se tenha avançado em negociações com possíveis parceiros comerciais.

Trabalhos envolvendo o látex de *E. milii* como potencial moluscicida já foram realizados. Vasconcellos & Schall (1986) mostraram que as concentrações letais para matar 90% dos moluscos (CL_{90}) foram inferiores a 0,5 ppm para *B. glabrata* e *B. tenagophila* criados em laboratório e 4,0 ppm para *B. tenagophila* obtidos de campo. Posteriormente, Schall et al. (1998) observaram uma DL_{100} de 2 μ L/L para adultos e indivíduos recém-eclodidos de *B. glabrata* e DL_{100} de 4 μ L/L para adultos de *B. tenagophila* e *B. straminea*. Neste trabalho, foi encontrado os valores de DL_{100} de 4 μ L/L (4 ppm v/v) para *B. tenagophila* e DL_{100} de 8 μ L/L (8 ppm v/v) para *B. glabrata* e *B. straminea*, valores que correspondem ao dobro da concentração encontrada por Schall et al. (1998). No entanto, a DL_{100} encontrada neste estudo não superou o valor estimado pela OMS, que recomenda uma concentração menor que 20 mg/L para matar 90% dos caramujos expostos por 24 horas. Os valores de DL_{100} encontrados para *B. glabrata* com diâmetro de concha de 12 a 17 mm, infectadas com *S. mansoni* e não infectadas, foram menores que os valores de DL_{100} encontrados para *B.*

glabrata de 10 a 12 mm. Além disso, uma diferença nas taxas de mortalidade entre *B. glabrata* infectadas com *S. mansoni* e *B. glabrata* não infectadas, foi observada na diluição de 2 $\mu\text{L/L}$ ($p = 0,038$). Provavelmente, essa diferença ocorreu devido às lesões na glândula digestiva (hepatopâncreas) decorrentes da ação de esporocistos de *S. mansoni* nesse órgão (Mello-Silva et al. 2010). Mello-Silva et al. (2010) analisaram a variação no teor de glicose em caramujos expostos a uma dose de látex subletal por 24 horas. Esses autores também observaram que *B. glabrata* infectadas com *S. mansoni* foram mais suscetíveis ao látex de *E. splendens* do que os caramujos não infectados.

Alguns caramujos expostos a diluições mais altas tiveram uma redução na contração muscular, frequência cardíaca e ficaram retraídos para dentro da concha após 24 horas. Este comportamento sugere que as substâncias encontradas no látex afetaram os caramujos, embora não houvesse mortalidade dentro de 24 horas após a exposição (dados não mostrados). Segundo Mello-Silva et al. (2006) ocorrem alterações fisiológicas em caramujos expostos a baixas doses de látex de *E. milii* alterando as reservas de glicogênio na glândula digestiva e o teor de proteína na hemolinfa de *B. glabrata*. Esses autores acreditam que a redução da capacidade de movimentação dos moluscos pode estar relacionada ao aumento do conteúdo de glicogênio da massa cefalopodal. McCullough et al. (1980) relataram que os moluscidas provavelmente causam estresse no sistema de balanço hídrico dos caramujos que em gastrópodes está sob controle neurosecretor. Araújo et al. (2002) demonstraram no gastrópode *Lymnaea columella* (Say, 1817) expostos ao látex de *E. splendens* alterações histológicas como degeneração, necrose e acúmulo de líquidos na glândula digestiva e nos tecidos renais desses moluscos.

Alterações na atividade reprodutiva de *B. glabrata* expostos ao látex de *E. splendens* foram avaliadas por Mello-Silva et al. 2007. Esses autores mostram que ao utilizar uma dose subletal (DL_{50}) do látex bruto (1 mg/L), na primeira semana após a exposição ocorreu uma diminuição na postura dos ovos. Porém, após a quarta semana de exposição ocorreu um aumento do número de ovos postos por caramujo. Segundo Mello-Silva et al. (2007) esse comportamento reflete uma tentativa de compensar as perdas reprodutivas ocorridas precocemente, fato comumente observado em caramujos estressados fisiologicamente. Além disso, mostraram uma redução acentuada na eclosão dos moluscos, revelando uma interferência da exposição ao látex de *E. splendens* com o processo reprodutivo de *B. glabrata*, atuando assim indiretamente no controle populacional. É importante ressaltar que Schall et al. (1998) ao estudarem a diluição necessária para matar os embriões dos caramujos

dentro dos ovos encontraram uma concentração de 1500 ppm do látex. Essa concentração é incompatível com a concentração recomendada pela OMS.

Em outro estudo interessante, Augusto et al. (2017) testaram o látex *E. milii* contra cercárias de *S. mansoni*. Eles demonstraram que a exposição à baixa concentração de látex produziu efeitos no estágio de verme adulto, como redução da taxa de parasitos, número de ovos liberados e alterações no tegumento masculino. Além disso, a análise proteômica de machos adultos de *S. mansoni* provenientes de cercárias expostas ao látex, mostrou alvos protéicos que produziram mudanças na regulação positiva e negativa de algumas funções moleculares. Assim, o uso do moluscicida também pode afetar as cercarias do parasito, resultando em danos nos futuros vermes adultos. Dessa forma, o uso de MoluSchall poderia ser considerado em outro aspecto interessante no controle da transmissão da esquistossomose.

Em relação à estabilidade de MoluSchall, os aspectos físicos e atividade moluscicida contra *B. glabrata* foram mantidos após 24 meses, independente da temperatura de armazenamento (2-8 °C, 22-26 °C e 37 °C). Esses resultados corroboram com o trabalho de Schall et al. (1992) que demonstraram atividade moluscicida do látex liofilizado por 24 meses quando armazenado em geladeira.

Não foi possível verificar a variação sazonal da atividade moluscicida do látex de *E. milii*, fato que constituiu uma limitação deste estudo. No entanto, Schall et al. (1992) coletaram o látex de *E. milii* de diferentes regiões do Brasil ao longo do ano e demonstraram a consistência da sua atividade moluscicida contra *B. tenagophila*. Em contraste, Vasconcellos & Amorin (2003) avaliaram a sazonalidade do látex utilizando exemplares de *L. columella* e observaram que houve variações da atividade moluscicida sobre esse gastrópode, considerando as estações do ano.

No presente estudo, a diluição de MoluSchall utilizada como moluscicida (8µL/L) não foi letal para os alevinos de *D. rerio* (zebrafish), que é um teleóstato de água doce amplamente utilizado para estudos de desenvolvimento, estudos genéticos, comportamentais e fisiológicos (Grunwald, 2002; Howe et al., 2013). O Zebrafish apresenta grande sensibilidade quando exposto às substâncias químicas, pois tem a capacidade de absorver rapidamente os compostos que são adicionados à água e acumulá-los em diferentes tecidos, principalmente no sistema nervoso central (Grossel & Wood, 2002). O efeito letal observado contra o zebrafish ocorreu somente a partir de uma diluição oito vezes maior que a DL_{100} definida para o uso como moluscicida. Da mesma forma, Oliveira-Filho & Paumgarten (2000) observaram que o

látex liofilizado de *E. milii* é aproximadamente quatro vezes menos tóxico que a niclosamida para adultos de *D. rerio*.

A atividade moluscicida do MoluSchall observada em campo apresentou resultados consistentes com os observados em laboratório. A diluição de 8 µL/L, definida como DL₁₀₀ para *B. glabrata*, também foi eficaz após 48 horas de exposição em campo. Assim, o rendimento por frasco do kit MoluSchall é de 1.250 litros de água tratada, sendo que o kit contendo 10 frascos, pode tratar 12.500 litros de água. Embora os resultados sejam promissores, é necessário realizar outros estudos de campo em condições naturais para testar o MoluSchall em ambientes lênticos e lóticos de acordo com os trabalhos já realizados por Mendes et al. (1992; 1997) e Baptista et al. (1992).

Schall et al. (2001) observaram que no riacho, tratado com látex de *E. splendens* em Comercinho, houve uma redução na densidade dos caramujos em comparação com um riacho não tratado, porém a população de caramujos se recuperou rapidamente. No entanto, foi observado que após a realização de duas aplicações de látex numa concentração de 5 ppm, com um intervalo de duas semanas entre elas, resultou no desaparecimento completo de *B. glabrata*. Além disso, não foram encontrados caramujos até o 14º mês após as aplicações do látex. Já no riacho controle, sem aplicação de látex, foram encontrados caramujos durante todos os meses. Dessa maneira, os autores sugerem que o látex de *E. splendens* pode ser eficiente no controle dos caramujos *B. glabrata*, ao se realizar duas aplicações de látex com intervalo de 15 dias entre elas. Provavelmente, a primeira aplicação mata todos os caramujos (jovens e adultos) e a segunda mata aqueles que eclodiram após a primeira aplicação, uma vez que o látex não é ovicida na concentração utilizada (Schall et al., 1998).

6. Conclusão

Em conclusão, o kit protótipo MoluSchall mostrou eficiência na eliminação das três espécies de caramujos, hospedeiros intermediários de *S. mansoni* no Brasil, estabilidade por um período de 24 meses quando armazenado em três diferentes temperaturas (2-8 ° C, 22–26 ° C e 37 ° C), baixa toxicidade ao *D. rerio* e atividade moluscicida em condições semi-naturais. Além disso, os exemplares de *B. glabrata* infectados com *S. mansoni* se mostraram mais sensíveis ao produto.

Considerando os resultados apresentados, MoluSchall representa um moluscicida natural interessante para justificar novos experimentos para que possa se tornar uma estratégia alternativa para o controle da esquistossomose.

No entanto, para produzir o MoluSchall em larga escala, são necessários mais estudos para melhorar a técnica de obtenção do látex. É necessária a redução do tempo gasto entre a coleta, armazenamento e transporte da amostra até a estação de liofilização, evitando perdas do produto.

7. Bibliografia

- ANDERSON, C; GOBERT, E. Des mesures prophylactiques applicables contre la bilharzioses en Tunisie. Archh. Inst. Pasteur Tunis, v. 13, p. 125-128, 1924.
- ANDRADE, ZA. Schistosomiasis and liver fibrosis. Parasite Immunol., v. 31, p. 656-663, 2009.
- ANDREWS, P; THYSSEN, J; LORKE D. The biology and toxicology of molluscicides, Bayluscide®. Pharmacol Ther., v. 19, p. 245-295, 1983.
- AMORIN, JP; PESSOA, SB. Experiência de alguns vegetais como moluscocida. Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais, v. 14, p. 254-260, 1962.
- ARAÚJO, SM et al. Alterações histológicas em *Lymnaea columella* provocadas pelo látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii*. Braz J Vet Res Anim Sci., v. 39, p. 157–159, 2002.
- ARCHIBALD, RG. The use of the fruit of the tree *Balanites aegyptiaca* in the control of schistosomiasis in the Sudan. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 27. P. 207-210, 1933.
- AUGUSTO, RC et al. Double impact: natural molluscicide for schistosomiasis vector control also impedes development of *Schistosoma mansoni* cercariae into adult parasites. PLoS Negl Trop Dis., v. 11, n. 7, e0005789, 2017. Disponível em <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005789>
- BANDONI, SM; MULVEY, M; LOKER, ES. Intraspecific and interspecific patterns of allozyme variation among species of *Biomphalaria* Preston, 1910 (Gastropoda: Planorbidae). Biochem Syst Ecol., v. 23, p. 593-616, 1995.
- BAPTISTA, DF et al. Perspectives of using *Euphorbia splendens* as a molluscicide in schistosomiasis control programs. Southeast Asian J Trop Med Public Health., v. 25, p. 419-424, 1994.
- BAPTISTA, DF et al. Evaluation of the molluscicidal property of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (N.E.B.) (Euphorbiaceae). 2. Investigation in a lotic habitat. Mem Inst Oswaldo Cruz., v. 87, p. 549– 553, 1992.
- BARBOSA, CS et al. Epidemiologia e controle da Esquistossomose mansoni. In: CARVALHO OS, COELHO PMZ, LENZI HL. *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Fiocruz. p. 967-1008, 2008.
- BARBOSA, FS; BARBOSA, C. S. The bioecology of snail vectors for Schistosomiasis in Brazil. Cadernos de Saúde Publica, v. 10, p. 200-209, 1994.
- BERG, CO. Sciomyzid larvae (Diptera) that feed on snails. J. Parasit., v. 39, p. 630-636, 1953.

BOROS, DFL; WARREN, KS. Delayed hypersensitivity type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by soluble isolated from *Schistosoma mansoni* eggs. J. Exp. Med., v. 132, p. 448-507, 1970.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portalms.saude.gov.br [homepage on the Internet]. Brasília: Ministério da Saúde, Inc.; c2013-19 [updated 2019 Jan 02; cited 2018 May 17]. Available <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/esquistossomose/situacao-epidemiologica>

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde, Vigilância da Esquistossomose, Diretrizes Técnicas. 4. ed. Brasília, 2014. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigilancia_esquistossome_mansoni_diretrizes_tecnicas.pdf>. Acesso em: 20 março 2017.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: diretrizes técnicas: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE).2008 / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2ed., Brasília.

BRUMPT, E. Observations biologiques diverses concernant *Planorbis (Australorbis) glabratus* hôte intermédiaire de *Schistosoma mansoni*. Ann. Parasitolo., v. 18, p. 9-45, 1941.

CALDAS, IR et al. Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection. Acta Trop., v. 108, n. 2-3, p. 109-17, 2008.

CARVALHO, OS, et al. Distribuição geográfica dos hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni* nos estados do Paraná, Minas Gerais, Bahia, Pernambuco e Rio Grande do Norte, 2012-2014. Epidemiol. Serv. Saúde, v. 27, n. 3, e2017343, 2018.

CARVALHO, OS et al. Distribuição espacial de *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila* hospedeiros intermediários de *Schistosoma mansoni* no Brasil. In: CARVALHO OS, COELHO PMZ, LENZI HL. *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Fiocruz. p. 529-46, 2008.

CARVALHO, OS et al. Moluscos de importância médica no Brasil. Belo Horizonte Centro de Pesquisas René Rachou. Fiocruz: Belo Horizonte, 2005.

CHEN, C. Molluscicides and their application in China. J Schisto Cont., v. 15, n. 5, p. 321-322, 2003.

CHERNIN, E. Behavioral responses of miracidia of *Schistosoma mansoni* and other trematodes to substances emitted by snails. J. Parasitol., p. 287-296, 1970.

CHERNIN, E. Some host-finding attributes of *Schistosoma mansoni* miracidia. Am. J. Trop. Med. Hyg., v. 23, p. 320-327, 1974.

CHIMBARI, MJ; MADSEN, H; NDAMBA J. Laboratory experiments on snail predation by *Sargochromis codringtoni*, a candidate for biological control of the snails that transmit schistosomiasis. Ann. Trop. Med. Parasitol., v. 91, p. 95-102, 1997.

COELHO, MV. Aspectos do desenvolvimento de formas larvárias do *Schistosoma mansoni* em *Australorbis nigricans*. Rev. Bras. Biol., v. 17, p. 325-337, 1957.

COELHO, PMZ. Resistência e susceptibilidade à infecção por *Schistosoma mansoni* em caramujos do gênero *Biomphalaria*. In: Barbosa FS. Tópicos em Malacologia Médica, Ed. Fiocruz. 1995. p. 208-217.

COELHO, PMZ; CALDEIRA, RL. Critical analysis of molluscicide application in schistosomiasis control programs in Brazil. Infectious Diseases of Poverty, v. 5, p. 57, 2016.

COELHO, PMZ; BOSON, FCB; GERKEN, SE. Potencialidade de predação à *Biomphalaria glabrata*: (Say, 1818) por duas espécies de quelônios sul-americanos: *Platemys spixii* (Duméril e Dibrion, 1935) e *Chrysemys (Trachemys) dorbigni* (Duméril e Dibrion, 1935). Ciência e cult. v. 27, p. 301-303, 1975.

COLLEY ,DG; SECOR, WE. Immunology of human schistosomiasis. Parasite Immunol., v. 36, n. 8, p.347-57, 2014.

CORRÊA, LR; PARAENSE, WL. Susceptibility of *Biomphalaria amazonica* to infection with two strains of *Schistosoma mansoni*. Rev Inst Med Trop São Paulo, v. 13, p. 387-90, 1971.

CORRÊA, MP. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Ed. Ministério da Agricultura - Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. II, pp. 533. 1984

COUTO FF et al. *Schistosoma mansoni*: a method for inducing resistance to praziquantel using infected *Biomphalaria glabrata* snails. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 106, n. 2, p. 153-157, 2011.

FARNSWORTH, NR; HENDERSON, TO; SOEJARTO DD. Plants with potential molluscicidal activity. In: MOTT, K. E. ed. Plant molluscicides. New York, Wiley. p.131-204. 1987

FAUST, EC; HOFFMANN, WA Studies on schistosomiasis mansoni in Puerto Rico. The extramamalian phases on lyfe cycle. Puerto Rico J.Pub.Health Trop. Med, v. 10, p. 1-47, 1934.

FAVRE, TC; MASSARA, C. Trajetória de contribuições à pesquisa e ao controle da esquistossomose. In: Monteiro S, Pimenta DN. Ciência, Saúde e Educação: O legado de Virgínia Schall, Ed. Fiocruz. 2018. p. 315-340.

FENWICK, A; WEBSTER, JP. Schistosomiasis: challenges for control, treatment and drug resistance. Curr Opin Infect Dis, v. 19. p. 577-582, 2006.

FERRARI TC, Moreira PR 2011. Neuroschistosomiasis: clinical symptoms and pathogenesis. Lancet Neurol; 10(9): 853-64.

FREITAS, JCB et al. 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.

- FREITAS, JR; BOSCHI, MB; SANTOS, MBL. Suscetibilidade de híbridos de *Biomphalaria tenagophila* à cepa LE (BH) do *Schistosoma mansoni*. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v. 1, p. 6-12, 1985.
- FREITAS, JR; SANTOS, MBL. Current advances on the study of snail-snail interactions, with special emphasis on competition process. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 90, n. 2, p. 261-269, 1995.
- GORDON, RM; GRIFFITHS, RB. Observation on the means by which the cercariae of *S. mansoni* penetrate mammalian skin together with an account of certain morphological changes observed in the newly penetrated larvae. Ann. Trop. Med, v. 45, p. 227-243, 1951.
- GRAY, DJ et al. Schistosomiasis elimination: lessons from the past guide the future. Lancet Infect Dis, v. 10, n. 10, p. 733-6, 2010.
- GROSELL, M; WOOD, CM. Copper uptake across rainbow trout gills: mechanisms of apical entry. J. Exp. Biol., v. 205, p. 1179-1188, 2002.
- GRUNWALD, DJ; EISEN, JS. Headwaters of the zebrafish -- emergence of a new model vertebrate. Nature Reviews Genetics, v. 3, n. 9, p. 717-24, 2012.
- GRYSEELS, B et al. Human schistosomiasis. Lancet, v. 368, n. 9541, p. 1106-1118, 2006.
- HE, JX et al. Observation on the molluscicidal effect of niclosamide ethanolamine salt dustable powder by dusting in fields. J Trop Dis Parasit., v. 5, p. 153-4, 2007.
- HORA, SL. Control of molluscan fauna through the culture of *Panagasius panagasius*. Current Science, v. 21, p. 164-165, 1952.
- HOWE, K et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. Nature, v. 496, n. 7446, p. 498-503, 2013.
- HUBENDICK, B. A possible method of schistosome-vector between resistant and susceptible strains. Bulletin of the World Health Organization, v. 18, p. 1113-1116, 1958.
- JENKINS-HOLICK DS, Kaul TL. Schistosomiasis. Urol Nurs, v. 33, n. 4, p. 163-70, 2013.
- JANNOTTI-PASSOS, LK; CALDEIRA, RL; CARVALHO, OS. In.: CARVALHO OS, COELHO PMZ, LENZI HL *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Fiocruz. 2008
- JOUDANE, J; THERON, A; COMBES, C. Demonstration of several sporocysts generations as a normal pattern of reproduction of *Schistosoma mansoni*. Acta Tropica, v. 37, p. 177-182, 1980.
- JURBERG, P; VASCONCELLOS, M; MENDES, NM. Plantas empregadas como moluscicidas: Uma visão crítica. Mem. Inst Oswaldo Cruz, v. 84, p. 76-88, 1989.
- KATZ, N. Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geo-helmintoses (2010- 2015). Belo Horizonte: Instituto Rene Rachou—Fiocruz, 2018 março, 2018.

KING, CH; SUTHERLAND, LJ; BERTSCH; D. Systematic review and meta-analysis of the impact of chemical- based mollusciciding for control of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* transmission. PLoS Negl Trop Dis, v.9, n. 12, e0004290, 2015. doi:10.1371/journal.pntd.0004290.

KIMMEL, CB et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. Developmental dynamics": an official publication of the American Association of Anatomists, v. 203, n. 3, p. 253–310, 1995.

KLOOS, H; MCCULLOUGH, FS. Plants with recognized molluscicidal activity. In MOTT, K. E. ed. Plant molluscicides. Chichester, UNDP/WORLD BANK/ WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, John Wiley & Sons LTD. 1987, Capítulo 1: 45-108.

LAMBERTUCCI, JR. Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 105, n. 4, p. 422-35, 2010.

LEE, KH et al. Lasiodiploidin, a potent antileukemic macrolide from *Euphorbia splendens*. Phytochemistry, v. 2, p. 1119–1121, 1982.

LEMMA, A; YAU, P. Studies on the molluscicidal properties of endod (Phytolacca dodecandra), III. Ethiopian Medical Journal, v. 12, p. 109-114, 1974.

LINDOSO, JAL; LINDOSO, AABP. Neglected Tropical Diseases in Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v.51, p. 247–253, 2009.

LIMA, LC; SOARES, DM; GUIMARÃES, CT. '*Biomphalaria occidentalis*, Paraense, 1981, in the State of Minas Gerais, Brasil'. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. v. 88, n. 2, p. 289-92, 1993.

LIU, LX; QIONG, C; FAN, XL. Recent Advances in Antischistosomal Drugs and Agents. Mini Rev Med Chem, v. 17, n. 18, p. 1389-5575, 2013.

LUTZ, A. *Schistosoma mansoni* e a Schistosomatose segundo observações feitas no Brasil. Mem. do Inst. Oswaldo Cruz, v. 1, p. 121-155, 1919.

MALDONADO, JF; ACOSTA-MATIENZO, J. The development of *Schistosoma mansoni* in the snails intermediate host *Australorbis glabratus*. Puerto Rico J.Pub.Health Trop. Med, v. 22, p. 331-373, 1947.

MALEK, E; CHENG, T. Medical and economic malacology. New York, Academic Press, 1974.

MANZELLA, A et al. Schistosomiasis of the liver. Abdom Imaging, v. 33, n. 2, p. 144-150, 2008.

de MARIA, M; PELLEGRINO, J; OKABE, K. Predatory activity of *Luciola cruciata* larvae on newly hatched *Biomphalaria glabrata*. Mushi, v. 41, p. 121-122, 1967.

- MARQUES, DPA et al. Reduced susceptibility of a *Biomphalaria tenagophila* population to *Schistosoma mansoni* after introducing the resistant Taim/RS strain of *B. tenagophila* into Herivelton Martins Stream. Plos One, v. 9, n. 6, p. 1-5, 2014.
- MCCULLOUGH, FS et al. Molluscicides in schistosomiasis control. Bull World Health Organ, v. 58, p. 681-689, 1980.
- MELLO-SILVA, CC et al. Carbohydrate metabolism alterations in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* and exposed to *Euphorbia splendens* var. *hislopii* latex. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 105, p. 492-495, 2010.
- MELLO-SILVA, CC et al. Reproductive activity alterations on the *Biomphalaria glabrata* exposed to *Euphorbia splendens* var. *hislopii* latex. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 102, n. 6, p. 671-674, 2007.
- MELLO-SILVA, CC 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). Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 101, p. 1-6, 2006.
- MENDES, NM et al. Evaluation of the molluscicidal 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, NM et al. Ensaios preliminares em laboratório para verificar a ação moluscicida de algumas espécies da flora brasileira. Rev Saúde Públ São Paulo, v. 18, p. 348-354, 1984.
- MENDES, NM et al. Evaluation of the molluscicidal properties of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (N.E.B.) latex: experimental test in an endemic area of Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 92, p. 715-720, 1997.
- MICHELSON, EH. Studies on the biological control of schistosome-bearing snails. Predators and parasites of freshwater mollusca: a review of the literature. Parasitology, v. 47, p. 413-426, 1957.
- MONTEIRO, S; PIMENTA, DN. Ciência, Saúde e Educação: O legado de Virgínia Schall, Ed. Fiocruz. 2018. 469 p.
- MOTT, KE. Plant Molluscides. UNDP/World Bank/WHO, John Wiley & Sons, New York, 1987. 326 pp.
- MOZLEY, A. Freshwater mollusca of the Tanganyika Territory and the Zanzibar Protectorate, and their relation to human schistosomiasis. Trans. Roy. Soc, v. 59, p. 687-730, 1939.
- MURRAY, CJ et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. Lancet, v. 380, n. 9859, p; 2197-223, 2012

OLIVEIRA-FILHO, EC; PAUMGARTTEN, FJR. Photodegradation of the molluscicidal latex of Crown-of-Thorns (*Euphorbia milii* var. *hislopilii*). Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 92, p. 657-659, 1997.

OLIVEIRA-FILHO, EC; PAUMGARTTEN, FJR. Toxicity of *Euphorbia milii* Latex and Niclosamide to Snails and Nontarget Aquatic Species. Ecotox Environ Safe, v. 46, p. 342-350, 2000.

OLIVER-GONZALEZ, J. The possible role of the guppy, *Lebistes reticulatus*, on the biological control of *Schistosoma mansoni*. Science, v. 104, p. 605, 1946.

OLIVER, L; MAO, CP. The early larval stages of *Schistosoma mansoni* (Sambon,1907) in the snails host *Australorbis glabratus* (Say, 1818). J. Parasitol, v. 35, p. 267-275, 1949.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. O controle da esquistossomose: segundo relatório do comitê de especialistas da OMS. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 1993. 110 p. (Technical Reports Series, 830).

PARAENSE, WL. Histórico do *Schistosoma mansoni*. In: CARVALHO, OS; COELHO, PMZ; LENZI, HL, organizadores. *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Fiocruz. 2008. p. 31-41.

PARAENSE, WL. The schistosome vectors in the Americas. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 96, Suppl., p. 7-16, 2001.

PARAENSE, WL. Control of Schistosomiasis mansoni: an outlook from current expectation. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 82, p. 1-12, 1987.

PARAENSE, WL. Distribuição dos caramujos no Brasil. In: REIS, FA; FARIA, I; KATZ, Ns. Modernos Conhecimentos sobre Esquistossomose Mansônica. Belo Horizonte: Academia Mineira de Medicina; 1986; v. 1, p.117-128.

PARAENSE, WL. '*Biomphalaria occidentalis* sp. n. from South America (Mollusca Basommatophora Pulmonata)'. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 76, n. 2, p. 199-211, 1981.

PARAENSE, WL. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. Arq Mus Nac, v. 55, p. 105-128, 1975.

PARAENSE, WL. Planorbídeos hospedeiros intermediários de *Schistosoma mansoni*. In: Cunha AS, Esquistossomose mansônica. São Paulo: Sarvier, Edusp. 1970. p. 13-30.

PARAENSE, WL. Fauna Planorbídica do Brasil. In. LACAZ, CS et al. Introdução à Geografia Médica do Brasil. Edgard Blucher, Editora Universidade de São Paulo. 1972. p.213-239

PARAENSE, WL. Autofecundação e fecundação cruzada em *Australorbis glabratus*. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 53, p. 277-284, 1955.

PARAENSE, WL; CORRÊA, LR. Susceptibility of *Biomphalaria peregrina* from Brazil and Ecuador to two strains of *Schistosoma mansoni*. Rev Inst Med Trop São Paulo, v. 15, p. 127-30 1973.

PARAENSE, WL; CORRÊA, LR. Self-fertilization in freshwater snails *Helisoma duryi* and *Helisoma trivolvis*. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 83, p. 404-409, 1988 .

PARAENSE, WL; CORRÊA, LR. Variation in susceptibility of populations of *Australorbis glabratus* to a strain of *Schistosoma mansoni*. Rev. Inst. Med Trop. São Paulo, v. 5, p. 15-22, 1963.

PAULINYI, HM; PAULINI, E. Laboratory observations on the biological control of *Biomphalaria glabrata* by *Pomacea* (Ampullariidae). Bull. WHO, v.46, p. 243- 247, 1972.

PEGADO, AFJ. Gastrópodes e outros invertebrados bentônicos do sedimento litorâneo e associado à macrófitas aquáticas em açudes do semi-árido paraibano, nordeste do Brasil. 2002. 179 p. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

PEREIRA, LH et al. Recovery of young daughter sporocysts from snails infected with *Schistosoma mansoni*. Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg, v. 78, n. 4, p. 563, 1984.

PIMENTA, DN; STRUCHINER, M; MONTEIRO, S. A trajetória de Virgínia Schall: integrando Saúde, Educação, Ciência e Literatura. Ciênc. Saúde Coletiva, v. 22, n. 10, p. 3473-3480, 1984.

PINTO, C; ALMEIDA, AF. Um novo método para a profilaxia da esquistossomose mansoni. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 40, p. 291-311, 1994.

PONTIER, JP; JOURDANE, J. Biological control of the snail hosts of schistosomiasis in areas of low transmission: the example of the Caribbean area. Acta Trop, v. 77, p. 53-60, 2000.

PRATA, AR; COURA, JR. Fases e formas clínicas da esquistossomose mansoni. In: CARVALHO, OS; COELHO, PMZ; LENZI, H. *Schistosoma mansoni* & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Fiocruz. 2000. p. 739.

RAO, CB; SUSSELA, K. Chemical examination of *Euphorbia splendens* Boj. Indian J Chem, v. 21B, p. 495-496, 1982.

ROLLINSON, D et al. Time to set the agenda for schistosomiasis elimination. Acta Trop, v. 128, n. 2, p. 423-40, 2013.

ROUQUAYROL, MZ; SOUZA, MP; SILVA, MJM. Atividade moluscicida de plantas do nordeste brasileiro (III). Revista Brasileira de Farmacologia, v. 53, n. 5, p. 215-220, 1972.

SANTOS, MBL et al. Suscetibilidade ao *Schistosoma mansoni* de híbridos de *Biomphalaria tenagophila* do Taim, RS, Cabo Frio, RJ, e Belo horizonte, MG. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v. 21, p. 281-286, 1979.

SARVEL, AK et al. Evaluation of a 25-year-program for the control of schistosomiasis mansoni in an endemic area in Brazil. PLoS Negl Trop Dis, v. 5, n. 3, e990, 2011.

- SCHALL, VT et al. The control of the schistosome- transmitting snail *Biomphalaria glabrata* by the plant molluscicide *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (Syn *E. milli* Des. Moul): A longitudinal field study in an endemic area in Brasil. *Acta Trop*, v. 79, p; 165-170, 2001.
- SCHALL, VT et al. 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, n. 1, p. 7-10, 1998.
- SCHALL, VT et al. Evaluation of temporal, seasonal and geographic stability of the molluscicidal properties of *Euphorbia splendens* látex. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v. 34, p. 183-191, 1992.
- SCHALL, VT et al. Evaluation of the genotoxic activity and acute toxicity of *Euphorbia splendens* latex, a molluscicide for the control of schistosomiasis. *Brazilian J Med Biol Res*, v. 24, p. 573-582, 1991.
- SILVA-MORAES, V et al. Antischistosomal activity of a calcium channel antagonist on schistosomula and adult *Schistosoma mansoni* worms. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 108, n. 5, p. 600-604, 2013.
- SILVA, MJM; SOUZA, MP; ROUQUAYROL, MZ. Atividade moluscicida de plantas do nordeste brasileiro II. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 52, n. 3, p. 117-123, 1971.
- SOHN, IG; KORNICKER, LS. Predation of schistosomiasis vector snails by *Ostracoda* (Crustacea). *Science*, v. 175, p. 1258-1259, 1972.
- SOKOLOW, SH et al. Global assessment of schistosomiasis control over the past century shows targeting the snail intermediate host works best. *PLoS Negl Trop Dis.*, v. 10, n. 7, e0004794, 2016. doi:10.1371/journal.pntd.0004794.
- SOUZA, CAM et al. Study of the embryofeto-toxicity of Crown-of-Thorns (*Euphorbia milii* var. *hislopii*) latex, a natural molluscicide. *Brazilian J Med Biol Res*, v. 30, p. 1325-1332, 1997.
- STREISINGER, G et al. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*brachydanio rerio*). *Nature*, v. 291, p. 293–296, 1981
- TELES HMS, CARVALHO OS. Implicações da biologia de *Biomphalaria* no controle da Esquistossomose. In: CARVALHO, OS; COELHO, PMZ; LENZI, HL. *Schistosoma Mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar*. Rio de Janeiro: Fiocruz. 2008. p. 461-484.
- TELES, HMS; PEREIRA, PAC; RICHINITTI, LMZ. Distribuição de *Biomphalaria* (Gastropoda, Planorbidae) nos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, Brasil. *Rev. Saúde Pública*, v. 25, n. 5, p. 350-352, 1991.
- TEODORO, TM et al. Occurrence of *Biomphalaria cousini* (Mollusca: Gastropoda) in Brazil and its susceptibility to *Schistosoma mansoni* (Platyhelminths: Trematoda). *Mol Phyl Evol.*, v. 57, p. 144-151, 2010.

The Plant List, 2013. Version 1.1 Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org/> (acessado 11/06/2018).

VALADARES, TE et al. *Schistosoma mansoni*: Aspects of the oviposition of the LE strain in mice infected with a couple of worms. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v. 23, p. 6-11, 1981.

VALLE, C; PELLEGRINO, J; ALVARENGA, N. Ritmo circadiano de emergência de cercárias (. *Schistosoma mansoni*- *Biomphalaria glabrata*). Rev.Bras. Biol, v. 31, p. 53- 63, 1971.

VASCONCELLOS, MC; 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. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 98, n. 4, p. 557-563, 2003.

VASCONCELLOS, MC; SCHALL, VT. Latex of "coroa de cristo" (*Euphorbia splendens*): An effective molluscicide. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 81, n. 4, p. 475-476, 1986.

VOELKER, J. Nutrien, breeding, biology and life history of *Limnogeton fieberi*: Study of natural predator of tropical freshwater snails. En. Mitt. Zool. Staatinst. u. Zool. Mus. Hamburg, v. 3, p. 1-24, 1968.

UTZINGER, J et al. From innovation to application: social-ecological context, diagnostics, drugs and integrated control of schistosomiasis. Acta Trop., v. 120, Suppl 1, p. S121-37, 2011.

WEINZETT, LM; JUNBERG, P. Biological control of *Biomphalaria tenagophila* (Mollusca, Planorbidae), a schistosomiasis vector, using the fish *Geophagus brasiliensis* (Pisces, Cichlidae) in the laboratory or in a seminatural environment. Mem. Inst. Oswaldo cruz, v. 85, p. 35-38, 1990.

WESTERFIELD M. The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*). 5th ed. Eugene, Oregon, USA: University of Oregon Press. 2007

WHO.int [homepage on the Internet]. Geneva: World Health Organization, Inc.; c2019 [updated 2019 Jan 02; cited 2018 Nov 17]. Available from: <http://www.who.int/schistosomiasis/disease/en/>.

WHO. Field use of Molluscicides in Schistosomiasis Control Programmes Organization; Geneva, 2017.

WHO. Schistosomiasis: number of people treated worldwide in 2014. World Health Organization, v. 91, p. 53-60, 2016.

WHO. Schistosomiasis. 2014 Disponível em: <http://www.who.int/schistosomiasis/en/> - Acesso em 23/04/2014.

WHO. Schistosomiasis: progress report 2001–2011 and strategic plan 2012–2020. World Health Organization; Geneva, 1–80, 2013.

WHO a. Accelerating work to overcome the global impact of neglected tropical diseases – a roadmap for implementation. World Health Organization; Geneva, 1–42, 2012.

WHO b. Schistosomiasis: population requiring preventive chemotherapy and number of people treated in 2010. *Wkly Epidemiol Rec.*, v. 87, p. 37–44, 2012. PMID: 22308580.

WHO. Preventive chemotherapy in human helminthiasis: coordinated use of anthelmintic drugs in control interventions. World Health Organization; Geneva, 2006.

WHO. Prevention and control of schistosomiasis and soiltransmitted helminthiasis: report of a WHO expert committee. WHO Tech Rep Ser, 912, 2002.

WHO. The Control of Schistosomiasis: Second report of a WHO Expert Committee. World Health Organization; Geneva WHO Tech Rep Ser, 830, 1993.

WHO. Report of a Scientific Working Group on Plant Molluscicide and Guidelines for Evaluation of Plant Molluscicide. Geneva: World Health Organization, (TDR/SCH-SWE, (4)/83.3), 1983.

WHO. Epidemiology and Control of Schistosomiasis: report of a WHO Expert Committee. World Health Organization; Geneva, 1980.

WHO. Schistosomiasis Control. World Health Organization; Geneva. WHO Tech Rep Ser., 515, 1973.

WHO. Epidemiology and Control of Schistosomiasis: report of a WHO Expert Committee. World Health Organization; Geneva. WHO Tech Rep Ser., 372, 1967

WHO A. WHO Expert Committee on Bilharziasis: third report. World Health Organization; Geneva. WHO Tech Rep Ser., 299, 1965.

WHO B. Molluscicide screening and evaluation. *Bull World Health Organ*, 33, p. 567–581, 1965.

WHO. Molluscicides. Second report of the WHO Expert Committee on Bilharziasis. World Health Organization; Geneva. WHO Tech Rep Ser., 214, 1961.

YANG, G-J et al. Molluscicidal efficacies of different formulations of niclosamide: result of meta-analysis of Chinese literature. *Parasit Vectors*, v. 3, p. 84, 2010.

YUAN, HC et al. The 1992–1999 world bank schistosomiasis research initiative in China: outcome and perspectives. *Parasitol Int.*, v. 49, p. 195–207, 2000.

ZAMITH, HPS; PAUMGARTTEN, FJR; SPEIT, G. Evaluation of the molluscicidal latex of Christ's Crown (*Euphorbia milii* var. *hislopii*) in mammalian cells in vitro and in vivo. *Mutagenic Res*, v. 368, p. 15-20, 1996.

ZANI, CL et al. Molluscicidal miliamines from *Euphorbia milii* var. *hisloppi*. *Phytochemistry*, v. 34, n. 1, p. 89-95, 1993.

ZHOU, XN et al. The public health significance and control of schistosomiasis in China-then and now. *Acta Trop.*, v. 96, n. 2-3, p. 97-105, 2005.

8. ANEXOS

Anexo 1 - Carta do Ministério da Saúde


 MINISTÉRIO DA SAÚDE
 SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE
 DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA
 Esplanada dos Ministérios, Bloco G, Edifício Sede, 1º Andar, Sala 155
 70.058-900 - Brasília-DF
 Tel. (61) 3315.3522 / 3226.6682 / 3213.8133 / 3213.8135

SIPART - Ministério da Saúde

Registro Número:

25000.163.586/2010-23

Ofício nº 187 DEVEP/SVS/MS

Brasília, 21 de setembro de 2010.

A Sua Senhoria a Senhora
 VIRGÍNIA TORRES SCHALL
 Pesquisadora Titular
 Laboratório de Educação em Saúde e Ambiente – LAESA
 Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz
 Av. Augusto de Lima, 1715, Barro Preto
 30.190-020 – Belo Horizonte/MG

Assunto: Informações sobre pesquisa com moluscicida biológico em desenvolvimento no Laboratório de Educação em Saúde e Ambiente – LAESA/René Rachou-Fiocruz/MG.

Senhora Pesquisadora,

1. Ao tempo em que cumprimento cordialmente Vossa Senhoria solicito informações a respeito do desenvolvimento da pesquisa para produção de um moluscicida de origem vegetal, que tem como produto final, o látex liofilizado da planta “coroa de Cristo”. Sabe-se que o Laboratório de Educação em Saúde e Ambiente – LAESA/René Rachou-Fiocruz/MG, vem conduzindo esta pesquisa, cujos resultados são promissores e se tiver eficácia comprovada, será um marco para o controle biológico dos moluscos no País.
2. Os estudos até então publicados sobre o látex da coroa de Cristo indicam que a planta merece investimento para viabilizar sua produção, por tratar-se de uma espécie vegetal que se desenvolve bem nas áreas endêmicas dos estados das regiões Sudeste e Nordeste.
3. As substâncias moluscicidas são um fator crucial para o controle da esquistossomose. No momento apenas um produto sintético, a niclosamida, pó molhável a 70%, é recomendada pela Organização Mundial de Saúde - OMS, como moluscicida. O uso de moluscicidas sintéticos, além de ser importado, é de alto custo e tem causado problemas de toxicidade, contaminação do meio ambiente, além de não serem seletivos e ocasionarem a resistência dos caramujos (*Biomphalaria glabrata*, *tenagophila* e *straminea*) espécies hospedeiras intermediárias do *Schistosoma mansoni* e transmissores da esquistossomose. Todavia, o uso de plantas com atividade moluscicida poderá representar uma alternativa de baixo custo, além de não poluir o meio ambiente.

FL. 02 do Ofício nº DEVEP/SVS/MS, de de agosto de 2010.

4. Tendo em vista, que o Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose-PCE, tem como uma das prioridades de linha de pesquisa, o desenvolvimento de novos moluscídeos e também carece de informações e conhecimentos atuais na área de controle de planorbídeos, a fim de orientar os técnicos e profissionais de campo que desempenham as atividades de malacologia, além da necessidade em dispor de um produto natural e eficaz para o controle dos hospedeiros intermediários do *S. mansoni*.

5. Para informações adicionais, seu corpo técnico poderá contatar a Subcoordenação de Hídricas e Alimentares-Sub-HA, GT2-Parasitárias: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose, pelos telefones (61) 3213.8135, 3213.8133 ou 3213.8131.

Atenciosamente,



Carla Magda A. S. Domingues
Diretora do Departamento de Vigilância Epidemiológica
Substituta

Anexo 2 – Folha de rosto Parecer EVP 02/2018

**Parecer EVP02/18 – Instituto René Rachou****RELATÓRIO DE VIABILIDADE PATENTÁRIA**

Data de entrada:	09/11/2017
Unidade:	Instituto René Rachou (IRR)
Inventores:	Paulo Marcos Zech Coelho (IRR) Cynthia de Paula Andrade (IRR) Edward José de Oliveira (IRR)
Título:	Produto moluscicida composto por látex extraído da planta <i>Euphorbia splendens</i> var. <i>hislopilii</i> para aplicação no controle dos caramujos, hospedeiros da esquistossomose mansoni.

9. APÊNDICE

Artigo publicado na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

Major Article

Development of a natural molluscicide prototype kit (MoluSchall) for the control of schistosomiasis mansoni transmission

**Cynthia de Paula-Andrade^[1], Paulo Ricardo Silva Coelho^[1],
Ricardo Aurélio Pinto Nascimento^[2], Pedro Moacyr Pinto Coelho Mota^[2],
Marco Aurélio Romano-Silva^[3], Kevin Augusto Faria de Alvarenga^[3], Virgínia Torres Schall^{[4]†},
Denise Nacif Pimenta^[4], Paulo Marcos Zech Coelho^[1] and Edward Oliveira^[4]**

[1]. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto René Rachou, Diagnóstico e Terapia de Doenças Infecciosas e Oncológicas, Belo Horizonte, MG, Brasil.

[2]. Laboratório Nacional Agropecuário, Pedro Leopoldo, MG, Brasil.

[3]. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina, Laboratório de Neurociência, Belo Horizonte, MG, Brasil.

[4]. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto René Rachou, Pesquisa Clínica e Políticas Públicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Abstract

Introduction: In Brazil, *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila*, and *B. straminea* are intermediate hosts of *Schistosoma mansoni*, the etiological agent of schistosomiasis mansoni. Molluscicide use is recommended by the WHO for controlling the transmission of this parasite. *Euphorbia milii* latex has shown promising results as an alternative molluscicide. Thus, a natural molluscicide prototype kit based on freeze-dried *E. milii* latex was developed and evaluated against *Biomphalaria* spp. **Methods:** *E. milii* latex was collected, processed, and lyophilized. Two diluents were defined for freeze-dried latex rehydration, and a prototype kit, called MoluSchall, was produced. A stability test was conducted using prototype kits stored at different temperatures, and a toxicity assay was performed using *Danio rerio*. Additionally, MoluSchall was tested against *B. glabrata* under semi-natural conditions according to defined conditions in the laboratory. **Results:** MoluSchall was lethal to three Brazilian snail species while exhibiting low toxicity to *D. rerio*. Regardless of storage temperature, MoluSchall was stable for 24 months and was effective against *B. glabrata* under semi-natural conditions, with the same LD₁₀₀ as observed under laboratory conditions. **Conclusions:** MoluSchall is a natural, effective, and inexpensive molluscicide with lower environmental toxicity than existing molluscicides. Its production offers a possible alternative strategy for controlling *S. mansoni* transmission.

Keywords: *Euphorbia milii*. MoluSchall. Natural molluscicide. Prototype kit. Schistosomiasis control.

INTRODUCTION

Human schistosomiasis is a parasitic disease caused by trematode flukes of the genus *Schistosoma*. More than 240 million people worldwide have schistosomiasis, and almost 700 million are at risk of infection¹. Of the six *Schistosoma* spp. that

cause human infections, only *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907) maintains a life cycle in the American continent. Brazil is considered an important endemic country, with approximately 1.5 million infected individuals².

Freshwater snails of the genus *Biomphalaria* (Preston, 1910) are the intermediate hosts of *S. mansoni*. In Brazil, the species *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835), and *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) are naturally infected and are essential for the transmission of *S. mansoni*³.

It is necessary to carry out integrated measures to implement and sustain successful control programs. These integrated

† in memoriam

Corresponding author: Dr. Edward Oliveira.

e-mail: edward.oliveira@fiocruz.br

Orcid: 0000-0002-0042-5178

Received 29 May 2019

Accepted 6 September 2019

measures should include the use of chemotherapy in association with the use of molluscicides for snail control, as well as educational interventions and improved sanitation systems, including a regular supply of treated water⁴.

For the past few decades, the WHO has recommended the application of the synthetic molluscicide, niclosamide, which is the 2-amino ethanol salt of 2',5-dichloro-4'-nitro salicylanilide or Bayluscide®, in natural sites where snails are present. Since a report published in 1953 by the WHO, the use of molluscicides in schistosomiasis control has been recommended along with other control measures⁵. In 1961, another report concluded that the application of molluscicides in the fight against intermediate hosts was the single most efficient measure for controlling schistosomiasis⁶. Recently, the WHO published an operational manual to facilitate the reintroduction of practices and protocols for the field use of molluscicides in schistosomiasis control programs, reaffirming their importance in these programs⁴.

In Brazil, since the 1970s, the synthetic molluscicide Bayluscide® has been used in national schistosomiasis control programs⁷. However, after 1986, its use progressively decreased and starting in 2002, the Brazilian Ministry of Health did not register the use of Bayluscide® in the country⁷. According to Coelho and Caldeira⁷, this decrease was probably associated with the lack of specificity to *Biomphalaria* and to more stringent regulations regarding the use of toxic substances in aquatic ecosystems.

In this context, natural molluscicides are a promising alternative to synthetic chemicals since they are locally available, cheaper, and less hazardous to the aquatic environment⁸. Several authors have demonstrated the molluscicidal effects of some plants against snail species^{9,10,11}. The latex of *Euphorbia milii* var. *hislopii* (N.E.Br.) Ursch & Leandri 1955 (Syn. *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.Br.), also known as the "Crown of Christ", showed the lowest lethal dose mentioned in the literature⁹.

The lethal dose defined for *Euphorbia* spp. complies with the WHO recommendations for a plant to be considered a molluscicide⁹. Furthermore, toxicological tests have revealed no toxic effects at the concentrations utilized¹²⁻¹⁵.

Here, we present a prototype kit based on *E. milii* latex that is effective against the three species of *Biomphalaria* naturally infected by *S. mansoni* in Brazil.

METHODS

Latex collection

Specimens of *E. milii* var. *hislopii* were cultivated in an area of approximately 1.35 m² in the Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO), Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brazil (19°38'01.9"S, 44°02'42.3"W).

Samples of latex were collected every two months for three years. After longitudinal incisions were made in the stems, specimens were stored in Falcon® tubes (Corning Brasil Ind & Comercio Ltda, São Paulo, SP, Brazil). After collection, the samples were rapidly transported in plastic boxes, at room

temperature, to the Instituto René Rachou, Oswaldo Cruz Foundation (IRR/FIOCRUZ), where they were processed.

Snails

All snails used in this study were produced by Moluscário Lobato Paraense, IRR/FIOCRUZ, and included the following: 600 uninfected *B. glabrata* measuring 3 to 6 mm in diameter; 2,430 uninfected *B. glabrata* measuring 10 to 12 mm in diameter; 180 uninfected *B. glabrata* measuring 12 to 17 mm in diameter; and 180 *B. glabrata* measuring 12 to 17 mm in diameter that were infected for 39 days with *S. mansoni* (LE strain). We also used 180 uninfected *B. tenagophila* measuring 10 to 12 mm in diameter and 180 uninfected *B. straminea* measuring 5 to 10 mm in diameter.

E. milii latex preparation and freeze-drying

Crude latex was filtered through surgical gauze and the pH was measured with a pH meter (Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA). The latex was aliquoted in amber vials (5 mL/vial), weighed on an analytical balance (Sartorius AG, Goettingen, GE), and frozen at -80°C for 18 h before being subjected to freeze-drying in an Alpha2-4 LD plus lyophilizer (Martin Christ GmbH, Osterode am Harz, GE) at 0.020 mbar and -55°C for 24 h. At the end of the process, the vials were vacuum sealed, the dry mass was weighed, and the vials were stored in a refrigerator at 2-8°C.

Freeze-dried *E. milii* latex rehydration

In a previous experiment, we observed that water did not fully rehydrate freeze-dried *E. milii* latex. To improve the rehydration, a series of additives were included in the latex preparation, such as 5% trehalose, 5% trehalose + 10% mannitol, 5% trehalose + 10% betaine, 5% and 20% mannitol, 5% and 10% N-carboxymethylcellulose (CMC), 0.5% CMC + 15% mannitol, 5% mannitol + 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.16 M N-acetylcysteine (NAC), and 2 mg/mL ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). After the freeze-drying process, the final product was rehydrated with water and the latex dissolution was visually evaluated. After several tests, a formulation was developed consisting of two diluents, denoted in this work as Diluent 1 and Diluent 2. After adding these diluents, it was possible to completely rehydrate the freeze-dried *E. milii* latex.

Freeze-dried *E. milii* latex proof-of-concept

In the proof-of-concept phase, freeze-dried *E. milii* latex was rehydrated with Diluent 1 and Diluent 2 and tested against *B. glabrata*. For this, 90 uninfected *B. glabrata* measuring 10 to 12 mm in diameter were used. The snails were separated into subgroups of 10 snails and placed in triplicate in beakers containing latex diluted to 1 µL/L and 10 µL/L in dechlorinated water. For the control group, snails were separated into subgroups of 10 snails and maintained in dechlorinated water containing Diluent 1 and Diluent 2 under the same conditions. The mortality rates were 80% and 100% at 1 µL/L and 10 µL/L, respectively. There was no mortality in the control group. These results confirmed the molluscicidal activity of the latex after the freeze-drying process.

A molluscicide prototype kit: MoluSchall

A prototype kit was composed of 10 vials of freeze-dried *E. milii* latex, 10 vials of Diluent 1 (5 mL), and 10 vials of Diluent 2 (5 mL). The molluscicide prototype kit was called MoluSchall in honor of Dra. Virginia Torres Schall, the researcher who highlighted the molluscicidal activity in her pioneering work^{12,16,17}.

Lethal Dose (LD₁₀₀) of MoluSchall against *Biomphalaria* spp.

The latex LD₁₀₀ determination was performed according to the methodology recommended by the WHO and described by Schall et al.¹⁷. In this experiment, 180 snails of three species, including *B. glabrata*, *B. tenagophila*, and *B. straminea* were separated into groups A, B, and C, respectively.

Using 150 snails from groups A, B, and C, subgroups of 10 snails were formed. These snails were exposed in triplicate to the molluscicide diluted to 1, 2, 4, 8, and 12 µL/L in dechlorinated water. For controls, 30 snails of each species were separated into subgroups of 10 individuals and kept in triplicate in dechlorinated water containing 12 µL/L of Diluent 1 and 12 µL/L of Diluent 2. The snails were maintained in beakers with 500 mL of the different solutions for 24 h at room temperature. After exposure, the snails were removed from the beakers and washed, and the live snails were returned to the same beakers containing 500 mL of dechlorinated water only. Pieces of lettuce were added to the beakers, and the snails were observed for more than 24 h to assess mortality. Dead and surviving animals were counted after 48 h. Mortality was identified by the loss of muscle contraction and heartbeat, shell discoloration, deterioration of the cephalopodal mass, and hemolymph release via a stereoscopic microscope.

Lethal Dose (LD₁₀₀) of MoluSchall against infected *B. glabrata*

In addition, molluscicidal activity assays were performed on *B. glabrata* infected with *S. mansoni*. For this experiment, 360 snails were equally separated into an infected and uninfected group. The snails in both groups were separated into subgroups of 10 snails and exposed in triplicate to MoluSchall diluted to 1, 2, 4, 8, and 12 µL/L in dechlorinated water. As controls, 30 snails from each group were separated into subgroups of 10 and kept in triplicate in dechlorinated water containing 12 µL/L of Diluent 1 and 12 µL/L of Diluent 2. Snail mortality was measured as described above in the LD₁₀₀ determination experiment.

Thermal stability of MoluSchall

A thermal stability test was conducted over 24 months using prototype kits stored in a refrigerator (2-8°C), at ambient temperature (22-26°C), and in an incubator (37°C). Every two months, one vial from each prototype kit stored at the different temperatures was randomly chosen, and its physical appearance was visually assessed. Subsequently, the vials were rehydrated with Diluent 1 and Diluent 2 and tested against ten *B. glabrata* snails placed in triplicate in beakers containing MoluSchall diluted to 8 µL/L in dechlorinated water for 24 h at room

temperature. As the control group, 10 snails in triplicate were kept in beakers containing 8 µL/L Diluent 1 and Diluent 2 in dechlorinated water under the same conditions. Mortality was assessed as described in the LD₁₀₀ determination experiment.

Toxicity bioassay for MoluSchall

To investigate the toxicity of MoluSchall, *Danio rerio* (Hamilton, 1822) fingerlings that were three days post-fertilization were collected after natural spawning and reared in E2 embryo medium (E2) at 28°C at a density of 60 fingerlings/Petri dish^{18,19}.

Groups of five *D. rerio* fingerlings were placed in duplicate in culture plates containing MoluSchall diluted to 8, 16, 32, 64, and 128 µL/L in E2 medium. As the control group, 10 *D. rerio* fingerlings were maintained in a culture plate containing only E2 medium. The toxicity of MoluSchall was evaluated every 24 h over 72 h of exposure. At the end of the experiment, mortality was assessed.

Field MoluSchall activity assay

The molluscicidal activity of MoluSchall in semi-natural conditions was also evaluated in three artificial puddles containing 1,000 L of water. For this experiment, 1,800 uninfected *B. glabrata* were used and separated into three groups, puddle A, puddle B, and a control puddle, with each group containing 200 snails that were 3 to 6 mm in diameter, 200 snails that were 7 to 9 mm in diameter, and 200 snails that were 10 to 12 mm in diameter.

Puddles A and B were treated with MoluSchall at 8 µL/L and 12 µL/L, respectively, while the control puddle was not treated. The researchers followed the WHO's safety instructions⁴ at all stages of application to prevent direct contact with the skin or eyes.

After 48 h of MoluSchall exposure, the snails were collected and observed, and mortality was assessed. A second experiment was performed on a different day.

Statistical analysis

The results were expressed as percentages of the total number of snails used in the bioassays and subjected to analysis of variance (ANOVA), Tukey's multiple comparisons test, and the Student's t-test (or Mann-Whitney test) using the program GraphPad Prism 4.0.

Ethical considerations

The experimental and breeding procedures used for the *D. rerio* fingerlings were approved by the Ethics Committee for Animal Use of the Federal University of Minas Gerais State (CEUA/UFMG), under protocol no. 9/2012.

RESULTS

Twenty-nine latex samples were collected throughout the study. On average, 60 mL were collected on the appropriate day. The average weight ratio of the crude to the freeze-dried *E. milii* latex showed that 5 mL weighed approximately 1 g post-freeze-drying. However, this equivalency was not constant, as the weight varied from 1.02 to 1.24 g, with a mean of 1.09 g per vial.

The LD₁₀₀ was 8 µL/L against *B. glabrata* and *B. straminea* and 4 µL/L against *B. tenagophila*. There was a statistical difference between the LD₁₀₀ of *B. glabrata* and *B. straminea* when compared to *B. tenagophila* ($p = 0.031$). No

mortality occurred in the control groups, which were exposed to dechlorinated water containing only Diluent 1 and Diluent 2 (Figure 1). The snails in all control groups were active, foraging in the beaker, and consuming the lettuce during the recovery period.

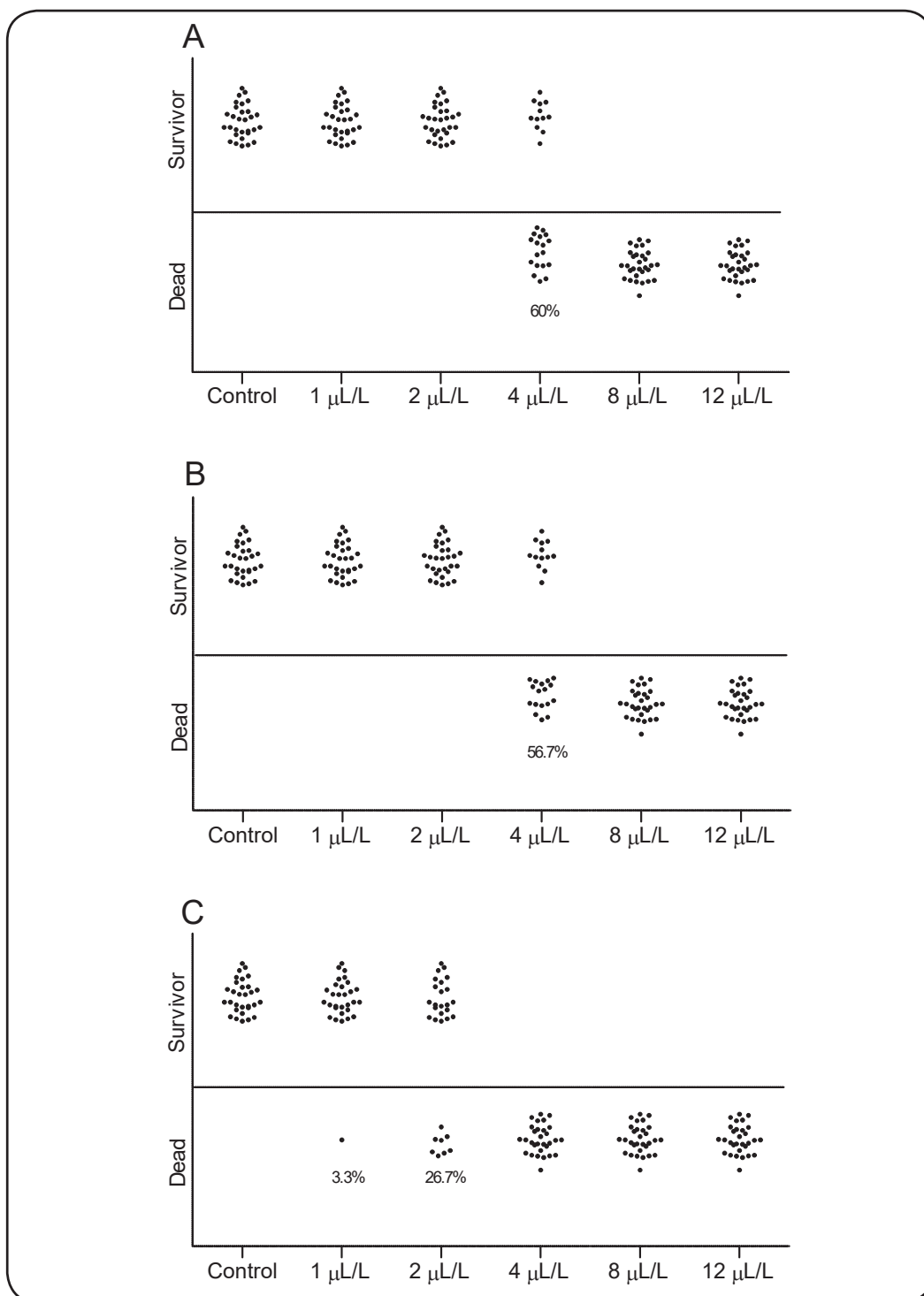


FIGURE 1: The lethal dose (LD₁₀₀) of MoluSchall against adult *B. glabrata* (A), *B. straminea* (B), and *B. tenagophila* (C) snails, after 48 h of exposure to MoluSchall. For each dilution, 30 adult snails were placed in three beakers (10 snails/beaker) containing 1, 2, 4, 8, or 12 µL/L of MoluSchall diluted in 500 mL of dechlorinated water. As the control group, 30 *B. glabrata*, 30 *B. straminea*, and 30 *B. tenagophila* snails were distributed in beakers (10 snails/beaker) and exposed to dechlorinated water containing 12 µL Diluent 1 and Diluent 2 under the same conditions. There was a significant difference between the LD₁₀₀ in *B. glabrata* and *B. straminea* when compared to *B. tenagophila*, $p = 0.031$.

The activity of MoluSchall against *B. glabrata* adults infected with *S. mansoni* is shown in **Figure 2**. When MoluSchall was used at 2 $\mu\text{L/L}$ in dechlorinated water, 63.3% of the infected and 3.3% of the uninfected *B. glabrata* were found dead, and the difference was significant ($p = 0.038$). At 4 $\mu\text{L/L}$, the mortality rates were 100% and 96.7% for infected and uninfected *B. glabrata*, respectively, with no significant difference ($p > 0.05$). In the infected control group, a mortality rate of 10% was observed, with no significant difference ($p = 0.098$) compared to the uninfected control group exposed to dechlorinated water, with Diluent 1 and Diluent 2.

MoluSchall demonstrated stability for 24 months at the three temperatures tested. Snail mortality was 100% after 48 h of exposure to 8 $\mu\text{L/L}$ molluscicide diluted in dechlorinated water in every activity assay. No mortality occurred in the control group, which was only exposed to dechlorinated water containing Diluent 1 and Diluent 2 (data not shown). MoluSchall diluted to 8 $\mu\text{L/L}$

and 16 $\mu\text{L/L}$ in E2 medium was not lethal to *D. rerio* fingerlings after 72 h of exposure. However, MoluSchall killed 30% of the fingerlings at 32 $\mu\text{L/L}$ and killed 100% of the fingerlings at dilutions of 64 $\mu\text{L/L}$ and 128 $\mu\text{L/L}$ after 72 h of exposure (**Figure 3**).

In the artificial puddles treated with 8 $\mu\text{L/L}$ and 12 $\mu\text{L/L}$ MoluSchall, a mortality rate of 100% was observed for *B. glabrata*, regardless of the snail size, after 48 h of molluscicide exposure (**Figure 4**). In the untreated puddle, the mortality rate was 0.5% and was not significantly different from the expected 0% ($p > 0.05$). As in the laboratory tests, snails were evaluated for mortality by visual inspection and via a stereoscopic microscope using the same criteria.

DISCUSSION

This study utilized a molluscicide prototype kit, which was developed using freeze-dried *E. milii* latex and appropriate diluents. The important choice of diluent led to the success of this

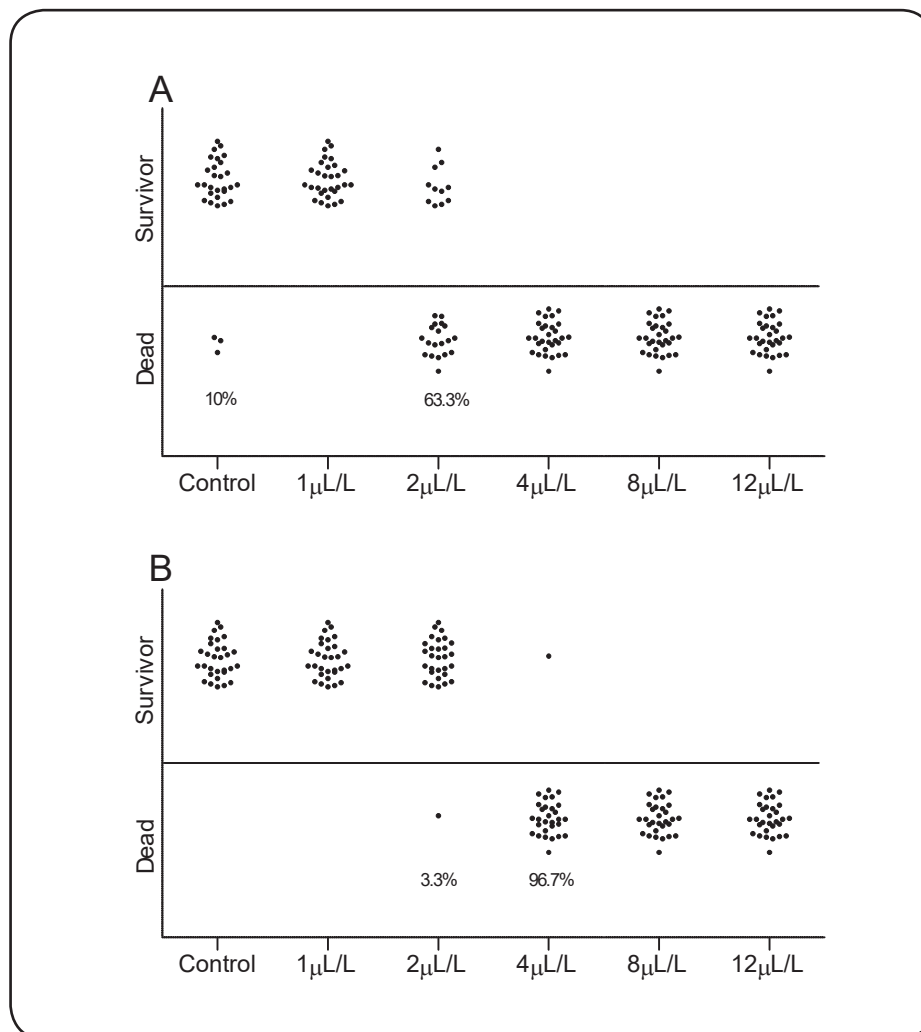


FIGURE 2: The lethal dose (LD_{100}) of MoluSchall against *B. glabrata* infected (A) and uninfected (B) with *S. mansoni*, after 48 h of exposure. The results correspond to the total number of snails (30) placed in the three beakers (10 snails/beaker) containing 1, 2, 4, 8, or 12 $\mu\text{L/L}$ of MoluSchall diluted in dechlorinated water. As the control group, 30 infected and uninfected *B. glabrata* were placed in beakers and exposed to dechlorinated water containing 12 μL Diluent 1 and Diluent 2 under the same conditions. There was a significant difference between infected (A) and uninfected (B) *B. glabrata*; $p = 0.038$.

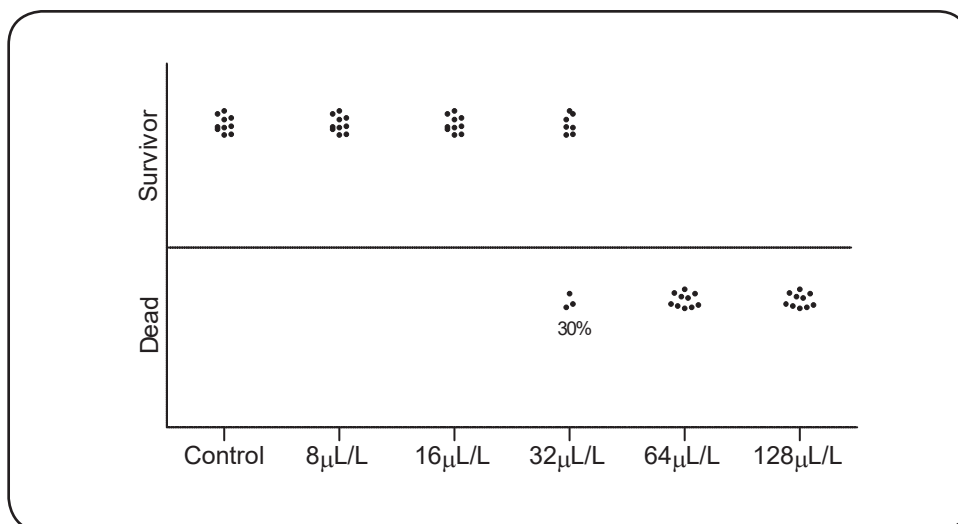


FIGURE 3: Representation of the toxicity assay for different dilutions of MoluSchall against *D. rerio* fingerlings after 72 h of exposure. The results correspond to the number of surviving and dead *D. rerio* fingerlings (10) exposed to each dilution for 72 h.

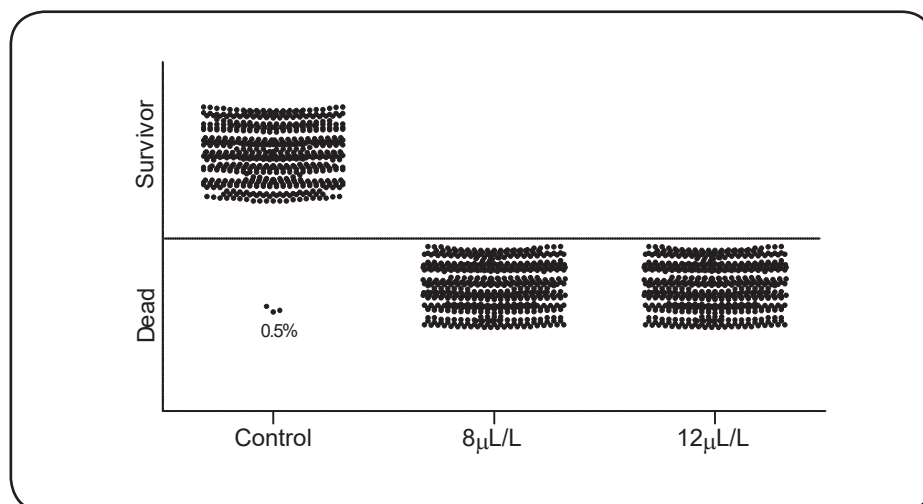


FIGURE 4: Representation of MoluSchall activity against *B. glabrata* under semi-natural conditions. The results correspond to the total number of snails exposed on different days to 8 µL/L and 12 µL/L MoluSchall in water for 48 h. The control group was kept in only water for 48 h in a separate puddle.

prototype kit. Previously, Mendes et al.²⁰ had reported problems in the field with reconstitution of the lyophilized latex. These authors associated the low mortality rate with low solubility of the *E. milii* latex. We also had difficulty reconstituting lyophilized latex in water alone or when substances other than Diluent 1 or Diluent 2 were used.

Studies involving *E. milii* latex as a potential molluscicide have previously been performed. Vasconcellos and Schall¹⁶ showed that the lethal concentrations that killed 90% of snails (LC_{90}) were lower than 0.5 ppm against *B. glabrata* and *B. tenagophila* that were grown under laboratory conditions and 4.0 ppm against *B. tenagophila* obtained from the natural environment. Later, Schall et al.¹⁷ used freeze-dried *E. splendens* latex and observed an LD_{100} of 0.2 ppm against adult and newly hatched *B. glabrata* and 0.4 ppm against adult *B. tenagophila*

and *B. straminea*. In this study, we found LD_{100} values of 4 µL/L (4 ppm, v/v) against *B. tenagophila* and 8 µL/L (8 ppm, v/v) against *B. glabrata* and *B. straminea*, which are higher than the concentrations found by Schall et al.¹⁷. We believe that this inconsistency can be explained by the different study conditions. Unfortunately, the lethal effects between *E. splendens* latex and freeze-dried *E. milii* latex were not compared in this study.

The LD_{100} values determined in the current study do not exceed the 20 mg/L estimated by the WHO²¹ as the value that will kill 90% of snails after exposure for 24 h. The LD_{100} values found against infected and uninfected *B. glabrata* with shell diameters of 12 to 17 mm were lower than those with diameters of 10 to 12 mm. Furthermore, a mortality rate difference between infected and uninfected *B. glabrata* was observed at the 2 µL/L dilution ($p = 0.038$). This difference was likely to

be due to lesions in the digestive gland, the hepatopancreas, as a consequence of parasite action²². Mello-Silva et al.²² analyzed glucose content variation in snails exposed to a sub-lethal dose of *E. splendens* latex for 24 h and also determined that infected *B. glabrata* were more susceptible to latex than uninfected snails.

Some snails exposed to higher dilutions for 24 h presented a reduction in muscle contraction and heart rate and were retracted into their shell. This behavior suggests that the substances affected the snails even though no mortality was seen after 24 h of exposure (data not shown). According to Mello-Silva et al.²³, physiological changes occur in snails exposed to low doses of *E. milii* latex, altering the glycogen reserves in the digestive gland and the protein content in the hemolymph of *B. glabrata*. These authors believe that the reduced snail movement could be related to the increase in glycogen content in the cephalopodal mass. McCullough et al.²⁴ reported that molluscicides probably induce stress on the water balance system, which is thought to be under neurosecretory control in gastropods. Araújo et al.²⁵ demonstrated histological alterations, such as degeneration, necrosis, and liquid accumulation in the digestive gland and kidney tissues of *Lymnaea columella* (Say, 1817) exposed to *E. splendens* latex.

Another study demonstrated that the exposure of *S. mansoni* cercariae to a low concentration of *E. milii* latex produced effects in adult worms, including a reduction in the parasite burden and the number of eggs released, changes in the male tegument, and alterations in molecular functions²⁶. Regarding the stability of the prototype kit, its physical aspects and molluscicidal activity against *B. glabrata* were maintained at all storage temperatures tested for 24 months. These results corroborate the work of Schall et al.²⁷, which showed effective molluscicidal activity of lyophilized latex for 24 months when stored in a refrigerator.

It was not possible to verify the seasonal variation of the molluscicidal activity of *E. milii* latex, which was a limitation of this study. However, Schall et al.²⁷ collected *E. milii* latex from different regions of Brazil throughout the year and demonstrated the consistency of its molluscicidal activity against *B. tenagophila*. In contrast, Vasconcellos and Amorim²⁸ tested *E. splendens* latex against *L. columella* and observed seasonal variations in the molluscicidal activity.

In the current study, only dilutions eight times higher than the LD₁₀₀ defined for molluscicide use were lethal to *D. rerio*, which is a freshwater fish known for its significant sensitivity to chemical substances¹⁸. These animals can quickly absorb compounds that are added to the water and these compounds accumulate in different tissues, mainly in the central nervous system²⁹. Similarly, Oliveira-Filho and Paumgarten¹⁵ observed that freeze-dried *E. milii* latex was approximately four times less toxic than niclosamide to *D. rerio* adults.

The field molluscicidal activity of MoluSchall was the same as that observed in the laboratory. The 8 µL/L dilution of MoluSchall, defined as the LD₁₀₀ against *B. glabrata*, was effective in killing all snails after 48 h of exposure. Therefore, the yield per vial of the MoluSchall kit is 1,250 L of treated water. Thus, the kit can treat up to 12,500 L of water. Although

the results are promising, it is necessary to conduct additional MoluSchall field studies under natural conditions, including both lentic and lotic environments, as mentioned by Mendes et al.^{20,30}.

Considering the results presented, MoluSchall is an excellent candidate for a natural molluscicide and it is useful as an alternative strategy for controlling schistosomiasis transmission.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMG) for the doctoral scholarship. We also thank Alexandre Henrique dos Santos of the Laboratório Nacional Agropecuário, LANAGRO, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. We also thank Dr. Liana Konovaloff Jannotti Passos and Dr. Lângia Colli Montresor of Moluscário Lobato Paraense and Dr. Ana Paula Granado and MSc. Cristiana Carrara of Núcleo de Inovação Tecnológica, Instituto René Rachou. E. Oliveira is research fellows supported by CNPq, the National Council for the Development of Research of Brazil.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Financial support

This study received partial financial support from the Instituto René Rachou, Oswaldo Cruz Foundation.

REFERENCES

1. World Health Organization (WHO). Schistosomiasis [Internet]. Geneva: WHO. [updated 2019 Jan 02; cited 2019 Feb 17]. Available from: <http://www.who.int/schistosomiasis/disease/en/>.
2. Ministério da Saúde (MS). Portalms.saude [Internet]. Brasília: MS; 2017 [updated 2019 Jan 02; cited 2018 May 17]. Available from: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/esquistossomose/situacao-epidemiologica>
3. Paraense WL. The schistosome vectors in the Americas. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001;96:7-16.
4. World Health Organization (WHO). Field use of Molluscicides in Schistosomiasis Control Programmes: an operational manual for programme managers. Geneva: WHO; 2017. 50p.
5. World Health Organization (WHO). Molluscicides. First Report of the Expert Committee on Bilharziasis. Technical Report Series 65. Geneva: WHO; 1953. 48p.
6. World Health Organization (WHO). Second Report of the Expert Committee on Bilharziasis. Technical Report Series 214. Geneva, WHO; 1961. 54p.
7. Coelho PMZ, Caldeira RL. Critical analysis of molluscicide application in schistosomiasis control programs in Brazil. Infect Dis Poverty. 2016;5:57.
8. Oliveira-Filho EC, Geraldino BR, Coelho DR, De-Carvalho RR, Paumgarten FJR. Comparative toxicity of *Euphorbia milii* latex and synthetic molluscicides to *Biomphalaria glabrata* embryos. Chemosphere. 2010;81(2):218-27.
9. Mott KE. Plant Molluscicides. New York, John Wiley & Sons, 1987. 326 p.

10. Pereira LPLA, Dias CN, Miranda V, Firmo WCA, Rosa CS, Santos PF, et al. Molluscicidal effect of *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns latex on *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* host snail. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2017;59:e85. doi: 10.1590/S1678-9946201759085.
11. Mendes RJA, Filho AAP, Nogueira AJL, Araújo KRF, França CRC, Carvalho IB, et al. Evaluation of molluscicidal activity of three mangrove species (*Avicennia schaueriana*, *Laguncularia racemosa* and *Rhizophora mangle*) and their effects on the bioactivity of *Biomphalaria glabrata* Say, 1818. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2018;60:e7. doi.org/10.1590/S1678-9946201860007.
12. Schall VT, Vasconcellos MC, Valent GU, Sato MIZ, Furian EV, Sanchez PS. Evaluation of the genotoxic activity and acute toxicity of *Euphorbia splendens* latex, a molluscicide for the control of schistosomiasis. *Braz J Med Biol Res*. 1991;24(6):573-82.
13. Zamith HPS, Paumgartten FJR, Speit G. Evaluation of the moluscicidal latex of Christ's Crown (*Euphorbia milii* var. *hislopii*) in mammalian cells in vitro and in vivo. *Mutat Res*. 1996;368:15-20.
14. Souza CAM, Carvalho RR, Kuriyma SN, Araújo LB, Rodrigues RP, Volmer RS, et al. Study of the embryofeto-toxivity of Crown-of-Thorns (*Euphorbia milii* var. *hislopii*) latex, a natural molluscicide. *Braz J Med Biol Res*. 1997;30(11):1325-32.
15. Oliveira-Filho EC, Paumgartten FJR. Toxicity of *Euphorbia milii* Latex and Niclosamide to Snails and Nontarget Aquatic Species. *Ecotoxicol Environ Safe*. 2000;46(3):342-50.
16. Vasconcellos MC, Schall VT. Latex of "coroa de cristo" (*Euphorbia splendens*): An effective molluscicide. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1986;81(4):475-6.
17. Schall VT, Vasconcellos MC, Souza CP, Baptista DF. 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*. 1998;58(1):7-10.
18. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn*. 1995;203:253-310.
19. Westerfield M. *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*. 5th ed. Eugene: University of Oregon Press; 2007. 654p.
20. Mendes NM, Baptista DF, Vasconcellos MC, Schall VT. Evaluation of the molluscicidal properties of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (N.E.B) (Euphorbiaceae). 1. Experimental test in a lentic habitat. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1992;87:21-3.
21. World Health Organization (WHO). Report of a Scientific Working Group on Plant Molluscicide and Guidelines for Evaluation of Plant Molluscicide. Geneva: WHO; 1983. 11p.
22. Mello-Silva CC, Vilar M, Vasconcellos MC, Pinheiro J, Rodrigues MLA. Carbohydrate metabolism alterations in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* and exposed to *Euphorbia splendens* var. *hislopii* latex. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010;105:492-5.
23. Mello-Silva CC, Vasconcellos MC, Pinheiro J, Rodrigues MLA. 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). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101:1-6.
24. McCullough FS, Gayral PH, Duncan J, Christie JD. Molluscicides in schistosomiasis control. *Bull World Health Organ*. 1980;58:681-9.
25. Araújo SM, Pile EAM, Barros JSL, Santos JAA, Vasconcellos MC. Alterações histológicas em *Lymnaea columella* provocadas pelo látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii*. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2002;39:157-9.
26. Augusto RC, Tetreau G, Chan P, Walet-Balieu ML, Mello-Silva CC, Santos CP, et al. Double impact: natural molluscicide for schistosomiasis vector control also impedes development of *Schistosoma mansoni* cercariae into adult parasites. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(7):e0005789. doi/10.1371/journal.pntd.0005789
27. Schall VT, Vasconcellos MC, Villaça-Coelho AL, FerreiraLopes FE, Silva IP. Evaluation of temporal, seasonal and geographic stability of the moluscicidal properties of *Euphorbia splendens* latex. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1992;34(3):183-91.
28. Vasconcellos MC, 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. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98(4):557-63.
29. Grosell M, Wood CM. Copper uptake across rainbow trout gills: mechanisms of apical entry. *J Exp Biol*. 2002;205(Pt 8):1179-88.
30. Mendes NM, Vasconcellos MC, Rocha RS, Baptista DF, Schall VT. Evaluation of the molluscicidal properties of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (N.E.B.) latex: experimental test in an endemic area of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1997;92(5):715-20.