



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL  
E SAÚDE PÚBLICA**

**GLENNYHA FERNANDES DUARTE**

---

**Viabilidade de massas ovíferas de *Biomphalaria glabrata* em filme  
de água e susceptibilidade a *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria  
bassiana***

---

**Goiânia  
2014**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR  
 AS TESES E  
 DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**       Dissertação       Tese

**2. Identificação da Dissertação**

Autor (a):	Glennyha Fernandes Duarte		
E-mail:	glennyha@yahoo.com.br		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	<input type="checkbox"/> Sim	<input checked="" type="checkbox"/> Não	
Vínculo empregatício do autor			
Agência de fomento:		Sigla:	
País:	UF:	CNPJ:	
Título:	<b>Viabilidade de massas ovíferas de <i>Biomphalaria glabrata</i> em filme de água e susceptibilidade a <i>Metarhizium anisopliae</i> e <i>Beauveria bassiana</i></b>		
Palavras-chave:	pedra de argila, ágar água, blastosporos, fungos entomopatogênicos.		
Título em outra língua:	<b>Viability of egg masses of <i>Biomphalaria glabrata</i> in water film and susceptibility to <i>Metarhizium anisopliae</i> and <i>Beauveria bassiana</i></b>		
Palavras-chave em outra língua:	<b>clay stone, water agar, blastospores, entomopathogenic fungi.</b>		
Área de concentração:	Parasitologia		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	17/07/2014		
Programa de Pós-Graduação:	Medicina Tropical e Saúde Pública – IPTSP – UFG		
Orientador (a):	Prof. Dr. Wolf Christian Luz		
E-mail:	wchisluz@hotmail.com		

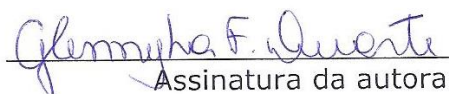
\*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

**3. Informações de acesso ao documento:**

Concorda com a liberação total do documento  SIM

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.


  
 Assinatura da autora

Data: 23 / 01 / 2015

**GLENNYHA FERNANDES DUARTE**

---

**Viabilidade de massas ovíferas de *Biomphalaria glabrata* em filme de água e susceptibilidade a *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana***

---

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre em Medicina Tropical e Saúde Pública.

Orientador: Dr. Wolf Christian Luz

**Goiânia  
2014**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)  
GPT/BC/UFG**

D812v Duarte, Glennyha Fernandes.  
Viabilidade de massas ovíferas de *Biomphalaria glabrata* em filme de água e susceptibilidade a *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* [manuscrito] / Glennyha Fernandes Duarte. - 2014.  
xiii, 45f. : il., figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. Wolf Christian Luz.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2014.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

1. *Biomphalaria glabrata* 2. Caramujos aquáticos. I. Título.

CDU: 594.3

**BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Aluna: Glennyha Fernandes Duarte**

---

**Orientador: Prof. Dr. Wolf Christian Luz**

---

**Membros:**

**1. Prof<sup>a</sup>. Dra. Clélia Christina C. Mello-Silva**

**2. Prof<sup>a</sup>. Dra. Walquíria Arruda**

**Data: 17/07/2014**

*Dedicado à minha mãe Olinda, ao  
meu pai Wilson, e ao meu amado  
esposo Renan*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Wolf Christian Luz pela orientação, oportunidade, motivação, confiança e por contribuir com meu crescimento acadêmico.

Ao CAPES pela bolsa de estudos concedida.

A todos os integrantes do Laboratório de Patologia de Invertebrados, em especial o Prof. Dr. Éverton Kort Kamp Fernandes, Juscelino Rodrigues Filho, Rayssa Fátima Hubner Campos e Cíntia das Chagas Bernardo pela prontidão, auxílio e apoio.

Agradeço aos integrantes do Laboratório de Estudos da Relação Parasito-Hospedeiro na pessoa do Prof. Dr. José Clecildo Barreto Bezerra, à Profa Dra. Luciana Damascena da Silva e alunos pelo fornecimento de massas ovíferas para a realização dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Richard Humber pelo carinho, auxílio, revisão crítica de textos e pela contribuição na realização da pesquisa.

Agradeço à Profa Dra. Luciana Damascena da Silva pelo incentivo e por ter me encaminhado no mundo acadêmico.

Aos servidores do Programa de Medicina Tropical e Saúde Pública.

## SUMÁRIO

---

	<b>TABELAS E FIGURAS .....</b>	<b>viii</b>
	<b>SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS .....</b>	<b>xi</b>
	<b>RESUMO .....</b>	<b>xii</b>
	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xiii</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
2.1	<i>Biomphalaria glabrata</i> .....	3
2.1.1	Sistemática e características morfoanatômicas .....	3
2.1.2	Habitat .....	9
2.1.3	Mecanismos de defesa ao ambiente desfavorável .....	9
2.2	Esquistossomose mansônica .....	10
2.3	Controle de <i>Biomphalaria glabrata</i> .....	11
2.4	Fungos patogênicos à invertebrados .....	13
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>16</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
4.1	Objetivo geral .....	17
4.2	Objetivos específicos .....	17
<b>5</b>	<b>MÉTODOS .....</b>	<b>18</b>
5.1	Origem e criação de <i>Biomphalaria glabrata</i> .....	18
5.2	Preparo de massas ovíferas .....	18
5.3	Preparo de dispositivos com filme de água .....	18
5.4	Origem dos fungos .....	20
5.5	Cultivo de conídios .....	21
5.6	Produção de blastosporos (corpos hifais) .....	21
5.7	Preparo de suspensões fúngicas .....	21
5.8	Exposição de massas ovíferas em filme de água .....	22
5.9	Tratamento de massas ovíferas com fungos .....	22
5.9.1	Massas ovíferas em filme de água em pedra de argila .....	22
5.9.2	Massas ovíferas submersas .....	23
5.10	Variáveis avaliadas .....	23
5.11	Análise dos resultados .....	23
<b>6</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>24</b>

6.1	Viabilidade de massas ovíferas em filme de água .....	24
6.2	Efeito de conídios e blastosporos em massas ovíferas .....	28
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>32</b>
7.1	Influência do ambiente em massas ovíferas e utilidade dos dispositivos.....	32
7.2	Susceptibilidade de massas ovíferas a fungos .....	33
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>35</b>
<b>9</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>36</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>37</b>

## TABELAS E FIGURAS

Tabelas	Título	Página
Tabela 1	Fungos utilizados em testes de patogenicidade em massas ovíferas de <i>Biomphalaria glabrata</i> .	20
Tabela 2	Eclosão média relativa acumulada ( $\pm$ erro padrão da média, EP) de juvenis de <i>Biomphalaria glabrata</i> , 15 dias após exposição de massas ovíferas em ambientes como água (controle), filme de água sobre pedra de argila flutuando em água (filme de água I), em meio ágar água (filme de água II) com diferentes concentrações de ágar ou sobre vidro sem presença de água em umidade relativa $> 98\%$ ou $75\%$ .	26
Tabela 3	Eclosão média relativa acumulada ( $\pm$ erro padrão da média, EP) de juvenis de <i>Biomphalaria glabrata</i> e presença semiquantitativa de micélio e novos conídios na superfície de massas ovíferas, 15 dias após tratamento com conídios ou blastosporos de <i>Metarhizium anisopliae</i> (Ma) ou <i>Beauveria bassiana</i> (Bb) e exposição em filme de água sobre pedra de argila flutuando na água ou submersão em água.	28

Figuras	Título	Página
Figura 1	Desenho da concha de <i>Biomphalaria glabrata</i> : vista do lado direito (A) e lado esquerdo (B) (BRASIL, 2007, p. 23).	3
Figura 2	Esquema geral do corpo de <i>Biomphalaria glabrata</i> . Massa cefalopediosa (ms), pé (p), mufla (mf), tentáculo (te), abertura genital masculina (om), colar do manto (cm), pseudobrânquias (ps), ânus (an), pneumóstoma (pn), músculo columelar (mc), crista lateral (cl), crista retal (ct), reto (rt), tubo renal (tr), cavidade pulmonar (cp), glândula do albúmen (ga), intestino anterior (ia), estômago (et), intestino médio (im), intestino posterior (ip), glândula digestiva (gd) e ovoteste (ot). Adaptado de Brasil (2007, p. 24).	4
Figura 3	Corte transversal da cavidade do manto de <i>Biomphalaria glabrata</i> , lado direito (A) e esquerdo (B), enfatizando: coração (c), concha (ch), câmara de ar (ca), câmara de entrada de água (cea) e câmara de saída de água (csa). Adaptado de Jurberg, Cunha e Rodrigues (1997).	4
Figura 4	Sistemas circulatório e excretor de <i>Biomphalaria glabrata</i> . Sistema circulatório: coração (co) e pericárdio (pe). Sistema excretor: ureter (ur), meato do ureter (mu), crista renal (cr) e tubo renal (tr). Adaptado de Brasil (2007, p. 25).	5

Figura 5	Sistema digestivo de <i>Biomphalaria glabrata</i> composto por A - mandíbula (ma); saco bucal (sb); glândula salivar (gs); esôfago (ef); intestino anterior (ia); estômago: papo (pa), moela (mo) e piloro (pl); intestino médio (im); glândula digestiva (gd); intestino posterior (ip); B - crista retal (ct); reto (re) e ânus (an); C - dentes da rádula: central (c), marginal (m), intermediário (i) e lateral (l). Sistema nervoso composto pelo anel periesofágico (sn). Adaptado de Brasil (2007, p. 26).	6
Figura 6	Sistema reprodutor dissecado de <i>Biomphalaria glabrata</i> : ovoteste (ot), canal coletor do ovoteste (cc), vesícula seminal (vs); estruturas masculinas: espermiduto (ed), próstata (pr), canal deferente (cd) e pênis (pp); estruturas femininas: oviduto (ov), bolsa do oviduto (bo), glândula do albúmen (gn), espermateca (es), útero (ut), bolsa vaginal (bv) e vagina (va). Adaptado de Brasil (2007, p. 28).	8
Figura 7	Massa ovígera de <i>Biomphalaria glabrata</i> com aproximadamente 100 horas após postura. Enfatizando membrana externa (me), ovo (ov), embriões (em), substância coloidal (col) e perivitelínica (per).	8
Figura 8	Ciclo biológico de <i>Schistosoma</i> spp. Adaptado de CDC (2014).	11
Figura 9	Ciclo biológico de <i>Metarhizium anisopliae</i> no hospedeiro artrópode. Adaptado de Mascarin e Pauli (2010).	14
Figura 10	Dispositivo com pedra de argila. A - visão lateral de dispositivo de pedra de argila; B - massa ovígera (ms) de <i>Biomphalaria glabrata</i> sobre pedra de argila (pd) envolta por anel de isopor (is).	19
Figura 11	Dispositivo de meio ágar água. A - dispositivo de meio ágar água composto por placa de Petri maior (150 x 30 mm) e placa de Petri menor (57 x 15 mm); visão lateral (B) e frontal (C) de dispositivo de ágar água enfatizando uma massa ovígera (ms) de <i>Biomphalaria glabrata</i> sobre meio ágar água (aa) dentro da placa de Petri menor.	20
Figura 12	Eclosão média relativa acumulada ( $\pm$ erro padrão da média) de juvenis de <i>Biomphalaria glabrata</i> a partir de massas ovígeras expostas em filme de água de dispositivos de pedra de argila e grupo controle na água. Foram incubadas por 15 dias a 25 °C, fotofase de 12 horas e umidade relativa (UR) > 98% ou 75%.	24
Figura 13	Eclosão média relativa acumulada de juvenis de <i>Biomphalaria glabrata</i> a partir de massas ovígeras expostas em filme de água em dispositivos de ágar água com diferentes concentrações de ágar e grupo controle na água (0% de ágar). Foram incubadas por 15 dias a 25 °C, fotofase de 12 horas e umidade relativa > 98%.	25

Figura 14	Eclosão média relativa acumulada de juvenis de <i>Biomphalaria glabrata</i> a partir de massas ovíferas expostas em filme de água em dispositivos de ágar água com diferentes concentrações de ágar e grupo controle. Foram incubadas por 15 dias a 25 °C, fotofase de 12 horas e umidade relativa 75%.	27
Figura 15	Deslocamento de juvenis (jv) de <i>Biomphalaria glabrata</i> em direção à água (ag) a partir de massas ovíferas expostas em filme de água em dispositivos em umidade relativa > 98%. Juvenil sobre anel de isopor (is) de dispositivo de pedra (pd) de argila (A) e em ágar água (B) em concentração de 0,5% de ágar e, detalhe de juvenil na borda externa da placa de Petri menor (C).	27
Figura 16	Eclosão média acumulada ( $\pm$ erro padrão da média) de juvenis de <i>Biomphalaria glabrata</i> a partir de massas ovíferas tratadas com conídios ( $2 \times 10^7$ conídios) de <i>Metarhizium anisopliae</i> ou <i>Beauveria bassiana</i> e grupo controle (sem fungo) expostas em pedra de argila. Foram incubadas por 15 dias a 25 °C, fotofase de 12 horas e umidade relativa > 98%.	29
Figura 17	Eclosão média relativa acumulada ( $\pm$ erro padrão da média) de juvenis de <i>Biomphalaria glabrata</i> em massas ovíferas tratadas com blastosporos ( $2 \times 10^7$ blastosporos) de <i>Metarhizium anisopliae</i> ou <i>Beauveria bassiana</i> e grupo controle (sem fungo) expostas em pedra de argila. Incubadas por 15 dias a 25 °C, fotofase de 12 horas e umidade relativa > 98%.	30
Figura 18	Massa ovígera (ms) de <i>Biomphalaria glabrata</i> em dispositivo de pedra de argila (pd) 24 horas após tratamento com blastosporos ( $2 \times 10^7$ blastosporos) de <i>Metarhizium anisopliae</i> com desenvolvimento de micélio (A), novos conídios (B) e embriões (em) não desenvolvidos de <i>B. glabrata</i> em massa ovígera 15 dias após tratamento (C).	30
Figura 19	Eclosão média relativa acumulada ( $\pm$ erro padrão da média) de juvenis de <i>Biomphalaria glabrata</i> em massas ovíferas submersas tratadas com conídios ( $2 \times 10^7$ conídios/ml) (A) ou blastosporos ( $2 \times 10^7$ blastosporos/ml) (B) de <i>Metarhizium anisopliae</i> ou <i>Beauveria bassiana</i> . Incubadas por 15 dias a 25 °C, fotofase de 12 horas e umidade relativa > 98%.	31
Figura 20	Tratamento de massas ovíferas submersas com blastosporos ( $2 \times 10^7$ blastosporos/ml) de <i>Beauveria bassiana</i> (A, B) ou <i>Metarhizium anisopliae</i> (C, D), enfatizando embriões (em) em massa ovígera 15 dias após tratamento.	31

---

## SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

---

RPM	rotações por minuto
UV-C	radiação ultravioleta C
ANOVA	Análise de variância
BDA	Batata, Dextrose, Ágar
°C	Graus Celsius
UR	Umidade Relativa
pH	Potencial hidrogeniônico
EUA	Estados Unidos da América
OMS	Organização Mundial da Saúde
CDC	Centers for Disease Control and Prevention

## RESUMO

---

*Biomphalaria glabrata* são caramujos aquáticos e habitam coleções hídricas frequentemente efêmeras. Possuem alta capacidade reprodutiva, e massas ovíferas são postas em substratos submersos nas margens dos criadouros expostas ao ressecamento e a patógenos como fungos. Praticamente nada é sabido sobre a viabilidade de massas ovíferas em criadouros transitórios e a sua susceptibilidade a fungos. Estas informações são importantes para o controle desse caramujo hospedeiro intermediário de *Schistosoma mansoni*, causador de esquistossomose. O presente trabalho relata a viabilidade de massas ovíferas em filme de água e a susceptibilidade a *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*. Massas ovíferas foram expostas em filme de água formado em dois dispositivos diferentes confeccionados, um com pedra de argila em copo com água e outro com meio ágar água com diferentes concentrações de ágar (0,3% - 3%) em placas de Petri em diferentes umidades relativas (UR > 98% e 75%). Conídios ou blastosporos de *B. bassiana* (ARSEF 9588) ou *M. anisopliae* (IP 46) ( $2 \times 10^7$  conídios ou blastosporos/massa ovífera) foram inoculados em massas ovíferas expostas em filme de água em pedra de argila ou submersas ( $2 \times 10^7$  conídios/ml ou blastosporos/ml). As massas ovíferas expostas em filme de água em pedra de argila ou em meio ágar água (ágar < 1%) em UR > 98% foram viáveis. A eclosão e o deslocamento de juvenis nos filmes foram observados independentemente do dispositivo testado (UR > 98%, ágar < 1%), exceto em UR 75% e em vidro sem filme de água. Micélio e conídios desenvolveram sobre massas ovíferas tratadas com conídios ou blastosporos de *M. anisopliae* em filme de água em pedra de argila (UR > 98%), e não houve eclosão de juvenis a partir de massas ovíferas tratadas com blastosporos de *M. anisopliae*. Em massas ovíferas submersas tratadas com blastosporos de *M. anisopliae* ou *B. bassiana* não houve eclosão de juvenis e em massas ovíferas tratadas com conídios a eclosão média acumulada foi < 52,5%. A viabilidade de massas ovíferas e o deslocamento de juvenis em ambos os dispositivos em UR > 98% foi devido à formação de filme de água estável. Blastosporos podem ter liberado metabólitos tóxicos que inibiram a eclosão de juvenis de *B. glabrata*. Ambos os dispositivos são promissores para testes com massas ovíferas em filme de água. A viabilidade de massas ovíferas em filme de água em condições laboratoriais deve ser considerada no controle de *B. glabrata*. Blastosporos de *M. anisopliae* e *B. bassiana* são promissores contra *B. glabrata*.

Palavras – chave: pedra de argila, ágar água, blastosporos, fungos entomopatogênicos.

## ABSTRACT

---

*Biomphalaria glabrata* snails are aquatic and inhabit often ephemeral basins. They have high reproductive capacity, and egg masses are laid on submerged substrates on the banks of breeding sites exposed to desiccation and pathogens like fungi. Virtually nothing is known about the viability of egg masses in breeding and transient sites and their pathogens. This information is important to control this intermediate host of *Schistosoma mansoni*, which causes schistosomiasis. This study describes the feasibility of egg masses in water films and susceptibility infection with *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Egg masses were exposed to water film formed in two different devices, one with a stone clay in a cup with water and another one with water agar at different concentrations of agar (0.3% - 3%) in Petri dishes in different relative humidity (RH > 98% and 75%). Conidia or blastospores of *B. bassiana* (ARSEF 9588) or *M. anisopliae* (IP 46) ( $2 \times 10^7$  conidia or blastospores/egg mass) were inoculated in egg masses exposed in the water film in stone clay or submerged ( $2 \times 10^7$  conidia/ml or blastospores/ml). Egg masses exposed in the water film in stone clay or in water agar (agar < 1%) at RH > 98% were viable. The eclosion and the displacement of juveniles in the films were observed regardless of the tested device (RH > 98%, agar < 1%), except at 75% RH and glass without water film. Mycelium and conidia developed on egg masses treated with conidia or blastospores of *M. anisopliae* in the water film in stone clay (RH > 98%), and there was no eclosion of juveniles from egg masses treated with blastospores of *M. anisopliae*. In egg masses submerged treated with blastospores of *M. anisopliae* or *B. bassiana* no eclosion of juveniles and egg masses treated with conidia accumulated average onset was < 52.5%. The feasibility of egg masses and the displacement of juveniles in both devices on RH > 98% was due to the formation of stable water film. Blastospores may have released toxic metabolites that inhibited the eclosion of juvenile *B. glabrata*. Both devices are promising for testing egg masses in the water film. The feasibility of egg masses in water under laboratory conditions film should be considered to control *B. glabrata*. Blastospores of *M. anisopliae* and *B. bassiana* are promising against *B. glabrata*.

Keywords: clay stone, water agar, blastospores, entomopathogenic fungi.

# 1 INTRODUÇÃO

---

Caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* são hermafroditos com alta atividade reprodutiva (PARAENSE, 1955; PIMENTEL, 1957). São aquáticos e habitam coleções hídricas frequentemente efêmeras (DEJONG et al., 2001; TUAN, 2009; ALMEIDA, 2010). Em substratos flutuantes, rochas e vegetação ribeira de criadouros são encontradas massas ovíferas constituídas por dezenas de ovos agrupados por uma membrana e banhados numa substância coloidal (PIMENTEL, 1957; KAWAZOE, 1977; PARAENSE, 2008, p.291). Os embriões são protegidos e nutridos por uma substância perivitelínica rica em lipídios, proteínas e glicogênio (RIBEIRO-PAES et al., 1994; ROSA, 2008; BARON et al., 2013; HATHAWAY et al., 2011). Um único indivíduo pode gerar até 10 milhões de descendentes em três meses (PARAENSE, 1955; PIMENTEL, 1957). Este número elevado ressalta a importância do controle de *B. glabrata* que é hospedeiro intermediário de *Schistosoma mansoni*, trematódeo causador de esquistossomose mansônica.

Esses caramujos são combatidos com moluscicidas químicos e com a retirada de vegetação ribeira, drenagem e aterramento de criadouros. Entretanto, mecanismos de defesa ao ressecamento do habitat como enterramento no barro, saída da água, anidrobiose e estivação dificultam a erradicação de focos (BRAND; MCMAHON; NOLAN, 1957; MALEK, 1958; BARBOSA, 1989). Geralmente moluscicidas sintéticos são eficazes contra massas ovíferas, mas a aplicação é restrita devido à toxicidade a organismos não alvos (COURA-FILHO, 1992; FERREIRA, 2006; BARBOSA et al., 2008, p. 986; ALMEIDA, 2010; CATANHEDE et al., 2010). Quanto à resistência de massas ovíferas a medidas de manejo ambiental ou expostas em criadouros transitórios ainda pouco se sabe. Não está esclarecido se massas ovíferas permanecem viáveis nessas condições, possibilitando a embriogênese e a eclosão de juvenis, ou se são alvos de predadores ou patógenos, como fungos.

Infecções fúngicas são descritas em bivalves marinhos tanto em estágios larvares quanto em adultos, camarões, algas e em corais (CAMPION-ALSUMARD'S; GOLUBIC; PRIESS, 1995; FRIEDMAN; GRINDLEY; KEOGH 1997; RAMAIAH, 2006). Diferentes estágios de vida de artrópodes, assim como os ovos, também são acometidos por fungos

entomopatogênicos (LELES et al., 2010; SOUSA et al., 2013) . Há curtos relatos de fungos patogênicos a *B. glabrata*.

Propágulos dos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* são protagonistas no controle de artrópodes pragas terrestres (SCHOLTE et al., 2004). Apresentam uma alternativa natural a inseticidas sintéticos comumente empregados visto que sua aplicação é mais segura para o homem e ambiente comparando com os químicos (FARIA; MAGALHÃES, 2001; THUNGRABEAB; TONGMA, 2007; BORGES; NOVA, 2011; OLIVEIRA-FILHO et al., 2011; PIMENTEL; FERREIRA, 2012). Ocorrem predominantemente em solo e são isolados a partir de amostras de artrópodes mortos de infecção (SCHOLTE et al., 2004). A reduzida especificidade destes fungos para artrópodes e a atividade larvicida para fases aquáticas de mosquitos sugerem que eles podem também ser patogênicos a outros invertebrados como moluscos terrestres ou aquáticos.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

---

### 2.1 *Biomphalaria glabrata*

#### 2.1.1 Sistemática e características morfoanatômicas

O termo *Biomphalaria* [*bis* (latim) = duas vezes; *omphalos* (grego) = umbigo] refere-se aos dois lados da concha serem fundos, como um duplo umbigo, *glabrata* [*glabrata* (latim) = liso] refere-se ao fato da superfície da concha ser lisa. Pertence ao filo Mollusca, à classe Gastropoda, ordem Basommatophora e família Planorbidae. É a maior espécie da família visto que, o corpo distendido abrange cerca de 4,7 cm (PARAENSE; DESLANDES, 1955; SOUZA; LIMA, 1997, p.36). O diâmetro da concha planispiral varia entre 2 e 4 cm com 5 a 8 mm de espessura e 6 a 7 giros. Não há opérculo (Figura 1). A coloração natural da concha é castanha, mas pode mudar de acordo com a constituição química da água (GERALDINO, 2004; PARAENSE, 2008, p.292).

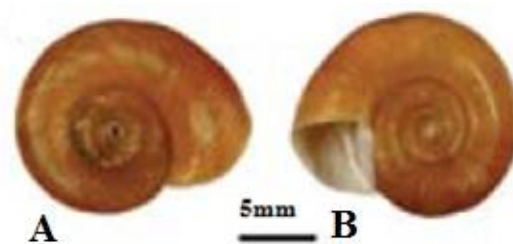


Figura 1 - Desenho da concha de *Biomphalaria glabrata*: vista do lado direito (A) e lado esquerdo (B) (BRASIL, 2007, p.23).

O corpo do molusco é formado pela concha e por partes moles como massa cefalopédica e a massa visceral (RUPERT; FOX; BARNES, 1996, p. 357). Na parte superior da massa cefalopédica estão os olhos situados na base do par de tentáculos que são filiformes e possuem função tátil (Figura 2). A massa visceral é envolta pelo manto que é responsável pela produção da concha (REY, 2008, p. 794).

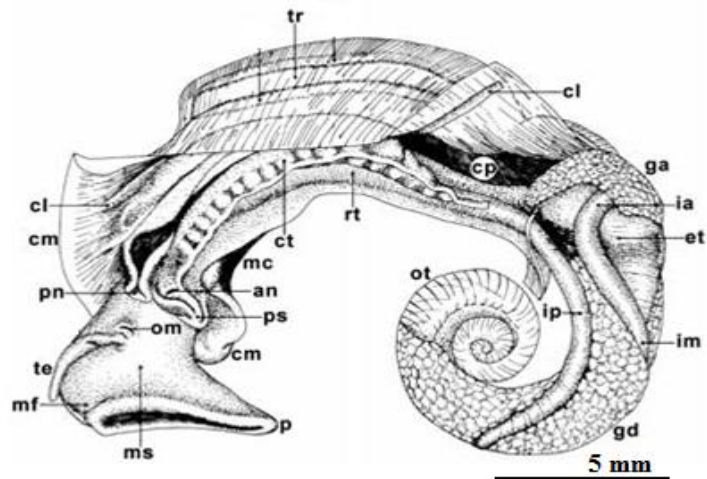


Figura 2 – Esquema geral do corpo de *Biomphalaria glabrata*. Massa cefalopédica (ms), pé (p), mufla (mf), tentáculo (te), abertura genital masculina (om), colar do manto (cm), pseudobrânquias (ps), ânus (an), pneumóstoma (pn), músculo columelar (mc), crista lateral (cl), crista retal (ct), reto (rt), tubo renal (tr), cavidade pulmonar (cp), glândula do albúmen (ga), intestino anterior (ia), estômago (et), intestino médio (im), intestino posterior (ip), glândula digestiva (gd) e ovoteste (ot). Adaptado de Brasil (2007, p.24).

Entre a massa visceral e o manto há a cavidade palial, local ricamente vascularizado dividido em câmara pulmonar, câmara de entrada de água e câmara de saída de água (Figura 3). A entrada de água fornece o oxigênio para a hematose e, a saída de água retira as excretas liberadas pelo meato do ureter (JURBERG; CUNHA; RODRIGUES, 1997).

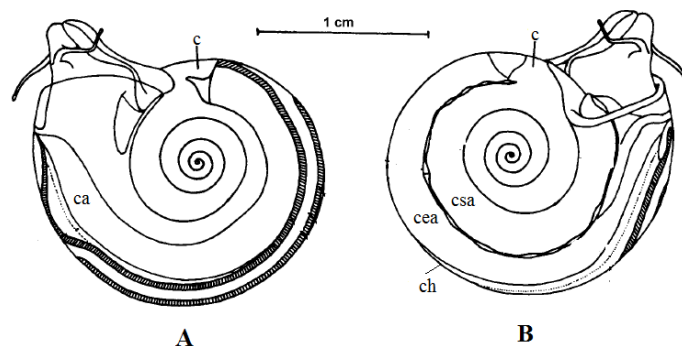


Figura 3 - Corte transversal da cavidade do manto de *Biomphalaria glabrata*, lado direito (A) e esquerdo (B), enfatizando: coração (c), concha (ch), câmara de ar (ca), câmara de entrada de água (cea) e câmara de saída de água (csa). Adaptado de Jurberg, Cunha e Rodrigues (1997).

Na borda do manto do lado esquerdo da região cefalopodal, há um conjunto de pregas que formam um orifício denominado pneumóstoma que permite a entrada de ar para a cavidade palial (Figura 2). A respiração pode ser realizada através de pulmão, pseudobrânquias e tegumento (JURBERG; CUNHA; RODRIGUES, 1997) (Figura 2). O pulmão é responsável pela respiração atmosférica e, a respiração aquática é realizada por pseudobrânquia e o tegumento, permitindo uma vida anfíbia aos caramujos (MALEK, 1958; FERREIRA; ALENCASTRO; HERMES-LIMA, 2003; ALMEIDA, 2010).

O deslocamento dos caramujos é feita através de contrações musculares do pé oblongo (Figura 2). As glândulas podais secretam muco sobre o qual o animal move-se e prende-se ao substrato. O corpo do molusco é preso à concha através do músculo columelar (Figura 2) (PARAENSE; DESLANDES, 1955).

O sistema circulatório é simples, contendo um coração com uma aurícula e um ventrículo encerrados na região pericárdica (Figura 4). A hemolinfa é vermelha devido à presença de hemoglobina, a cor é semelhante ao sangue de mamíferos. Na hemolinfa há células de defesa, os hemócitos (BARBOSA, 2007; REY, 2008, p.801; CANTINHA, 2012).

O órgão responsável pela excreção é o rim, que apresenta uma prega saliente denominada crista renal (Figura 4). A crista renal é pigmentada na espécie *B. glabrata*, característica importante para a identificação. As substâncias excretadas pelo rim são levadas ao tubo renal, ureter e meato do ureter (Figura 4) (PARAENSE, 1955).

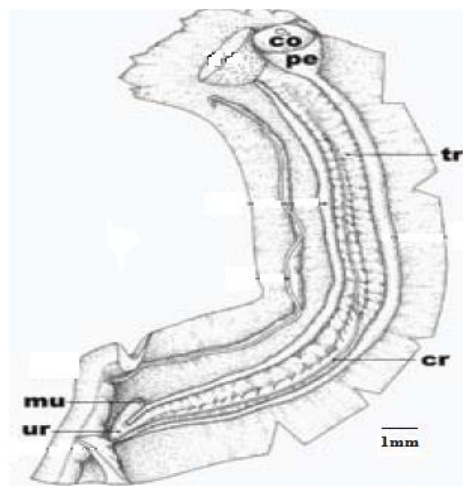


Figura 4 - Sistemas circulatório e excretor de *Biomphalaria glabrata*. Sistema circulatório: coração (co) e pericárdio (pe). Sistema excretor: ureter (ur), meato do ureter (mu), crista renal (cr) e tubo renal (tr). Adaptado de Brasil (2007, p. 25).

O sistema digestivo é completo, desembocando no lado esquerdo da cabeça (Figura 2). A glândula digestiva absorve e armazena nutrientes (Figura 5). Entre os tentáculos e a boca encontra-se a mufla, com dois palpos labiais em forma de T (Figura 2). A boca é formada por mandíbula e saco bucal que comportam a rádula (Figura 5). A rádula é uma língua raspadora composta por várias fileiras de dentes (REY, 2008, p. 801).

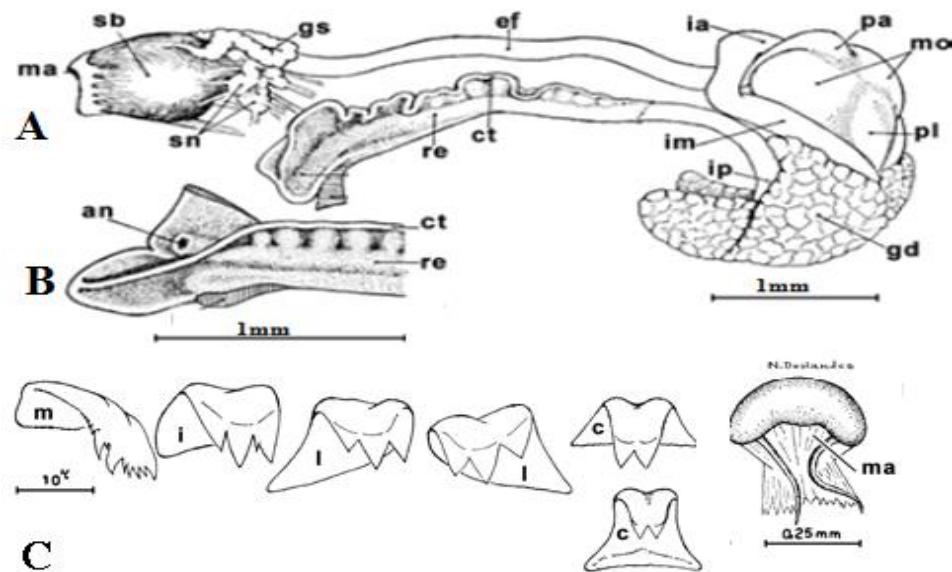


Figura 5 – Sistema digestivo de *Biomphalaria glabrata* composto por A - mandíbula (ma); saco bucal (sb); glândula salivar (gs); esôfago (ef); intestino anterior (ia); estômago: papo (pa), moela (mo) e piloro (pl); intestino médio (im); glândula digestiva (gd); intestino posterior (ip); B - crista retal (ct); reto (re) e ânus (an); C – dentes da rádula: central (c), marginal (m), intermediário (i) e lateral (l). Sistema nervoso composto pelo anel periesofágico (sn). Adaptado de Brasil (2007, p. 26).

Pares de gânglios formam o sistema nervoso central, organizados ao redor do esôfago, e o sistema nervoso autônomo (Figura 5). Além dos tentáculos e olhos como órgãos de sentido, há também o osfrádio, responsável pelo olfato, estatocistos como órgãos de orientação e equilíbrio, e rinóforos que são quimiorreceptores (SOUZA; LIMA, 1997, p. 55; REY, 2008, p.797).

O sistema genital é composto principalmente pelo ovoteste, situado na parte posterior do caramujo, que é um órgão hermafrodita produtor de gametas masculinos e femininos (Figura 6). O ovoteste possui um canal chamado ovispermiduto por onde são transportados os gametas (Figura 6). No ovispermiduto há regiões com vesículas seminais onde ocorre a maturação de espermatozoides e posteriormente há a glândula do albumem que tem a função de envolver os ovos produzidos (Figura 6). A partir desta glândula, o ovispermiduto se torna

bifurcado, diferenciando-se em partes masculina e feminina. Na parte masculina, o espermiduto consiste em um vaso eferente com uma próstata que, partindo do testículo, desemboca em um pênis tentacular localizado atrás do tentáculo encefálico esquerdo (Figura 6). O útero está situado na porção terminal da glândula nidamental (Figura 6), e posteriormente desembocará na vagina disposta próximo ao pênis (PARAENSE, 2008, p. 291). Após chegar à parte feminina, os ovos são banhados por substância similar a um colóide, rica em galactogênio, proteínas, glicogênio e lipídios liberados pela glândula do álbumem (RIBEIRO-PAES et al., 1994; ROSA, 2008; HATHAWAY et al., 2011; BARON et al., 2013). Os ovos então ficam agrupados, envoltos por uma membrana protetora, formando a massa ovígera (Figura 7). Posteriormente, a massa ovígera é encaminhada pela bolsa do oviduto para a glândula nidamental (Figura 6). A fecundação cruzada predomina sobre a autofecundação (PARAENSE, 1955, 1956; VIANEY-LIAUD; DUSSART, 2002).

Após a fertilização, as massas ovígeras são postas translúcidas e friáveis e, em pouco tempo tornam-se consistentes e amareladas (KAWANO; NAKANO; WATANABE, 2008, p. 350). As divisões mitóticas começam após a fertilização dos ovos. Posteriormente ocorre a gastrulação que é caracterizada pelo início de movimentações dos embriões dentro dos ovos, a organogênese e o desenvolvimento de células germinativas (KAWANO; NAKANO; WATANABE, 2008, p. 349). A duração do período embrionário é de 6 dias à 30°C e 8 dias à 25° C (KAWAZOE, 1976). Cada massa ovígera possui dezenas de embriões (PIMENTEL, 1957; KAWAZOE, 1977). Um único indivíduo pode gerar mais do que 10 milhões de descendentes em 90 dias, se não fosse os mecanismos de regulação natural (PARAENSE, 1955; PIMENTEL, 1957). Possuem desenvolvimento direto e, após eclodirem, os juvenis se alimentam de matéria orgânica disponível. A atividade reprodutiva inicia a partir da quinta semana após a eclosão (PARAENSE, 1955). A ovipostura ocorre ao longo do ano, geralmente durante a noite em vegetações ribeiras e em rochas submersas (PIMENTEL, 1957). Em períodos de variações sazonais, ficam sujeitas à variação de nível de água do criadouro.

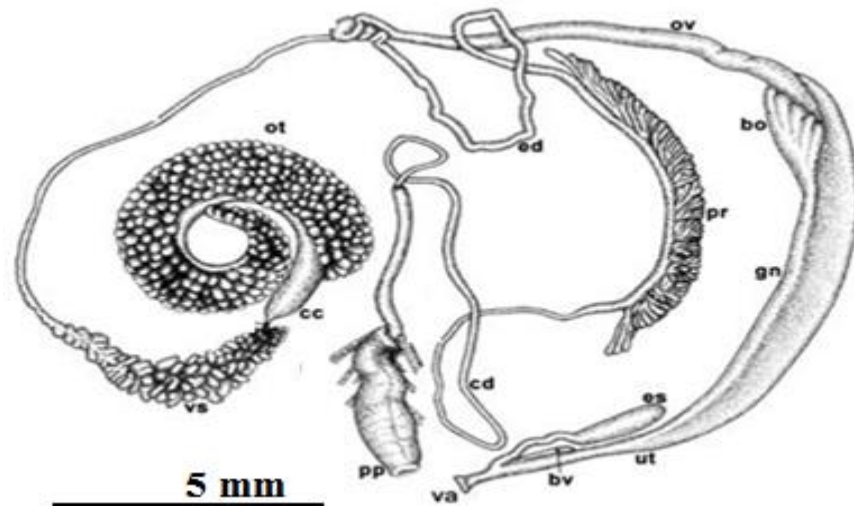


Figura 6 - Sistema reprodutor dissecado de *Biomphalaria glabrata*: ovoteste (ot), canal coletor do ovoteste (cc), vesícula seminal (vs); estruturas masculinas: espermiduto (ed), próstata (pr), canal deferente (cd) e pênis (pp); estruturas femininas: oviduto (ov), bolsa do oviduto (bo), glândula do albúmen (gn), espermateca (es), útero (ut), bolsa vaginal (bv) e vagina (va). Adaptado de Brasil (2007, p.28).

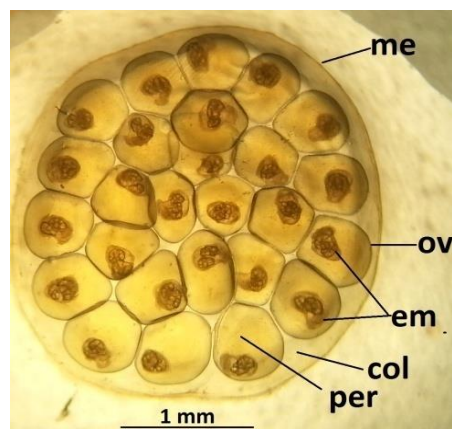


Figura 7 - Massa ovígera de *Biomphalaria glabrata* com aproximadamente 100 horas após postura. Enfatizando membrana externa (me), ovo (ov), embriões (em), substância coloidal (col) e perivitelínica (per).

### 2.1.2 Habitat

Criadouros potenciais são aqueles com água doce estagnada ou pouco corrente, às vezes efêmeros, como lagos, lagoas, poços, cisternas, rios, plantações e pastos alagados que podem ressecar periodicamente (DEJONG et al., 2001; TUAN, 2009; ALMEIDA, 2010). Os caramujos situam-se preferencialmente em partes rasas e ensolaradas, com temperatura entre 20° a 25°C e pH entre 6 e 8 (MALEK, 1958; PAZ, 1997). O baixo teor de oxigênio na água não é um fator limitante para a sobrevivência destes caramujos, visto que conseguem realizar respiração atmosférica (PAZ, 1997). Para o desenvolvimento de suas conchas e manutenção metabólica, esses caramujos utilizam o carbonato de cálcio dissolvido na água ou de macrófitas aquáticas, das quais se alimentam (SILVA et al., 2006). A espécie *B. glabrata* é bioindicadora de qualidade da água de coleções hídricas (MALEK, 1958; GRISOLIA; FREITAS, 1985; ABDALLAH; WANAS; THOMPSON, 1997; PAZ, 1997).

### 2.1.3 Mecanismos de defesa ao ambiente desfavorável

Condições de estresse como variações de temperatura, nível de água e aplicação de moluscidas desencadeiam mecanismos de defesa de caramujos relacionados à retração na concha, saída da água e secreção de muco para fechar a abertura da concha, as lamelas (BRAND; NOLAN; MANN, 1948; BRAND; McMAHON; NOLAN, 1957; PIMENTEL; WHITE, 1959; BARBOSA, 1989; DANNEMANN; PIERI, 1989; OHLWEILER; KAWANO, 2002). A diminuição da temperatura da água resulta em um processo denominado diapausa que ocorre somente em juvenis com até um mês de idade. Estes saem da água, retraem-se na concha, formam lamelas e entram em dormência. Esta condição confere resistência à dessecação e dura por tempo indeterminado (DANNEMANN; PIERI, 1989). Outro mecanismo é a anidrobiose, que consiste na saída da água e dormência em qualquer idade quando o ambiente não está favorável para a sobrevivência. Não há formação de lamelas, assim, o caramujo está mais propenso ao dessecamento. Quando as condições ambientais se tornam propícias, os caramujos retornam à água (DANNEMANN; PIERI, 1989). O enterramento no barro é o mecanismo mais eficaz para a sobrevivência de caramujos, visto

que, permanecem em dormência e as partículas de terra presentes no barro selam a entrada da concha, evitando a perda de água. Isto garante um retorno rápido e é mais vantajoso do que sair da água (PIERI; RAYMUNDO; JURBERG, 1980; FERREIRA; ALENCASTRO; HERMES-LIMA, 2003). Esses mecanismos têm um impacto importante para a epidemiologia da esquistossomose mansônica, visto que, caramujos infectados e não infectados com *S. mansoni* podem se esquivar de moluscidas saindo da água ou enterrando-se no barro e, em seguida, entram em dormência (PIERI; JURBERG, 1981). Conseqüentemente, os infectados continuarão liberando cercárias quando o ambiente voltar a ser favorável (PIERI; RAYMUNDO; JURBERG, 1980; DANNEMANN; PIERI, 1989; TELES; MARQUES, 1989; COELHO, 1995, p. 203; BEZERRA; KEMPER; BECKER, 1999).

## 2.2 Esquistossomose mansônica

A esquistossomose mansônica é encontrada em países da África, Ásia, América do Sul, Caribe e Oriente Médio (VITORINO et al., 2012; CDC, 2013). Mais de 207 milhões de pessoas no mundo apresentam a doença e, 700 milhões de pessoas possuem risco de contraí-la (OMS, 2013). Há aproximadamente 74 países endêmicos no mundo (OMS, 2013). Sua expansão ocorreu através de navios oriundos da África Ocidental e Moçambique e com o avanço da colonização territorial do nordeste para o interior do Brasil (CHIEFFI; WALDMAN, 1988; ARIADNA et al., 2001; ANDRADE et al., 2010; VITORINO, et al., 2012). Os fatores que permitem a disseminação e estabelecimento da esquistossomose mansônica são a presença de hospedeiros intermediários, as espécies *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* (TELES, 2005; SCHOLTE et al., 2012), de hospedeiros definitivos como o homem e mamíferos silvestres (PAZ, 1997; FERREIRA, 2006; VITORINO et al., 2012), a disponibilidade de criadouros potenciais contaminados com ovos de *S. mansoni* e a ausência de redes de esgoto (VITORINO et al., 2012). O ciclo da doença (Figura 8) inicia-se com a eliminação de ovos de *S. mansoni* em fezes de hospedeiros definitivos. Na água, larvas ciliadas denominadas miracídios eclodem e penetram no tegumento de caramujos. Estes miracídios originarão a forma infectante denominada cercária, responsável por causar esquistossomose nos hospedeiros definitivos (SILVA et al., 2006). As medidas para controlar a doença são o tratamento de pessoas infectadas, a educação sanitária,

o saneamento básico e o controle de caramujos (COURA-FILHO, 1996; FERREIRA; SILVA, 2007). Porém, para diminuir a disseminação do parasito é necessário interromper o ciclo de transmissão através do controle de populações de hospedeiros intermediários (MUNIZ, 2007).

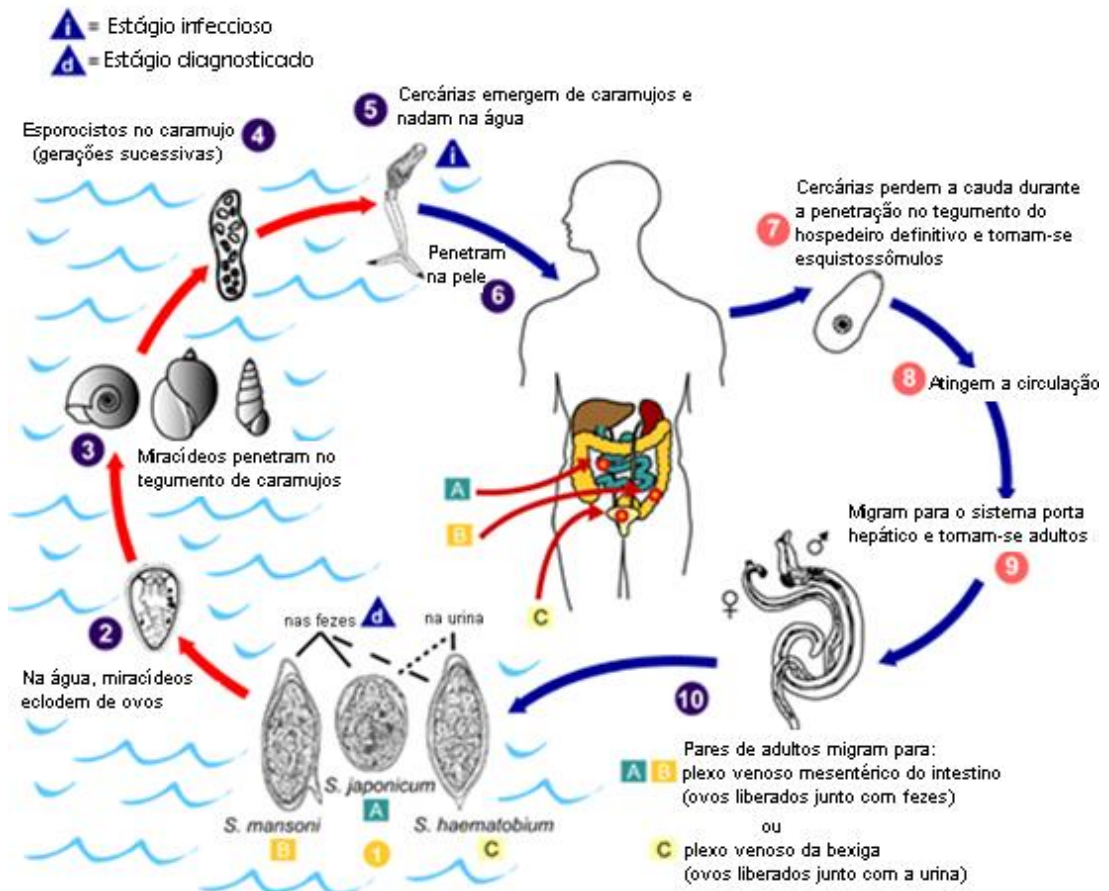


Figura 8 – Ciclo biológico de *Schistosoma* spp. Adaptado de CDC (2014).

### 2.3 Controle de *Biomphalaria glabrata*

O controle químico de *B. glabrata* é feito com o moluscicida niclosamida (SOUZA; LIMA, 1997, p. 71; OLIVEIRA-FILHO, 2003; CATANHEDE et al., 2010). São eficazes para matar moluscos e suas desovas, porém, são tóxicos, cumulativos em tecidos de animais e são prejudiciais ao ambiente (COURA-FILHO et al., 1992; SOUZA; LIMA, 1997; p. 71, CATANHEDE et al., 2010). Por possuírem alto custo, o uso destes produtos por períodos prolongados em países em desenvolvimento pode se tornar inviável (HARTMANN et al., 2011). A aplicação contínua de niclosamida não diminui permanentemente a população de

planorbídeos e não interrompe a transmissão da parasitose (COURA-FILHO et al., 1992). Outro fator que deve ser considerado ao empregar moluscidas é a seleção de moluscos resistentes aos produtos químicos aplicados. O uso de princípios ativos de extratos de plantas é procurado, porém, podem mostrar toxicidade devido a presença de metabólitos secundários, como taninos, saponinas, flavonóides e outros (MENDES et al., 1984; JURBERG; CABRAL-NETO; SCHALL, 1985; ALCANFOR et al., 2001; MELLO-SILVA et al., 2007; CATANHEDE et al., 2008; VINAUD; LINO-JUNIOR; BEZERRA, 2008; SILVA-FILHO et al., 2009; HARTMANN et al., 2011). Moluscidas sintéticos ou obtidos através de extratos de plantas não apresentam toxicidade a embriões de *B. glabrata* exceto quando aplicados em dosagens relativamente altas (SCHALL et al., 1998), o que pode prejudicar organismos não alvos.

Os métodos físicos de controle são a drenagem de áreas infestadas por *B. glabrata* e a canalização de água. Há medidas saneadoras de baixo custo, como aterrar valas e poços e retirar plantas aquáticas periodicamente de lugares que tenham o molusco (FERREIRA, 2006). Estes processos são eficazes, podem ser aplicados em criadouros pequenos e que não sejam habitats de outros animais (SOUZA; LIMA, 1997, p. 72; BARBOSA et al., 2008, p. 987).

Caramujos possuem inimigos naturais que contribuem para o controle de populações como aves aquáticas, peixes, sanguessugas, sapos e tartarugas. Esta relação tem sido explorada para o desenvolvimento de métodos biológicos de controle como meio de evitar os danos que poderiam ser causados pela aplicação compulsória de moluscidas (BERG, 1973). Estes predadores ingerem indivíduos adultos ou ovos de *B. glabrata*. As interações competitivas entre espécies de caramujos também são descritas com *Thiara granifera* (PRENTICE, 1983), *Melanoides tuberculatus* (GIOVANELLI; VIEIRA; SILVA, 2003), *Marisa cornuarietis* (POINTIER; DAVID, 2004), *Helisoma duryi* (ABDALLAH; NASR, 1973), *Pomacea lineata* e *P. haustum* (GUIMARÃES, 1983). Estes caramujos podem competir por alimentos e também ingerir ovos de *B. glabrata*, porém, a vegetação aquática favorece a sobrevivência dos moluscos, reduzindo a ação competidora entre as espécies. As espécies de peixes testadas foram *Serranochromis macrocephala*, *Tilapia melanopleura*, *Barbus conchoniuis*, *Cichlasoma biocellatume*, *C. ocellatum*, *Geophagus brasiliensis* (WEINZERTTL; JURBERG 1990). Sanguessugas e aves também são predadoras de *B. glabrata* (GUIMARÃES et al., 1983; CANTINHA, 2008). O uso de predadores é eficiente, porém, é necessário cautela ao inserir novas espécies no habitat, haja vista que, podem se

tornar pragas. A ingestão de massas ovíferas ou de indivíduos de *B. glabrata* é explicada pelo hábito alimentar generalista dessas espécies, e não por esses predadores terem uma predileção por ingerir somente *B. glabrata* (BERG, 1973).

O controle biológico de caramujos com microrganismos ainda é pouco desenvolvido. Bactérias são comumente os patógenos mais testados, *Bacillus alvei*, *B. brevis*, *B. circulans*, *B. aterosporus*, *B. pinottii*, *Brevibacillus laterosporus* mostraram atividade moluscicida em caramujos (DIAS, 1954ab; DIAS; DAWOOD, 1955; CHENG, 1986; SINGER et al., 1997). Existem primeiros indícios de alguma atividade fúngica em caramujos adultos (DIAS, 1954ab; DIAS; DAWOOD, 1955; CHENG, 1986; SINGER et al., 1997). Fungo do gênero *Beauveria* spp foi isolado em adultos de *B. glabrata* expostos a sedimentos coletados no Cerrado, sugerindo que o isolado pode ter tido alguma ação no caramujo (ROCHA et al., 2009). Fungos são encontrados na natureza desencadeando processos infecciosos em diferentes organismos, atuando como patógenos naturais, entretanto, praticamente nada é sabido sobre a patogenicidade de fungos a *B. glabrata*.

## 2.4 Fungos patogênicos a invertebrados

Os fungos apresentam elevada importância para vários setores de produção em indústrias farmacêuticas e alimentícias, para a gastronomia, para a saúde e na manutenção de cadeias tróficas. No ambiente, interações fúngicas com outros organismos são frequentemente encontradas. Fungos desencadeiam processos infecciosos em ostras e abalones, causando descalcificação da concha e posterior penetração e infecção no molusco. Em corais, há desenvolvimento de micélio nos poros o que causa necrose e morte na parte atingida. Algas também são acometidas por infecção fúngica, diminuindo estoques de clorofila, carboidratos e proteínas, interferindo no processo de fotossíntese (CAMPION-ALSUMARD; GOLUBIC; PRIESS, 1995; RAMAIAH, 2006).

Fungos patogênicos a artrópodes são aplicados no controle de pragas agrícolas e vetores de doenças de importância médica e veterinária para a saúde pública. A ordem Hypocreales reúne importantes fungos entomopatogênicos. São isolados a partir de cadáveres de artrópodes que apresentam indícios de infecção fúngica como mumificação e formação de micélio sobre a cutícula e em amostras de solo. Em condições ideais de temperatura e

umidade, a infecção inicia-se com o contato da forma de propagação, conídio, com a cutícula do hospedeiro (Figura 9). Após o contato, o conídio germina formando um tubo germinativo. A parte posterior deste tubo se dilata, formando o apressório. A diferenciação da parte inferior do apressório forma o grampo de penetração que pressiona e libera enzimas para penetrar a cutícula do hospedeiro e iniciar a colonização. Dentro da hemocele do artrópode, há uma encapsulação de hifas formando corpos hifais, ou blastosporos, que produzem toxinas. Com a morte do hospedeiro, hifas emergem através de espiráculos e pela cutícula, cobrindo todo o cadáver. Após algumas horas ou poucos dias, inicia-se a conidiogênese e disseminação de conídios (ALVES, 1998).

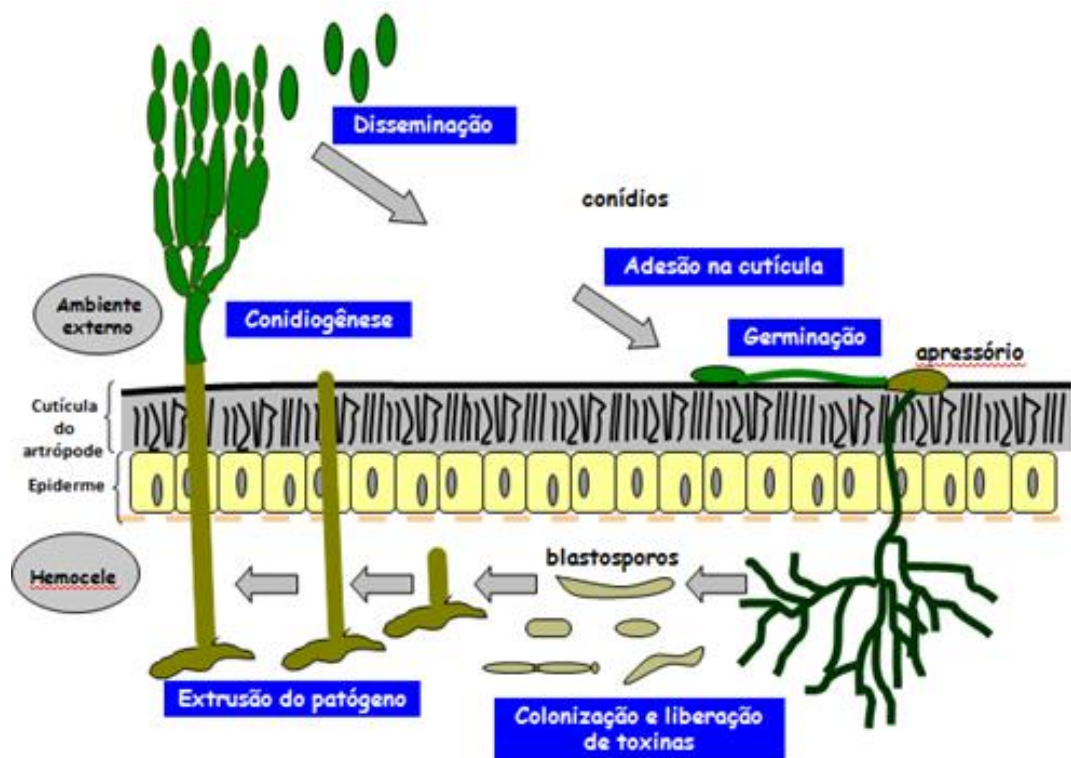


Figura 9 – Ciclo biológico de *Metarhizium anisopliae* no hospedeiro artrópode Adaptado de Mascarin e Pauli (2010).

*M. anisopliae* e *B. bassiana* são fungos terrestres entomopatogênicos com distribuição ampla na natureza. São patógenos de inúmeros artrópodes em seus diferentes estágios de desenvolvimento. Fatores abióticos como umidade, temperatura e radiação influenciam na germinação e sobrevivência destes fungos. A germinação e o crescimento ocorrem entre 20° e 30 °C para *M. anisopliae* e 22° e 28° C para *B. bassiana*. Temperaturas muito altas ou baixas atrapalham o desenvolvimento dos fungos, podendo retardar a doença no hospedeiro ou até prejudicar o patógeno. Ambos os fungos são facilmente cultiváveis em laboratório e já são produzidos para formulações aplicadas no controle de pragas agrícolas (ALVES, 1998). A

ocorrência natural e ausência de efeitos tóxicos aos seres humanos e ao ambiente estimulam a aplicação destes produtos (FARIA; MAGALHÃES, 2001; THUNGRABEAB; TONGMA, 2007; BORGES; NOVA, 2011; OLIVEIRA-FILHO et al., 2011; PIMENTEL; FERREIRA, 2012). São uma alternativa promissora ao uso de pesticidas, principalmente pela baixa especificidade de hospedeiros, o que os tornam ferramentas importantes no controle de pragas (ALVES, 1998; SCHOLTE et al., 2004).

### 3 JUSTIFICATIVA

---

*B. glabrata* é uma espécie de acentuada importância no ciclo da esquistossomose mansônica devido ser a espécie mais susceptível à infecção por *Schistosoma mansoni*. Mecanismos complexos de defesa, sobrevivência e reprodução destes caramujos dificultam o controle de suas populações e, por conseguinte a erradicação da doença. A possibilidade de massas ovíferas de moluscos permanecerem viáveis em criadouros transitórios é impactante para a manutenção do ciclo de *S. mansoni*, devendo ser elucidada para um melhor entendimento da biologia do caramujo. Dado o ambiente em que se encontram, os produtos moluscidas tornam-se dispersos na água, causando toxicidade a organismos não alvos, inclusive ao ser humano. Novas abordagens de controle devem ser exploradas, a fim de se encontrar uma alternativa de controle natural para interromper o ciclo da doença visando um menor impacto ambiental e econômico. Fungos são empregados no controle de artrópodes pragas e podem ser a base de uma nova geração de produtos para combater caramujos com importância na saúde humana, como *B. glabrata*. A escassez de dados sobre susceptibilidade de *B. glabrata* a fungos estimulam o desenvolvimento de metodologias de controle, visto que, pouco é sabido sobre o potencial patogênico de fungos em caramujos aquáticos ou em suas desovas.

## 4 OBJETIVOS

---

### 4.1 Objetivo geral

Desenvolver dispositivos com filme de água para testes com moluscidas em massas ovíferas e contribuir com o controle biológico de *B. glabrata* com fungos entomopatogênicos.

### 4.2 Objetivos específicos

1. Desenvolver dispositivos para avaliar a viabilidade de massas ovíferas de *B. glabrata* em filme de água.
2. Avaliar a eclosão acumulada relativa e o deslocamento de juvenis de *B. glabrata* em filme de água em umidade relativa (UR 75% e UR > 98%).
3. Avaliar o efeito de conídios e blastosporos dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* na eclosão de *B. glabrata*.

## 5 MÉTODOS

---

### 5.1 Origem e criação de *Biomphalaria glabrata*

Exemplares de *B. glabrata* provenientes do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil, foram mantidos em laboratório, dentro de recipientes de polietileno (70 x 20 x 45cm) contendo 15 litros água desclorada proveniente de reservatório próprio com capacidade de 1000 litros. Foram alimentados com folhas de alface (*Lactuca sativa*) frescas higienizadas com água corrente desclorada. Cinco cubos de isopor (50 x5x60 mm) foram colocados na água dos recipientes para substrato de ovipostura (AUGUSTO et al., 2009).

### 5.2 Preparo de massas ovíferas

Massas ovíferas com mínimo de 4 horas e máximo de 48 horas após ovipostura foram retiradas dos isopores com auxílio de espátula. Posteriormente, foram rinçadas em três frascos contendo cada um 50 ml água desclorada estéril por 5 segundos. Em seguida, os ovos de cada massa ovífera foram quantificados, e o excesso de água das massas ovíferas foi absorvido por papel filtro estéril.

### 5.3 Preparo de dispositivos com filme de água

Foram preparados dois tipos de dispositivos para a simulação de filme de água estável, um com pedra de argila expandida flutuando sobre a água (Figura 10) e outro com meio ágar água em diferentes concentrações de ágar (Figura 11). Para a confecção do dispositivo com pedra de argila expandida (32 x 22 mm, absorção de água de 10% em 24 horas, Cinexpan – Indústria e Comércio de Argila Expandida Ltda, São Paulo, Brasil), as pedras foram limpas

em água desclorada corrente com auxílio de escova. Posteriormente as pedras foram autoclavadas a 121°C por 20 minutos. Um anel de isopor (10 mm de raio da borda x 2 mm de espessura) foi exposto à radiação ultravioleta (Phillips UV-C lâmpada ultravioleta germicida G30 T8, Holanda) em ambos os lados por 15 minutos e foi encaixado em cada pedra. O dispositivo de pedra de argila foi colocado em um copo plástico descartável (80 x 70 mm) contendo 100 ml de água desclorada estéril e o copo foi fechado com tampa transparente própria (80 mm de diâmetro), exceto os copos com dispositivos expostos em UR 75%.

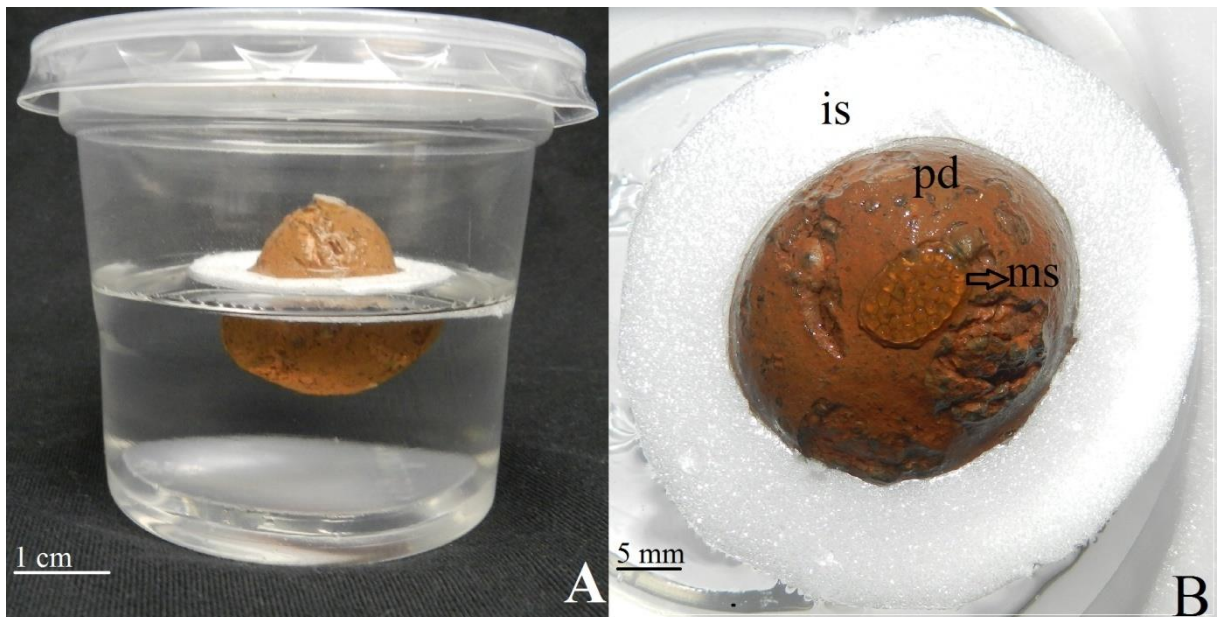


Figura 10 – Dispositivo com pedra de argila. A – visão lateral de dispositivo de pedra de argila; B – massa ovígera (ms) de *Biomphalaria glabrata* sobre pedra de argila (pd) envolta por anel de isopor (is).

Os dispositivos com meio ágar água (Figura 11) foram feitos com concentrações diferentes de ágar (0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 1%, 2% ou 3%). As concentrações de meio ágar (60 ml) foram distribuídas em placa de Petri menor (57 x 15 mm) separadamente, disposta dentro de outra placa de Petri maior (150 x 30 mm). O meio ágar água transbordou para a face externa da borda da placa de Petri menor, forrando o fundo da placa de Petri maior. Após, foram adicionados 50 ml de água desclorada estéril na placa de Petri maior, para promover o contato contínuo da água com as massas ovígeras dentro do filme de água. A placa de Petri maior foi fechada com a tampa própria.

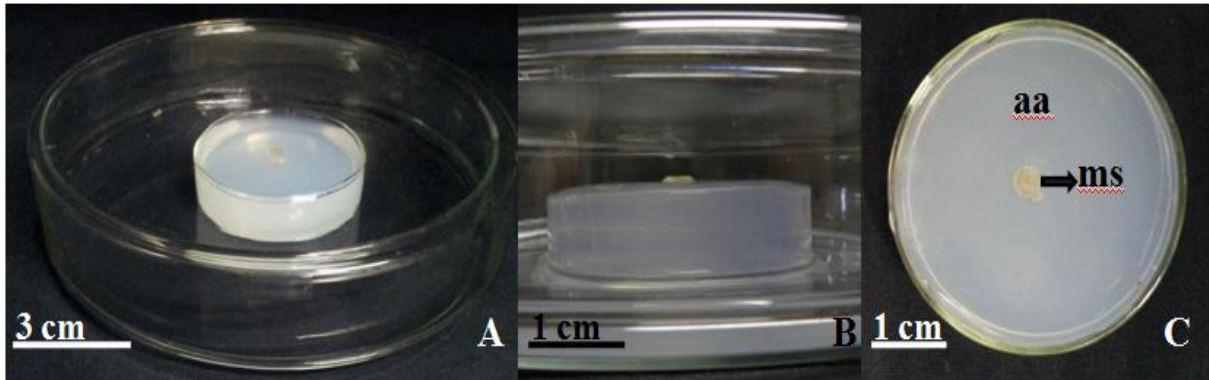


Figura 11 – Dispositivo de meio ágar água. A – dispositivo de meio ágar água composto por placa de Petri maior (150 x 30 mm) e placa de Petri menor (57 x 15 mm); visão lateral (B) e frontal (C) de dispositivo de ágar água enfatizando uma massa ovígera (ms) de *Biomphalaria glabrata* sobre meio ágar água (aa) dentro da placa de Petri menor.

Foram testadas duas umidades relativas UR 75% e UR > 98% para ambos os dispositivos. O controle foi feito com massas ovígeras submersas na água desclorada estéril em umidades relativas supracitadas. Ambos os dispositivos foram mantidos em 25 °C e 12 horas de fotofase.

#### 5.4 Origem dos fungos

A linhagem de *Beauveria bassiana* (ARSEF 9588) foi proveniente de USDA-ARS (United States Department of Agriculture – Agricultural Research Service) Coleção de Culturas de Fungos Entomopatogênicos (ARSEF), NY, EUA, e a linhagem de *Metarhizium anisopliae* s. l. (IP 46) está depositada como CG 620 na Coleção de Fungos de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Brasil, (Tabela 1).

Tabela 1 – Fungos utilizados em testes de patogenicidade em massas ovígeras de *Biomphalaria glabrata*.

Fungo	Número de acesso	País	Ano	Substrato/hospedeiro
<i>Beauveria bassiana</i>	ARSEF 9588	EUA	2009	<i>Frankliniella occidentalis</i>
<i>Metarhizium anisopliae</i>	IP 46	Brasil	2001	solo

## 5.5 Cultivo de conídios

*M. anisopliae* e *B. bassiana* foram cultivados em meio BDA (batata, dextrose e ágar; Difco<sup>®</sup>, Becton, Dickinson and Company – EUA) por 15 dias a 25 °C, com fotofase de 12 horas e 75 ± 5 % de umidade relativa (UR) na incubadora. Posteriormente, foram mantidos a 4°C até o uso.

## 5.6 Produção de blastosporos (corpos hifais)

*M. anisopliae* e *B. bassiana* foram cultivados em frascos tipo Erlenmeyer (250 ml) contendo meio Adámek modificado feito com milhocina (31,58 ml – 5g de amido de milho dissolvidos em 250 ml de água), extrato de levedura (42,1 g), glicose (42,1 g - glicose D(+) glucose anidra (dextrose) P. A. ACS, Vetec Química Fina Ltda), Tween 80 (Synth<sup>®</sup>) a 0,1% (21,06 ml) em 1000 ml de água deionizada. Os frascos foram fechados com tampas de algodão hidrófobo e gaze, autoclavados por 20 minutos a 121 °C e posteriormente os fungos foram inoculados no meio e mantidos em agitador a 150 rpm e 27 °C por quatro dias (ADÁMEK, 1963).

## 5.7 Preparo de suspensões fúngicas

Conídios de *M. anisopliae* e *B. bassiana* foram raspados com espátula estéril da superfície de cultura e suspendidos em 5 ml de Tween 80 a 0,01% em tubos de vidro estéreis. Os tubos foram agitados em Vortex por 2 minutos e em seguida, as suspensões foram filtradas em algodão hidrófilo.

As culturas de blastosporos de *M. anisopliae* e *B. bassiana* nos frascos com meio Adámek foram filtradas em gaze para tubos de plástico tipo Falcon e centrifugadas a 3000 rpm por 4 minutos. Posteriormente, o sobrenadante dos tubos foi retirado e 10 ml de Tween 0,1% foram adicionados nos tubos e agitados em Vortex. Em seguida, os tubos foram

centrifugados novamente. Após, o sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 5 ml de água desclorada estéril nos tubos e agitou-se em Vórtex.

Posteriormente, as suspensões de conídios e blastosporos foram diluídas em água deionizada ( $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-1}$ ), quantificadas em câmara de Neubauer e ajustadas na concentração de  $10^9$  conídios/ml ou  $10^9$  blastosporos/ml.

## **5.8 Exposição de massas ovíferas em filme de água**

Uma massa ovígera foi colocada no dispositivo de pedra de argila na região central da pedra não submersa, dentro do filme de água. Nos dispositivos com meio ágar água, foi colocada uma massa ovígera dentro do filme de água na superfície do meio ágar (0,3% - 3%) água em placa de Petri menor (50 x 10 mm). No vidro sem filme de água, foi colocada uma massa ovígera no centro da placa de Petri menor (50 x 10 mm) estéril. Para o controle, uma massa ovígera foi colocada em copo com água desclorada estéril.

## **5.9 Tratamento de massas ovíferas com fungos**

### **5.9.1 Massas ovíferas em filme de água em pedra de argila**

Foram inoculados 20 µl das suspensões de conídios (dose aproximada de  $2 \times 10^7$  conídios) ou blastosporos (dose aproximada de  $2 \times 10^7$  blastosporos) de *M. anisopliae* ou *B. bassiana* sobre massas ovíferas dispostas em dispositivos de pedra de argila expandida. Foram inoculados 20 µl de água desclorada estéril nas massas ovíferas do grupo controle dispostas no filme de água sobre o dispositivo de argila expandida.

### 5.9.2 Massas ovígeras submersas

Uma massa ovígera foi colocada dentro de um tubo de vidro com rosca contendo 5 ml de suspensão de conídios ( $2 \times 10^7$  conídios/ml) ou blastosporos ( $2 \times 10^7$  blastosporos/ml) de *M. anisopliae* ou *B. bassiana*. O controle foi realizado com uma massa ovígera em água desclorada estéril. Os dispositivos foram mantidos segundo condições supracitadas.

### 5.10 Variáveis avaliadas

O ressecamento de massas ovígeras, movimento dos embriões, a eclosão e o deslocamento de juvenis, sobrevivência dos juvenis em 30 dias e, para as massas ovígeras tratadas com suspensões fúngicas, também foram observadas a presença/ausência de micélio e conídios. Foram avaliados diariamente com auxílio de estereomicroscópio com aumento de 40x e com microscópio óptico com o aumento de 400x. Foram feitas quatro repetições para cada tratamento com cinco massas ovígeras por fungo e controle. Os juvenis foram alimentados com folha de alface fresca (*Lactuca sativa*) higienizada em água desclorada corrente.

### 5.11 Análise dos resultados

Os testes foram realizados em 4 repetições independentes e os dados foram convertidos usando Arcsin e avaliados com a análise de variância (ANOVA). As médias de eclosões acumuladas foram consideradas significativamente diferentes com  $p < 0,05$ .

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Viabilidade de massas ovígeras em filme de água

Em UR > 98% as massas ovígeras expostas em dispositivos de pedra de argila ou em concentrações de ágar (0,3% - 1%) não ressecaram e permaneceram túrgidas até o início da eclosão de juvenis. Movimento dos embriões dentro das massas ovígeras foi visualizado a partir do segundo dia de exposição até a eclosão. Para eclodir, os juvenis perfuraram a membrana na superfície da massa ovígera. Nesse momento o colóide extravasou e ela tornou-se murcha. Os primeiros juvenis eclodiram a partir do quinto dia de exposição no filme de água independentemente do dispositivo testado, e os últimos juvenis eclodiram no décimo dia (Figura 12). A eclosão acumulada de juvenis em 15 dias de exposição a partir de massas ovígeras expostas em dispositivo de pedra de argila variou entre 0% (UR 75%) e > 91,9% (grupos controle e pedra de argila em UR > 98%) sem efeito da exposição na eclosão de juvenis ( $F_{1,4} = 2,1$ ;  $P = 0,2$ ; Figura 12, Tabela 2). Massas ovígeras expostas nesse dispositivo (UR 75%) e a superfície exposta da pedra de argila ressecaram, o que não foi observado em UR > 98%, portanto, não houve eclosão de juvenis (Figura 12, Tabela 2).

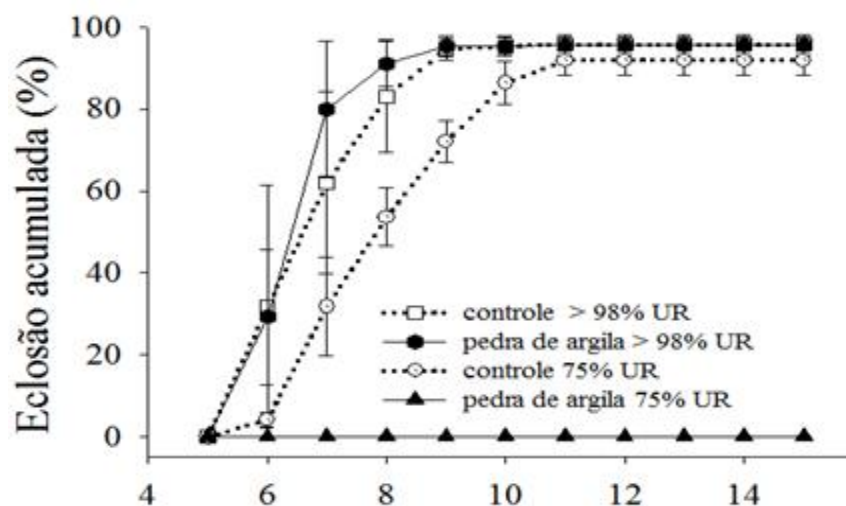


Figura 12 – Eclosão média relativa acumulada ( $\pm$  erro padrão da média) de juvenis de *Biomphalaria glabrata* a partir de massas ovígeras expostas em filme de água de dispositivos de pedra de argila e grupo controle na água. Foram incubadas por 15 dias a 25 °C, fotofase de 12 horas e umidade relativa (UR) > 98% ou 75%.

A eclosão acumulada de juvenis a partir de massas ovígeras expostas em filme de água em dispositivo de ágar água com diferentes concentrações de ágar em UR > 98% variou entre 0% (ágar > 2%) e > 81,8% (ágar < 1% e grupo controle), evidenciando o efeito da concentração de ágar na eclosão de juvenis ( $F_{6,14} = 57$ ;  $P < 0,001$ ; Figura 13, Tabela 2). As massas ovígeras expostas em vidro sem filme de água ressecaram independentemente da umidade testada, assim, não houve eclosão de juvenis (Tabela 2).

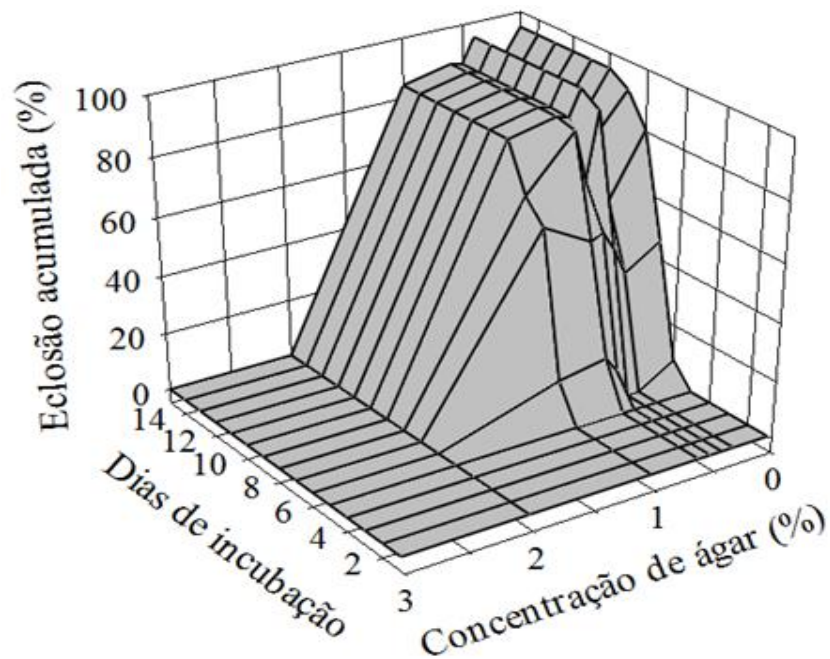


Figura 13 – Eclosão média relativa acumulada de juvenis de *Biomphalaria glabrata* a partir de massas ovígeras expostas em filme de água em dispositivos de ágar água com diferentes concentrações de ágar e grupo controle na água (0% de ágar). Foram incubadas por 15 dias a 25 °C, fotofase de 12 horas e umidade relativa > 98%.

Tabela 2 – Eclosão média relativa acumulada ( $\pm$  erro padrão da média, EP) de juvenis de *Biomphalaria glabrata*, 15 dias após exposição de massas ovíferas em ambientes como água (controle), filme de água sobre pedra de argila flutuando em água (filme de água I), em meio ágar água (filme de água II) com diferentes concentrações de ágar ou sobre vidro sem presença de água em umidade relativa > 98% ou 75%.

Umidade relativa (%)	Ambiente	Concentração de ágar (%)	Eclosão (%) ( $\pm$ EP)	
> 98 b	água	-	96 $\pm$ 0,7 b	
		filme de água I	-	96 $\pm$ 2,5 b
	filme de água II	0,3	83,7 $\pm$ 2,9 b	
		0,4	95,3 $\pm$ 2,3 b	
		0,5	84,8 $\pm$ 10,5 b	
		0,6	88,2 $\pm$ 4,8 b	
		1,0	81,8 $\pm$ 9,2 b	
		2,0	0,0 a	
		3,0	0,0 a	
	vidro	-	0,0 a	
	75 a	água	-	91,9 $\pm$ 3,5 b
			filme de água I	-
		filme de água II	0,3	16,7 $\pm$ 6,7 a
0,4			7,3 $\pm$ 7,3 a	
0,5			5,3 $\pm$ 4,4 a	
0,6			7,6 $\pm$ 7,7 a	
1,0			0,4 $\pm$ 0,4 a	
2,0			0,0 a	
3,0			0,0 a	
vidro		-	0,0 a	

Em cada ambiente foram testadas 12 massas ovíferas contendo entre 22 a 40 ovos/massa. Foram incubadas a 25 °C e 12 horas de fotofase.

Embora a eclosão acumulada de juvenis a partir de massas ovíferas expostas em dispositivos de ágar água em UR 75% ter sido < 16,7% (Figura 14, Tabela 2) não houve efeito significativo da concentração de ágar água na eclosão de juvenis ( $F_{6,14} = 0,6$ ;  $P = 0,75$ ), o que evidenciou o efeito altamente significativo da umidade testada na eclosão de juvenis ( $F_{1,28} = 178,3$ ;  $P < 0,001$ ; Figura 14, Tabela 2).

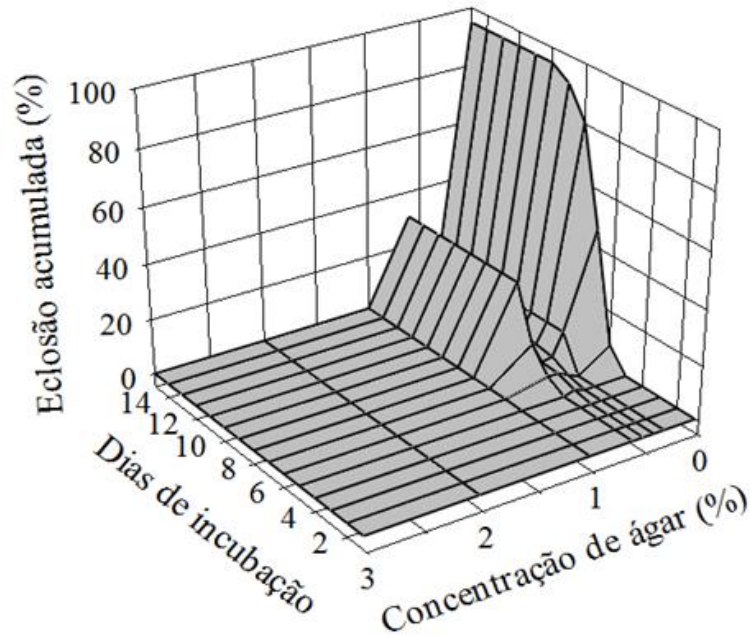


Figura 14 – Eclosão média relativa acumulada de juvenis de *Biomphalaria glabrata* a partir de massas ovíferas expostas em filme de água em dispositivos de ágar água com diferentes concentrações de ágar e grupo controle. Foram incubadas por 15 dias a 25 °C, fotofase de 12 horas e umidade relativa 75%.

Após eclosão, os juvenis se deslocaram em filme de água formado sobre o dispositivo de pedra de argila e na parede externa da placa de Petri do dispositivo de ágar água (UR > 98%) em direção à água (Figura 15).

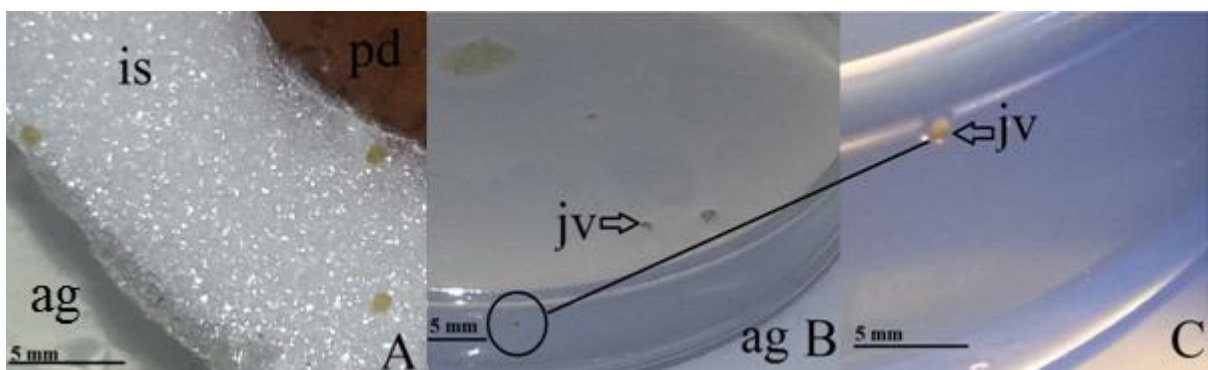


Figura 15 – Deslocamento de juvenis (jv) de *Biomphalaria glabrata* em direção à água (ag) a partir de massas ovíferas expostas em filme de água em dispositivos em umidade relativa > 98%. Juvenil sobre anel de isopor (is) de dispositivo de pedra (pd) de argila (A) e em ágar água (B) em concentração de 0,5% de ágar e, detalhe de juvenil na borda externa da placa de Petri menor (C).

Todos os juvenis sobreviveram no período de 30 dias avaliados, independentemente do dispositivo testado.

## 6.2 Efeito de conídios e blastosporos em massas ovíferas

Na superfície de massas ovíferas expostas em dispositivo de pedra de argila (UR > 98%) tratadas com conídios de *B. bassiana* não houve crescimento de micélio (Tabela 3), porém, quando tratadas com conídios de *M. anisopliae* houve crescimento de micélio (> 4º dia; Tabela 3) e conídios (> 8º dia; Tabela 3). Houve eclosão de juvenis (Figura 16, Tabela 3) a partir de massas ovíferas tratadas com ambos os fungos.

Tabela 3 – Eclosão média relativa acumulada ( $\pm$  erro padrão da média, EP) de juvenis de *Biomphalaria glabrata* e presença semiquantitativa de micélio e novos conídios na superfície de massas ovíferas, 15 dias após tratamento com conídios ou blastosporos de *Metarhizium anisopliae* (*Ma*) ou *Beauveria bassiana* (*Bb*) e exposição em filme de água sobre pedra de argila flutuando na água ou submersão em água.

Ambiente	Propágulo	Fungo	Eclosão (%) ( $\pm$ EP)	M/C
filme de água	conídios	<i>Ma</i>	91,3 $\pm$ 3,1	+/+
		<i>Bb</i>	95,5 $\pm$ 1,3	-/-
	blastosporos	<i>Ma</i>	0,0	++/++
		<i>Bb</i>	96,8 $\pm$ 0,7	-/-
água	conídios	<i>Ma</i>	52,5 $\pm$ 22,1	+/+
		<i>Bb</i>	33,0 $\pm$ 21,4	+/+
	blastosporos	<i>Ma</i>	0,0	++/++
		<i>Bb</i>	0,0	++/++

Em cada tratamento foram testadas 20 massas ovíferas contendo entre 23 a 44 ovos/massa. Foram incubadas a 25 °C, 12 horas de fotofase e umidade relativa > 98%. A eclosão de juvenis do grupo controle foi  $\geq$  88,6 %. Presença de micélio (M) e conídios(C) classificados em não visível (-), bem visível (+),abundante (++); aumento 40x.

Os primeiros juvenis de massas ovíferas tratadas com conídios de *B. bassiana* ou *M. anisopliae* eclodiram no quinto dia após o tratamento e os últimos no décimo dia (Figura 16, Tabela 3) assim como os juvenis eclodidos a partir de massas ovíferas expostas em dispositivos com filme de água (Figuras 12 e 13).

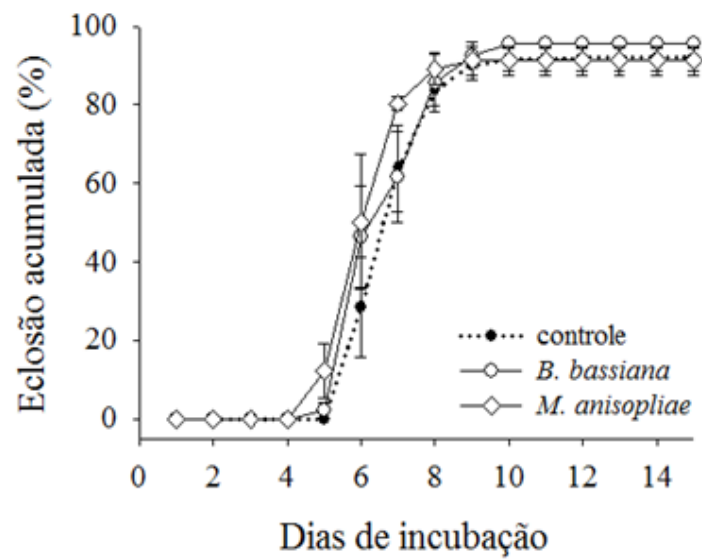


Figura 16 - Eclosão média acumulada ( $\pm$  erro padrão da média) de juvenis de *Biomphalaria glabrata* a partir de massas ovíferas tratadas com conídios ( $2 \times 10^7$  conídios) de *Metarhizium anisopliae* ou *Beauveria bassiana* e grupo controle (sem fungo) expostas em pedra de argila. Foram incubadas por 15 dias a 25 °C, fotofase de 12 horas e umidade relativa > 98%.

As massas ovíferas expostas em filme de água tratadas com blastosporos de *B. bassiana* não tiveram desenvolvimento de micélio e conídios, e os juvenis eclodiram (Figura 17, Tabela 3). Quando tratadas com blastosporos de *M. anisopliae*, houve desenvolvimento de micélio 24 horas após o tratamento e conídios a partir do quarto dia após o tratamento (Figura 18, Tabela 3) na superfície das massas ovíferas. Não houve eclosão de juvenis (Figuras 17 e 18).

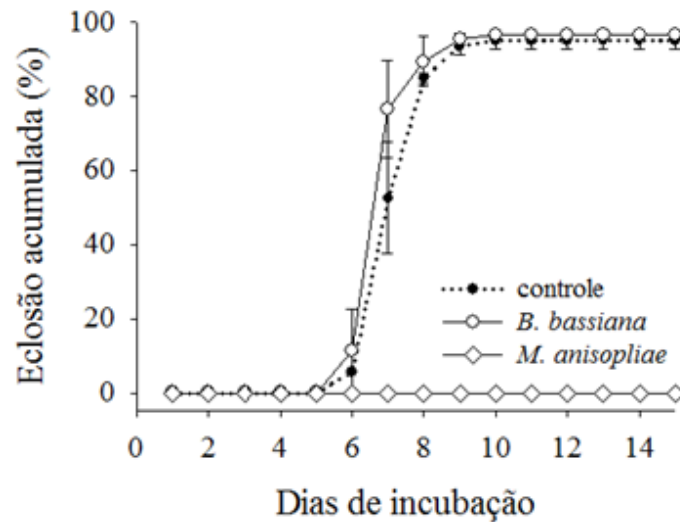


Figura 17 – Eclosão média relativa acumulada ( $\pm$  erro padrão da média) de juvenis de *Biomphalaria glabrata* em massas ovígeras tratadas com blastosporos ( $2 \times 10^7$  blastosporos) de *Metarhizium anisopliae* ou *Beauveria bassiana* e grupo controle (sem fungo) expostas em pedra de argila. Incubadas por 15 dias a 25 °C, fotofase de 12 horas e umidade relativa > 98%

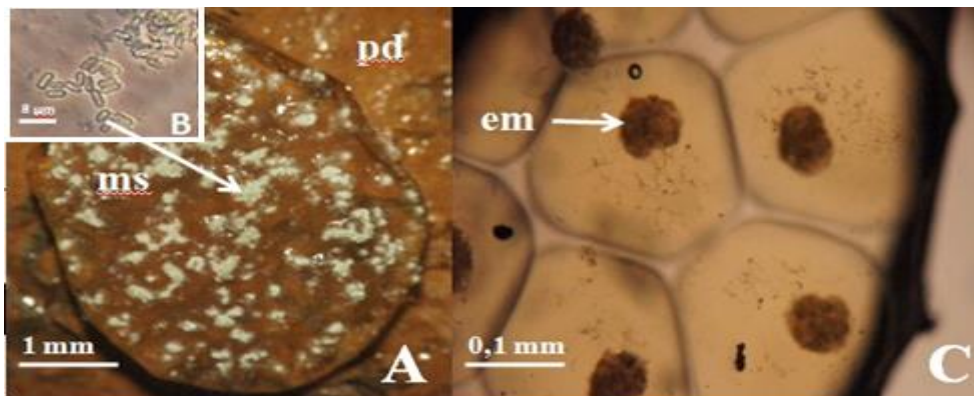


Figura 18 – Massa ovígera (ms) de *Biomphalaria glabrata* em dispositivo de pedra de argila (pd) 24 horas após tratamento com blastosporos ( $2 \times 10^7$  blastosporos) de *Metarhizium anisopliae* com desenvolvimento de micélio (A), novos conídios (B) e embriões (em) não desenvolvidos de *B. glabrata* em massa ovígera 15 dias após tratamento (C).

A eclosão acumulada de juvenis a partir de massas ovígeras submersas tratadas com conídios de *B. bassiana* ou *M. anisopliae* (Figura 19A) foi menor ( $< 52,5\%$ , Tabela 3) quando comparado com o grupo controle ( $\geq 88,6\%$ , Tabela 3) e em massas ovígeras tratadas com blastosporos de ambos os fungos a eclosão foi nula (Figuras 19 B e 20, Tabela 3). Houve variações ( $< 15\%$  e  $> 86\%$ ; Figura 19 A) na eclosão acumulada de juvenis por repetição em massas ovígeras tratadas com conídios de *M. anisopliae* ou *B. bassiana*.

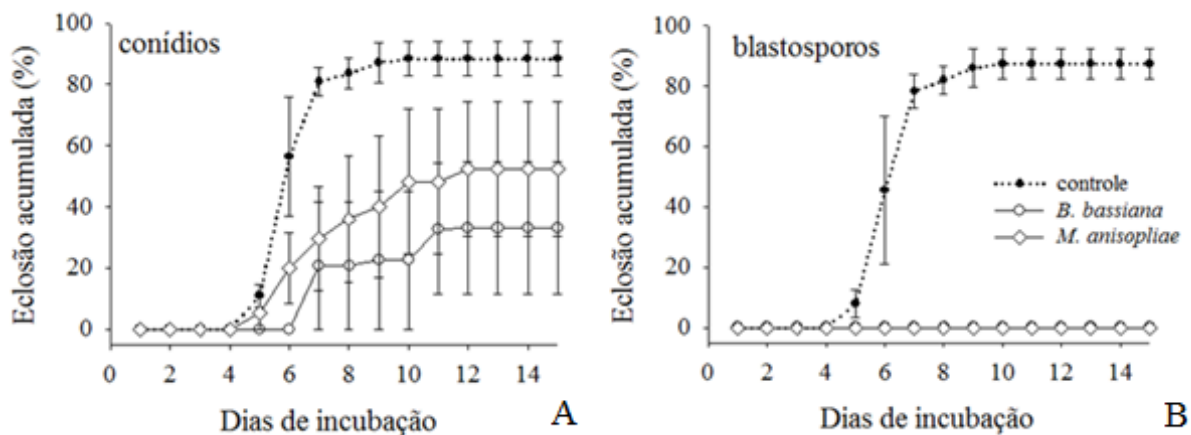


Figura 19 - Eclosão média relativa acumulada (± erro padrão da média) de juvenis de *Biomphalaria glabrata* em massas ovíferas submersas tratadas com conídios (2 x 10<sup>7</sup> conídios/ml) (A) ou blastosporos (2 x 10<sup>7</sup> blastosporos/ml) (B) de *Metarhizium anisopliae* ou *Beauveria bassiana*. Incubadas por 15 dias a 25 °C, fotofase de 12 horas e umidade relativa > 98%.



Figura 20 – Tratamento de massas ovíferas submersas com blastosporos (2 x 10<sup>7</sup> blastosporos/ml) de *Beauveria bassiana* (A, B) ou *Metarhizium anisopliae* (C, D), enfatizando embriões (em) em massa ovígera 15 dias após tratamento.

Houve eclosão de juvenis em filme de água a partir de massas ovíferas de *B. glabrata* tratadas com conídios de *M. anisopliae* ou de *B. bassiana*, porém, quando aplicado blastosporos de *M. anisopliae* não houve eclosão de juvenis. Em massas ovíferas submersas tratadas com conídios houve redução na média de eclosão acumulada (Figura 19A, Tabela 3), e quando tratadas com blastosporos não houve eclosão de juvenis em massas ovíferas tratadas com ambos os fungos (Figura 19B, Tabela 3). Desta forma, houve efeito do ambiente (filme de água ou submersão em água;  $F_{1,30}=41,2$ ;  $P<0,001$ ; Tabela 3) na ação dos propágulos (conídios ou blastosporos) e houve efeito do propágulo ( $F_{1,30}=10,9$ ;  $P=0,03$ ) quando considerado o fungo aplicado, *M. anisopliae* ou *B. bassiana*.

## 7 DISCUSSÃO

---

Este é o primeiro trabalho que aborda e propõe metodologia para avaliar a viabilidade de massas ovíferas, eclosão e deslocamento de juvenis em filme de água e que relata a atividade patogênica dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* em massas ovíferas de *B. glabrata*.

### 7.1 Influência do ambiente em massas ovíferas e utilidade dos dispositivos

A umidade relativa próxima à saturação possibilitou a viabilidade de massas ovíferas expostas em filme de água em ambos os dispositivos testados mostrando que, nestas condições, massas ovíferas permanecem viáveis favorecendo o desenvolvimento de embriões. Em maior concentração de ágar e em ausência de filme de água, os embriões não desenvolveram devido ao ressecamento das massas ovíferas ocasionado pela menor quantidade de água disponível quando comparado com as demais concentrações. Isto enfatiza a importância da presença de filme de água para o desenvolvimento de embriões e eclosão de juvenis.

A movimentação de embriões caracteriza o início da fase de gastrulação (KAWANO; NAKANO; WATANABE, 2008, p. 349) e também pode indicar a viabilidade de embriões em massas ovíferas submersas, que foi observada a partir do segundo dia após exposição em filme de água. Portanto, em massas ovíferas expostas em filme de água formado nos dispositivos confeccionados a movimentação de embriões inicia-se em período semelhante que em massas ovíferas submersas em água.

A eclosão de juvenis a partir do sexto dia após ovipostura ocorreu em massas ovíferas submersas em água e em expostas em filme de água em ambos dispositivos confeccionados e, o mesmo período descrito por Kawazoe (1976) em massas ovíferas submersas. Isto mostra que a eclosão de juvenis ocorre independentemente do ambiente, desde que haja filme de água estável e umidade próxima à saturação.

O deslocamento de juvenis foi possível pela formação de filme de água estável sobre a pedra de argila e em ágar água. Os juvenis se deslocaram para a água disponível nos dispositivos, porém, não foi comprovado que haja um deslocamento direcionado.

Geralmente, a ação de moluscicidas ou substâncias tóxicas é testada em massas ovíferas de *B. glabrata* submersas (JURBERG; CABRAL NETO; SCHALL, 1985; TANG; WHITFIELD; PERRET, 1985; GERALDINO, 2004), não considerando massas ovíferas postas em substratos nas margens de criadouros em condições de estresse. Os dispositivos desenvolvidos possibilitam a observação da viabilidade de massas ovíferas expostas em filme de água e também, a aplicação tópica de microrganismos, fungos e bactérias, extratos de plantas, moluscicidas sintéticos.

## 7.2 Susceptibilidade de massas ovíferas a fungos

*M. anisopliae* s. l. (IP 46), fungo terrestre isolado em solo e que tem um amplo espectro de espécies hospedeiras (ROCHA et al., 2013) inibiu a eclosão de juvenis de *B. glabrata* a partir de massas ovíferas expostas em filme de água e submersas. Blastosporos são uma fase de desenvolvimento posterior à fase de conídios, fungo em fase de resistência ao ambiente desfavorável. Por isso, o crescimento de micélio e a conidiogênese a partir da inoculação de blastosporos de *M. anisopliae* em massas ovíferas expostas em filme de água foram visivelmente mais rápidos quando comparados com a aplicação de conídios. Com isso, os blastosporos de *M. anisopliae* tiveram um tempo de ação maior sobre massas ovíferas quando comparado com conídios, o que pode ter ocasionado maior exposição de embriões de *B. glabrata* a metabólitos provavelmente liberados pelo fungo. Visto que, com a aplicação de conídios o desenvolvimento de micélio foi tardio em relação ao tempo de embriogênese e eclosão dos caramujos.

Após tratamento com conídios ou blastosporos de *B. bassiana*, fungo patogênico a muitas espécies de artrópodes e de ampla distribuição geográfica, assim como *M. anisopliae* (SCHOLTE et al., 2004), juvenis de *B. glabrata* eclodiram a partir de massas ovíferas expostas em filme de água. Rocha et al. (2013) isolaram *B. bassiana* (IP 307) em cadáveres de adultos de *B. glabrata* usados como iscas em campo e, no presente trabalho, a eclosão de juvenis a partir de massas ovíferas submersas tratadas com conídios *B. bassiana* foi reduzida e com blastosporos foi nula. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que o ambiente influenciou na ação patogênica deste fungo que foi mais eficaz quando submerso.

A ausência de juvenis a partir de massas ovíferas de *B. glabrata* submersas tratadas com blastosporos de *M. anisopliae* ou *B. bassiana* pode ter ocorrido pelo fato de blastosporos produzirem metabólitos tóxicos em meio líquido (KLEESPIES; ZIMMERMANN, 1992). Neste caso, as massas ovíferas forneceram nutrientes aos fungos, visto que, elas são fontes ricas em lipídios, proteínas e glicogênio (BENKENDORFF; DAVIS; BREMNER, 2001). O mesmo ocorre em hemolinfa de artrópodes infectados após a penetração do fungo na cutícula do hospedeiro (ALVES, 1998).

Proteínas antimicrobianas a fungos oomicetos foram isoladas a partir de massas ovíferas de *B. glabrata* que conferem proteção aos embriões contra estes patógenos (BARON et al., 2013). Porém, a inibição da eclosão de juvenis de *B. glabrata* a partir de massas ovíferas tratadas com *M. anisopliae* ou *B. bassiana* sugere que não há proteínas antimicrobianas que tenham ação para estes fungos nas mesmas. Fungos entomopatogênicos apresentam atividade ovicida e penetram ovos de mosquitos (LUZ et al., 2007), porém, não foram encontradas evidências de penetração através da membrana da massa ovífera de *B. glabrata* de estruturas fúngicas.

## 8 CONCLUSÕES

---

- 1 – Os dispositivos confeccionados são modelos promissores para avaliar a viabilidade de massas ovíferas, eclosão e deslocamento de juvenis de *B. glabrata* em filme de água e o efeito de fatores abióticos, bióticos e moluscidas sobre esse ou outros caramujos em filme.
- 2 – A viabilidade de massas ovíferas de *B. glabrata* está diretamente relacionada com a umidade relativa do ambiente e a presença de filme de água estável.
- 3 - O fato de massas ovíferas de *B. glabrata* serem viáveis em filme de água em condições laboratoriais sugere que o mesmo pode ser esperado também em populações de caramujos em condições naturais. Isto deve ser considerado para o controle integrado deste caramujo.
- 4 - Blastosporos de *M. anisopliae* e *B. bassiana* são promissores contra massas ovíferas de *B. glabrata*.

## 9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

Mecanismos de ação, patogenicidade e aplicação de fungos entomopatogênicos vêm sendo elucidados com a finalidade de elaborar metodologias para o controle biológico de pragas e vetores de doenças. A atividade moluscicida depende da espécie, linhagem e fase de desenvolvimento do fungo. Desta forma, a triagem com propágulos de *Metarhizium* spp e *Beauveria* spp em ovos, juvenis e adultos de *B. glabrata* e o posterior isolamento de prováveis metabólitos tóxicos produzidos por estes fungos irão contribuir com uma melhor compreensão do potencial patogênico desses gêneros para o controle de *B. glabrata*. Cortes histológicos de massas ovíferas tratadas com fungos esclareceriam os mecanismos de ação desses patógenos sobre ovos de *B. glabrata*, respondendo se eles conseguem penetrar e atingir os embriões.

## REFERÊNCIAS

---

- ABDALLAH, A.; NASR, T. *Helisoma duryi* as means of biological control of schistosomiasis vector snails. **Journal of the Egyptian Medical Association**, v. 56, p. 514-520, 1973.
- ABDALLAH, A. T.; WANAS, M. Q. S.; THOMPSON, S. N. Effects of heavy metals on survival and growth of *Biomphalaria glabrata* Say (Gastropoda: Pulmonata) and interaction with shistosome infection. **Journal of Molluscan Studies**, v. 63, p. 79-86, 1997.
- ADÁMEK, L. Submerge cultivation of the fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.). **Folia Microbiologica**, v. 10, n. 4, p. 255-257, 1963.
- ALCANFOR, J. D'A. et al. Plantas moluscicidas no controle dos caramujos transmissores da esquistossomíase, com ênfase na ação de taninos. **Revista de Patologia Tropical**, v. 30, n. 2, p. 167-175, 2001.
- ALMEIDA, B. R. **Malacologia dos gêneros *Lymnaea* e *Biomphalaria* na mesorregião sul espírito-santense, e a avaliação de extratos de *Melia azedarach*, *Azadirachta indica*, e *Cymbopogon winterianus* como agentes moluscicidas**. Alegre, 2010. 171p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2010.
- ALVES, S. B. Controle microbiano de insetos. In: ALVEZ, S. B. (Org.). **Fungos entomopatogênicos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 289-370.
- ANDRADE, F. R. et al. Investigação da presença e contaminação de moluscos do gênero *Biomphalaria* na área central do município de Iapu/MG. **Farmácia & Ciência**, v.1, p.16-26, 2010.
- ARIADNA, J. A. et al. Acompanhamento do ciclo de vida de *Schistosoma mansoni* (Platyhelminthes: Trematoda) em condições laboratoriais. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 1, n. 2, p. 1-6, 2001.
- AUGUSTO, R. C. et al. Fatores ambientais favoráveis a manutenção de populações de *Biomphalaria glabrata* (linhagem BH) em laboratório para fins de pesquisa. In: **Anais do Congresso de Ecologia do Brasil**, 9, 2009, São Lourenço. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2009.
- BARON, O. L. et al. Parental transfer of the antimicrobial protein LBP/BPI protects *Biomphalaria glabrata* eggs against oomycete infections. **PLOS Pathogens**, v. 9, n. 12, p. 1-10, 2013.

BARBOSA, F. S. Mass migration of juvenile *Biomphalaria glabrata* snails bred under semi-natural conditions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, p. 53-56, 1989.

BARBOSA, L. **Cultivo primário do órgão hematopoiético de moluscos do gênero *Biomphalaria*: caracterização morfológica e funcional das células**. 2007. 104 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

BARBOSA, C. S. et al. Epidemiologia e controle da esquistossomose mansoni. In: CARVALHO, O. S. (Org.). ***Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008. p. 965-1008.

BENKENDORFF, K.; DAVIS, A. R.; BREMNER, J. B. Chemical defense in the egg masses of benthic invertebrates: an assessment of antibacterial activity in 39 mollusks and 4 polychaetes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.78,p.109-118, 2001.

BERG, C. O. Biological control of snail-borne diseases: a review. **Experimental Parasitology**, v. 33, p. 318-330, 1973.

BEZERRA, J. C. B.; KEMPER, A.; BECKER, W. Profile of organic acid concentrations in the digestive gland and hemolymph of *Biomphalaria glabrata* under estivation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 6, p. 789-794, 1999.

BORGES, L. R.; NOVA, M. X. V. Associação de inseticidas químicos e fungos entomopatogênicos no manejo integrado de pragas – uma revisão. **Ambiência Guarapuava**, v. 7, n. 1, p. 179-190, 2011.

BRAND, T. V.; NOLAN, M. O.; MANN, E. R. Observation on the respiration of *Australorbis glabratus* and some other aquatic snail. **Bulletin**, v. 95, n. 2, p. 199-213, 1948.

BRAND, T. V.; MCMAHON, P.; NOLAN, M. O. Physiological observations on starvation and desiccation of the snail *Australorbis glabratus*. **Biological Bulletin**, v. 113, n. 1, p. 89-102, 1957.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica. Brasília, 2007. 178 p. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigilancia\\_controle\\_moluscos\\_import\\_epidemio\\_2ed.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigilancia_controle_moluscos_import_epidemio_2ed.pdf)>. Acesso em: 23 jan. 2014.

CAMPION-ALSUMARD, T. L.; GOLUBIC, S; PRIESS, K. Fungi in corals: symbiosis or disease? Interaction between polyps and fungi causes pearl-like skeleton biomineralization. **Marine Ecology Progress Series**, v. 117, p. 137-147, 1995.

CANTINHA, R. S. **Estudo da resposta do caramujo *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) frente a estímulos ambientais estressores, com enfoque na proteína HSP 70.** 2012. 103 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Pesquisa Energética Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

CATANHEDE, S. P. D. et al. Atividade moluscicida de plantas: uma alternativa profilática. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 20, p. 282-288, 2010.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Epidemiology and Risk Factors: Schistosomiasis. Disponível em:<[http://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/gen\\_info/faqs.html](http://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/gen_info/faqs.html)>. Acesso em: 06 nov. 2013.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Parasites - Schistosomiasis. Disponível em:< <http://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.html> >. Acesso em: 27 ago. 2014.

CHENG, T. C. Biological control studies: bacteria associated with moribund *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) in the laboratory. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 47, p. 219-224, 1986.

CHIEFFI, P. P.; WALDMAN, E. A. Aspectos particulares do comportamento epidemiológico da esquistossomose mansônica no Estado de São Paulo, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 4, p. 257-275, 1988.

COELHO, P. M. Z. Relação molusco/parasita:ciclo biológico do parasita no molusco. In: BARBOSA, F. S. (Org.). **Tópicos em malacologia médica** [online]. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1995. p. 203-210.

COURA-FILHO, P. et al. The prolonged use of niclosamide as a molluscicide for the control of *Schistosoma mansoni*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 34, n. 5, p. 427-435, 1992.

COURA-FILHO, P. Abordagens alternativas no controle da esquistossomose: buscando incluir o subjetivo na epidemiologia. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 12, p. 95-101, 1996.

DANNEMANN, R. D. A.; PIERI, O. S. Anidrobiose e diapausa em *Biomphalaria glabrata* (Say), caramujo transmissor da esquistossomose, na região nordeste. **Biotemas**, v. 2, n. 1, p. 57-68, 1989.

DEJONG, R. J. et al. Evolutionary Relationships and Biogeography of *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) with implications regarding its role as host of the human

bloodfluke, *Schistosoma mansoni*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 18, n. 12, p. 2225–2239, 2001.

DIAS, E. Nota prévia sobre ensaios de combate aos planorbídeos por métodos biológicos e bioquímicos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 52, n. 1, p. 247-260, 1954 a.

DIAS, E. Guerra bacteriológica contra os hospedeiros intermediários da esquistossomose humana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 52, n. 2, p. 315-327, 1954 b.

DIAS, E.; DAWOOD, M. M. Preliminary trials on the biological snail control with *Bacillus pinotti* in Egypt. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 53, n. 1, p. 12 - 29 1955.

FARIA, M. R.; MAGALHÃES, B. P. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. **Biociência**, n. 22, p. 18-22, 2001.

FERREIRA, M. V. R.; ALENCASTRO, A. C. R.; HERMES-LIMA, M. Role of antioxidant defenses during starvation and anoxia exposure in the fresh water snail *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835). **Canadian Journal of Zoology**, v. 81, p. 1239-1248, 2003.

FERREIRA, C. S. **Análise bioquímica e equilíbrio ácido base em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), hospedeiro intermediário de *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907), sob a exposição à *Stryphnodendron polyphyllum* (Martius, 1837), planta moluscicida do Cerrado brasileiro**. 2006. 106 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical e Saúde Pública) - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2006.

FERREIRA, I. L. M.; SILVA, T. P. T. Mortalidade por esquistossomose no Brasil: 1980-2003. **Revista de Patologia Tropical**, v. 36, p. 67-74, 2007.

FRIEDMAN, C. S; GRINDLEY, R.; KEOGH, J. A. Isolation of a fungus from shell lesions of New Zealand abalone, *Haliotis iris* Martyn and *H. australis* Gmelin. **Molluscan Research**, v. 18, p. 313-324, 1997.

GERALDINO, B. R. **Estudo dos efeitos embriotóxicos de xenobióticos em *Biomphalaria glabrata***. 2004. 92 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca ENSP-FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2004.

GIOVANELLI, A.; VIEIRA, M. V.; SILVA, C. L. P. A. C. Apparent competition through facilitation between *Melanoides tuberculata* and *Biomphalaria glabrata* and the control of schistosomiasis. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, n. 3, p. 429-431, 2003.

GRISOLIA, M. L. M.; FREITAS, J. R. Características físicas e químicas do habitat da *Biomphalaria tenagophila* (Mollusca, Planorbidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 80, n. 2, p. 237-244, 1985.

GUIMARÃES, C. T. Controle biológico: *Pomacea haustum* Reeve, 1856 (Mollusca, Pilidae) sobre planorbídeos, em laboratório. **Revista de Saúde Pública**, v. 17, p. 138-47, 1983.

GUIMARÃES, C. T. et al. Controle biológico: *Helobdella triserialis lineata* Blanchard, 1849 (Hirudinea: Glossiphonidae) sobre *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Mollusca: Planorbidae), em laboratório. **Revista de Saúde Pública**, v. 17, p. 481-92, 1983.

HARTMANN, D. B. et al. Letalidade do extrato de *Synadenium grantii* hook. F. (Euphorbiaceae) frente a caramujos *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Gastropoda, Planorbidae). **Arquivos de Ciência Veterinária Zoológica**, v. 14, n. 1, p. 5-11, 2011.

HATHAWAY, J. J. M. et al. Identification of protein components of egg masses indicates parental investment in immunoprotection of offspring by *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Mollusca). **Developmental & Comparative Immunology**, n. 34, p. 425-448, 2011.

JURBERG, P.; CABRAL NETO, J. B.; SCHALL, V. T. Molluscicide activity of the “avelos” plant (*Euphorbia tirucalli*, L.) on *Biomphalaria glabrata*, the mollusk vector of schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 80, n. 4, p. 423-427, 1985.

JURBERG, P.; CUNHA, R. A.; RODRIGUES, M. L. Behavior of *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Gastropoda: Planorbidae) - I. Morphophysiology of the mantle cavity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 2, p. 287-295, 1997.

KAWANO, T.; NAKANO, E.; WATANABE, L. C. Estudo do desenvolvimento embrionário de *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Planorbidae) e suas aplicações. In: CARVALHO, O. S. (Org.). *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008. p. 347-392.

KAWAZOE, U. Alguns aspectos da biologia de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e *Biomphalaria tenagophila* (D' Orbigny, 1835) (Pulmonata, Planorbidae). I – Duração do período embrionário. **Revista de Saúde Pública**, v. 10, p. 57-64, 1976.

KAWAZOE, U. Alguns aspectos da biologia de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e *Biomphalaria tenagophila* (D' Orbigny, 1835) (Pulmonata, Planorbidae). II – Fecundidade e fertilidade. **Revista Saúde Pública**, n. 11, p. 47-64, 1977.

KLEESPIES, R. G; ZIMMERMANN, G. Production of blastospores by three strains of *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin in submerged culture. **Biocontrol Science and Technology**, v. 2, p. 127-135, 1992.

LELES et al. Pathogenicity of some hypocrealean fungi to adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 107, n. 5, p. 1271-1274, 2010.

LUZ, C. et al. Ovicidal activity of entomopathogenic Hyphomycetes on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) under laboratory conditions. **Journal of Medical Entomology**, v.44, p.799-804, 2007.

MALEK, E. A. Factors conditioning the habitat of bilharziasis intermediate hosts of the family Planorbidae. **Bulletin of the World Health Organization**, n. 18, p. 785-818, 1958.

MASCARIN, G. M. ; PAULI, G. Bioprodutos à base de fungos entomopatogênicos. In: Madelaine Venzon; Trazilbo José de Paula Júnior; Angelo Pallini. (Org.). **Controle alternativo de pragas e doenças na agricultura orgânica**. 1ed. Viçosa: U.R. EPAMIG ZM, 2010, v. 4, p. 169-195.

MELLO-SILVA, C. C. et al. Reproductive activity alterations on the *Biomphalaria glabrata* exposed to *Euphorbia splendens* var. *hislopii* látex. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 671-674, 2007.

MENDES, N. M. Ensaio preliminares em laboratório para verificar a ação moluscicida de algumas espécies da flora brasileira. **Revista de Saúde Pública**, v. 18, p. 348-354, 1984.

MUNIZ, C. **Levantamento da malacofaunalímnica e aspectos ecológicos de focos de esquistossomose em Ana Dias, Vale do Ribeira – SP**. 2007. 164 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

OHLWEILER, F. P.; KAWANO, T. *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) (Mollusca): adaptation to desiccation and susceptibility to infection with *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 44, n. 4, p. 191-201, 2002.

OLIVEIRA-FILHO, E. C. **Efeito de substâncias químicas sobre a reprodução de moluscos de água doce: estudos com caramujos do gênero *Biomphalaria***. 2003. 139 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2003.

OLIVEIRA-FILHO, E. C. et al. Susceptibility of non-target invertebrates to Brazilian microbial pest control agents. **Ecotoxicology**, v. 20, p. 354-1360, 2011.

OMS (Organización Mundial de La Salud) 2010. **Esquistosomiasis: Datos Y Cifras**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/es/>>. Acesso em: 15 jun. 2013.

PARAENSE, W. L. Autofecundação e fecundação cruzada em *Australorbis glabratus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 53, p. 277-284, 1955.

PARAENSE, W. L.; DESLANDES, N. Observations on the morphology of *Australorbis glabratus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 53, n. 1, p. 52-77, 1955

PARAENSE, W. L. A genetic approach to the systematic of planorbid molluscs. **Evolution**, v. 10, n. 4, p. 403-407, 1956.

PARAENSE, W. L. Histórico do gênero *Biomphalaria*, morfologia e sistemática morfológica. In: CARVALHO, O. S. (Org.). *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008. p. 285-308.

PAZ, R. J. **Biologia e Ecologia de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Mollusca: Pulmonata: Planorbidae), na Fazenda Árvore Alta, Alhandra (Paraíba: Brasil)**.1997. 133 f.Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1997.

PIERI, O. S.; RAYMUNDO, J. S.; JURBERG, P. Estudos sobre o comportamento dos planorbídeos: II – Enterramento de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), como meio de proteção contra a dessecação. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 75, n. 1-2, p. 83-88, 1980.

PIERI, O. S.; JURBERG, P. Aspectos etológicos na sobrevivência dos caramujos vetores da xistosomose ao tratamento com moluscidas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 76, n. 1, p. 47-55, 1981.

PIMENTEL, D. Life history of *Australorbis glabratus*, the intermediate snail host of *Schistosoma mansoni* in Puerto Rico. **Ecology**, n.38, p. 576-580, 1957.

PIMENTEL, D.; WHITE, P. C. Biological environment and habits of *Australorbis glabratus*. **Ecology**, v. 40, n. 4, p. 541-550, 1959.

PIMENTEL, M. A. G.; FERREIRA, E. G. Toxicidade de produtos formulados à base de fungos entomopatogênicos para o caruncho-do-milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 11, n. 2, p. 209-215, 2012.

POINTIER, J. P.; DAVID, P. Biological control of *Biomphalaria glabrata*, the intermediate host of schistosomes, by *Marisa cornuarietis* in ponds of Guadeloupe: long-term impact on the local snail fauna and aquatic flora. **Biology Control**, v.29, p. 81-89, 2004.

PRENTICE, M. A. Displacement of *Biomphalaria glabrata* by the snail *Thiara granifera* in field habitats in St. Lucia, West Indies. **Annal of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 77, p. 51-59, 1983.

RAMAIAH, N.A review of fungal disease of algae, marine fishes, shrimps and corals. **Indian Journal of Marine Sciences**, v. 35, n. 4, p. 380-387, 2006.

REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**. 4. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

RIBEIRO-PAES, J. T. et al. Aspectos imunológicos do sistema enzimático fenoxidase de *Schistosoma mansoni*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 36, p. 395-402, 1994.

ROCHA, L. F. N. et al. Occurrence of invertebrate-pathogenic fungi in a Cerrado ecosystem in Central Brazil. **Biocontrol Science and Technology**, v. 19, p. 547-53, 2009.

ROCHA, L. F. N. et al. Occurrence of *Metarhizium* spp. in Central Brazilian soils. **Journal of Basic Microbiology**, v.53, p.251-259, 2013.

ROSA, F. M. ***Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) da linhagem do Taim, RS: estudos de campo e laboratorial visando o controle da transmissão da esquistossomose**. 2008. 143 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

SCHALL, V. T. et al. The molluscicidal activity of crown of christ (*Euphorbia splendens* Var. *Hislopilii*) latex on snails acting as intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 1, p. 7-10, 1998.

SCHOLTE, E. J. et al. Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. **Journal of Insect Science**, v. 4, n. 19, p. 1-24, 2004.

SCHOLTE, R. G. C. et al. Spatial distribution of *Biomphalaria* spp., the intermediate host snails of *Schistosoma mansoni*, in Brazil. **Geospatial Health**, v. 6, n. 3, p. 95-101, 2012.

SILVA, P. B. et al. Aspectos físico-químicos e biológicos relacionados à ocorrência de *Biomphalaria glabrata* em focos litorâneos da esquistossomose em Pernambuco. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 901-906, 2006.

SILVA-FILHO, C. R. M. et al. Avaliação da bioatividade dos extratos de cúrcuma (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae) e *Artemia salina* em *Biomphalaria glabrata*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 919-923, 2009.

SINGER, S. et al. Biological control of the zebra mussel *Dreissena polymorpha* and the snail *Biomphalaria glabrata*, using gramicidin S and D and molluscicidal strains of *Bacillus*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 18, p. 226–231, 1997.

SOUZA, C. P.; LIMA, L. C. 1997. **Moluscos de interesse parasitológico do Brasil**. 1. ed., Belo Horizonte: Fiocruz, 1997.

SOUSA, N. A. et al. New insights on the effectiveness of *Metarhizium anisopliae* formulation and application against *Aedes aegypti* eggs. **Letters in Applied Microbiology**, v. 57, p. 193-199, 2013.

TANG, S. S. H.; WHITFIELD, P. J; SHEENA, P. Activity of the molluscicidal plant *Millettia thonningii* (Leguminosae) toward *Biomphalaria glabrata* eggs. **Journal of Parasitology**, v. 81, n. 5, p. 833-835, 1995.

TELES, H. M. S., MARQUES, C. C. A. Estivação de *Biomphalaria tenagophila* (Pulmonata, Planorbidae). **Revista de Saúde Pública**, v. 23, p. 76-78, 1989.

TELES, H. M. S. Distribuição geográfica das espécies dos caramujos transmissores de *Schistosoma mansoni* no Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 5, p. 426-432, 2005.

THUNGRABEAB, M.; TONGMA, S. Effect of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* (Balsam) and *Metarhizium anisopliae* (Metsch) on non target insects. **Kmitl Science Technology**, v.7, p. 8-12, 2007.

TUAN, R. Distribuição e diversidade de espécies do gênero *Biomphalaria* em microrregiões localizadas no Médio Paranapanema, São Paulo, SP, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 9, n. 1, p. 279-283, 2009.

VIANEY-LIAUD, M.; DUSSART, G. Aspects of pairing and reproduction in the hermaphrodite freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Pulmonata). **Journal of Molluscan Studies**, v. 68, p. 245-248, 2002.

VINAUD, M. C.; LINO JUNIOR, R. S.; BEZERRA, J. C. B. Activity of *Stryphnodendron polyphyllum*, a plant from the Brazilian savannah, against hemocytes of *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host of *Schistosoma mansoni*. **Revista de Patologia Tropical**, v. 37, n. 3, p. 237-246, 2008.

VITORINO, R. R. et al. Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 10, n. 1, p. 39-45, 2012.

WEINZERTTL, M.; JURBERG, P. Biological control of *Biomphalaria tenagophila* (Mollusca, Planorbidae), a schistosomiasis vector, using the fish *Geophagus brasiliensis* (Pisces, Chichlidae) in the laboratory or in a seminatural environment. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, p. 35-38, 1990.