



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
**Setor de Ciências Exatas**  
**Departamento de Química**  
**Programa de Pós-Graduação em Química**

AVALIAÇÃO DA EXISTÊNCIA DE SEMIOQUÍMICOS VOLÁTEIS E DE CONTATO MEDIANDO A COMUNICAÇÃO INTER E INTRAESPECÍFICA DO CARAMUJO INVASOR *Achatina fulica* BOWDICH, 1822 (MOLLUSCA; ACHATINIDAE): PERSPECTIVAS PARA O MANEJO.

Mestranda: Vanice Fátima Schneider

Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Marques

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, como requisito para obtenção do título de Mestre em Química – Área de concentração em Química Orgânica – Setor de Ciências Exatas, UFPR.

Curitiba, Junho de 2009

## AGRADECIMENTOS

- A DEUS pela esperança, amparo em todos os meus momentos e pela força para superar todas as dificuldades e ausências.
- A minha mãe por ter servido sempre como incentivo para todas as minhas realizações. A ela agradeço de coração por todo amor, carinho, atenção e compreensão, principalmente nos momentos em que não era possível a minha presença.
- Ao professor Francisco de Assis Marques por seu aceite, pela orientação, paciência e por todas as ajudas prestadas. Hoje vejo quantos desafios enfrentei, e nesse processo muitas vezes falhei, mas vencendo cada uma das falhas sinto que consegui da melhor maneira possível concluir mais essa etapa da minha formação. Esse pode ter sido um dos grandes ensinamentos da pós-graduação, a persistência. Obrigada!
- Ao César Lenz, técnico da TECPAR pela auxílio na identificação dos compostos, pela amizade e pelos valiosos conselhos.
- À Profa. Marta Luciane Fischer – PUC-Pr pela ajuda, por viabilizar as coletas e por todo apoio prestado nos estudos comportamentais.
- A todos os professores do programa, e em especial aos que de alguma forma me ajudaram, me ensinaram, me incentivaram e/ou me aconselharam para atingir meus objetivos.
- Aos colegas de laboratório pelo auxílio prestado e as conversas alegres, que muitas vezes traziam a força que eu precisava para persistir nesses dois anos que se passaram.
- Aos que acordaram bem cedo e me auxiliaram nas coletas dos animais: Vanderlei, Elton, Toty, Bety.
- Aos professores da banca examinadora pelas importantes considerações realizadas.
- As minhas inesquecíveis amigas Sandra e Daniela.
- A amiga do laboratório, Bianca, pelas conversas e confidências.
- A todos os meus amigos que não puderam estar comigo, mas que sempre fizeram parte da minha vida como um alicerce para que eu chegasse até aqui.
- Aos colegas de laboratório; Celso, Gustavo, Bianca e Grece.

- Aos demais professores do Departamento de Química.
- Aos funcionários que sempre me ajudaram, por todas as orientações prestadas.
- À Fundação Araucária que é a empresa de fomento do projeto.

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	i
<b>SUMÁRIO</b> .....	iv
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	x
<b>LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS</b> .....	xi
<b>RESUMO</b> .....	xii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1. Achatinidae .....	2
1.2. <i>Achatina fulica</i> .....	4
1.2.1. Taxonomia da <i>A. fulica</i> .....	5
1.2.2. Agregação .....	7
1.2.3. Reprodução .....	7
1.2.4. Memória Odorífera .....	8
1.2.5. Muco .....	9
1.3. Facilidade de Dispersão e Instalação .....	9
1.4. Invasão da <i>Achatina fulica</i> no Estado do Paraná .....	10
1.5. Conseqüências da Invasão de <i>Achatina fulica</i> para Espécies Nativas .....	11
1.6. <i>Achatina fulica</i> como Praga Agrícola .....	11
1.7. Doenças e Formas de Transmissão .....	12
1.8. Possibilidades para o Controle Alternativo de <i>A. fulica</i> .....	13
1.8.1. Controle Físico .....	13
1.8.2. Controle Biológico .....	14
1.8.3. Controle Químico .....	14
1.8.4. Semioquímicos .....	15
1.8.5. Atrativos .....	17
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	18
2.1. Objetivos Específicos .....	18
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	19
3.1. Avaliação da existência de semioquímico de contato em filhotes, jovens e adultos.....	19
3.1.1. Teste de Lateralidade .....	21
3.2. Avaliação da existência de semioquímicos voláteis em filhotes, jovens e adultos.....	21

3.2.1. Aeração de Jovens .....	22
3.2.2. Aeração de Adultos .....	22
3.2.3. Coleta do Muco de Jovens e Adultos .....	23
3.2.4. Aeração do Muco de Jovens e Adultos .....	23
3.2.5. Extração dos Componentes do Muco de Adulto .....	23
3.3. Avaliação da existência de semioquímicos voláteis em algumas matrizes .....	23
3.3.1. Preparação do Extrato de Peixe Fresco .....	24
3.4. Procedimentos estatísticos .....	24
3.5. Identificação de compostos .....	24
3.5.1. Método de aeração, seguido por injeção em CG-EM .....	25
3.5.2. Condições de análise por “Purge and Trap” .....	25
3.5.3. Análise dos espectros .....	26
3.6. Identificação de compostos presentes nas matrizes .....	26
3.6.1. Técnica de Aeração seguida por análise via CG-EM .....	26
3.6.2. “Purge and Trap” e CG-EM .....	26
3.7. Teste para identificação de amins nas matrizes do peixe .....	26
3.8. Determinação da composição do Muco .....	27
3.9. Identificação e confirmação dos compostos por ionização química e índice de Kovatz .....	27
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>28</b>
4.1. Avaliação da existência de semioquímicos no muco de Achatina fulica. ....	28
4.1.1. Lateralidade .....	29
4.2. Análise temporal do comportamento exploratório .....	30
4.3. Reação de jovens diante de semioquímicos voláteis presentes no muco ou no corpo de coespecíficos .....	32
4.4. Análise temporal nos testes do tubo em Y .....	33
4.5. Aeração de Jovens .....	35
4.6. Aeração de Adultos .....	35
4.7. Resultados dos Estudos Envolvendo Atrativos .....	35
4.8. Investigação dos Compostos Presentes nas Matrizes .....	38
4.8.1. Identificação dos Compostos Presentes no Leite Fresco .....	38
4.8.2. Identificação dos Compostos Presentes no Extrato de Peixe Fresco ....	47
4.8.3. Identificação dos Compostos Presentes no Muco de Jovens e Adultos..	50
4.9. Isolamento e identificação dos voláteis presentes no muco de jovens e adultos por P&T .....	51

5. CONCLUSÕES .....	54
6. PERSPECTIVAS FUTURAS .....	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	57

**LISTA DE FIGURAS**

**Figura 01** - *A. fulica* adulto.

**Figura 02** - *A. fulica* jovem.

**Figura 03** – Indivíduos adultos em cópula.

**Figura 04** – Indivíduo adulto com concha quebrada e ovos à vista.

**Figura 5** - Indivíduo jovem frente a duas metades de papel filtro: metade A com estímulo e metade B sem estímulo coespecífico.

**Figura 6** - Esquema para teste de voláteis no tubo em Y.

**Figura 7** - Frequência de indivíduos *A. fulica* adultos, jovens e filhotes que se deslocaram na direção do estímulo (muco ou úmido), do branco (seco), para trás ou não se movimentaram (sem reação).

**Figura 8** - Frequência relativa de caramujos que exibiram a movimentação de cabeça com tentáculos orais e bucais e de animais que tatearam os substratos com seus tentáculos orais e bucais.

**Figura 9** - Frequência relativa de jovens e filhotes que se deslocaram em direção ao estímulo, ao branco e não reagiram diante do muco e de indivíduos jovem e adultos quando testados no tubo em Y.

**Figura 10** – Frequência relativa de jovens que se deslocaram em direção ao estímulo do atrativo ou ao branco quando testados no tubo em Y.

**Figura 11** - Fragmentação da 4-hidróxi-2-pentanona, gerando os fragmentos de massas  $m/z = 43$  e  $m/z = 59$ .

**Figura 12** - Cromatogramas do composto 4-hidroxi-2-pentanona e seus respectivos espectros de massas, obtido no modo impacto de elétrons (Espectro 1) e ionização química (Espectro 2).

**Figura 13** - Rearranjo de McLafferty para o decanoato de metila, originando o pico característico  $m/z = 74$ .

**Figura 14** - Fragmentação alfa do decanoato de metila.

**Figura 15** - Cromatogramas do éster dodecanoato de metila e seus respectivos espectros de massas obtidos no modo impacto de elétrons (Espectro 1) e ionização química (Espectro 2).

**Figura 16** - Estrutura da 5-metil-2-(*iso*-propil)-ciclohexanona.

**Figura 17** - Estrutura da 1-(etilfenil)-etanona.

**Figura 18** - Fragmentações sugeridas para o composto 5-metil-2-(iso-propil)-ciclohexanona.

**Figura 19** - Cromatograma e espectros de massas, no modo impacto de elétrons (Espectro 1) e ionização química (Espectro 2) da 5-metil-2-(1metiletil)-ciclohexanona.

**Figura 20** - Cromatograma e espectros de massas, no modo impacto de elétrons (Espectro 1) e ionização química (Espectro 2) da 1-(etilfenil)-etanona.

**Figura 21** - Cromatogramas representativos dos voláteis isolados do leite fresco por P&T. Compostos previamente identificados por espectrometria de massas no modo impacto de elétrons (IE) e por ionização química (IQ).

**Figura 22** – Espectro de massas do composto 1. a) Espectro 1 fragmentação por IE. b) Espectro 2 fragmentação por IQ

**Figura 23** - Fragmentação característica da butanona-2, gerando pico  $m/z$  = 29, 43.

**Figura 24** - Fragmentação característica do Pentano, gerando pico  $m/z$  = 29, 43.

**Figura 25** – Espectro de massas do composto pentanona-2. a) Espectro 1 fragmentação por IE. b) Espectro 2 fragmentação por IQ.

**Figura 26** – Pentanona-2 com as clivagens alfa às carbonilas mostrando a formação dos fragmentos de massas  $m/z$  = 43 e  $m/z$  = 71.

**Figura 27** – Rearranjo de McLafferty pentanona-2 originando o fragmento de massas  $m/z$  = 58.

**Figura 28** – Esquema de clivagem de cetonas.

**Figura 29** - Espectro de fragmentação de massas do pentanal no modo impacto de elétrons (Espectro 1) e no modo Ionização Química (Espectro 2).

**Figura 30** - Cromatograma representativo dos composto presentes na matriz D<sub>2</sub>.

**Figura 31** - Cromatogramas e espectros de fragmentação de massas do 2-metil-propanal no modo impacto de elétrons (IE) (Espectro 1) e no modo ionização química (IQ) (Espectro 2).

**Figura 32:** Cromatogramas e espectros de fragmentação de massas do hexanal no modo impacto de elétrons (IE) (Espectro 1) e no modo ionização química (IQ) (Espectro 2).

**Figura 33:** Cromatogramas e espectros de fragmentação de massas do heptanal no modo impacto de elétrons (IE) (Espectro 1) e no modo ionização química (IQ) (Espectro 2).

**Figura 34:** Cromatogramas e espectros de fragmentação de massas do octanal no modo impacto de elétrons (IE) (Espectro 1) e no modo ionização química (IQ) (Espectro 2).

**Figura 35:** Cromatograma dos compostos isolados do muco de dois indivíduos diferentes de *A. fulica* adultos através da técnica de P&T.

**Figura 36** - Cromatograma representativo dos compostos voláteis identificados do muco de *A. fulica*.

**LISTA DE TABELAS**

- Tabela 01** – Principais diferenças entre o caramujo *A. fulica* e outras espécies.
- Tabela 2**- Representação esquemática dos semioquímicos e suas subclasses.
- Tabela 3** - Relação dos indivíduos teste e os respectivos estímulos utilizados para avaliação de semioquímicos de contato.
- Tabela 4** - Relação dos indivíduos teste correlacionados aos estímulos utilizados.
- Tabela 5** - Matrizes utilizadas para testes de atratividade frente a indivíduos de *A. fulica* jovens.
- Tabela 6** - Resultados obtidos nos testes de possíveis semioquímicos de contato para indivíduos *A. fulica* adultos, jovens e filhotes frente aos estímulos de muco de adulto, de jovem, umidade e papel filtro seco.
- Tabela 7** - Resultados dos testes para avaliação da existência de lateralidade nos caramujos *A. fulica*.
- Tabela 8** – Tempo (em segundos) despendido para projeção dos tentáculos e para decisão da direção de deslocamento. Os valores foram comparados através do teste Anova com post hoc de Turkey, sendo as médias estatisticamente diferentes representadas com letras diferentes.
- Tabela 9** - Resultados dos testes de semioquímicos voláteis para jovens e filhotes de *A. fulica* diante do muco e de indivíduos coespecíficos, no tubo em Y.
- Tabela 10** - Tempo médio despendido para saída da concha, para chegar até a bifurcação e para tomada de decisão. As médias significativamente diferentes estão acompanhadas de letras diferentes.
- Tabela 11** - Resultado dos testes da escolha de indivíduos *A. fulica* jovens frente a diversas matrizes e branco, nos testes do tubo em “Y”.
- Tabela 12** - Compostos identificados no extrato de metanol da aeração do leite fresco.
- Tabela 13** - Compostos coletados da matriz do leite fresco (B<sub>1</sub>) pela técnica de P&T e identificados por CG-EM.
- Tabela 14** - Compostos coletados da matriz D<sub>2</sub> pela técnica de P&T.
- Tabela 15** - Compostos coletados do muco de indivíduos *A. fulica* jovem e adulto, pela técnica de P&T identificados por CG-EM.

**LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS**

<b>ANOVA</b>	- teste paramétrico
<b>°C</b>	- graus centígrados
<b>CG-EM</b>	- cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
<b>CG</b>	- cromatografia gasosa
<b>cm</b>	- centímetros
<b>E.M.</b>	- espectro de massas
<b>eV</b>	- elétron volts
<b>g</b>	- grama
<b>h</b>	- hora
<b>IE</b>	- impacto de elétrons
<b>IQ</b>	- ionização química
<b>L</b>	- litro
<b>L/min</b>	- litro por minuto
<b>m<sup>3</sup></b>	- metro cúbico
<b>µg</b>	- micrograma
<b>mL</b>	- mililitro
<b>cm</b>	- centímetro
<b>m/z</b>	- relação massa carga
<b>NEC</b>	- Núcleo de Estudos do Comportamento
<b>P</b>	- probabilidade de erro
<b>PR</b>	- Paraná
<b>PUC</b>	- Pontifícia Universidade Católica do Paraná
<b>P&amp;T</b>	- Purge and Trap (Purga e captura)
<b>rpm</b>	- rotações por minuto
<b>U</b>	- teste de Mann-Whitney
<b>W</b>	- watts
<b>χ<sup>2</sup></b>	- qui-quadrado

## RESUMO

Os moluscos terrestres incluem os animais conhecidos por caramujos, caracóis, lesmas, mexilhões, ostras, vieiras, lulas e polvos, sendo que existem cerca de 50.000 espécies descritas em todo mundo.

Os caramujos da espécie *Achatina fulica* são popularmente conhecidos como falso escargot ou caramujo gigante africano. Pertencem à família *Achatinidae* da subclasse Pulmonata, que agrupa milhares de espécies em todo o mundo. Dentre todas essas espécies a *A. fulica* é sem dúvida o grupo de gastrópodos mais bem sucedido na invasão ao ambiente terrestre, ficando quase sempre restrita a áreas urbanas ou agrícolas.

O olfato indica ser a principal modalidade sensorial, pois possuem olhos rudimentares e não possuem órgãos auditivos. Os sinais olfatórios são suficientes para permitir exatidão na orientação para uma variedade de estímulos, como alimentação, área de vida, indivíduo coespecífico e agregação.

Por ser uma espécie exótica, nativa da África, não possui predador natural no Brasil, e tem uma capacidade reprodutiva muito elevada, que é capaz de assolar a malacofauna nativa e tornar-se com rapidez uma praga agrícola de difícil controle.

Há vários casos de impactos ambientais, prejuízos econômicos e problemas de saúde pública em todos os continentes onde foi introduzido. No Brasil essa situação não é diferente, pelo menos 22 estados apresentam superpopulações de *A. fulica*. Trata-se de uma das 100 principais espécies invasoras a nível mundial, sendo que no estado do Paraná é encontrada em maior abundância no litoral.

Este trabalho esteve direcionado para o desenvolvimento de conhecimentos que permitissem avaliar, propor e estabelecer uma forma de manejo seletiva e de menor impacto ambiental possível para *A. fulica*.

A metodologia utilizada buscou estudar o comportamento dos indivíduos desta espécie frente a indivíduos coespecíficos, ao muco coespecífico, o qual pode atuar na comunicação dos animais através da liberação de compostos e também em relação à algumas matrizes alimentares. Posteriormente procedeu-se a identificação dos

compostos nos materiais que apresentaram atratividade em bioensaios realizados em laboratório.

Os resultados obtidos mostram pouca eficiência de atração para indivíduos co-específicos, bem como para o muco coespecífico, indicando a baixa possibilidade de uma forma de manejo através de feromônios. No entanto o estudo comportamental realizado foi fundamental para o conhecimento mais efetivo sobre a possibilidade de comunicação química em *A. fulica* e os casos em que se mostra mais relevante.

Dentre as matrizes alimentares testadas, duas apresentaram um resultado satisfatório, possibilitando um estudo mais detalhado dos compostos voláteis por elas emitidos, que podem exercer importante papel na comunicação química com *A. fulica*. Os compostos voláteis emitidos pelas duas matrizes foram coletados através da técnica de aeração e de "Purge and Trap" e analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Aldeídos foram encontrados em ambas as matrizes alimentares bem como no muco dos indivíduos em diferentes estágios de desenvolvimento, podendo estar envolvidos na atratividade das matrizes. Outros compostos comuns nas matrizes estudadas são as metilcetonas e os ésteres metílicos.

A comprovação da eficiência desses compostos na atratividade de *A. fulica* abriria uma interessante perspectiva de controle desta importante praga através de uma metodologia de captura seletiva, de baixo impacto ambiental, que certamente se consistiria em ferramenta de destaque para ser aplicada conjuntamente com outras metodologias em programas de Manejo Integrado de Pragas.

## 1. INTRODUÇÃO

Os moluscos terrestres incluem os animais conhecidos por caramujos, caracóis, lesmas, mexilhões, ostras, vieiras, lulas e polvos, sendo que existem cerca de 50.000 espécies descritas em todo mundo (SCHWANKE & MELO, 2002). Se forem consideradas as espécies não descritas estima-se a existência de aproximadamente 200.000 espécies (van BRUGGEN, 1995). Os moluscos terrestres pertencem ao segundo maior filo animal em termos de diversidade no número de espécies descritas, e suspeita-se que esse pode ser o maior grupo taxanômico de espécies em extinção. No filo incluem-se representantes de duas classes: Bivalvia e Gastrópodos dos quais, esta última, forma um grupo heterogêneo que provavelmente experimentou várias invasões ao ambiente terrestre (THIELE, 1931). Assim, somente uma minúscula fração de moluscos conhecida teve seu estado de conservação adequadamente avaliado (LYDEARD *et al.*, 2004). Sendo este um indicativo de que o conhecimento sobre moluscos está muito aquém do ideal, e o mesmo ocorre em relação a sua dispersão, principalmente no caso de moluscos terrestres (SIMONE, 1999).

A classificação tradicional da classe Gastrópoda, divide o táxon em três subclasses: Prosobranchia, Opisthobranchia e Pulmonata (THIELE, 1931). A subclasse Pulmonata, com base em sua enorme diversidade, apresenta três subordens e cerca de 25 superfamílias, agrupando milhares de espécies em todo o mundo (VAUGHT, 1989). Recebe o nome de Pulmonata devido à modificação da cavidade palial em um pulmão, quase todo fechado em uma câmara. Segundo Simone (1999) é sem dúvida o grupo de gastrópodos mais bem sucedido na invasão ao ambiente terrestre, não sendo observada com frequência a invasão de áreas naturais por esses organismos, ficando restrita quase sempre a áreas urbanas ou agrícolas (RAUT & BARKER, 2002). Nos ecossistemas florestais atuam como fornecedores de matéria orgânica e acumuladores de cálcio. A maior parte dos moluscos terrestres vive no solo e na vegetação perto dele, alimentando-se de serapilheira ou folhas tenras (SIMONE, 1999). Alguns vivem em árvores e alimentam-se raspando suas cascas e extraíndo os organismos que ali vivem e/ou a própria celulose (RAUT & BARKER, 2002). Há espécies que são restritas a ecossistemas estáveis enquanto a ocorrência de outras indicam habitats degradados pelo abuso humano. Assim, algumas espécies de moluscos são excelentes indicadores das condições ambientais. (TATTERSFIELD *et al.*, 1998).

Os moluscos apresentam grande importância para o homem como alimento, como agentes de reciclagem nos ecossistemas, como fontes de importantes substâncias medicinais e de pesquisa contribuindo para o entendimento da genética, do processo evolutivo e no controle biológico de outras pragas. Algumas espécies são vetores de

doenças para humanos e outros animais; outras se constituem em importantes pragas agrícolas (SIMONE, 1999). É, por exemplo, o caso do famoso caramujo-do-cajé, *Oxystyla pulchella* (SPIX, 1827), que assolou as plantações paulistas no início do século XX (FONSECA, 1936; BOFFI, 1979).

Apesar da alta diversidade e importância ecológica, os moluscos terrestres tem sido proporcionalmente pouco estudados. Os trabalhos mais freqüentes sobre levantamentos faunísticos, impactos ambientais e assuntos correlatos, raramente levam em conta os moluscos. Praticamente todas as regiões naturais do Brasil carecem de estudos mais detalhados sobre a biodiversidade dos moluscos terrestres (SIMONE, 1999).

Tattersfield, (1998) apresentou um estudo das principais espécies de moluscos terrestres descritas na região leste da África onde relata a ocorrência de 9 espécies diferentes pertencentes à Achatinidae. Dentre outras, constatou-se que o percentual de representação de *Achatina fulica* Bowdich, 1822, naquela região não se encontra entre os três maiores grupos. Outro trabalho que descreve as possíveis espécies da família *Achatinidae* encontradas em lavouras com sinais de devastação, relatam a *A. fulica* como praga do café (*coffea* linnaeus spp., Rubiaceae) na Tanzânia (MEAD, 1961). No entanto outras espécies da família *Achatinidae* aparecem como responsáveis pela devastação nos cultivos de banana, alface, mamão-papaia, e inúmeros outros.

Um problema ainda mais grave, que assola a malacofauna nativa, além de causar prejuízos econômicos e riscos à saúde, é a introdução descontrolada de espécies exóticas. Relatos de espécies européias como as lesmas da família *Limacidae*, os caracóis como *Bradybaena similaris* FÉRUSAC 1821, são apenas alguns exemplos de importantes pragas em plantações de hortaliças e flores no Brasil (BOFFI, 1979). Há outras espécies exóticas como *Helix aspersa* Müller 1774, que remontam há mais de um século (REEVE, 1854). Porém, Simone (1999) afirma que não se havia observado uma invasão de áreas naturais por esses organismos exóticos até ocorrer a introdução de uma espécie tropical, proveniente da África, a *A. fulica* (TELES *et al.*, 1997) a qual se torna com rapidez uma praga agrícola de difícil controle (SIMONE, 1999).

### **1.1. Achatinidae**

Os moluscos da família *Achatinidae* são nativos da África e o registro do maior fóssil de Achatinidae é do Pleistoceno (SOLEM, 1979a). A família é representada por cerca de 200 espécies em 13 gêneros (RAUT & BARKER, 2002). No entanto, dessas diversas espécies de *A. fulica*, é a que mais se dispersou por todo mundo a título de

promover alimento barato, tornando-se uma praga devastadora em muitos países (SIMONE, 1999).

Mead (1950a, 1995, 1998) postulou que os antecessores da *Achatinidae* tiveram origem no norte da Zâmbia. No entanto, nenhuma análise de caráter quantitativa foi apresentada até agora para explicar os relacionamentos filogenéticos dentro da família (MEAD, 1998). Assim a história evolutiva da *Achatinidae* permanece em sua maior parte desconhecida (RAUT & BARKER, 2002). Hoje a *Achatinidae* ocupa praticamente toda a África subsaariana, sendo que sua diversidade é consideravelmente mais baixa no sul e nordeste da África (van BRUGGEN, 1969, 1986). Na África central e no oeste, espécies de *Achatina* são confinadas a áreas úmidas, ao mesmo tempo em que espécies *Archachatina* encontram-se distribuídas em regiões menos úmidas (HODASI, 1984). De acordo com J. Bequaert, indivíduos dessa família são essencialmente das planícies, pois nas montanhas e nas áreas de maior altitude da África central o número de espécies e indivíduos diminui sendo que acima de 1500 m não são mais encontrados (PILSBRY, 1919).

Os indivíduos da família *Achatinidae*, assim como outros moluscos terrestres, entram em estivação por muitos meses, durante períodos adversos do clima ou no inverno. Costumam enterrar-se no solo (SIMONE, 1999) e formam uma camada protetora, o epifragma, a fim de fechar temporariamente a abertura da concha, o que aumenta sua chance de sobrevivência (RAUT & GHOSE, 1984). Mesmo espécies que vivem em florestas úmidas, podem estar durante os meses mais secos (RAUT & BARKER, 2002).

Certamente, diversas espécies da família *Achatinidae* exibiram uma grande adaptação à mudança ambiental causada pela usurpação humana e a modificação das florestas. Algumas espécies dessa família evidentemente são bem adaptadas ao distúrbio humano na floresta úmida e podem ser abundantes nas lavouras (RAUT & BARKER, 2002). Há relatos ocasionais, de várias partes da África, onde grupos de indivíduos da família *Achatinidae*, causam danos em diversas espécies de plantas de cultivo. Entretanto, muitas dessas situações são relatadas superficialmente já que são coletadas para obter carne, principalmente pelos povos mais pobres do oeste e centro da África (BEQUAERT, 1950a). No entanto, somente algumas espécies são consumidas pelos africanos como: *Achatina Achatina*, *Achatina monochromatica* Pilsbry, *Achatina balteata* Reeve, *Archachatina marginata* (Swainson), *Archachatina degneri* Bequaert & Clench e *Archachatina ventricosa* (Gould). Dentre estas, os povos do oeste da África tem preferências diferentes: a espécie mais apreciada é a *A. marginata* na Nigéria e *A. degneri*, em Ghana (HODASI, 1989; OLUFOKUNBI *et al.*, 1989). Assim o maior interesse comercial na África é por *A. achatina*, *A. marginata*, *A. degneri* e *A. ventricosa*.

Várias espécies foram distribuídas pela ação humana mesmo na África, e invadiram diferentes regiões dentre as quais: *A. balteata* na Guiné, *A. zebra* na região sul e *A. marginata* em Ghana, são alguns exemplos. Geralmente a escala natural da *A. fulica* é considerada a costa leste da África, incluindo suas inúmeras ilhas (PILSBRY, 1904; BEQUAERT, 1950A), mas pelo menos parte desta escala deve ser devido a introduções por seres humanos (VERDCOURT, 1961).

## **1.2. *Achatina fulica***

Observa-se que atualmente há pouca informação sobre o perfil econômico de *A. fulica* nas regiões invadidas. Entretanto, dentro de um curto período de sua introdução, essa espécie dominou a família *Achatinidae* da Costa do Marfim e em Ghana tornando-se uma importante praga agrícola (von STANISLAUS *et al.*, 1987), que particularmente, não é aceita como uma espécie comestível pelos povos africanos (RAUT & BARKER, 2002). Mesmo assim, vem sendo introduzida a título de promover alimento barato e ao mesmo tempo nutritivo à população necessitada, por causa do tamanho avantajado e da rápida adaptação (SIMONE, 1999).

Visto que os povos locais não aceitam *A. fulica* como uma espécie comestível (RAUT & BARKER, 2002), a dispersão fora de África foi discutida por vários autores, incluindo van Weel (1948/49), Lange (1950), Bequaert (1950a), Rees (1951), Mead (1961, 1979a), Wolfenbarger (1971), Lambert (1974), Srivastava (1992), Civeyrel e Simberloff (1996) e Cowie (2000). Bequaert (1950a) concluiu que a propagação de *A. fulica* desde o seu local de origem no continente africano e Madagascar às ilhas do Oceano Índico, da Índia, e do Pacífico é inteiramente devido ao transporte humano, geralmente deliberado, e em poucos casos acidental.

*A. fulica* é extremamente voraz e alimenta-se de quase tudo que vem ao seu alcance, entretanto à espécie foram atribuídas propriedades medicinais tornando-se um dos motivos de sua introdução em muitas ilhas do oceano Índico. De lá os naturalistas introduziram na Índia e em Sri Lanka. Em 30 anos foi espalhada por todo leste da Ásia e após a segunda guerra invadiu inúmeras partes do mundo (RAUT & BARKER, 2002).

O advento da *Achatinidae* no mercado mundial incentivou sua reprodução em cativeiro, o que foi estabelecido para diversas espécies em diferentes partes do mundo (MEAD, 1982; UPATHAM *ET AL.*, 1988; RUNHAM, 1989; MONNEY, 1994), aumentando o potencial para sua maior propagação. Quantidades consideráveis de carne são exportadas para Europa e América a partir de Taiwan, China e outros países asiáticos (MEAD, 1982). Além disso, o interesse contínuo em sua carne tem levado à expansão da indústria na América do Sul e foi responsável pelo mais recente estabelecimento de

populações selvagens de *A. fulica* em muitas regiões do Brasil, incluindo São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Paraná e Santa Catarina (TELES et al., 1997).

Os indivíduos da família *Achatinidae* são noturnos e dependem da disponibilidade de umidade para permanecerem ativos (RAUT & BARKER, 2002), mesmo a temperaturas abaixo de 10°C (MEAD, 1979a; RAUT E GHOSE, 1984), porém submetem-se à estivação nos períodos secos. Eles estivam individualmente ou em agregações de 100 animais ou mais (RAUT, 1978; SRIVASTAVA, 1992), com a abertura da concha orientada para baixo e selada com o epifragma (RAUT & GHOSE, 1984). Os caramujos tem tendência a enterrar-se no solo, mesmo quando não estão estivando (NISBET, 1974), portanto encontrar *A. fulica* descansando em paredes ou em troncos de árvore caracteriza a falta de lugar para o “homing” e pode servir como indicativo de elevada taxa populacional (RAUT & BARKER, 2002).

Alimentam-se de plantas frescas e suculentas, antes da estivação, como uma estratégia para hidratação do corpo (RAUT & GHOSE, 1983a). O tempo de alimentação em um local depende da qualidade e a quantidade do alimento, e também é intercalada com períodos de descanso (RAUT & BARKER, 2002). Observou-se que indivíduos adultos, retornam ao mesmo local de descanso após cada atividade noturna, enquanto os imaturos apresentam a tendência de utilizar locais de descanso diferentes a cada dia (TOMIYAMA, 1992).

O direcionamento para a área de vida em gastrópodos terrestres mostrou ser mediado pelo acompanhamento das trilhas de muco e quimiorrecepção de odores transportados por via aérea (CHELAZZI, 1991; COOK, 2001). A constatação de que os animais conseguem retornar para os locais de homing, apesar de estarem afastados até 30 metros (TOMIYAMA, 1992) sugere que a quimiorrecepção pode estar envolvida com o comportamento de direcionamento da *A. fulica* (RAUT & BARKER, 2002).

### **1.2.1. Taxonomia da *A. fulica***

Na fase adulta (Figura 01) os indivíduos de *A. fulica* são de grande porte, podendo atingir 20 cm de comprimento de concha e pesar até 200 g (TELES et al., 1997). O corpo é de tonalidade cinza-escura e as conchas possuem faixas de coloração variável, de castanho até levemente arroxeadas.



Figura 01 - *A. fulica* adulto







Figura 02 - *A. fulica* jovem

Quando jovens (Figura 02) podem ser confundidos com algumas espécies nativas, como as que pertencem ao gênero *Megalobulimus*, que apresentam a concha em formato de espiral cônica, coloração mais clara e borda mais espessa (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA, 2006a). Portanto é fundamental saber identificar a *A. fulica*, diferenciando-a de espécies nativas, e para isso algumas diferenças foram apresentadas na Tabela 01.

Os ovos de *A. fulica* são de coloração branco-leitosa ou amarelada, com tamanho um pouco maior que uma semente de mamão. Seus ninhos ficam enterrados de 4 a 6,8 cm de profundidade, porém em locais com solo mais compacto as posturas são observadas próximas à superfície (FRANCO e BRANDOLINI, 2007).

Tabela 01 – Principais diferenças entre o caramujo *A. fulica* e outras espécies.

Filo: Molusca Classe: Gastropoda Subclasse: Pulmonata Ordem: Stylommatophora Subordem: Sigmurethra Superfamília: Achatinoidea Família: Achatinidae Gênero: Achatina Espécie: <i>Achatina fulica</i> Bowdich, 1822	<i>Achatina fulica</i> (caramujo gigante africano)	<i>Megalobulimus sp</i> (caramujo da boca rosada)	<i>Thaumastus sp</i>	<i>Helix sp</i> (escargot verdadeiro)
				
<b>Habitat</b>	Terrestre	Terrestre	Terrestre	Aquático/Terrestre
<b>Coloração da Concha</b>	Marrom escuro com listras esbranquiçadas	De marrom claro a rosado	De marrom a marrom escuro	Listras escuras circulares
<b>Formato da Concha</b>	Espiral cônica	Espiral cônica	Espiral cônica	Espiral circular
<b>Abertura da Concha</b>	Borda fina	Borda espessada	Borda levemente espessada	Borda fina

Créditos das fotos: *Achatina*, *Megalobulimus* e *Thaumastus* - Vincent Kurt Lo, *Helix* - Airton De Grande.

### 1.2.2. Agregação

O comportamento gregário é característico da espécie, porém parece estar relacionado a elevadas populações, idade, parentesco e horário do dia (CHASE, 1982), sendo fundamental para proteção contra a dissecação e predação.

O comportamento gregário de *A. fulica* também tem um componente muito relevante tanto na defesa contra as condições adversas do meio e predadores, como no direcionamento para o local mais favorável ao crescimento. Chase *et al.* (1978, 1980) relacionaram a agregação com a idade dos animais, o fato de serem de uma mesma ninhada e o horário do dia.

### 1.2.3. Reprodução

A tendência a foragear é suspendida quando *A. fulica* está na fase de acasalamento.

Antes de alcançar a maturidade sexual, o que ocorre antes de completarem um ano de vida, os indivíduos de *A. fulica* são machos. Na última etapa da fase macho os indivíduos iniciam a cópula e depois de alguns meses ocorre o desenvolvimento dos órgãos femininos e a oviposição completando o desenvolvimento sexual (MEAD, 1949). No geral, *A. fulica* atinge a maturidade com 5 a 8 meses, em condições de campo (LEEFMANS, 1933; van WEEL, 1948/49; MEAD, 1949, 1961; van der MEER MOHR, 1949a; BEQUAERT, 1950a; KONDO, 1964; PAWSON & CHASE, 1984; RAUT, 1991). No entanto, quando o crescimento é interrompido pela letargia do inverno, os primeiros ovos não são produzidos até a idade de 12 a 15 meses (GHOSE, 1959; SAKAE, 1968; SUZUKI, 1981; NUMASAWA E KOYANO, 1987; TOMIYAMA, 1993).

Na fase adulta os indivíduos são hermafroditos e se fertilizam mutuamente, com cópula simultânea (Figura 03), ovipositam mais de 200 ovos por vez (Figura 04). A frequência da oviposição varia com a duração do período favorável para a atividade (MEAD, 1961), porém estudos demonstram que ocorrem cerca de três vezes por ano (VASCONCELLOS & PILE, 2001), durante pelo menos três anos de vida (KEKAUOHA, 1966; RAUT; BARKER, 2002).

A auto-fecundação pode ocorrer, mas os animais virgens conseguem desenvolver menos de 10 ovos e ainda com taxa de fecundidade comprometida. Portanto, a fertilização cruzada é necessária para a colocação de uma quantidade de ovos suficiente para assegurar a perpetuação da espécie (OLSON, 1973). Os indivíduos receptivos a um companheiro podem ser distinguidos por seu orifício genital dilatado e pela saliência ocasional do parceiro (RAUT E GHOSE, 1984).

Após um período de incubação de 71 a 112 dias ocorrem as eclôsões (RIOS *et al.*, 2004). Os dados disponíveis avaliados por Tomyiama e Miyashita (1992) indicam um potencial reprodutivo consideravelmente alto de *A. fulica* comparados a outras espécies de *Achatina* e *Achachantina*. Assim a comparação com o caramujo nativo brasileiro, *Megalobulimus*, torna-se de certo modo até injusta. O caramujo nativo desova de maio a setembro e de novembro a fevereiro com um tamanho de ninhada variando entre 1 e 3 ovos, aliado ainda, ao fato de ter sido constatada uma baixa taxa de eclôsão em condições laboratoriais o que pode estar ocorrendo também na natureza (RIOS *et al.*, 2004).

*A. fulica* pode viver ao longo de 9 anos em cativeiro (van LEEUWEN, 1932), porém em campo a longevidade é de 3 a 5 anos em média (MEAD, 1979a; SUZUKI E YASUDA, 1983; TOMIYAMA, 1993).



**Figura 03** – Indivíduos adultos em cópula



**Figura 04** – Indivíduo adulto com concha quebrada e ovos à vista

#### 1.2.4. Memória Odorífera

Um típico padrão de comportamento, que segue a saída do ambiente de vida, é a movimentação diretamente para as áreas de plantas preferidas em jardins ou lavouras. Tal comportamento em adultos é possivelmente reforçado por uma memória odorífera a longo prazo (CROLL & CHASE, 1977) e pela alimentação seletiva, auxiliada pelo olfato.

O olfato indica ser a principal modalidade sensorial, pois possuem olhos rudimentares e não possuem órgãos auditivos. O olfato, utilizado para a detecção e localização de objetos à distância, é aparentemente uma modalidade sensível e funcionalmente complexa. Os sinais olfatórios são suficientes para permitir exatidão na orientação para uma variedade de estímulos, como por exemplo, área de vida (EDELSTAM & PALMER, 1950; GELPERIN, 1974; CROLL & CHASE, 1977, 1980).

Indivíduos de *A. fulica* apresentam dois centros de recepção olfativa: os tentáculos oculares para substâncias voláteis e a boca para substâncias de contato (CHASE, 1981; CHASE & CROLL, 1981, CHASE & RIELING, 1986, CHASE & TOLLOCZKO, 1986; LEMAIRE & CHASE, 1998).

Croll e Chase (1980) verificaram que a *A. fulica* possui memória odorífera. Esse animal se orienta para os odores do alimento que comeu e essa memória dura em torno de quatro meses. Esse é um mecanismo importante para o animal, uma vez que pode evitar alimentos pouco nutritivos ou com efeito aversivo. Além disso, os animais usam os odores para localização da área de vida, mesmo que comam outras coisas. O contato por 12 horas com o alimento já é o suficiente para *A. fulica* memorizá-lo como preferencial por 12 a 16 horas. A funcionalidade do mecanismo é explicitada quando esses resultados são extrapolados para o animal em campo, que entra em repouso no início da manhã e que espera em torno de 12 horas para voltar a forragear.

#### **1.2.5. Muco**

O muco de *A. fulica* é composto pela achacin que é uma substância viscoelástica mucoglicoproteica obtida através da secreção de diferentes glândulas que tem um contexto muito importante na biologia do animal, uma vez que promove proteção contra microorganismos e desidratação, mas sua viscosidade auxilia também na locomoção, captura de alimentos, reprodução e osmorregulação (MARTINS *et al.*, 2003; JEONG *et al.*, 2001; LORENZI & MARTINS, 2008). A composição química do muco pode ser afetada pelas condições físicas e alimentares do animal (JEONG *et al.*, 2001; LORENZI & MARTINS, 2008). O muco pode também atuar como veículo para a liberação de compostos químicos que seriam empregados na comunicação dos animais, como os feromônios (CHASE & BOULANGER, 1978, CHASE, 1982).

### **1.3. Facilidade de Dispersão e Instalação**

O caramujo africano *A. fulica* é uma espécie invasora de importância mundial por desencadear impactos ambientais, econômicos e de saúde pública em diferentes locais onde foi introduzida para ser criada comercialmente (MEAD, 1961, RAUT; BARKER, 2002; SANTOS *et al.*, 2002). De acordo com Alowe *et al.* (2004) *A. fulica* está entre as 100 principais espécies invasoras do mundo, pois foi introduzida em diversos países, apresentando grande sucesso de adaptação e dispersão. No Brasil pelo menos 22 estados apresentam superpopulações de *A. fulica* (VASCONCELLOS & PILE, 2001; TELES *et al.*, 1997).

Autores como Cowie (1998) e Simberloff e Gibbons (2004) tem hipotetizado que as populações de *A. fulica* passam por três estágios: inicialmente poucos indivíduos chegam a um novo ambiente, então a população cresce rapidamente, originando animais grandes e vistosos. Logo após, os indivíduos atingem a maturidade com tamanho cada vez menor, ficando suscetíveis às doenças e sua população diminui até a extinção. No litoral do Paraná, Fischer e Colley (2004), verificaram extinções de populações em alguns terrenos e explosões populacionais em outros. Caso essa hipótese esteja correta, mecanismos de extinção e colonizações ocorrem intermitentemente promovendo a renovação das populações.

A dispersão passiva de *A. fulica* é bem documentada, podendo ser intencional ou acidental (RAUT & BARKER, 2002). No entanto, pouco se sabe sobre a dispersão ativa, em que o animal toma a iniciativa de se deslocar e colonizar novos sítios. Segundo Tomiyama e Nakane (1993), cada indivíduo pode deslocar-se em média 500 metros a cada 6 meses. Uma área de vida fixa é amplamente discutida na literatura. Mead (1961) acredita que tenham uma tendência limitada de permanência em um mesmo sítio, enquanto Tomiyama (1992, 1996, 2002) traz evidências que os adultos velhos são mais territoriais do que os adultos jovens. Mead (1961) se refere a uma “reação de escape” gerando “migração em massa” que pode ter um contexto cíclico, porém não são conhecidos os fatores intrínsecos e extrínsecos desencadeadores desse comportamento. A prova da existência desse fenômeno contribuiria muito para compreensão dos mecanismos de dispersão, considerando-se ainda, as elevadas taxas de re-colonização desse animal (SIMIÃO & FISCHER, 2004, FISCHER & COLLEY, 2004).

#### **1.4. Invasão da *A. fulica* no Estado do Paraná**

No Paraná, a espécie é encontrada em abundância no litoral (FISCHER & COLLEY, 2004, 2005; SIMIÃO & FISCHER, 2004), no entanto, o aumento desses moluscos se deu nos últimos doze anos, uma vez que em 1994 apenas os municípios de Antonina e Morretes apresentavam a ocorrência da espécie (KOSLOSKI & FISCHER; 2002).

Caso o ambiente ofereça condições de abrigo e alimento, tem-se uma alta taxa de recrutamento. Segundo Raut e Barker (2002) uma alta densidade corresponde a mais de 102 animais/m<sup>2</sup>. No litoral do Paraná, altas densidades são encontradas em pontos de infestação (SIMIÃO & FISCHER, 2004; FISCHER & COLLEY, 2004), porém não se sabe se são devido às condições específicas desses sítios, ou se os espaços vazios ainda serão colonizados.

### 1.5. Consequências da Invasão de *A. fulica* para Espécies Nativas

Os moluscos nativos são rapidamente e irreversivelmente sobrepujados, na presença de *A. fulica*, a qual também invade áreas naturais, competindo deslealmente com as demais espécies (SIMONE, 1999). *A. fulica* invadiu todas as regiões do estado de São Paulo em poucos anos e uma avaliação do prejuízo sobre a malacofauna local e medidas para seu controle nem sequer começaram (SIMONE, 1999).

Na região de Floresta Atlântica o maior impacto deve ocorrer sobre as espécies de caramujos gigantes nativos do gênero *Megalobulimus*. Existem alguns relatos que na presença do caramujo invasor eles entram em estivação e morrem. Esses caramujos possuem os mesmos hábitos alimentares e ocorrem em ambientes alternados, logo a grande quantidade de *A. fulica* é um ponto desfavorável na utilização dos recursos e pode levar à diminuição da população das espécies nativas. Atualmente, muitas espécies nativas estão presentes na lista de espécies ameaçadas (MMA, 2003).

### 1.6. *A. fulica* como praga agrícola

O caramujo gigante africano é conhecido por sua natureza destrutiva e é uma das maiores e mais danosa praga do mundo e tem causado sérios danos econômicos na Índia, Sri Lanka, Malásia, China, Taiwan, Japão, Filipinas, Havaí, Samoa, Taiti, Nova Guiné e Indonésia (ANONYMOUS, 2000). No Brasil, sua presença em grande número na quase totalidade do território nacional, aliada a ausência de predador natural (TELES *et al.*, 1997; SANTOS *et al.*, 2002; CARVALHO *et al.*, 2003; FISCHER & COLLEY, 2004) e de uma metodologia alternativa de controle, o coloca como uma das principais pragas emergentes.

Em países de clima tropical, os prejuízos para a agricultura são ainda maiores. Primeiramente, porque há perda de produtividade na colheita devido ao ataque destes herbívoros, sem contar o ataque a outras plantas que fornecem o enriquecimento da camada superficial do solo. Podem também transmitir organismos patogênicos para as plantas. Em segundo lugar, há o custo do trabalho e dos materiais associados com a gerência da praga. Terceiro, há perdas como a limitação dos tipos de plantações que podem ser cultivadas, devido às mudanças do ambiente e a presença de *A. fulica*.

Pode-se ainda considerar os prejuízos ao ambiente natural causados por: herbívoros em plantas de espécies nativas; alteração no ciclo dos nutrientes com o grande volume de planta que passam através do intestino desses indivíduos sob altas condições de infestação; efeitos adversos em gastrópodos nativos com os quais podem surgir fenômenos de competição pelos recursos além de sujar o habitat natural com

fezes e muco, contando também a possível ocorrência da predação caso haja inserção de algum agente de controle biológico; e por fim pelos efeitos adversos nos gastrópodes nativos que podem ser atingidos pela aplicação de inseticidas químicos, não seletivos.

Alguns autores como Civeyrel e Simberloff (1996) sugerem que o declínio da população é inevitável após um período inicial de infestação severa, o que não faria da *A. fulica* uma praga tão devastadora. Porém há registros de algumas áreas onde *A. fulica* persistiu em níveis pestíferos por muitas décadas. No entanto há pouca informação sobre a resistência de sistemas agrícolas sujeitados à infestação da praga por períodos prolongados (RAUT & BARKER, 2002).

A lista de plantas cultivadas suscetíveis a *A. fulica* é extensa, e inclui espécies decorativas, medicinais e cultivos de importância econômica (RAUT & BARKER, 2002). Em vários países onde *A. fulica* foi introduzida, tornando-se praga, o cultivo de inúmeras plantas como melão de água (*Citrullus lanatus* (Thunberg); Matsumura & Nakai; *Cucurbitáceas*) e mamão papaia (*Carica papaya* Linnaeus; *Caricaceae*) (CHAMBERLIN, 1952; RAUT E GHOSE, 1984) tornou-se economicamente inviável devido ao ataque devastador da *A. fulica*.

### 1.7. Doenças e Formas de Transmissão

Indivíduos de *A. fulica* também são portadores de agentes etiológicos de doenças humanas e veterinárias, como o causador de meningo-encefalite (TELES *et al.*, 1997). A transmissão dessa meningite eosinofílica por *A. fulica* deve ser considerada por se tratar de hospedeiro intermediário de *Angiostrongylus cantonensis*, Chen (1935) (KLIKS & PALUMBO, 1992). Essa zoonose já foi registrada em Cuba em 1981 (AGUIAR *et al.*, 1981); e em Porto Rico, em 1986, onde foram encontrados roedores parasitados por esse nematódeo (ANDERSEN *et al.*, 1986). Nos Estados Unidos foram detectados em ratos (CAMPBELL & LITTLE, 1988), em macacos (GARDINER *et al.*, 1990), em humanos (NEW *et al.*, 1995) e em cavalos (COSTA *et al.*, 2000). No Brasil há relatos de alguns casos isolados na cidade de Cariacica e Vila Velha no estado do Espírito Santo, até então não encontrado na América do Sul. As larvas e moluscos de *A. fulica* de São Vicente (SP) foram analisados e apresentaram os perfis compatíveis com *A. cantonensis*. A hipótese levantada é que a introdução do parasito ocorreu através de roedores proveniente de navios do continente asiático (AGÊNCIA FIOCRUZ DE NOTÍCIAS, 2007).

Outra espécie de parasita, *Angiostrongylus costaricensis* (MORERA & CÉSPEDES, 1971), encontrada do sul dos Estados Unidos até o Norte da Argentina (GRAEFF-TEIXEIRA *et al.*, 1991 a, b; PENA *et al.*, 1995; SILVA *et al.*, 2003) transmite a

angiostrongilose abdominal (ALICATA, 1991). No Brasil, foram registrados casos nas Regiões Sul, Sudeste e no Distrito Federal sendo a maior prevalência no Rio Grande do Sul (WAISBERG *et al.*, 1999; SILVA *et al.*, 2003 e MENTZ *et al.*, 2004), entretanto não é descrita nenhuma relação com os prováveis vetores que promoveram esta infecção (THIENGO, 2003).

A infecção humana é acidental, ocorrendo através da ingestão de verduras e água contaminadas com as larvas de terceiro estágio do parasita (TELES *et al.*, 1997). Não há relatos de exemplares de *A. fulica* naturalmente infectados por *A. costaricensis*, porém não pode ser descartada a possibilidade dessa espécie atuar como hospedeiro intermediário desse nematódeo, devido a dois importantes fatores na epidemiologia da transmissão de parasitoses, a inespecificidade de hospedeiro intermediário do parasita e a alta capacidade reprodutiva de *A. fulica* (TELES *et al.*, 1997; TELES & FONTES 1998; VASCONCELLOS & PILE 2001).

CARVALHO *et al.*, (2003) verificaram em experimentos laboratoriais o potencial do caramujo africano como vetor da Angiostrongilíase, mostrando razoável suscetibilidade à infecção por larvas de *Angiostrongylus costaricensis*. Assim a transmissão humana ou veterinária de Angiostrongilíase por *A. fulica* parece só uma questão de tempo, pois o verme, os hospedeiros intermediários e definitivos coexistem. Adicionalmente, *A. fulica* é o único caracol no Brasil a atingir densidade suficiente, durante todo o ano, para facilitar o estabelecimento do parasita.

## **1.8. Possibilidades para o Controle Alternativo de *A. fulica***

Diversas estratégias físicas, químicas e biológicas tem sido utilizadas no controle de *A. fulica*.

### **1.8.1. Controle físico**

O controle físico requer primeiramente a catação e destruição dos caramujos e seus ovos das áreas infestadas, e ainda é considerado o método mais eficiente de manejo para *A. fulica* em mais de 100 países (THIENGO, 2003), embora proporcione um controle apenas temporário (PETERSON, 1957c). Após a catação recomenda-se incinerar os moluscos, quebrar as conchas e enterrá-las (THIENGO, 2003), para evitar o acúmulo de água o que poderia facilitar o desenvolvimento das larvas de insetos transmissores de doenças como a dengue.

Uma alternativa para facilitar a catação é a utilização de iscas como alface e couve, testadas por Martins *et al.* (2007) que constataram maiores quantidades de

indivíduos de *A. fulica* atraídos em noites mais frias, devido à alta umidade. Isto ressalta a importância de se considerar fatores como o horário, temperatura, umidade relativa do ar e a proximidade das iscas em relação ao foco dos animais. Deve-se levar em conta ainda que nas estações chuvosas, quando os caramujos estão mais ativos, a eficiência destas diminui consideravelmente (RAUT & BARKER, 2002).

### 1.8.2. Controle biológico

Uma das formas de controle dos caramujos *A. fulica* é a introdução de um inimigo natural. Ratos foram introduzidos por Poloneses (*Rattus exulans*), e Europeus (*Rattus rattus*, *Rattus norvegicus*) para predação de um caramujo nativo (HADFIELD *et al.*, 1993). SOLEM (1976) defende a introdução de formigas predadoras mesmo com a falta de evidências convincentes quanto ao possível impacto que poderia ser causado.

Um importante caso em particular de desaparecimento de espécies nativas tem sido a introdução de caramujos predadores como *Euglandina rósea*, um caramujo carnívoro introduzido nas ilhas da Polinésia Francesa, (GOULD, 1993) na tentativa de controlar outro invasor, o caramujo gigante africano, *A. fulica*. Neste caso, a população de *A. fulica* não foi reduzida pelo caramujo carnívoro, porém as populações de caramujos nativos, especialmente dos que tem crescimento e reprodução lenta como o *Partulidae* e *Achatinellinae*, tem sido devastadas (MURRAY *et al.*, 1988; HADFIELD *et al.*, 1993; COWIE 2001b; COOTE & LOÈVE, 2003).

O mais recente inimigo natural exótico é a planária *Platydemus manokwari* que também foi introduzida na tentativa de controlar o caramujo gigante africano (HOPPER & SMITH, 1992). Algumas publicações informam que esta planária pode controlar *A. fulica*, permanecendo no ambiente, mas o impacto desses indivíduos, usados como agentes de controle biológico em espécies nativas, parece não ter sido considerado (MUNIAPPAN, 1990). Muitas das evidências que pretendem mostrar que esses predadores podem controlar populações de *A. fulica* são baseadas em uma má compreensão dos princípios ecológicos. Não é evidente que essas espécies predadoras podem controlar a população de *A. fulica*. Mesmo na medida em que ocorre uma forte predação, esta pode não ter muito efeito sobre o número de indivíduos *A. fulica*, que são extremamente férteis e se reproduzem rapidamente (LYDEARD, 2004).

### 1.8.3. Controle químico

As primeiras tentativas de controle químico empregavam iscas contendo metanal ou arsenato de cálcio. Um considerável número de substâncias, tóxicas e

repelentes, foram avaliadas em diferentes momentos e locais quanto a sua atividade contra *A. fulica* (MEAD, 1979A; RAUT E GHOSE, 1984; SRIVASTAVA, 1992), mas a grande maioria destas avaliações não produziram avanços significativos em relação às iscas à base de farelo contendo metanal, desenvolvidas inicialmente na década de 1930 para controlar gastrópodes em regiões temperadas. Em muitos casos, as avaliações sobre a eficácia desses produtos foram realizadas apenas no âmbito experimental, sem serem testadas em condições de campo (RAUT & BARKER, 2002).

A situação nos últimos anos não mudou muito, apesar da disponibilidade de alguns moluscidas químicos novos no mercado, porém sem registros de desenvolvimento específico contra *A. fulica* (RAUT & BARKER, 2002).

Por essa razão a procura de substâncias facilmente biodegradáveis tem aumentado o interesse em moluscidas de origem vegetal (MCCULLOUGH *et al.*, 1980). No Brasil, os primeiros estudos sobre este grupo de moluscidas foram realizados com caules de *Serjania* spp. para a espécie *Biomphilaria glabrata* (LEYTON *et al.*, 2005). Depois várias plantas medicinais, tóxicas e ornamentais foram testadas com a finalidade de verificar sua possível ação moluscida (AMORIN & PESSOA, 1962; MENDES *et al.*, 1984; ROUQUAYROL *et al.*, 1972; SILVA *et al.*, 1971).

O óleo essencial das folhas de *Ocotea gardneri* (DIAS *et al.*, 2005) e extrato de folhas de *Lycopersicon esculentum* (LEYTON *et al.*, 2005) foram avaliados contra o caramujo *Biomphilaria glabrata* mostrando boa atividade. O óleo essencial das folhas de *Ocotea gardneri* mostrou atividade contra *Biophilalaria glabrata* sendo seus componentes principais identificados como (*E*)- $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -pineno e caureno.

Portanto, todos os estudos já realizados são fundamentais para buscar uma forma de manejo seletiva e de menor impacto ambiental possível para *A. fulica*. Silva *et al.* (2007) concluíram que *A. fulica* possui alta sensibilidade a estímulos táteis, os quais promovem o recolhimento imediato para o interior da concha, acarretando uma maior dificuldade em obter uma forma de controle eficiente. A concha é uma carapaça protetora composta principalmente por compostos de cálcio e os animais não apresentam qualquer reação quando substâncias ácidas ou básicas são colocadas em contato com a mesma (SILVA *et al.* 2007). Ainda nesse contexto, o muco tem a função de proteger e reparar o local atingido (SCHMIDT & NILSEN, 1996). Esses fatores justificam a necessidade fundamental de um atrativo eficiente no controle dessa espécie.

#### **1.8.4. Semioquímicos**

A comunicação segundo alguns autores, pode ser definida como um processo no qual a informação é trocada entre organismos, com vantagens mutuamente

adaptativas (KLOPFER & HATCH, 1968). A comunicação pode ainda ser definida como a transmissão de sinais entre dois ou mais organismos, favorecendo a seleção tanto de produção, quanto da recepção do sinal ou sinais (LEWIS & GOWER, 1980). As substâncias químicas envolvidas na comunicação entre os organismos são denominadas semioquímicos, que significam “sinais químicos” (NORDLUND & LEWIS, 1976).

O termo semioquímicos é amplo, não se referindo apenas às substâncias químicas responsáveis pelo fornecimento de informações, como também às toxinas. Assim utilizou-se o termo infoquímicos para enfatizar a diferença entre esta categoria de substâncias químicas que transportam informações, toxinas e nutrientes (DICKE, & SABELIS, 1988). O termo infoquímico pode ser definido, então, como uma substância química que em seu contexto natural fornece informações em uma interação entre dois indivíduos, provocando no receptor um comportamento ou uma resposta fisiológica.

A classificação dos infoquímicos baseia-se no tipo de interação, se intraespecífica ou interespecífica, bem como na relação custo/benefício estabelecida entre cada organismo da interação, que está ilustrada na Tabela 2.

**Tabela 2** - Representação esquemática dos semioquímicos e suas subclasses

SEMIOQUÍMICOS (infoquímicos + toxinas + nutrientes)			
INFOQUÍMICOS			
Ação intraespecífica		Ação interespecífica	
FEROMÔNIOS		ALELOQUÍMICOS	
(+); (-+); (++)	ALOMÔNIOS (+-)	CAIROMÔNIOS (-+)	SINOMÔNIOS (++)

Feromônios sexuais tem influenciado o comportamento de alguns pulmonatas (ROLL, 1983). Takeda e Tsuruoka (1979) concluíram que a glândula na cabeça do caramujo terrestre, *Eukadra*, secreta um feromônio sexual. Na espécie *Achatina fulica* acredita-se que a glândula localizada no pé, além de secretar o muco que previne a dissecação e promove o deslizamento, deva liberar feromônios utilizados para navegação e comunicação (CHASE & BOULANGER, 1978, CHASE, 1982).

Em outro estudo com indivíduos de *A. fulica* sexualmente maduros, observou-se que caramujos socialmente isolados seguem mais as trilhas do muco coespecífico que os caramujos sociais (CHASE *et al.*, 1978). CHASE (1978) extraiu os compostos da glândula pedal com éter e verificou que os indivíduos foram atraídos significativamente por voláteis, porém até o momento os compostos desses extratos não foram identificados. Há apenas a suspeita de que se trata de um lipídio porque

hormônios identificados em espécies terrestres pertencem a esse grupo de compostos (SHOREY, 1976).

Thomas *et al.*, (1980) apresentaram evidências que ácido propiônico pode ter função de feromônio e tem sido encontrado como um constituinte do muco depositado pela glândula pedal de *Biomphalaria*.

A existência de semioquímicos voláteis nos indivíduos ou algum semioquímico de contato no muco possibilitaria uma forma de manejo a partir da utilização de armadilhas seletivas. Isso seria extremamente favorável porque descartaria a possibilidade de atração de espécies endêmicas podendo então ser utilizada em programas de controle sem prejuízos para a biodiversidade nativa.

### 1.8.5. Atrativos

Vários atrativos são relatados na literatura, na tentativa de atrair significativamente caramujos de diversas espécies. Um estudo mostra que para a espécie *Biomphalaria glabrata* a alface mostrou boa atratividade, devido à presença de aminoácidos, porém outros grupos de compostos testados (ácidos orgânicos, lipídios e açúcares) não foram atrativos (UHAZY *et al.*, 1978). Técnicas de ultrafiltração usadas por Blousfield, (1978) mostraram que os ingredientes ativos de extratos de alimentos, que orientam *Biomphalaria glabrata*, tem massa molar entre 1000 e 4000 daltons. Chase (1982) estudou alguns compostos químicos que atraíam os pulmonatas terrestres *A. fulica* e constatou que vapores de acetato de amila, ácido hexanóico, ácido butírico e 2-octanol, eram eficientes na promoção da mudança de direção para o lado do tentáculo que estava sendo estimulado pela passagem destes compostos; já o acetaldeído, valeraldeído, (*E*)-2-hexenal e etanol foram ineficientes. Bicker *et al.* (1982a) mostraram que a combinação de alguns aminoácidos pode apresentar efeito sinérgico, porém outras substâncias atrativas não foram avaliadas nesse sentido até o momento.

Em 2004, Ravikumara *et al.* mostraram que o extrato da haste de mamão, acompanhado de folha de repolho fresco, apresentou atratividade sobre *A. fulica*, porém as substâncias responsáveis por essa atratividade não foram identificadas.

## 2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a existência de semioquímicos mediando o comportamento de *A. fulica* visando o desenvolvimento de estratégia alternativa de controle populacional.

### 2.1 Objetivos Específicos

Avaliar comportamentalmente a existência de semioquímicos de contato em filhotes, jovens e adultos de *A. fulica*.

Avaliar a existência de semioquímicos voláteis em filhotes, jovens e adultos de *A. fulica*.

Avaliar a existência de aleloquímicos mediando a comunicação de possíveis atrativos frente a *A. fulica*.

Identificar os semioquímicos voláteis envolvidos na comunicação intra e interespecífica de *A. fulica*.

Integrar os conhecimentos acumulados visando o desenvolvimento de metodologia que permita o controle populacional deste animal.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os indivíduos de *A. fulica* foram coletados em terrenos baldios no município de Morretes, litoral do Paraná, e a criação dos caramujos foi mantida no Núcleo de Estudos do Comportamento Animal (NEC) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC). Os caramujos foram mantidos em ciclo de luminosidade de 12/12 horas conjuntamente em terrários de 200 L ou de 50 L com uma população de aproximadamente 20 a 100 animais/m<sup>3</sup>, considerando as diferentes classes de tamanho. Os terrários, compostos de terra orgânica e um recipiente com água, foram mantidos a temperatura média de  $23 \pm 5^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa do ar de  $77 \pm 5\%$ . Os indivíduos foram alimentados 2 vezes por semana (verduras, legumes e ração) e a troca de água e limpeza dos recintos foi realizada diariamente. Os testes comportamentais que investigaram a existência de semioquímicos voláteis entre os indivíduos foram conduzidos no Centro de Ciências Biológicas da PUC-PR e todos os ensaios necessários para a identificação de semioquímicos foram realizados no Departamento de Química da UFPR e no Instituto de Tecnologia do Paraná, em colaboração com o Dr. César Antonio Lenz..

Os experimentos foram realizados nas mesmas condições de temperatura e umidade nos quais os indivíduos foram mantidos. Realizou-se 30 repetições para cada teste de comportamento, e o tempo para efetuar a escolha foi fixado em 30 minutos. Os indivíduos foram também classificados em três categorias de acordo com o tamanho da concha conforme Tomiyama (1992). Assim, indivíduos constituintes de concha menor que 3 cm foram considerados filhotes; entre 3 a 6 cm jovens e superiores a 6 cm adultos.

#### 3.1 Avaliação da existência de semioquímico de contato em filhotes, jovens e adultos

O estudo de comportamento frente ao muco, na investigação por semioquímicos de contato, foi realizado com indivíduos em diferentes fases de desenvolvimento testados frente a diversos estímulos conforme mostra a Tabela 3.

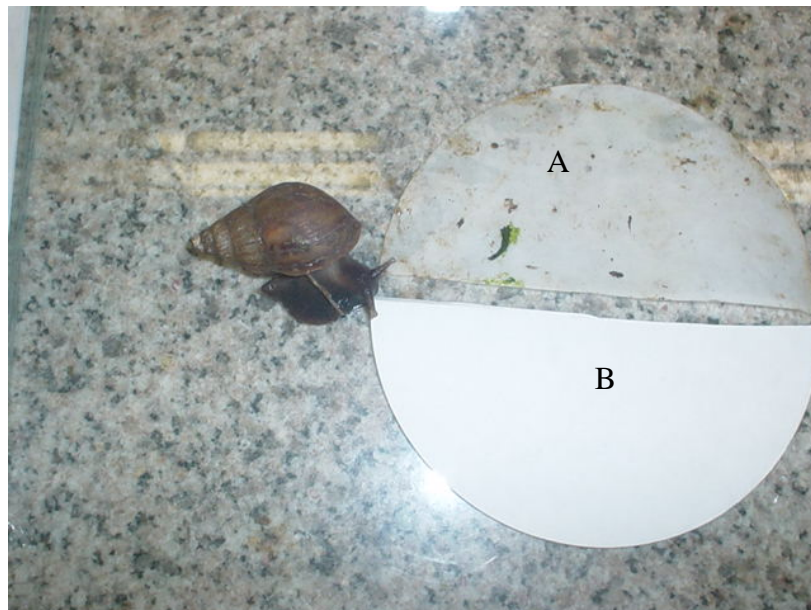
Primeiramente colocava-se um indivíduo para caminhar sobre um papel filtro para que houvesse a deposição do muco, denominado papel filtro com o estímulo. Outro indivíduo (Indivíduo teste) foi colocado em arena fechada diante de duas metades de papel filtro justapostos (Figura 5). Na parte A encontrava-se a metade do papel filtro com estímulo e na parte B a outra metade com papel filtro sem estímulo coespecífico

(controle). As posições do papel de filtro com estímulo e o controle foram trocadas em cada experimento.

**Tabela 3** - Relação dos indivíduos teste e os respectivos estímulos utilizados para avaliação de semioquímicos de contato.

Indivíduo teste	Estímulos Utilizados	Controle
Adulto		
Jovem	muco jovem	seco
Filhote		
Adulto		
Jovem	muco adulto	seco
Filhote		
Adulto		
Jovem	muco adulto	água
Filhote		
Adulto		
Jovem	água	seco
Filhote		

Os testes envolvendo papéis de filtro secos ou umedecidos com água serviram para avaliar a escolha devido à umidade. As observações de comportamento nos testes incluíram o monitoramento do tempo para o indivíduo expor os tentáculos, tatear o papel filtro com a boca ou com os tentáculos e o deslocamento para um dos lados. O direcionamento dos tentáculos orais e oculares, e a movimentação da cabeça também foram observados e documentados (CHASE, 1982).



**Figura 5** - Indivíduo jovem frente a duas metades de papel filtro: metade A com estímulo e metade B sem estímulo coespecífico.

### 3.1.1 Teste de Lateralidade

O teste de lateralidade avalia a existência de uma tendência natural dos animais em se deslocarem para um dos lados. Assim em todos os testes realizados em arena fechada diante de duas metades de papel filtro justapostos (Figura 5), o lado do atrativo em relação ao branco foi intercalado, com o atrativo permanecendo do lado direito em 50% dos testes e em 50% dos testes no lado esquerdo.

### 3.2 Avaliação da existência de semioquímicos voláteis em filhotes, jovens e adultos.

Os testes foram realizados em um olfatômetro em “Y” com 4 cm de diâmetro interno, comprimento dos braços de 15 cm e ângulo entre os mesmos de 120°. O indivíduo teste (relacionado na Tabela 04) era colocado no tubo, conforme mostrado na Figura 6, a aproximadamente 7 cm da entrada da aresta A, por onde se passava um fluxo de ar de 2 L/min. Antes de ser admitido no tubo em Y o fluxo de ar passava por carvão ativado e era borbulhado em água destilada para ser umedecido. O sentido do fluxo de ar foi das arestas B e C para a aresta A, em direção ao indivíduo. Na aresta C era colocado o estímulo coespecífico (Tabela 04) e na aresta B permaneciam somente as condições ambientes do tubo (branco) ou vice-versa.

**Tabela 4 - Relação dos indivíduos teste correlacionados aos estímulos utilizados**

Indivíduo teste	Estímulo utilizado
Jovem	Muco jovem
Jovem	Jovem
Jovem	Muco adulto
Jovem	Adulto
Jovem	Filhote
Filhote	Muco jovem
Filhote	Jovem
Filhote	Muco adulto
Filhote	Adulto

O teste era concluído quando o indivíduo optava por um dos braços, B ou C, ou caso o indivíduo permanecesse no braço A por um tempo superior a 30 minutos. A escolha pelo braço com o estímulo resultava em teste positivo e pelo com ausência de estímulo em um teste negativo, assim como a permanência na aresta A resultava em um teste “zero”. Os indivíduos testados e os estímulos utilizados estão especificados na Tabela 4.



**Figura 6** - Esquema para teste de voláteis no tubo em Y.

### 3.2.1 Aeração de jovens.

Os jovens foram colocados em câmaras de aeração de 40 mm de diâmetro interno. Foram aerados por um período de 24 à 72h sob fluxo de ar de 2 L/min, sendo que a dessorção dos compostos foi realizada de 6 em 6 horas ou de 10 em 10 horas. Cada câmara comportou 10 jovens de aproximadamente 4 cm, e os compostos emitidos por esses indivíduos foram coletados em 0,5 g de resina Super Q 80/100 (Alltech) e dessorvidos com 2,0 mL de diclorometano (J.T. Baker), grau pesticida.

Os extratos foram concentrados, sob leve fluxo de argônio, e armazenados em vidro apropriado, sob refrigeração, para serem injetados em cromatógrafo gasoso acoplado a detector de massas para a identificação dos componentes.

### 3.2.2 Aeração de adultos

Os adultos foram aerados de forma semelhante aos indivíduos jovens, conforme descrito no item anterior, porém as câmaras de vidro foram substituídas por galões de água mineral de 10 L. O galão de 10 L foi perfurado no fundo, para a saída de ar e adaptado à uma rolha de borracha no gargalo após a inserção de dois indivíduos. A aeração, coleta dos compostos e posterior extração foi realizada de forma análoga aos jovens.

### **3.2.3 Coleta do Muco de jovens e adultos**

O muco foi extraído de 20 jovens e 20 adultos tanto em campo como após um dia de permanência nos viveiros do laboratório. Inicialmente procedeu-se a limpeza dos indivíduos com lenços de papel, e extraiu-se o muco estimulando-os na região dos pés com o auxílio de um cotonete.

O tempo de estímulo para a coleta do muco foi de 1 minuto para cada indivíduo. A coleta do muco após a permanência em laboratório foi realizada da forma descrita acima, porém anteriormente os indivíduos foram lavados com água devido à grande quantidade de terra orgânica neles aderida.

### **3.2.4 Aeração do muco de jovens e adultos.**

O muco de 5 jovens foi adsorvido em papel filtro o qual foi introduzido em uma câmara de aeração com fluxo de 2L/min por um período de 24 a 72 horas. O muco de 3 adultos também foi adsorvido em papéis filtro, os quais foram introduzidos em câmaras de aeração. Os compostos voláteis do muco foram coletados em 0,5 g de resina Super Q 80/100 (Alltech) e desorvidos com 2,0 mL de diclorometano. O muco foi diluído em água deionizada na proporção 1:1 e os extratos obtidos foram concentrados, sob leve fluxo de argônio, e armazenados em vidro apropriado, sob refrigeração, para serem injetados em cromatógrafo gasoso acoplado a detector de massas para identificação dos compostos liberados.

### **3.2.5 Extração dos componentes do muco de adulto**

Extraiu-se aproximadamente 5 mL do muco de indivíduo adulto e adicionou-se 20 mL de água destilada. Após adicionou-se cloreto de sódio. Os compostos do muco foram extraídos com 3 frações de 25 mL de éter etílico, grau pesticida (marca). Os testes foram repetidos utilizando-se para extração o éter de petróleo. A mistura foi centrifugada a 4.500 rpm por 20 min à 4°C, para separação das fases. A fase etílica foi secada com sulfato de sódio, filtrada e armazenada para posterior injeção em cromatógrafo acoplado ao detector de massas.

## **3.3 Avaliação da existência de semioquímicos voláteis em algumas matrizes**

Algumas matrizes foram testadas a fim de se avaliar a existência de atração devido à presença de substâncias voláteis, as quais serão denominadas neste trabalho

de matriz: A, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>. Cada matriz utilizada encontra-se descrita na Tabela 5.

Os testes com as matrizes seguiram os mesmos procedimentos descritos para semioquímicos voláteis no tubo em “Y”, substituindo-se o indivíduo coespecífico por uma amostra de 2,0 mL dos atrativos.

**Tabela 5** - Matrizes utilizadas para testes de atratividade frente a indivíduos de *A. fulica* jovens.

Matriz	Natureza
A	Solução de Amônia – concentração 1%
A <sub>1</sub>	Solução de Amônia – concentração 0,1%
A <sub>2</sub>	Solução de Amônia – concentração 0,01%
B <sub>1</sub>	Leite fresco
B <sub>2</sub>	Leite azedo
C <sub>1</sub>	Cerveja com álcool
C <sub>2</sub>	Cerveja sem álcool
D <sub>1</sub>	Peixe fresco
D <sub>2</sub>	Extrato de peixe fresco

### 3.3.1 Preparação do extrato de peixe fresco.

O extrato de peixe fresco foi preparado com 20 g de peixe fresco cortados em cubos, adicionados à água destilada até completar um volume total de 100 mL. A mistura permaneceu em geladeira por 48 h. Após esse período a parte aquosa desse extrato foi diluída 10 vezes para ser utilizado no tubo em “Y”.

### 3.4 Procedimentos estatísticos

Como procedimentos estatísticos foram obtidos dois tipos de dados: frequência e temporal. Os dados de frequência foram tratados com teste qui-quadrado. Os dados temporais que apresentam distribuição normal estão sendo analisados usando os testes paramétricos: ANOVA, Teste t de Student e Regressão. Porém caso os dados não apresentassem distribuição normal, eram transformados. Se ainda assim não se encaixassem na curva de distribuição normal eram processados utilizando os testes não paramétricos: Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

### 3.5 Identificação de Compostos

Duas metodologias para identificação de compostos voláteis foram utilizadas: o método de aeração, seguido por injeção em CG-EM e o método direto por “Purge and

Trap” (P&T) acoplado ao CG-EM. Apresentam-se abaixo as condições de análise para cada metodologia.

### **3.5.1 Método de Aeração, Seguido por Injeção em CG-EM**

Os extratos foram concentrados, sob leve fluxo de argônio e armazenados em vidro apropriado, sob refrigeração. Posteriormente os componentes do extrato foram injetados em cromatógrafo gasoso marca Varian CP 3800 acoplado a detector de massas da marca Varian, Saturn 2000 com impacto de elétrons (E.I.), a 70 eV, detecção de m/z entre 20 e 350 uma. Iniciou-se com temperatura de 50°C mantida por 1 min, elevando-se a razão de 10°C/min até 100°C, mantida por 1 minuto, e finalmente elevando-se a razão 10°C/min até 300°C mantendo-se nesta temperatura por 1 min. A injeção foi em modo “splitless”, com temperatura do injetor a 250°C e fluxo de hélio a 1mL/min. Nas análises por ionização química foram empregadas as mesmas condições de análise e acetonitrila como agente ionizante.

### **3.5.2 Condições de Análise por “Purge and Trap”**

No “Purge and Trap” (P&T) a amostra foi submetida ao sistema de concentração fechado da marca TEKMAR, modelo 3100 com vaso de purga de 25 mL, utilizando gás hélio de alta pureza (>99,99%) a 35 mL/min. A purga, fase de dessorção dos compostos voláteis da amostra e adsorção dos mesmos na fase estacionária do “trap”, ocorreu por 45 minutos a uma temperatura específica para cada tipo de amostra. O adsorvente do “trap” utilizado foi o Vocarb 4000 (Supelco) contendo uma mistura dos adsorventes comerciais (Supelco) Carbopak C, Carbopak B, Carboxen 1000 e Carboxen 1001. O “trap” foi mantido a 30°C, durante a purga, e depois aquecido a 250 °C durante a dessorção térmica, que é a fase de injeção dos compostos no sistema CG-EM através do gás hélio desviado para o trap por 4 minutos.

Os cromatogramas e espectros de massa foram obtidos em um sistema de cromatografia gasosa acoplado a detetor de massas CG/EM Varian Saturn-2000 com impacto de elétrons (E.I.) ou ionização química com acetonitrila (I.Q), operando a 70 eV e equipado com detetor de "ion trap", e aquisição de íons na faixa de m/z entre 20 e 350. Utilizou-se coluna CP-SIL 8 CB LOW BLEED/MS (Varian) 30 m x 0,25 mm x 1,00 µm, iniciando-se com temperatura de 30°C mantida por 5 min, elevando-se a razão de 10°C/min até 80°C, depois 4°C/min até 200°C, e finalmente 10°C/min até 260°C, mantendo-se nesta temperatura por 1 min. O fluxo de hélio foi mantido constante em 1

mL/min, e a injeção foi realizada em modo “splitless”, com temperatura do injetor a 250°C.

### **3.5.3 Análise dos espectros**

Os espectros obtidos em ambos os métodos, no modo de ionização química e por impacto de elétrons (E.I.), foram analisados pelo programa Saturn CG-EM Workstation e comparados com a biblioteca NIST 2005 na tentativa de identificação estrutural dos compostos.

## **3.6 Identificação de compostos presentes nas matrizes**

As matrizes B<sub>1</sub> (leite fresco) e D<sub>2</sub> (extrato de peixe fresco) foram as que apresentaram atratividade significativa, e por isso foram submetidas à identificação dos compostos voláteis através de duas técnicas: a técnica de aeração e captura em resina, seguida por análise via CG-EM e a técnica de P&T acoplada ao CG-EM.

### **3.6.1 Técnica de Aeração seguida por análise via CG-EM**

Uma amostra de 3 mL das matrizes B<sub>1</sub> (leite fresco) ou D<sub>2</sub> (extrato de peixe fresco), nas mesmas condições utilizadas no tubo em Y, foi colocada no interior de uma câmara de aeração, sobre papel filtro. A aeração foi realizada por 6 horas e 22 horas, sob um fluxo de ar de 2 L/min. Após esse período os compostos foram dessorvidos, sequencialmente, com diclorometano e metanol.

Os extratos foram concentrados até um volume aproximado de 0,25 mL, sob fluxo de argônio, e posteriormente 1µL foi injetado em CG-EM no modo splitless conforme as condições de análise descritas no item 3.7.2.

### **3.6.2 “Purge and Trap” e CG-EM**

Os experimentos foram conduzidos em um sistema de concentração tipo P&T acoplado diretamente à porta de injeção do sistema de cromatografia gasosa com detetor de massas (CG-EM), operando nas condições de trabalho dadas abaixo. Utilizou-se 5 mL dos extratos no tubo de Purga a uma temperatura de 60°C.

## **3.7 Teste para identificação de aminas nas matrizes do peixe**

Uma amostra de 5 mL do extrato de peixe fresco foi analisada pelo método P&T descrito no item 3.5.2 deste trabalho para avaliar a presença de aminas.

### **3.8 Determinação da Composição dos Voláteis do Muco**

Os experimentos foram conduzidos conforme as condições de análise do CG-EM por P&T descritas no item 3.5.2, utilizando em média 1 g de muco de indivíduos filhote e jovem; e 2 g de muco de indivíduos adultos no tubo de purga à temperatura de 45 °C.

### **3.9 Identificação e confirmação dos compostos por ionização química e índice de Kovatz**

Todos os ensaios de identificação dos compostos do leite fresco, do extrato de peixe e do muco foram repetidos, com a adição de 1 µL de solução padrão de n-alcenos em hexano. A solução padrão continha compostos de C<sub>11</sub>H<sub>24</sub> a C<sub>30</sub>H<sub>62</sub>, à exceção dos alcanos C<sub>27</sub>H<sub>56</sub> e C<sub>29</sub>H<sub>60</sub>.

Os experimentos para confirmação dos compostos das identificações tentativas foram conduzidos com o tempo de purga de 45 min à temperatura de 60°C, e com tempo de dessorção de 4 min. As demais condições de operação do CG-EM seguiram as mesmas, descritas neste trabalho no item 3.7.2, alterando apenas a temperatura final de 260°C para 280°C e o detector ligado após 9 min.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Avaliação da existência de semioquímicos no muco de *Achatina fulica*.

Os resultados dos testes que investigaram a resposta de indivíduos de *A. fulica* frente ao muco de coespecíficos, à umidade e ao controle estão expressos na Tabela 6. Nesses testes os indivíduos apresentaram 4 situações diferentes de comportamento: opção pelo estímulo, pelo branco, direcionar-se para trás ou não apresentar resposta ao teste. Observou-se que indivíduos adultos foram menos responsivos que jovens e filhotes, o que ficou evidente no significativo número de testes em que os indivíduos adultos permaneceram sem reação em relação a jovens e filhotes (Tabela 6).

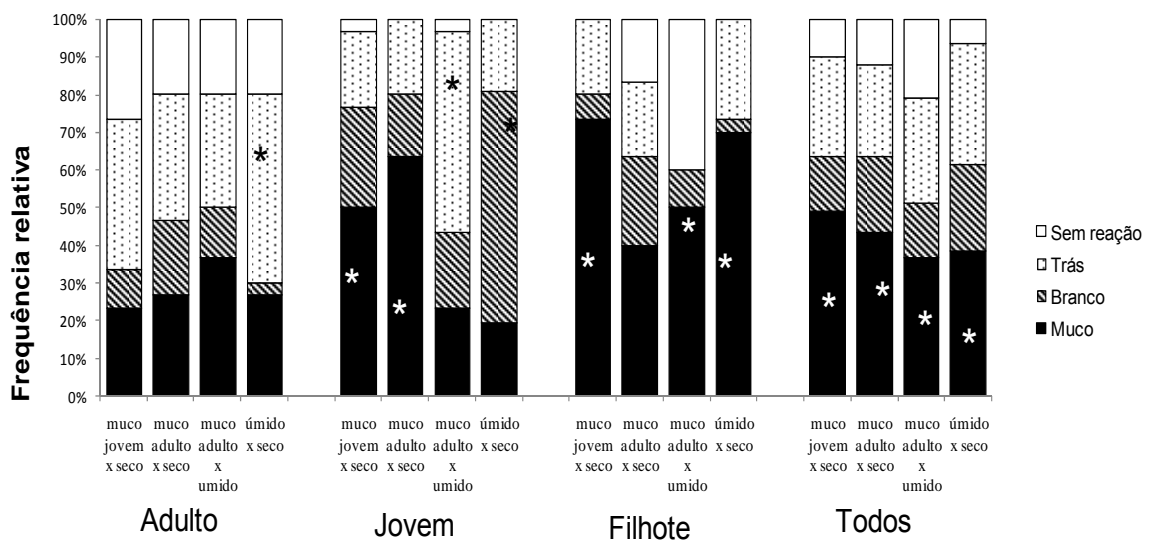
A Figura 7 apresenta a freqüência percentual do comportamento dos indivíduos frente ao muco. Observa-se que os jovens responderam significativamente para o estímulo (muco) quando em contato com muco de jovem ou adulto versus papel seco, enquanto os filhotes responderam significativamente para o muco de jovem quando testado frente a papel seco e para o muco de adulto versus o papel úmido. Os filhotes apresentam também resposta significativa para o papel úmido versus o seco.

**Tabela 6** - Resultados obtidos nos testes de possíveis semioquímicos de contato para indivíduos *A. fulica* adultos, jovens e filhotes frente aos estímulos de muco de adulto, de jovem, umidade e papel filtro seco. O total corresponde à soma de todos os resultados de adultos, jovens e filhotes.

Indivíduo Teste	Estímulos	Resultados			
		Muco	Branco	Trás	Sem reação
Adulto	muco jovem x seco	7	3	12	8
Adulto	muco adulto x seco	8	6	10	6
Adulto	muco adulto x úmido	11	4	9	6
Adulto	úmido x seco	8	1	15	6
Jovem	muco jovem x seco	15	8	6	1
Jovem	muco adulto x seco	19	5	6	0
Jovem	muco adulto x úmido	7	6	16	1
Jovem	úmido x seco	6	19	6	0
Filhote	muco jovem x seco	22	2	6	0
Filhote	muco adulto x seco	12	7	6	5
Filhote	muco adulto x umido	15	3	0	12
Filhote	úmido x seco	21	1	8	0
Total	muco jovem x seco	44	13	24	9
Total	muco adulto x seco	39	18	22	11
Total	muco adulto x umido	33	13	25	19
Total	úmido x seco	35	21	29	6

Na análise geral, somando-se todos os estágios de desenvolvimento, pode-se observar que a maioria dos indivíduos se deslocou em direção ao muco quando as opções do substrato foram muco versus papel de filtro seco ou úmido (Figura 7).

A decisão em se deslocar em direção ao muco foi mais freqüente em jovens e filhotes (Figura 7), o que sugere que o estágio reprodutivo tem um papel importante na reação do animal, mas provavelmente não envolve a comunicação por feromônio sexual devido à imaturidade dos indivíduos que mais rapidamente responderam ao teste, mesmo porque os adultos não responderam significativamente. O fato de jovens e filhotes apresentarem tal comportamento pode estar relacionado à escolha do sítio de repouso, agregação e territorialidade (Tomiyama, 1992).



**Figura 7** - Frequência de indivíduos *A. fulica* adultos, jovens e filhotes que se deslocaram na direção do estímulo (muco ou úmido), do branco (seco), para trás ou não se movimentaram (sem reação). “Todos” corresponde à soma de todos os testes com adultos, jovens e filhotes, analisando o comportamento de *A. fulica* sem distinção do estado de desenvolvimento. Os valores significativamente maiores estão acompanhados pelo asterisco.

#### 4.1.1 Lateralidade.

A lateralidade é a possibilidade de preferência dos indivíduos de se deslocarem para um dos lados, direito ou esquerdo da arena. O teste de lateralidade foi realizado porque poderia interferir nos resultados de todos os testes de atratividade realizados com indivíduos. Observa-se, portanto na Tabela 7, que a escolha deu-se ao acaso, eliminando a existência de lateralidade nesses indivíduos, porque nenhum dos testes apresentou uma preferência de deslocamento para um dos lados, o que fica evidente na observação do valor de P maior que 0,05 em todos os testes.

**Tabela 7** - Resultados dos testes para avaliação da existência de lateralidade nos caramujos *A. fulica*.

Indivíduo	Estímulo	Direito	Esquerdo	P
Adulto	Muco de jovem e seco	10	13	0,53
Adulto	Muco de adulto e seco	16	11	0,34
Adulto	Muco de adulto e água	15	9	0,22
Adulto	Água e seco	11	10	0,83
Jovem	Muco de adulto e seco	17	13	0,47
Jovem	Muco de adulto e água	13	15	0,71
Jovem	Água e seco	14	13	0,85
Filhote	Muco de jovem e seco	14	16	0,72
Filhote	Muco de adulto e seco	14	11	0,55
Filhote	Muco de adulto e água	11	19	0,14
Filhote	Água e seco	15	14	0,85

#### 4.2 Análise temporal do comportamento exploratório

O tempo despendido pelos animais para iniciarem o comportamento exploratório ( $F_{(221)} = 3,8$ ;  $P < 0,01$ ), bem como para a escolha ( $F_{(314)} = 5,6$ ;  $P < 0,01$ ) foi maior no adulto e menor no jovem quando diante do estímulo de muco de adulto (Tabela 8). De modo geral os jovens e os filhotes reagiram e efetuaram a escolha por um dos substratos mais rapidamente. O adulto demorou mais para reagir e iniciar o reconhecimento, principalmente diante do muco do adulto (Tabela 8, Figura 8).

A prontidão de *A. fulica* para iniciar a atividade e a decisão da orientação de deslocamento está relacionada com diferentes estímulos. A umidade é o principal fator que estimula o início da locomoção de *A. fulica* (TAKEDA & OZAKI, 1986) porque as moléculas de água seriam fundamentais para a recepção olfativa (CHASE, 1981). Neste estudo verificou-se que a umidade realmente desencadeia um tempo de reação mais curto, principalmente em animais mais jovens, nos quais a desidratação tem uma ação mais acentuada.

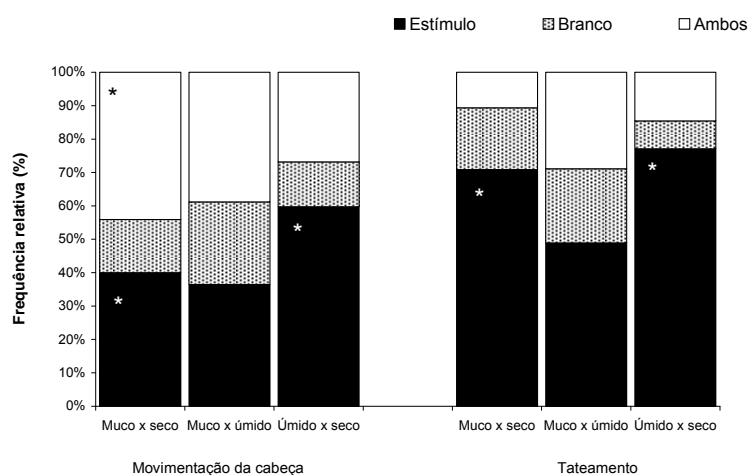
Os resultados mostram que a atração ao muco do coespecífico, principalmente pelos jovens e recém-eclodidos é, provavelmente, decorrente da presença de semioquímicos voláteis e ou de contato. A glândula pedal da *A. fulica* produz uma série de substâncias que servem para proteção e locomoção, produzindo inclusive, segundo (CHASE *et al.*, 1978) um lipídio que atuaria como ferômonio utilizado no contexto sexual, na navegação e na agregação (CHASE *et al.*, 1978, CHASE & BOULANGER, 1978). Chase *et al.* (1978) descrevem que a reação da *A. fulica* à trilha de muco não é um fenômeno simples e provavelmente o muco tem uma ou mais substâncias voláteis as quais são atrativas a coespecíficos, mas também é possível que o muco contenha outros compostos menos voláteis atuando na comunicação química desses indivíduos.

Por outro lado, é possível que os estímulos voláteis possam se originar também de outras fontes que não a trilha, como o próprio corpo ou as fezes, acumuladas principalmente no sítio de repouso. Deve-se considerar que o muco pode eliminar compostos voláteis os quais inclusive estimulam a movimentação da cabeça e tentáculos na direção dos dois substratos, porém a consumação da recepção se dá após o toque dos tentáculos bucais no substrato, como evidenciado no presente estudo e corroborando com os estudos de Chase *et al.*, (1978). Questiona-se a possibilidade do animal ser capaz de controlar a emissão de semioquímicos voláteis e de contato, uma vez que já foi verificada a influência do estresse (JEONG *et al.*, 2001) e da alimentação (LORENZI & MARTINS, 2008) na composição do muco, da mesma forma que foi verificado que fatores como idade, proximidade genética e experiência anterior de isolamento ou permanência em grupos, podem afetar a reação do animal (CHASE *et al.*, 1978, 1980), o que faria do muco uma ferramenta mais ampla na comunicação dos indivíduos de *A. fulica*, no sentido de possibilitar informações a respeito de condições favoráveis ou adversas do ambiente, ou mesmo disponibilidade de recursos e tamanho populacional.

**Tabela 8** – Tempo (em segundos) despendido para projeção dos tentáculos e para decisão da direção de deslocamento. Os valores foram comparados através do teste Anova com post hoc de Turkey, sendo as médias estatisticamente diferentes representadas com letras diferentes.

Experimento	Exposição dos tentáculos	Decisão
	574±542,2	956,7±631,9
Adulto - muco de jovem x seco	(N=30; i.v.=40-2580) a	(N=30; i.v.=180-2880) ac
	1226,7±841,4	1582,2±1050
Adulto - muco de adulto x seco	(N=30; i.v.=240-3060) b	(N=30; i.v.=259-3884) bc
	815,6±509,3	1429,5±779
Adulto - muco x úmido	(N=30; i.v.=60-1920) ab	(N=30; i.v.=120-2940) c
	528,4±478,5	1077,0±594,4
Adulto – seco x úmido	(N=30; i.v.=60-1860) a	(N=30; i.v.=120-2700) abc
	849,1±935,2	822,4±602,3
Jovem - muco de jovem x seco	(N=30; i.v.=49-4020) ab	(N=30; i.v.=144-2046) a
	353,9±302,6	589,4±393,8
Jovem - muco de adulto x seco	(N=30; i.v.=60-1740) a	(N=30; i.v.=104=2100) a
	666,2±601,9	1104,7±720
Jovem - muco x úmido	(N=30; i.v.=60-2820) ab	(N=30; i.v.=300-3780) ac
	465,7±375,5	687,2±461,3
Jovem - seco x úmido	(N=30; i.v.=30-1680) a	(N=30; i.v.=120-2040) a
	380,0±483,1	836,0±638,9
Filhote - muco de jovem x seco	(N=30; i.v.=60-2220) a	(N=30; i.v.=120-3360) a
	437,1±249	928,4±590,6
Filhote - muco de adulto x seco	(N=30; i.v.=720-3060) a	(N=30; i.v.=138=3060) ac
	714,0±694,2	834,0±628,8
Filhote - muco x úmido	(N=30; i.v.=120-2400) ab	(N=30; i.v.=120-2820) a
	437,1± 237	872,0±440
Recém-eclodido - seco x úmido	(N=30; i.v.=437- ) a	(N=30; i.v.=180-2220) ac

O movimento de cabeça, tentáculos oculares e o tateamento dos tentáculos orais e da boca foram mais efetivos nos testes em que o estímulo (muco ou substrato umedecido) foi avaliado com substrato seco, uma vez que mesmo nos testes com muco, porém na presença de substrato umedecido, as frequências de respostas foram ao acaso (Figura 8). Quando comparada as respostas (estímulo, branco e ambos) entre os dois comportamentos (movimentação de cabeça e tateamento) entre cada teste, foi verificado que apenas nos testes em que foi utilizado muco *versus* substrato sem estímulo ( $\chi^2_{(2)} = 51$ ;  $P < 0,01$ ) os caramujos movimentaram mais a cabeça na direção de ambos os estímulos, e tatearam significativamente mais o muco. Nos outros dois testes não houve diferenças (Figura 8). A frequência com que o caramujo virou primeiro para direita (52%) e esquerda (48%) não diferiu, porém a maioria significativa virou primeiro em direção ao estímulo testado (muco ou umidade) (63%) ( $\chi^2_{(1)} = 21,8$ ;  $P < 0,01$ ).



**Figura 8** - Frequência relativa de caramujos que exibiram a movimentação de cabeça com tentáculos orais e bucais e de animais que tatearam os substratos com seus tentáculos orais e bucais. Os valores significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ) estão acompanhados pelo asterisco (\*).

#### 4.3 Reação de jovens diante de semioquímicos voláteis presentes no muco ou no corpo de coespecíficos

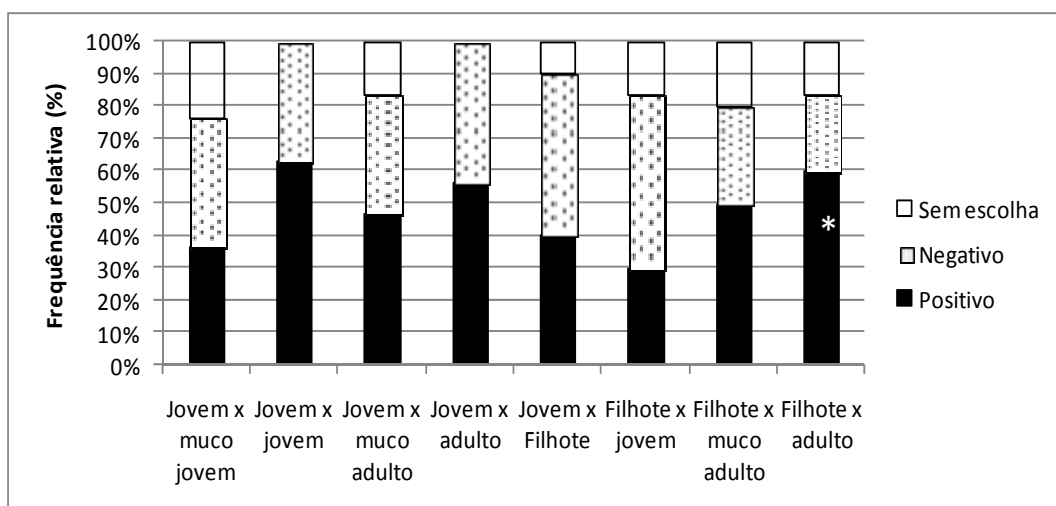
Os resultados da reação de jovens diante de indivíduos ou mesmo do muco de coespecíficos foram no geral pouco significativos, com exceção do teste de filhote frente ao indivíduo adulto (Tabela 9, Figura 9). A frequência mais significativa dos filhotes optando para o muco de adulto pode ser justificada caso o adulto sirva como um sinal na identificação da área de vida ou mesmo de proteção. Sabe-se que os animais dessa espécie forrageiam em local diferente da área de vida (TOMIYAMA, 2000), assim os adultos, mais sedentários, supostamente devem ter a capacidade de escolher o local

mais favorável e seguro para se estabelecerem, e por isso, qualquer estímulo destes pode servir como um sinal para os mais jovens.

**Tabela 9** - Resultados dos testes de semioquímicos voláteis para jovens e filhotes de *A. fulica* diante do muco e de indivíduos coespecíficos, no tubo em Y.

Indivíduo x Estímulo	Positivo	Negativo	Sem escolha	P
Jovem x muco jovem	11	12	7	0,83
Jovem x jovem	19	11	0	0,14
Jovem x muco adulto	14	11	5	0,55
Jovem x adulto	17	13		0,47
Filhote x jovem	9	16	5	0,16
Filhote x adulto	<b>18</b>	7	5	<b>0,03</b>

Outro fator muito importante que pode estar relacionado com a comunicação de *A. fulica* é a agregação que serve para proteção contra a dessecação e predação. Provavelmente devido a esse fato, os filhotes se atraem mais para o muco do adulto, pois nesse estágio de desenvolvimento, o animal apresenta maior tendência a se agregar e os filhotes são os indivíduos dessa espécie mais sensíveis a perda de umidade e mais sensíveis a predação. A agregação varia com o fato de serem de uma mesma ninhada e o horário do dia, sendo a luz um fator que desencadeia a agregação.



**Figura 9** - Frequência relativa de jovens e filhotes que se deslocaram em direção ao estímulo, ao branco e não reagiram diante do muco e de indivíduos jovens e adultos quando testados em tubo em Y. Os valores significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ) acompanhados do asterisco (\*).

#### 4.4 Análise temporal nos testes do tubo em Y

O tempo médio despendido para o início do reconhecimento foi significativamente maior no filhote diante do muco do jovem quando comparado com o

jovem diante do adulto ou muco de jovem. O período gasto até a chegada na bifurcação não diferiu entre os testes e o tempo para a escolha foi menor no jovem diante do jovem do que quando comparado com jovem diante do muco do jovem (Tabela 10).

**Tabela 10** - Tempo médio despendido para saída da concha, para chegar até a bifurcação e para tomada de decisão. As médias significativamente diferentes estão acompanhadas de letras diferentes.

Teste	Reconhecimento		Bifurcação	Escolha	
Jovem x muco jovem	82,3±128 (N=30, i.v.= 2-690)	ab	746,6±561,2 (N=30, i.v.=170-1800)	960,1±569,8 (N=30, i.v.=197-1800)	ac
Jovem x jovem	70,1±75,9 (N=30, i.v.=2-323)	ab	441,3±241,3 (N=30, i.v.=148-1800)	598,1±270,7 (N=30, i.v.=230-1380)	b
Jovem x muco adulto	55,3±91,6 (N=30, i.v.=2-420)	ab	580,3±524,5 (N=30, i.v.=60-1800)	830,0±492,3 (N=30, i.v.=300-1800)	ab
Jovem x adulto	29,5±51,2 (N=30, i.v.=2-272)	a	485,7±338,7 (N=30, i.v.=135-1680)	978,4±531,3 (N=30, i.v.=138-1800)	ab
Filhote x jovem	114,3±103,5 (N=30, i.v.=2-338)	b	650,2±407,6 (N=30, i.v.=180-1800)	F <sub>(180)</sub> =4,7, P<0,01	ac
Filhote x adulto	36,5±63,8 (N=30, i.v.=2-240)	a	615,0±451,9 (N=30, i.v.=60-1800)		
Anova	F <sub>(180)</sub> = 3,6, P<0,01		NS		

As diferenças de tempo para reação nos estágios reprodutivos refletem o papel ecológico de cada um, sendo que os imaturos e os jovens apresentam uma maior responsividade ao muco do coespecífico do que os adultos. Esse resultado reforça os dados de Tomiyama (1992, 2000) que verificou que os adultos são mais sedentários por serem mais territoriais e os jovens mais errantes. Isso se deve ao fato dos adultos serem hermafroditas e responsáveis pela oviposição, assim após forragear, voltam para o sítio mais favorável a sua proteção durante o dia (TOMIYAMA, 2000) e por isso afastam-se ou demoram a responder ao muco dos adultos coespecíficos.

Os jovens, que possuem apenas o aparelho reprodutor masculino desenvolvido, devem procurar parceiros reprodutivos e provavelmente usam informações químicas do coespecífico para localização de um sítio de repouso favorável e potenciais cópulas. Também podem usar as trilhas de muco como indicativos de rotas de alimentação, retorno ao substrato de repouso e localização de coespecíficos para exibirem o comportamento de agregação. A agregação é especialmente importante em jovens, porque protege da perda de água, o que causa a morte em poucas horas. Assim o contato com locais muito secos e com alta temperatura é extremamente desfavorável aos indivíduos (CHASE *et al.*, 1980).

#### 4.5 Aeração de jovens.

Os extratos obtidos da aeração de indivíduos jovens não foram analisados via CG-EM pelo fato de não se obter resultados de atração significativos com tais indivíduos nos estudos comportamentais frente às diversas faixas de desenvolvimento de *A. fulica* assim como para o muco coespecífico.

#### 4.6 Aeração de adultos

Os indivíduos adultos de *A. fulica* não couberam em nossas câmaras de aeração de vidro. Uma tentativa de aerá-los foi efetuada colocando-os no interior de um frasco plástico de água mineral de 10 L, no entanto, os compostos liberados pelo plástico inviabilizou a continuidade dos testes.

#### 4.7 Resultados dos estudos envolvendo atrativos

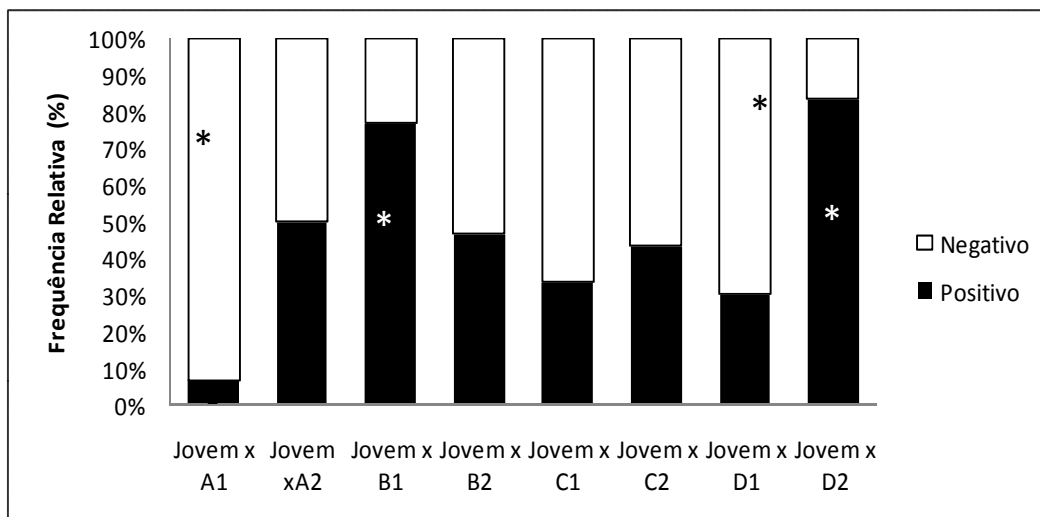
Os resultados obtidos na investigação envolvendo semioquímicos motivaram o estudo do comportamento de *A. fulica* frente a algumas matrizes em sua maioria, alimentares, com o intuito de verificar a eficiência de cada uma, em condições diferentes, na atratividade dos indivíduos dessa espécie. No geral 8 matrizes diferentes foram testadas, variando as condições de cada uma conforme a Tabela 5 (pag. 16). Os resultados dos bioensaios realizados com as matrizes encontram-se na Tabela 11 e na Figura 10.

**Tabela 11** - Resultado dos testes da escolha de indivíduos *A. fulica* jovens frente a diversas matrizes e branco, nos testes do tubo em "Y".

Indivíduo x Atrativo	Positivo	Negativo	P
Jovem x A1	2	28	<b>0,005</b>
Jovem x A2	15	15	1,00
Jovem x B1	23	7	<b>0,03</b>
Jovem x B2	14	16	0,577
Jovem x C1	10	20	0,067
Jovem x C2	13	17	0,465
Jovem x D1	9	21	<b>0,028</b>
Jovem x D2	25	5	<b>0,007</b>

Obtiveram-se quatro resultados significativos ( $P < 0,05$ ) com as matrizes testadas, sendo que nos testes com amônia a 0,1% (v/v) ( $A_1$ ) e com uma matriz do peixe ( $D_1$ ) foram observadas uma escolha significativa para o lado sem atrativo. Porém os resultados com outras duas matrizes ( $B_1$  e  $D_2$ ), leite fresco e extrato de peixe,

respectivamente, apresentaram uma opção significativa pelos atrativos (Tabela 11). O gráfico da Figura 10 destaca a eficiência do leite fresco ( $B_1$ ) e o extrato de peixe fresco ( $D_2$ ) na atração de indivíduos jovens de *A. fulica*, já a amônia a 0,1% ( $A_1$ ) e o peixe fresco em pedaços ( $D_1$ ) exerceram um significativo efeito de repulsão nesses indivíduos.



**Figura 10** – Frequência relativa de jovens que se deslocaram em direção ao estímulo do atrativo ou ao branco quando testados em tubo em Y. Os valores significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ) estão acompanhados de asterisco (\*).

A matriz A, única matriz de natureza não alimentar, solução aquosa de amônia, foi testada em três concentrações diferentes ( $A$ ,  $A_1$  e  $A_2$ ), concentração diminuída nesta ordem. A matriz A foi empregada nos testes por apresentar resultados de atração para insetos (Ventura *et al.*, no prelo) e por ser material eliminado pelos seres vivos. Os testes com a matriz mais concentrada A, realizados em olfátômetros na forma de Y, mostraram uma alta sensibilidade do animal frente à matriz na concentração empregada, levando à morte dos três animais utilizados nos testes. Observou-se uma alta frequência de movimentação dos tentáculos com uma expansão lenta dos mesmos, seguida de contração brusca. Esse comportamento imediato por parte do indivíduo mostra que a amônia deve ter causado algum estímulo irritante conforme relata Silva *et al.* (2006).

Ressalta-se que a amônia é utilizada em alguns trabalhos de ecologia química como atrativo (VENTURA *et al.*, no prelo). Perante este fato constatou-se a necessidade de avaliar o efeito da amônia em concentrações menores, pois *A. fulica* é capaz de identificar baixos teores de voláteis (THOMAS *et al.*, 1997). Observa-se (Figura 10) que para  $A_1$  (solução de amônia a 0,1%) houve uma significativa repulsão dos indivíduos, o que diminuiu consideravelmente para  $A_2$  (solução de amônia a 0,01%) o que levantou a hipótese de haver possível atração desses indivíduos em concentrações ainda menores. Portanto um estudo mais detalhado sobre a atuação da amônia na

comunicação química dos indivíduos de *A. fulica* é necessário, uma vez que os resultados obtidos mostram um efeito repulsivo quando os indivíduos estão submetidos a uma concentração mais elevada de amônia, efeito que se perde quando a concentração é diminuída. Testes com concentrações ainda menores poderão revelar se a amônia pode estar sendo usada por *A. fulica* como indicativo de área de vida, por exemplo. Conforme já relatado por Croll & Chase (1977) os indivíduos de *A. fulica* possuem memória odorífera, a qual é utilizada para identificar alimentos, área de vida e coespecíficos. Por isso a concentração de amônia no ambiente pode estar relacionada, devido a sua natureza, com a escolha do ambiente de vida e conseqüentemente com o mecanismo de migração dos animais para outros sítios. O aumento da população de *A. fulica*, deve elevar os níveis de amônia naquele ambiente já que se suspeita da eliminação desta pelos próprios indivíduos. Isto explicaria o mecanismo de migração dos animais, nos quais se constatou que quando a população no sítio original cresce muito há a busca por novos sítios (Tomiyama, 1992). Caso essa suspeita seja confirmada, a concentração de amônia no ambiente natural pode ser a responsável pela variação da taxa populacional e até mesmo pela extinção dessa espécie no local com elevado índice de amônia, secretado possivelmente pelos próprios animais. Por isso essa hipótese seria comprovada somente com um estudo mais detalhado sobre os odores no ambiente de vida de *A. fulica* e um estudo dos teores de amônia não agressivos para essa espécie.

A matriz B, leite, foi empregada nos testes devido ao fato de ser uma fonte rica em cálcio, necessário para o desenvolvimento da concha dos caramujos.

Os indivíduos testados com leite fresco ( $B_1$ ) ( $\chi^2 = 8,53$   $P < 0,05$ ) apresentaram uma freqüência significativa de escolha pelo estímulo utilizado (Figura 5). Porém quando testados com o leite azedo ( $B_2$ ), essa atratividade significativa não se repetiu. Esse fato pode ser devido a vários fatores como: o leite fresco contém substâncias que diminuem de concentração conforme o seu estado de conservação; ou o leite fresco ( $B_1$ ) pode possuir substâncias atrativas, que permanecem na mesma concentração, porém, o azedamento do leite pode estar gerando ou aumentando a concentração de um ou mais compostos, com características repulsivas para os caramujos.

As matrizes de cerveja também foram testadas, pois esta é popularmente conhecida como um atrativo para caramujos em geral. A cerveja com álcool ( $C_1$ ) não apresentou escolha significativa pelos indivíduos testados, ( $\chi^2 = 3,33$   $P = 0,067$ ) o que poderia ser devido à presença do álcool. A fim de eliminar essa hipótese, a cerveja sem álcool ( $C_2$ ) foi testada e da mesma forma que a cerveja com álcool não apresentou resultado significativo ( $\chi^2 = 0,53$   $P = 0,47$ ) na atração dos indivíduos jovens (Figura 10), eliminando a possibilidade de ser um atrativo eficiente para os caramujos jovens de *A. fulica*.

As matrizes contendo peixe foram empregadas pela observação em campo da atratividade da água usada para limpar peixes, feitas tanto pelos agricultores como por integrantes da equipe de coleta dos animais.

Os resultados obtidos nos testes com pedaços de peixe fresco ( $D_1$ ) apresentaram significativa repulsão dos indivíduos ( $\chi_2 = 4,8$   $P = 0,03$ ) nos testes realizados com jovens, pois a maioria foi para o lado sem atrativo (Figura 10). Porém quando a matriz foi diluída em água (extrato de peixe fresco) apresentou atração significativa dos indivíduos ( $\chi_2 = 13,33$   $P = < 0,01$ ). Devido à natureza da matriz, ela pode estar relacionada com o fato da liberação de amônia ou seus derivados como as aminas. Assim algumas hipóteses foram levantadas: a) a preparação do extrato em água pode estar gerando compostos responsáveis pela atratividade dos indivíduos de *A. fulica* e este aumento na concentração dos compostos com atividade atrativa tornou a matriz do extrato de peixe fresco ( $D_2$ ) eficiente; b) a adição de água destilada auxiliou a liberação do(s) composto(s) responsável(is) pela atratividade em concentração(ões) mais adequada(s) para o animal, mostrando-se necessária a identificação dos possíveis compostos desta matriz.

Na tentativa de elucidar quais são os compostos responsáveis pela atração de indivíduos *A. fulica* apresentada tanto pelo leite fresco como pelo extrato de peixe fresco, passou-se a investigar as composições dessas matrizes.

#### **4.8 Investigação dos compostos presentes nas matrizes**

Os compostos das matrizes do leite fresco ( $B_1$ ), do extrato de peixe fresco ( $D_2$ ) e do muco dos indivíduos, foram investigados pelo método tradicional de coleta envolvendo aeração em câmaras de vidro e análise dos extratos preparados via injeção CG-EM. Outra técnica utilizada envolveu a coleta dos possíveis voláteis das três matrizes através do método P&T. Esta técnica facilita a liberação dos compostos voláteis, principalmente de matrizes aquosas, pois utiliza um gás de arraste, no caso hélio, que é borbulhado pela solução. Os espectros de massas dos compostos foram obtidos pela técnica de impacto de elétrons (IE) e por ionização química (IQ), técnica que facilita a observação do íon molecular e, com isso, a determinação da massa molecular dos compostos.

##### **4.8.1 Identificação dos Compostos Presentes no Leite Fresco**

O leite fresco apresentou resultado significativo na atração de *A. fulica* nos testes em tubo em “Y”, o que indica a existência de algum composto volátil ou mesmo um

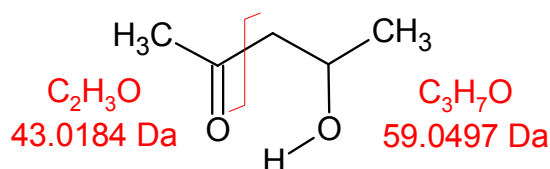
grupo de compostos, que podem ou não apresentar efeito sinérgico, responsável pela atração dos indivíduos. Assim levantou-se a necessidade de identificação dos compostos presentes nesta matriz (B<sub>1</sub>).

Os resultados obtidos no isolamento e posterior identificação pelo método tradicional de aeração em câmaras de vidro, seguido por injeção em CG-EM levaram à identificação tentativa de dois compostos no extrato preparado pela lavagem da resina adsorvente com diclorometano e oito compostos no extrato em que se empregou metanol para a lavagem da resina.

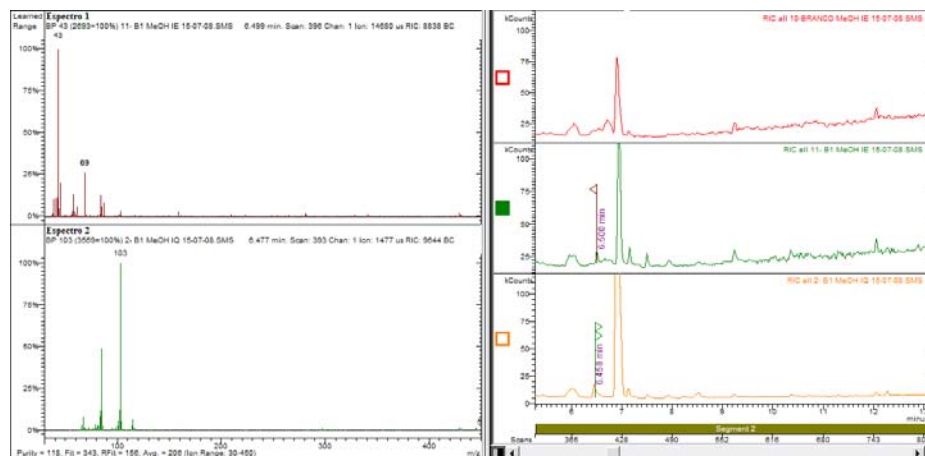
**Tabela 12** - Compostos identificados no extrato de metanol da aeração do leite fresco.

Nº	Composto	Tempo de Retenção (Tr) (min)	Pico Base (IE) ( <i>m/z</i> )	M <sup>+</sup> (IE)	M <sup>+</sup> (IQ)
1	4-hidróxi-pentanona-2	6,500	43	102	103
2	4-hidróxi-4-metil-2-pentanona	6,923	43	116	117
3	octanoato de metila	12,286	74	158	159
4	decanoato de metila	15,469	74	186	187
5	dodecanoato de metila	18,217	74	214	215
6	12-metil-tridecanoato de metila	20,645	74	242	243
7	12-metil-tetradecanoato de metila	21,763	74	256	257
8	Pentadecanoato de metila	22,820	74	270	271
9	octadecenoato de metila	24,619	55	296	297
10	octadecanoato de metila	24,808	74	298	299

A 4-hidroxi-2-pentanona, com tempo de retenção de 6,500 min, apresentou espectro de massas com pico base  $m/z = 43$  característico de metil cetonas. A sugestão para a formação do pico base é a clivagem alfa à carbonila (Figura 11), o que leva à formação do íon acílio, estabilizado por ressonância. O pico em  $m/z = 58$  é devido ao rearranjo de McLafferty e o pico de pouca intensidade em  $m/z = 102$  corresponde ao íon molecular (M<sup>+</sup>), o que foi confirmado pelo resultado obtido utilizando o modo de ionização química, com o pico M<sup>+1</sup> em  $m/z = 103$  (Espectro 2, Figura 12).



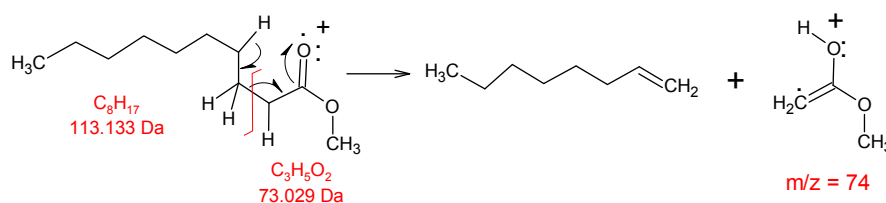
**Figura 11** - Fragmentação da 4-hidróxi-2-pentanona, gerando os fragmentos de massa  $m/z = 43$  e  $m/z = 59$ .



**Figura 12** - Cromatogramas do composto 4-hidroxi-2-pentanona e seus respectivos espectros de massas, obtido no modo impacto de elétrons (Espectro 1) e ionização química (Espectro 2).

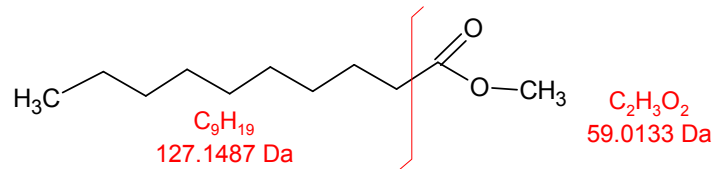
Algumas hidroximetil cetonas são componentes voláteis do leite (OVERTON & MANURA, 1999), fato que corrobora com nosso resultado bem como a possível presença de outras hidroximetil cetonas, como a 4-hidróxi-4-metil-2-pentanona, também identificada (Tabela 12).

Os ésteres metílicos de cadeia longa, que constituem a maioria dos compostos identificados nesta matriz, apresentam um pico bem característico, de grande intensidade, em  $m/z = 74$ , devido ao rearranjo de McLafferty. Este pico base esteve presente em todos os ésteres metílicos saturados (Tabela 12, Figuras 13 e 15).

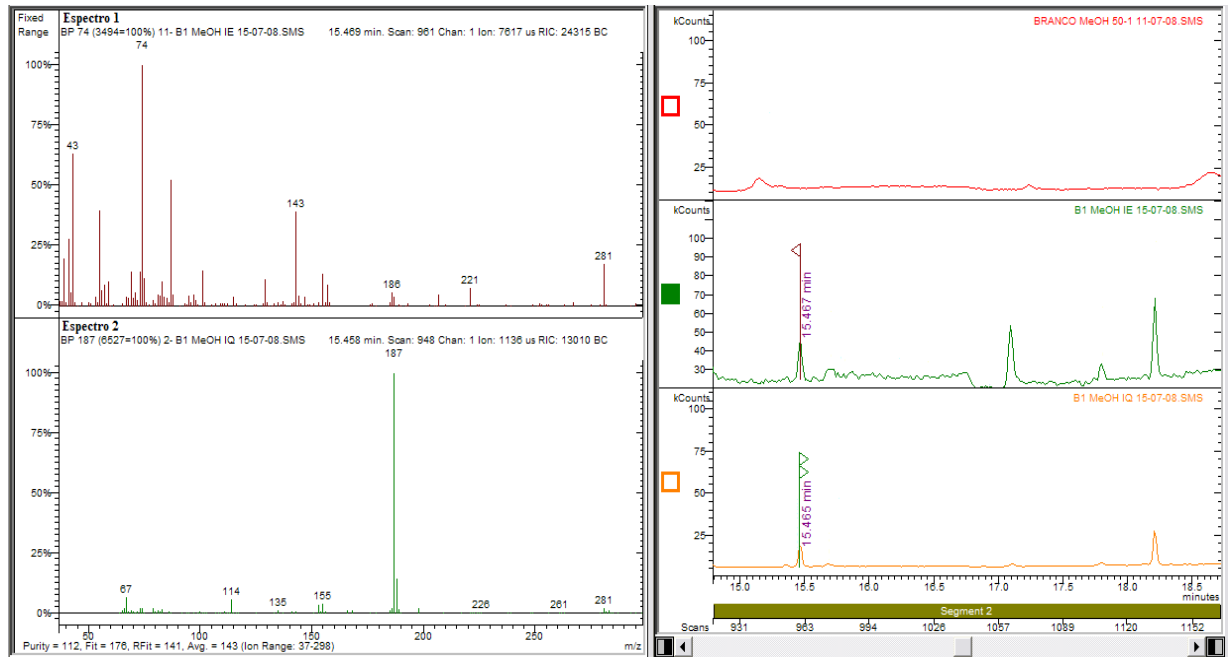


**Figura 13** - Rearranjo de McLafferty para o decanoato de metila, originando o pico característico  $m/z = 74$ .

No caso do composto com tempo de retenção de 15,469 min, identificado como decanoato de metila, observou-se um fragmento de leve intensidade em  $m/z = 59$ , formado com a clivagem alfa à carbonila o que indica ser um éster metílico, conforme mostram as Figuras 14 e 15. Além disso, a massa molecular desse composto foi confirmada pela análise no modo ionização química, a qual apresentou um fragmento de massa  $m/z = 187$  relativo ao  $M^{+1}$  (espectro 2 da Figura 15).



**Figura 14** - Fragmentação alfa do decanoato de metila

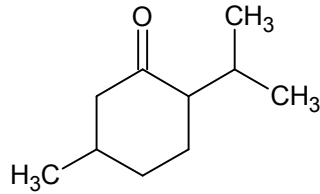


**Figura 15** - Cromatogramas do éster decanoato de metila e seus respectivos espectros de massa obtidos no modo impacto de elétrons (Espectro 1) e ionização química (Espectro 2).

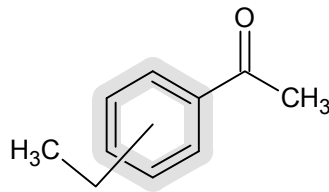
A ocorrência de ésteres no leite foi citada por Overton & Manura, (1999) em um estudo que envolveu a identificação de compostos orgânicos voláteis presentes no leite utilizando o sistema P&T acoplado ao CG-EM. Vários hidrocarbonetos, aldeídos, álcoois, cetonas, ácidos graxos, ésteres, compostos fenólicos e lactonas de cadeia normal e ramificada ocorrem no leite, porém há uma significativa diferença nos compostos voláteis que ocorrem no leite fresco em relação ao leite aberto, mantido à temperatura ambiente, após 2 dias (OVERTON & MANURA, 1999). Overton e Manura, (1999) ressaltaram ainda que identificaram mais de 50 compostos orgânicos voláteis, sendo que muitos desses estão presentes em ambas as condições de conservação do leite, porém há também uma variação distinta na quantidade e na variedade de compostos nas condições analisadas. Esta variação pode ser devido às condições do ambiente, armazenamento e/ou oxidação dos lipídios.

Nos extratos de diclorometano os dois compostos voláteis isolados foram tentativamente identificados como: 5-metil-2-(*iso*-propil)-ciclohexanona (Figura 16) e

1-(etilfenil)-etanona (Figura 17). A posição do radical etila no anel aromático precisa ser determinada.

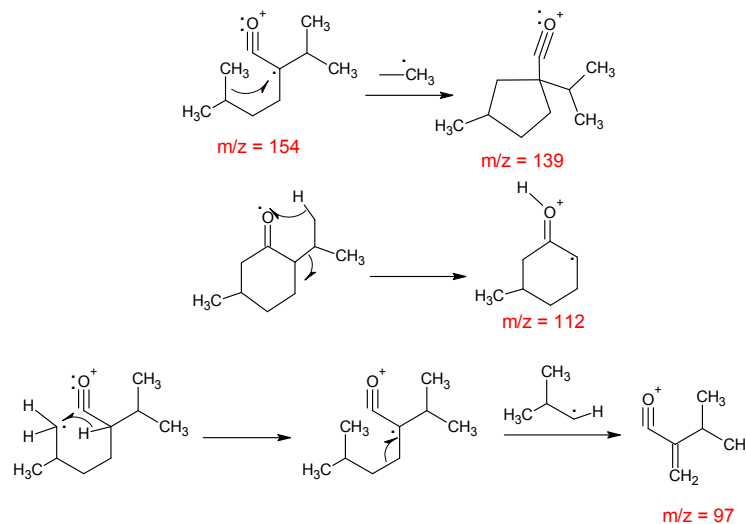


**Figura 16** - Estrutura da 5-metil-2-(*iso*-propil)-ciclohexanona

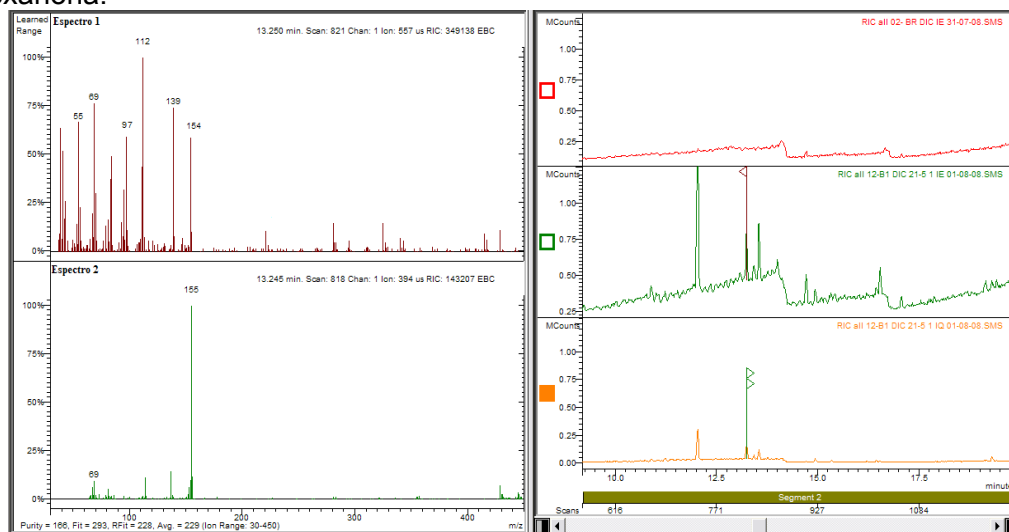


**Figura 17** - 1-(etilfenil)-etanona

O composto volátil 5-metil-2-(*iso*-propil)-ciclohexanona, foi detectado no tempo de retenção  $t_r = 13,250$  min. O espectro de fragmentação de massas apresentou como fragmento base  $m/z = 112$ , originado pela perda do radical *iso*-propila. O fragmento de massa  $m/z = 154$  é intenso, pois a clivagem alfa à carbonila pode ocorrer sem perda de massa, por se tratar de uma cetona cíclica. A massa molecular desse composto foi confirmada pela massa de  $M^{+1} = 155$ , obtida ao se registrar o espectro no modo IQ (Figura 19). Outras fragmentações características desta cetona são a perda de metila gerando o fragmento  $m/z = 139$ .

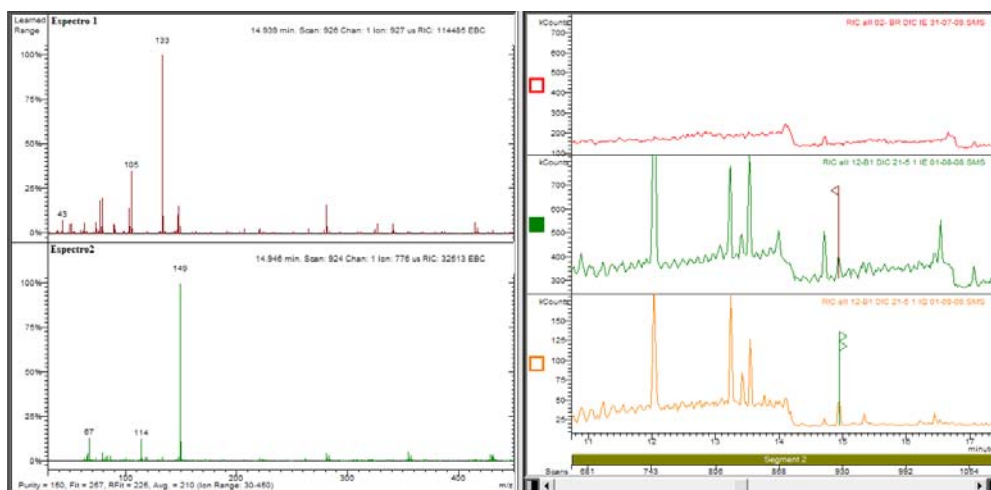


**Figura 18** - Fragmentações sugeridas para o composto 5-metil-2-(iso-propil)-ciclohexanona.



**Figura 19** - Cromatograma e espectros de massa, no modo impacto de elétrons (Espectro 1) e ionização química (Espectro 2) da 5-metil-2-(1 metiletil)-ciclohexanona.

O composto identificado como 1-(etilfenil)-etanona apresentou o tempo de retenção  $t_r = 14,941$  min e no espectro de fragmentação de massas no modo IE observou-se o pico base  $m/z = 133$ , que ocorre devido à clivagem alfa à carbonila, com perda do radical metila. O pico do íon molecular foi observado em  $m/z = 148$ , o qual foi confirmado por ionização química (IQ) onde o pico  $m/z = 149$  corresponde ao íon  $M^{+1}$ .

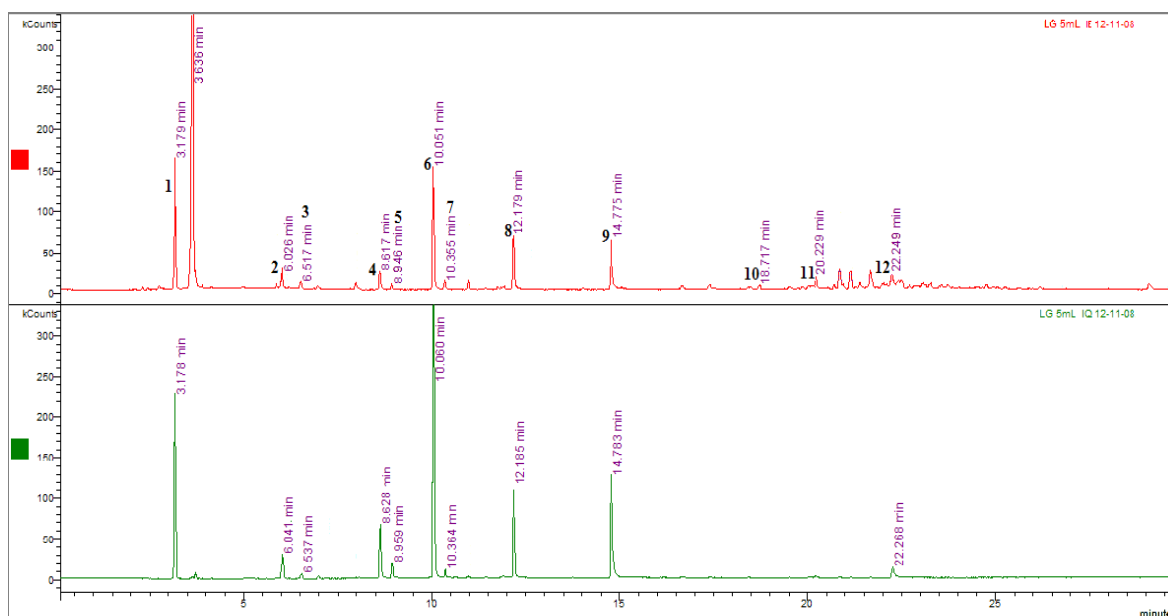


**Figura 20** - Cromatograma e espectros de massa, no modo impacto de elétrons (Espectro 1) e ionização química (Espectro 2) da 1-(etilfenil)-etanona

Um composto semelhante, a fenil-etanona, foi detectado no leite após ser mantido 2 dias à temperatura ambiente (OVERTON & MANURA, 1999). Sendo assim, a identificação da 1-(etilfenil)-etanona pode ser um indício de que o método de aeração, que demanda mais tempo do que o método P&T, não é o mais eficiente para a

identificação de compostos voláteis do leite, devido à natureza da matriz que se deteriora a temperatura ambiente.

De posse desses resultados optou-se em realizar as análises de investigação de voláteis em sistema P&T. O cromatograma representativo dos voláteis isolados e previamente identificados do leite pelo método P&T está ilustrado na Figura 21.

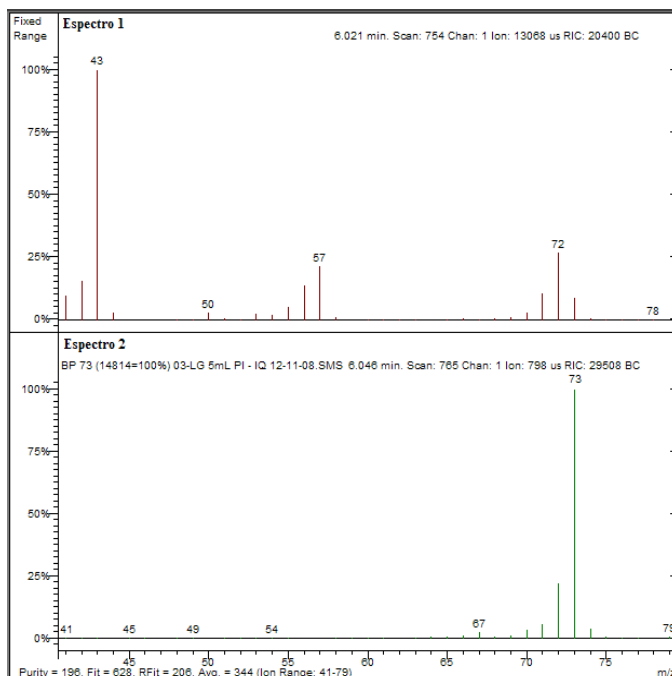


**Figura 21** - Cromatogramas representativos dos voláteis isolados do leite fresco por P&T. Compostos previamente identificados por espectrometria de massas no modo impacto de elétrons (IE) e por ionização química (IQ).

Dentre os compostos voláteis identificados da matriz B<sub>1</sub> (leite fresco) pelo método de P&T estão cetonas, aldeídos, álcoois e o limoneno. A maioria dessas substâncias foi identificada através de sua fragmentação de massas características, auxiliada ainda pelo espectro de fragmentação de massa, obtido por ionização química, o qual permite confirmar a sua massa molar.

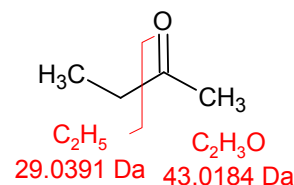
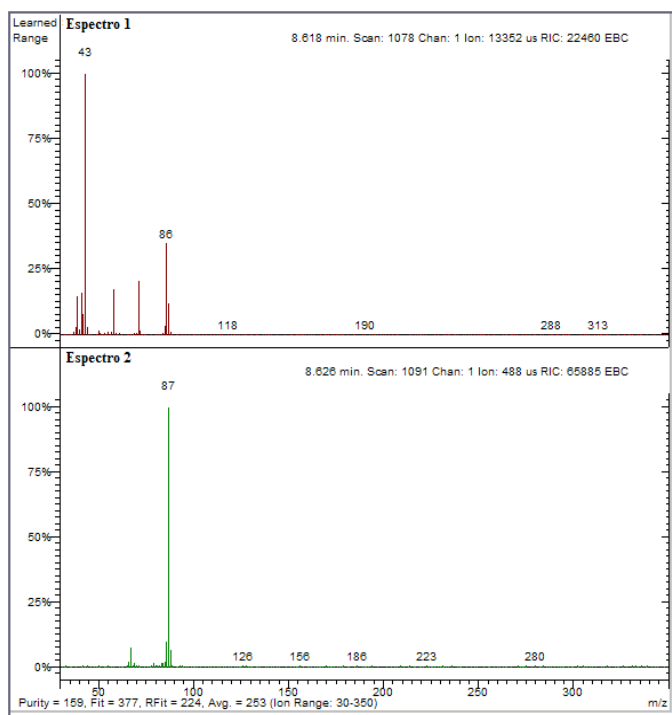
O composto 1, com  $t_r = 6,02$  min, apresentou o espectro de fragmentação de massas por IE representado na Figura 22 (Espectro 1), juntamente com o espectro de fragmentação de massas por IQ (Espectro 2 da Figura 22). Observa-se na fragmentação por IE o pico  $M^+ = 72$ , o qual foi confirmado por IQ com pico base igual a  $M^{+1} = 73$ . Assim na identificação tentativa, dois compostos mais prováveis foram sugeridos: 2-butanona ou pentano. Ambos os compostos apresentam pico base  $m/z = 43$  (Figura 22, Espectro 1) o que é muito comum em metilcetonas devido à clivagem alfa à carbonila conforme representado na Figura 23, porém o pentano também apresenta em sua fragmentação o pico  $m/z = 43$  devido à clivagem entre os carbonos 2 e 3 (Figura 24). Levando em consideração ainda o pico  $m/z = 57$ , o mesmo pode ser originado pela perda de uma metila em cada um dos compostos. Suspeita-se que o composto em questão seja a 2-

butanona pelo fato da matriz apresentar outras metilcetonas. Isso será confirmado em trabalho posterior ao comparar o tempo de retenção de amostras de pentano e de 2-butanona, analisadas nas mesmas condições que às utilizadas para analisar o leite fresco, com o tempo de retenção do produto encontrado no leite.

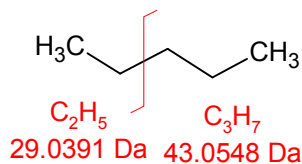


**Figura 22** – Espectro de massa do composto 1. a) Espectro 1 fragmentação por IE. b) Espectro 2 fragmentação por IQ

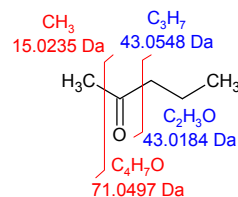
O composto com  $t_r = 8,617$  min corresponde à 2-pentanona com pico base  $M^+ = 86$  (Espectro 1, Figura 25) e confirmado por IQ com  $M^{+1} = 87$  (Espectro 2, Figura 25). A fragmentação característica deste composto gera os picos  $m/z = 43$  (Figura 26).



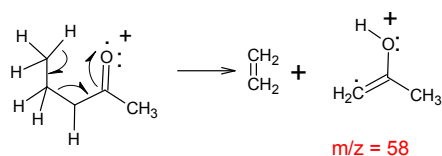
**Figura 23** - Fragmentação característica da Butanona-2, gerando pico  $m/z = 29, 43$ .



**Figura 24** - Fragmentação característica do Pentano, gerando pico  $m/z = 29, 43$ .

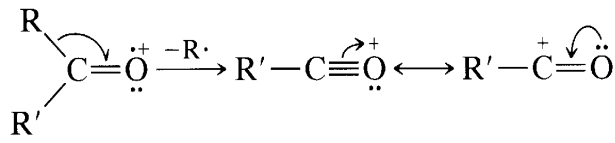


**Figura 26** – Pentanona-2 com as clivagens alfa às carbonilas mostrando a formação dos fragmentos de massa  $m/z = 43$  e  $m/z = 71$ .



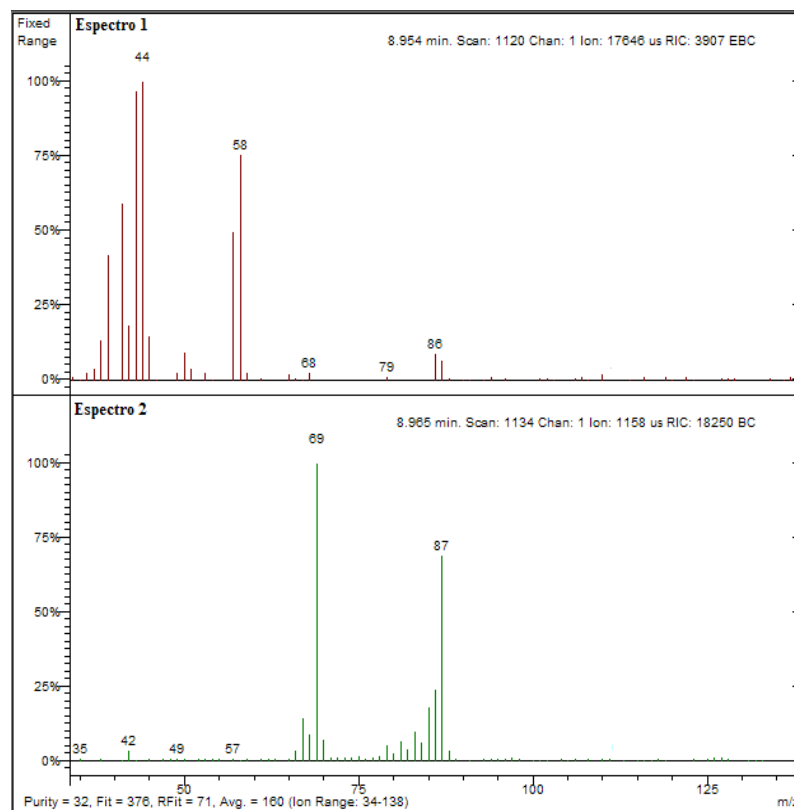
**Figura 27** – Rearranjo de McLafferty da pentanona-2 originando o fragmento de massa  $m/z = 58$ .

**Figura 25** – Espectro de massa do composto pentanona-2. a) Espectro 1 fragmentação por IE. b) Espectro 2 fragmentação por IQ



**Figura 28** – Esquema de clivagem de cetonas.

O composto com tempo de retenção  $t_r = 8,946$  min, foi identificado como pentanal, pois apresentou o pico majoritário em  $m/z = 44$  o qual indica uma fragmentação característica de aldeído, quando ocorre a clivagem da ligação entre o carbono alfa e beta ao oxigênio. Esta clivagem ocorre devido ao rearranjo de McLafferty e o íon formado é estabilizado por ressonância. O íon molecular ( $M^+ = 86$ ) foi identificado e confirmado por IQ ( $M^{+1} = 87$ ) (Figura 29). O fragmento em  $m/z = 68$  é devido a perda de água enquanto o de  $m/z = 58$  é devido a perda de etileno.



**Figura 29** - Espectro de fragmentação de massas do pentanal no modo impacto de elétrons (Espectro 1) e no modo Ionização Química (Espectro 2).

Como a concentração de alguns aldeídos, identificados por Overton & Manura (1999), diminui conforme o estado de conservação do leite, no leite azedo esses aldeídos

aparecem em menor quantidade, o que pode ser explicado devido as suas oxidações, causando o odor característico de leite azedo.

O composto com  $t_r = 10,051$  min foi identificado como 4-metil-2-pentanona. O íon molecular foi observado nos dois modos, IE  $M^+ m/z = 100$  e via IQ  $M^{+1} m/z = 101$ . O pico base com  $m/z = 85$  é devido à fragmentação alfa à carbonila com perda do radical metila, sendo a perda do outro radical também observada com  $m/z = 57$ . O pico característico do rearranjo de McLafferty para cetonas também foi observado,  $m/z = 58$ , o que reforça o fato da metila estar ligada ao carbono 4.

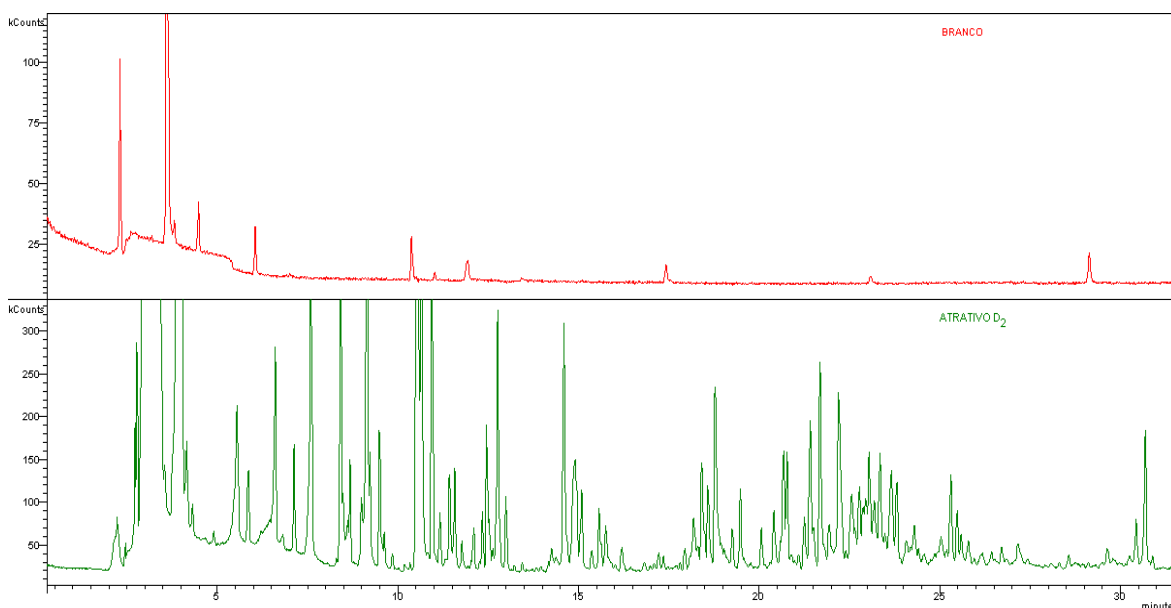
**Tabela 13** - Compostos coletados da matriz do leite fresco ( $B_1$ ) pela técnica de P&T e identificados por CG-EM.

Nº	Composto	Tempo de Retenção (tr) (min)	Pico Base (IE) ( $m/z$ )	$M^+$ (IE)	$M^+$ (IQ)
1	Amida	3,179	47	93	89
2	2-Butanona / Pentano	6,026	43	72	73
3	2-Metil-3-Buten-2-ol	6,517	43	-	-
4	Pentanona-2	8,617	43	86	87
5	Pentanal / 4-Metil-butanal	8,946	44	86	86
6	4-Metil-2-pentanona	10,051	43	100	101
7	Sulfeto de dimetila	10,355	94	94	95
8	Ester	12,179	71	83	84
9	2-heptanona / 4 metil hexanona	14,775	43	114	115
10	Decanol	18,717	57	-	-
11	Limoneno	20,229	67	136	137
12	2-Nonanona	22,248	43	142	143

Os demais compostos listados na Tabela 13 foram tentativamente identificados da mesma maneira que os descritos acima.

#### 4.8.2 Identificação dos Compostos Presentes no Extrato de Peixe Fresco

Os resultados das análises de isolamento e identificação de compostos pelo método de aeração foram pouco eficientes na identificação de compostos voláteis oriundos da fase aquosa. Porém pelo método de P&T foram identificados alguns compostos voláteis conforme relatado na Tabela 14. Esse fato é consequência de se utilizar gás de arraste no método P&T que facilita a liberação dos voláteis da matriz aquosa. O Cromatograma representativo dos compostos identificados no extrato de peixe fresco via P&T é apresentado na Figura 30.



**Figura 30** - Cromatograma representativo dos composto presentes na matriz D<sub>2</sub>

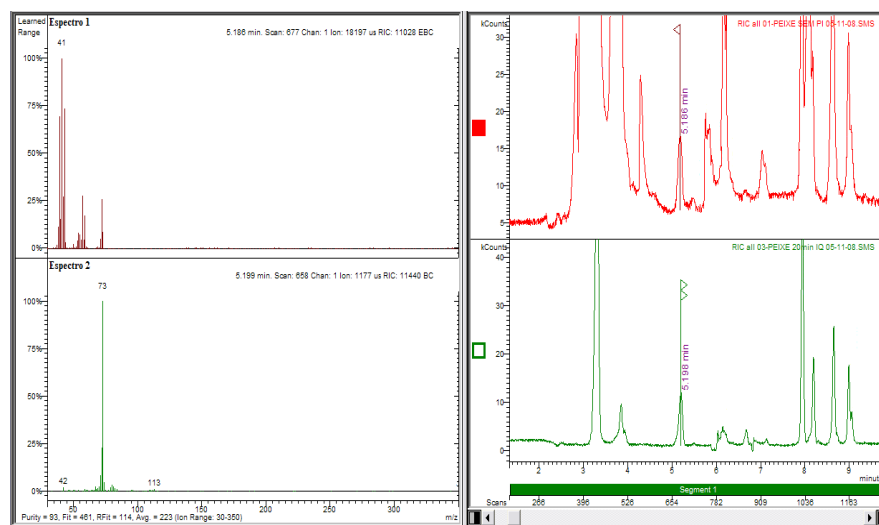
Na Tabela 14 estão colocados os compostos, previamente identificados por CG-EM desta matriz pelo método de P&T nos modos IE e IQ.

**Tabela 14** - Compostos coletados da matriz D<sub>2</sub> pela técnica de P&T identificados por CG-EM.

Nº	Composto	Tempo de Retenção (min)	Pico Base (m/z)	Íon Molecular M <sup>+</sup> (IE)	M <sup>+</sup> 1 (IQ)
1	Dimetilamina	2,783	44	45	--
2	Trimetilamina	3,92	58	59	--
3	2-metil propanal, 2-butanona	5,178	41	72	73
4	3-metil-pentano	6,215	56	84	--
5	3-metil-butanal	7,919	43	86	---
6	Hexanal,	11,955	56	100	101
7	Heptanal,	15,354	97	114	115
8	Terpeno	18,502	93	136	137
9	Octanal	19,079	41	128	129
10	Limoneno	20,312	67	136	137
11	Terpeno	21,227	57	204	205
12	Terpeno	30,238	57	204	205

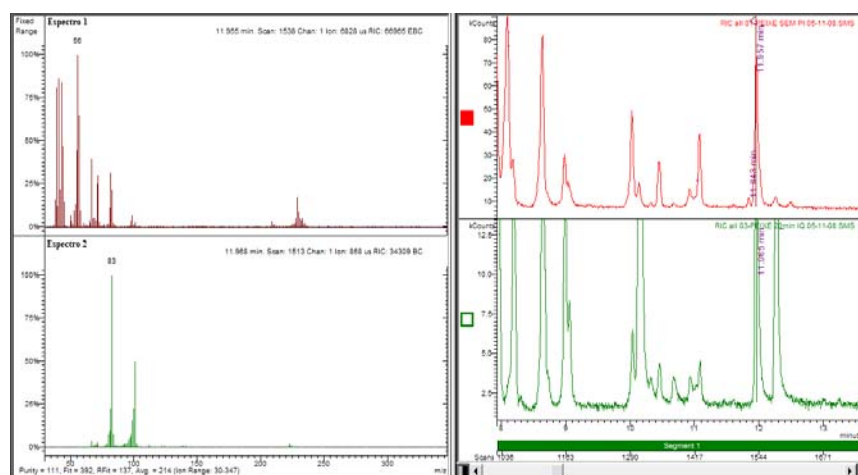
Na investigação de voláteis para a matriz do extrato de peixe constatou-se a dimetilamina, porém em concentração bastante inferior à trimetilamina. Após essa identificação, programou-se o equipamento para as mesmas não serem mais detectadas porque a alta concentração da trimetilamina dificulta a interpretação e identificação dos compostos minoritários. A maioria dos aldeídos sugeridos foram também confirmados por Ionização Química (IQ) conforme informado na Tabela 14.

O 2-metil-propanal foi identificado com  $t_r = 5,178$  min, apresentando pico base  $m/z = 41$  e o seu íon molecular ( $M^{+1}$ ) foi confirmado por IQ com  $m/z = 73$  (Figura 31).

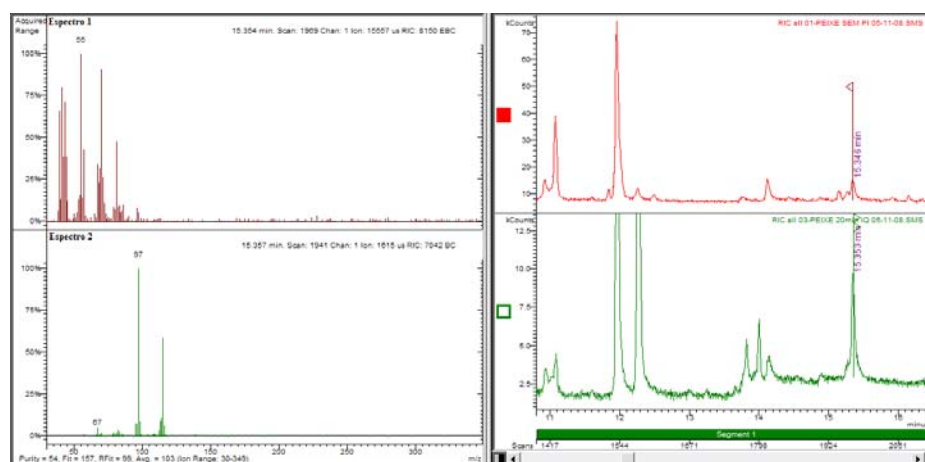


**Figura 31** - Cromatogramas e espectros de fragmentação de massas do 2-metil-propanal no modo impacto de elétrons (IE) (Espectro 1) e no modo ionização química (IQ) (Espectro 2).

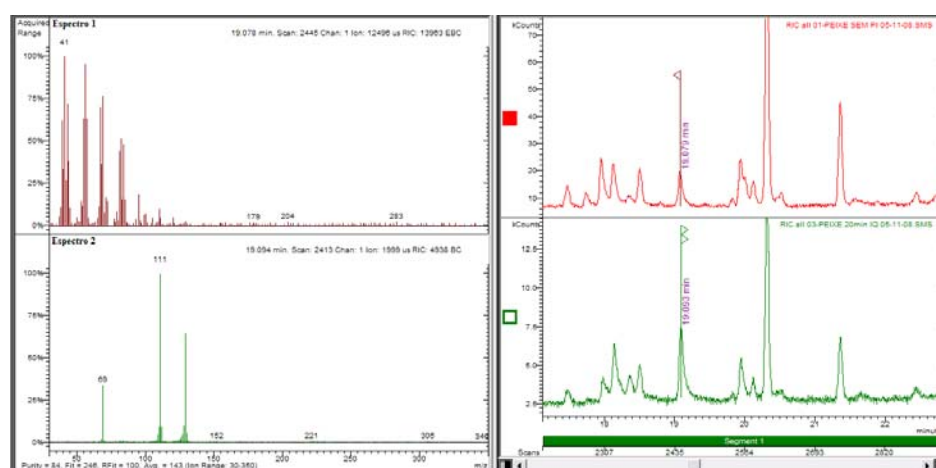
Os outros aldeídos citados na Tabela 14 foram identificados da mesma forma, baseando-se em sua fragmentação característica: hexanal (Figuras 32), heptanal (Figuras 33) e octanal (Figuras 34), todos confirmados por IQ (Figuras 32, 33, 34) respectivamente.



**Figura 32** - Cromatogramas e espectros de fragmentação de massas do hexanal no modo impacto de elétrons (IE) (Espectro 1) e no modo ionização química (IQ) (Espectro 2).



**Figura 33** - Cromatogramas e espectros de fragmentação de massas do heptanal no modo impacto de elétrons (IE) (Espectro 1) e no modo ionização química (IQ) (Espectro 2).



**Figura 34** - Cromatogramas e espectros de fragmentação de massas do 2-metil-propanal no modo impacto de elétrons (IE) (Espectro 1) e no modo ionização química (IQ) (Espectro 2).

Vários aldeídos são compostos voláteis de peixes, destes o hexanal e o heptanal já foram anteriormente identificados, assim como propanal, butanal e pentenal (IGLESIAS *et al*, 2007), e também o octanal (FERSGAARD *et al*, 1999).

Ressalta-se aqui a facilidade de oxidação percebida pelos aldeídos o que dificulta suas identificações, principalmente pelo método de aeração em que a amostra é mantida por mais tempo para a coleta dos voláteis.

#### 4.8.3 Identificação dos Compostos Presentes no Muco de Jovens e Adultos

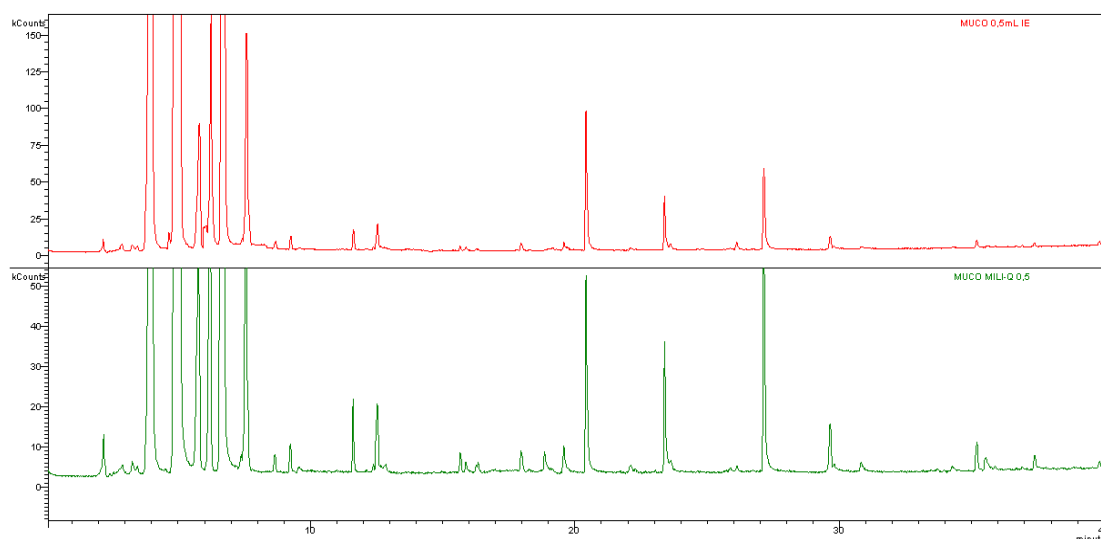
Os extratos obtidos da aeração dos mucos de jovens e adultos, quando analisados por CG-EM mostraram inúmeros compostos sililados, provavelmente

provenientes de contaminações da própria coluna. Como esses compostos aparecem em uma concentração relativamente alta, eles dificultam a identificação de compostos em concentrações bem menores, o que poderia justificar o não aparecimento de compostos voláteis nos cromatogramas analisados via injeção direta em CG-EM. Por esse motivo, os extratos obtidos através da extração direta dos compostos do muco com éter também não foram analisados via CG-EM. Desta forma o muco de jovens e adultos foram coletados pela técnica de P&T e analisados por CG-EM tanto no modo impacto de elétrons como ionização química.

#### 4.9 Isolamento e identificação dos voláteis presentes no muco de jovens e adultos por P&T

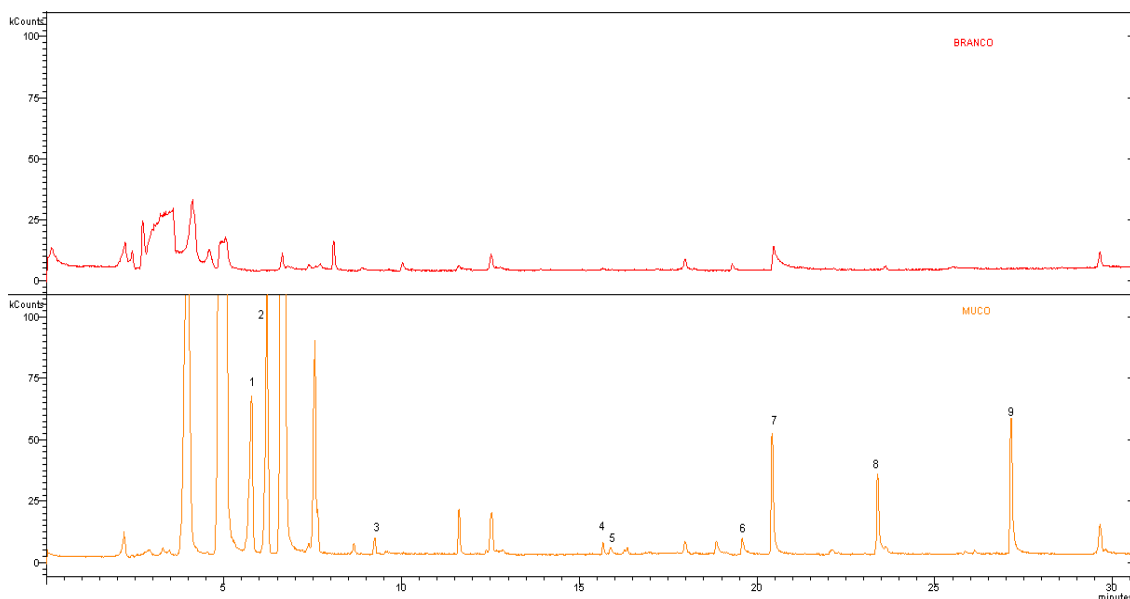
Tendo em vista que o muco de indivíduos adultos mostrou atratividade para jovens e filhotes, esforços foram direcionados no sentido de isolar e identificar possíveis voláteis presentes neste muco.

Nas análises para determinação de alguns compostos voláteis do muco a água utilizada nos viveiros também foi analisada, e observou-se que alguns compostos clorados presentes no muco também estavam presentes na água. Portanto os compostos clorados dos espectros do muco devem ser devido ao contato dos caramujos com a água tratada. O muco de diferentes indivíduos foi analisado nas mesmas condições, obtendo boa representatividade, ou seja, as substâncias encontradas no muco não variaram de um indivíduo para outro, conforme pode ser observado na Figura 35.



**Figura 35** - Cromatograma dos compostos isolados do muco de dois indivíduos diferentes de *A. fulica* adultos através da técnica de P&T.

O cromatograma representativo dos compostos identificados previamente no muco de *A. fulica* está representado na Figura 36 e os compostos listados na Tabela 15.



**Figura 36** - Cromatograma representativo dos compostos voláteis identificados do muco de *A. fulica*.

Observou-se que a composição do muco, quanto aos compostos majoritários, não varia de indivíduo para indivíduo que se encontra em uma mesma fase de desenvolvimento, porém as concentrações desses compostos variaram em indivíduos que se encontram em diferentes etapas do seu ciclo de desenvolvimento.

**Tabela 15** - Compostos coletados do muco de indivíduos *A. fulica* jovem e adulto, pela técnica de P&T identificados por CG-EM.

Nº	Composto	Tempo de Retenção (tr) (min)	Pico Base (m/z)
1	alceno	5,766	-
2	metil-hexeno	6,211	56
3	3-metil-ciclohexanol	9,255	-
4	2-nonenal, decenal	15,888	57
5	benzaldeído	18,326	105
6	octanal	19,593	43
7	nonanal ou nonenol.	23,395	41
8	5-metil-2-isopropil ciclohexanona	26,126	55
9	decanal ou ciclodecanol	27,154	67

Os compostos acima relacionados não foram identificados por ionização química, portanto é a sugestão mais provável, tendo em vista as características de fragmentação.

A identificação pelo índice de Kovatz também não foi possível, pois a técnica utilizada impossibilita a comparação com os índices já relatados em literatura.

Vários compostos do grupo aldeído, presentes em ambas as matrizes (leite e peixe) também foram identificados no muco de *A. fulica*. A identificação de alguns aldeídos também presentes no muco de *A. fulica* poderia assim explicar a atratividade de ambas as matrizes (leite e peixe) pelo animal. Levando em conta ainda a sua memória odorífera em relação ao ambiente de vida, como os aldeídos estão presentes no muco, eles podem ser indícios de comunicação química para a localização da área de vida.

Observou-se que os compostos octanal, nonanal, decanal (aldeídos de cadeias maiores) também estão presentes no leite fresco (OVERTON & MANURA, 1999), e também no peixe (IGLESIAS *et al*, 2007; FERSGAARD *et al*, 1999). No leite fresco apenas identificamos alguns aldeídos menores o que pode ser devido a variação desses compostos nesta matriz em relação ao seu estado de conservação, porém alguns autores identificaram esses compostos no leite também (OVERTON & MANURA, 1999). O octanal, nonanal e decanol foi identificado por nós, porém uma série de aldeídos de cadeia de 5 a 10 carbonos estão presentes em peixes e leite (OVERTON & MANURA, 1999; IGLESIAS *et al*, 2007; FERSGAARD *et al*, 1999). Ressalta-se ainda a diminuição desse grupo de compostos, que segundo Overton & Manura (1999), é típica da oxidação de lipídios e o fato disto contribuir para o desenvolvimento do odor característico da rancidez no leite o que reforça a influência desses compostos para atrair *A. fulica* uma vez que a matriz do leite azedo não apresentou atratividade.

A comprovação da eficiência desses compostos na atratividade de *A. fulica* se daria através de uma série de testes comportamentais no tubo em “Y”, para os diferentes estágios de desenvolvimento, com uma mistura desses compostos em concentrações variadas.

As confirmações mais eficientes poderiam ser realizadas através do cálculo do índice de Kovatz, porém devido à técnica de P&T utilizada, observou-se que os índices de Kovatz apresentavam uma considerável variação mesmo para compostos conhecidos. Isto deve ser devido ao método de injeção utilizado e ao tempo de dessorção do “Trap” e injeção na coluna, o qual foi programado para 4 minutos.

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados permitem inferir que a maioria dos caramujos gigantes africanos, independente do tamanho, se desloca em direção ao muco, porém tateiam os estímulos presentes no local antes da escolha. No entanto, o tempo para a escolha foi significativamente menor nos moluscos mais jovens em relação aos adultos o que pode ocorrer devido ao fato dos adultos serem mais territoriais, e os jovens mais errantes. Portanto, pode-se concluir que o muco deve conter compostos que auxiliam a comunicação química dos caramujos *A. fulica*, os quais podem ser de contato, ou voláteis.

Houve atração significativa do filhote de *A. fulica* para o adulto nos testes que foram efetuados no olfatômetro na forma de Y. Essa comunicação pode ser consequência da presença de compostos voláteis no corpo do animal ou no muco. Provavelmente essa comunicação possa ser interpretada como os filhotes buscando localizar o local escolhido pelos adultos para se estabelecerem através dos compostos emitidos pelo mesmo, tendo em vista que os adultos são mais sedentários e escolhem a área de vida em função de sua memória olfativa que está relacionada, entre outros fatores, com a melhor possibilidade de se procriarem.

Os resultados obtidos com a amônia indicam que este composto possa estar relacionado com os ciclos migratórios observados para *A. fulica*. Um estudo mais detalhado ainda é necessário para avaliar qual é o papel da amônia na comunicação química dos caramujos *A. fulica* e se ela tem alguma influência nos ciclos migratórios.

A cerveja, conhecida como um dos atrativos mais populares para caramujos, não apresentou eficiência nos testes efetuados em tubos em Y. Porém é importante salientar que a mesma não foi testada em diferentes estágios de decomposição, o que poderia levar a outros resultados.

Os atrativos B<sub>1</sub> (leite fresco) e D<sub>2</sub> foram os únicos que apresentaram atratividade significativa nos testes efetuados com jovens. Os compostos voláteis presentes nos dois atrativos foram identificados através da técnica de aeração em câmaras de vidro e posterior injeção em cromatografo gasoso acoplado à espectrometria de massas, porém o método P&T mostrou-se mais adequado para a captura dos compostos da fase aquosa e também devido à natureza da matriz que se decompõe facilmente.

Os compostos identificados no leite fresco foram diferentes nos métodos utilizados para a sua captura e identificação. O método de aeração possibilitou identificar duas metilcetonas, e uma série de ésteres metílicos. Foi ainda identificada a 1-(etilfenil)-etanona. Um composto deste tipo está presente no leite apenas após dois dias a

temperatura ambiente (OVERTON & MANURA, 1999) o que indica que a matriz pode estar se degradando com a utilização dessa metodologia. Assim sendo, o método de P&T mostrou-se mais adequado para o estudo dos compostos desta matriz, sendo que foram identificadas 4-metilcetonas, e um aldeído, os quais são citados por Overton e Manura (1999) como compostos voláteis do leite.

Os compostos voláteis do peixe foram identificados apenas com a utilização do método P&T. Verificou-se a presença de dimetilamina e trimetilamina, terpenos e outros 5 aldeídos, porém há a possibilidade de um deles ser uma metilcetona e os demais aldeídos foram confirmados por ionização química.

No muco de *A. fulica* foram identificados alguns aldeídos como o octanal, nonanal e decanal, que também estão presentes no leite e na matriz do peixe. Assim os compostos desse grupo podem ser os responsáveis pela atração de *A. fulica* abrindo a perspectiva de que uma mistura desses compostos em concentrações mais próximas possíveis da qual se encontram nos atrativos, deva ser atrativa para esses animais, o que pode ser comprovado com testes comportamentais no tubo em Y.

## 6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os compostos voláteis isolados das matrizes atrativas B<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>, bem como do muco de jovem e adulto, terão suas estruturas químicas determinadas por comparação com padrões e o respectivo tempo de retenção.

As metilcetonas e os aldeídos identificados neste trabalho, conjuntamente ou isoladamente com os sugeridos em literatura, devem ser testados frente a *A. fulica*, para avaliar sua capacidade de atrair os caramujos. Para as outras estruturas que ainda necessitam de confirmação também serão realizados testes comportamentais com uma mistura dos compostos identificados visando determinar suas atividades bem como avaliar a presença de efeito aditivo ou sinérgico. Os testes serão realizados em várias concentrações para avaliar a influência da concentração dos compostos.

A amônia também pode ser avaliada em concentrações ainda menores para avaliar qual o comportamento dos caramujos *A. fulica* em testes com concentrações menores que 0,01%.

Um estudo mais detalhado sobre os efeitos das concentrações de amônia nas áreas de vida dos animais é necessário, como também o seu papel no ciclo de migração dos caramujos *A. fulica*.

Caso os compostos já identificados neste trabalho mostrem efeito atrativo, podem propiciar estudos posteriores em campo e até mesmo o desenvolvimento de uma metodologia alternativa de controle, baseado em armadilhas seletivas de captura, o que possibilitará retirar do ambiente os indivíduos mais jovens, que são mais difíceis de serem retirados por catação.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFN – Agência Fiocruz de Notícias. **Sociedade Brasileira de Infectologia**. 2007. Disponível em <[infectologia.org.br/default.asp?mBusc\\_Palavras=parasito&site\\_Acao=Busc](http://infectologia.org.br/default.asp?mBusc_Palavras=parasito&site_Acao=Busc)> Acesso em 08 de fevereiro de 2008.

AGUIAR, P. H. P.; MORERA L.; PASCUAL, J.Eiba. First record of *Angiostrongylus cantonensis* in Cuba. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 30: 963–965. 1981.

ALICATA, J. E. The Discovery of *Angiostrongylus cantonensis* as a Cause of Human Eosinophilic meningitis. **Parasitol today**, 7:151-153. 1991.

ALOWE, S.; BROWNE, M.; BOUDJELAS, S. 2004. 100 of the world's worst invasive alien species. **A selection from the global invasive species database**. Disponível em <[www.issg.org/database](http://www.issg.org/database) [2004]>. Acesso em 20 de outubro de 2007.

AMORIN, J. P. & PESSOA, S. B. Experiência de alguns vegetais como moluscocida. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais** 14:254-260. 1962.

ANDERSEN, E., D. J. GUBLER, K. SORENSEN, J. BEDDARD, AND L. R. ASH. First report of *Angiostrongylus cantonensis* in Puerto Rico. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 35: 319–322. 1986.

ANONYMOUS, DPI Notes on Giant African Snail. **Animal and Plant Health Service**, DPJ, Queensland, p. 1-9. 2000. Extracellular Analysis of Nerve Responses. **Journal of Comparative Physiology** 149:221-234. 1982a.

BEQUAERT, J.C. Studies on the Achatinidae, a group of African land snails. **Bulletin of the Museum of Comparative Zoology**, Harvard 105, 1–216. 1950a.

BOUSFIELD, J. D. Rheotaxis and Chemoreception in the Freshwater Snail *Biomphalaria glabrata* (Say): Estimation of the Molecular Weights of Active Factors. **Biological Bulletin** 154:361-373. 1978.

BOFFI, A.V. Moluscos brasileiros de interesse médico e econômico. **FAPESP**. Editora Hucitec, 182 pp. 1979.

CAMPBELL, B. G., & LITTLE, M. D. The finding of *Angiostrongylus cantonensis* in rats in New Orleans. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 38: 568–573. 1988.

CARVALHO, O. D. S.; TELES, H. M.S.; MOTA, E. M.; MENDONÇA, C. L. G. F.; HENRIQUE, L.; Potentiality of *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca: Gastropoda) as intermediate host of the *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Céspedes 1971. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 36(6): 743-745, 2003.

CHAMBERLIN, J.L. *Final Report on an Ecology and Population Study of the Giant African Snail on Tinian, Marianas Islands*. Pacific Science Board of the National Research Council, **Invertebrate Consultants Committee for the Pacific**, pp. 27. 1952.

CHASE, R. Electrical responses of snail tentacle ganglion to stimulation of the epithelium with wind and odors. **Comp. Biochem. Physiol.** 70A:149-155.1981.

CHASE, R. The olfactory sensitivity of snails, *Achatina fulica*. **J. Comp. Physiol.** 148:225-235. 1982.

CHASE, R.; BOULANGER, C. M. Attraction of the snail *Achatina fulica* to extracts of conspecific pedal glands. **Behavioral biology**, 23: 107-111. 1978.

CHASE, R.; CROLL, R. P. Tentacular function in snail olfactory orientation. **Comp. Physiol.**, 143:357-362.1981.

CHASE, R., CROLL, R. P., ZEICHNER, L. L. Aggregation in snails, *Achatina fulica*. **Behavioral and neural biology**, 30:218-230.1980.

CHASE, R., PRYER, K., BAKER, R., MADISON, D. Responses to conspecific chemical stimuli in the terrestrial snail *Achatina fulica* (Pulmonata: Sigmurethra). **Behavioral biology**, 22: 302-315. 1978.

CHASE, R.; RIELING, J. Autoradiographic evidence for receptor cell renewal in the olfactory epithelium of a snail. **Brain Research**, 384: 232-239.1986.

CHASE, R.; TOLLOCZKO, B. Secretory glands of the snail tentacle and their relation to the olfactory organ (Mollusca, Gastropoda). **Zoomorphology**, 105:60-7. 1985.

CHASE, R.; TOLLOCZKO, B. Synaptic glomeruli in the olfactory system of a snail, *Achatina fulica*. **Cell and Tissue Research**, 246:567-573.1986.

CHELAZZI, G. L'È VOICI, G., PAPPAGNOLI, D. Relative importance of airborne odours and trails in the group homing of *Limacus flavus* (Linnaeus) (Gastropoda, Pulmonata). **J. Moll. Stud**, 54:173-180. 1988.

CHELAZZI, G. Eco-ethological aspects of homing behaviour in molluscs. **Ethological Ecology and Evolution** 2, 11–26. 1991.

CIVEYREL, L.. & SIMBERLOFF, D. A tale of two snails: is the cure worse than the disease? **Biodiversity and Conservation** 5, 1231–1252. 1996.

COOK, A. Behavioural ecology: on doing the right thing, in the right place at the right time. In: Barker, G.M. (ed.) *The Biology of Terrestrial Molluscs*. CAB International, Wallingford, pp. 447–487. 2001.

COOTE, T.; LOÈVE, É. From 61 species to five: Endemic tree snails of the Society Islands fall prey to an ill-judged biological control programme. **Oryx** 37: 91–96. 2003.

COSTA, L. R. R., J. J. MCCLURE, T. G. SNIDER III, AND T. B. STEWART. Verminous meningoencephalomyelitis by *Angiostrongylus cantonensis* in an American miniature horse. **Equine Veterinary Education** 12: 2–6. 2000.

COWIE R. H. Can snails ever be effective and safe biocontrol agents? **International Journal of Pest Management** 47: 23–40. 2001b.

CROLL, R. P. Gastropod chemoreception. **Biol. Rev.** 58:293-319. 1983.

CROLL, R. P.; CHASE, R. A long-term memory for food odors in the land snail, *Achatina fulica*. **Behavioral biology**, 19:261-268. 1977.

CROLL, R. P.; CHASE, R. Plasticity of Olfactory Orientation to Foods in the Snail *A. fulica*. **J. Comp. Physiol**, 136:267-277. 1980.

CROLL, R. P.; CHASE, R. Tentacular Function in Snail Olfactory Orientation. **J. Comp. Physiol**, 143:357-362. 1981.

CROLL R. P. Gastropod Chemoreception. **Biol. Rev.** 58:293-319. 1983.

COWIE, R. H. Patterns of introduction of non-indigenous non-marine snails and slugs in the Hawaiian Islands. **Biodiversity and Conservation** 7: 349-368. 1998.

COWIE, R.H. Non-indigenous land and freshwater molluscs in the islands of the Pacific: conservation impacts and threats. In: Sherley, G. (ed.) *Invasive Species in the Pacific: a Technical Review and Draft Regional Strategy*. South Pacific Regional Environment Programme, Apia, pp. 143–172. 2000.

COWIE, R. H. Can snail ever be effective and safe biocontrol agents? **International Journal of Pest Management** 47:23-40. 2001b.

CUELLAR, G.P. & CUELLAR, T. Caracoles. **Mundi Presa**. Madrid. 228. 1986.

DIAS, C. S.; COUTINHO, D. F. ; MOTA, S. G. R.; CABRAL, A. G. R.; MARTINS, R. M. ; ANALÚCIA, T. M. S. S.; CÂMARA, C. A.; BARBOSA FILHO, J. M. Análise do Óleo Essencial e Atividade Moluscicida de *Ocotea bracteosa* (lauraceae). In: **V Simpósio Brasileiro De Farmacognosia**, RECIFE-PERNAMBUCO. 2005.

DICKE, M.; SABELIS, M. W. Infochemical terminology: should it be based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds. **Funct. Ecol.**, v. 2, p. 131-139, 1988.

EDELSTAM, C., & PALMER, C. Homing Behaviour in Gastrópodes. **Oikos** 2, 259-270. 1950.

FISCHER, M. L. & COLLEY, E. Diagnóstico da ocorrência do caramujo gigante africano *Achatina fulica* Bowdich, na APA de Guaraqueçaba, Paraná, Brasil. **Estudos de Biologia**, 26: 43-50. 1822. 2004.

FISCHER, M. L. & COLLEY, E. Espécie invasora em reservas naturais: caracterização da população de *Achatina fulica* Bowdich, 1822. (Mollusca – Achatinidae)

Na Ilha Rasa, Guaraqueçaba, Paraná. **Biota Neotropica**, 5:1-18 ([www.biotaneotropica.com.br](http://www.biotaneotropica.com.br)). 2005.

FONSECA, J.P. Caramujo do cafeeiro. **Biológico** 2: 67-68. 1936.

FRANCO, D. O. & BRANDOLINI, S. V. P. B. Comportamento reprodutivo de *Achatina fulica* BOWDICH, 1822 (Mollusca Achatinidae) sob condições experimentais. **Zoociências**. 57-61, 2007.

GARDINER, C. H., S. WELLS, A. E. GUTTER, L. FITZGERALD, D. C. ANDERSON, R. K. HARRIS, AND D. K. NICHOLS. Eosinophilic meningoencephalitis due to *Angiostrongylus cantonensis* as the cause of death in captive non-human primates. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 42: 70–74. 1990.

GELPERIN, A. Olfactory basis of homing behaviour in the Giant Garden Slug, *Limax maximus*. **Proc. Nat. Acad. SCI. USA** 71, 966-970. 1974.

GRAEFF-TEIXEIRA, C., CAMILLO-COURA, L., LENZI, H. L. Histopathological Criteria for the Diagnosis of Abdominal Angiostrongyliasis. **Parasitol Res.**, 77:606-611. 1991a.

GRAEFF-TEIXEIRA, C., CAMILLO-COURA, L., LENZI, H. L. Clinical and Epidemiological Aspects of Abdominal Angiostrongyliasis in Southern Brazil. **Ver. Inst. Med. Trop.** 33:373-378. 1991b.

GHOSE, K.C. Observations on the mating and oviposition of two land pulmonates, *Achatina fulica* Bowdich and *Macrochlamys indica*. **Journal of the Bombay Natural History Society** 56, 183–187. 1959.

GOULD, S.J. Dedo mindinho e seus vizinhos. Ensaio de história natural. **Companhia das Letras**. São Paulo. 492 p. 1993.

HADFIELD M. G. Extinction in Hawaiian achatinelline snails. **Malacologia** 27: 67–81. 1986.

HADFIELD M. G.; MILLER S. E.; CARWILE A. H. The decimation of endemic Hawaiian tree snails by alien predators. **American Zoologist** 33: 610–622. 1993.

HODASI, J.K.M. Some observations on the edible giant land snails of West Africa. **World Animal Review** 52, 24–28. 1984.

HODASI, J.K.M. The potential for snail farming in West Africa. In: Henderson, I.F. (ed.) *Slugs and Snails in World Agriculture*. Monograph No. 41, **British Crop Protection Council**, Thornton Heath, pp. 27–31. 1989

HOPPER D. R.; SMITH B. D. Status of tree snails (Gastropoda: Partulidae) on Guam, with a resurvey of sites studied by H. E. Crampton in 1920. **Pacific Science** 46: 77–85. 1992.

INSTITUTO HÓRUS DE DESENVOLVIMENTO E CONSERVAÇÃO AMBIENTAL. Base de dados de espécies exóticas invasoras. Disponível em: <www.institutohorus.org.br>. Acesso em: 19 fev. 2008.

IRELAND, M. P. The effect of dietary calcium on growth, shell thickness and tissue calcium distribution in the snail *Achatina fulica*. **Comparative-Biochemistry - Physiology**. 98:1, 111-116, 1991.

JEONG, J., TOIDA, T., MUNETA, Y., KOSIISHI, I., IMANARI, T., LINHARDT, R.J., CHOI, H.S., WU, S.J., KIM, Y.S. Localization and characterization of acharan sulfate in the body of the giant African snail *Achatina fulica*. **Comp. Biochem. Physiol.**, B. 130, 513–519. (2001)

KEKAUOHA, W. Life history and populations studies of *Achatina fulica*. **Nautilus**, 80:3-10, 1966.

KLIKS, M. M., PALUMBO, N. E. Eosinophilic Meningitis Beyond the Pacific Basin: the Global Dispersal of a Peridomestic Zoonosis Caused by *Angiostrongylus cantonensis*, the Nematode Lungworm of Rats. **Social Sciences and Medicine**, 34:199-212. 1992.

KLOPFER, P.H.; HATCH, J. J. Experimental considerations In : Sebeok, T.A. (ed.), **Animal communication**., University of Indiana Press, Bloomington, 1968.

KONDO, Y. (1964) Growth rates in *Achatina fulica* Bowdich. **The Nautilus** 78, 6–15. 1964.

KOSLOSKI, M. A. & FISCHER, M. L. Primeira ocorrência de *Achatina fulica* (Bowdich, 1822) no litoral do Estado do Paraná (Mollusca; stylommatophora; Achatinidae). **Estudos de Biologia**, 24: 65-69, 2002.

LAMBERT, M. The African giant snail, *Achatina fulica*, in the Pacific islands. **South Pacific Bulletin** 24, 35–40. 1974

LANGE, W.H. Life history and feeding habits of the giant African snail on Saipan. **Pacific Science** 4, 323–325. 1950.

LEEFMANS, S. Voorloopige mededeeling inzake de bestrijding van *Achatina fulica* Fér. in Batavia. Landbouw, **Landbouwkundig Tijdscher voor Nederlandsch-Indie** 9, 289–298. 1933.

LEMAIRE, M.; CHASE, R. Twitching and quivering of the tentacles during snail olfactory orientation. **J. Comp. Physiol.** A, 182:81-87, 1998.

LEYTON, V.; HENDERSON T. O.; MASCARA D.; KAWANO T. Atividade moluscicida de princípios ativos de folhas de *Lycopersicon esculentum* (Solanales,

Solanaceae) em *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Planorbidae). **Sér. Zool.** 95(2):213-216. 2005.

LEWIS, B. AND GOWER, M. Biology of communication. **Blackie, Lodon**, p. 239, 1980.

LYDEARD, C.; COWIE, R. H.; PONDER, W. F.; BOGAN, A. E.; BOUCHET, P.; CLARK, S. A.; CUMMINGS, K. S.; FREST, T. J.; GARGOMINY, O.; HERBERT, D. G.; HERSHLER, R.; PEREZ, K. E.; ROTH, B.; SEDDON, M.; STRONG, E. E.; THOMPSON, F. G. The Global Decline of Nonmarine Mollusks. **BioScience**, 4:54, 2004.

LORENZI, A. T.; MARTINS, M. F. Análise Colorimétrica e Espectroscópica do Muco de Caracóis Terrestres *Achatina* sp Alimentados com Ração Diferenciada. **Revista Brasileira de Zootecnia / Brazilian Journal of Animal Science**, v. 37, p. 572/6413-579, 2008.

MARTINS, M. F.; CAETANO, F. A. M.; SÍRIO, O. J.; YIOMASA, M. M.; MIZUSAKI, C. I.; FIGUEIREDO, L. D.; PACHECO, P. Avaliação do reparo de lesões de pele de coelhos tratadas com secreção mucoglicoproteica do escargot *Achatina fulica*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 1-1, 2003.

MARTINS, M.F; GIRALDI, G.M; LIMA, P.M.P.S; SOLANO M.; LIMA A.M.; FRISSON R.S. ; YOKOYA E. Utilização de iscas para atração e captura de escargots *Achatina fulica* em terrenos baldios da região de Pirassununga-SP. In: **Combravet**, 2007, Santos. 34 **Combravet**, 2007.

MCCULLOUGH, F. S.; GAYRAL, P.; DUNCAN, J. & CHRISTIE, J. D. Molluscicides in schistosomiasis control. **Bulletin of the World Health Organization** 58(5):681-689. 1980

MEAD, A.R. The giant snails. **Atlantic Monthly** 184(2), 38–42. 1949.

MEAD, A.R. Comparative genital anatomy of some African Achatinidae (Pulmonata). **Bulletin of the Museum of Comparative Zoology**, Harvard 105, 217–291. 1950a.

MEAD, A.R. The giant african snail: A problem in economic malacology. Chicago: **University of Chicago published**. 1961.

MEAD, A.R. Economic malacology with particular reference to *Achatina fulica*. In: Fretter, V. and Peake, J. (eds) Pulmonates, Vol. 2B. **Academic Press**, London, 150 pp. 1979a.

MEAD, A.R. Economic malacology with particular reference to *Achatina fulica*. In: Fretter, V. and Peake, J. (eds) Pulmonates, Vol. 2B. **Academic Press**, London, pp. 150. 1979a.

MEAD, A.R. The giant African snails enter the commercial field. **Malacologia** 22, 489–493. 1982.

MEAD, A.R. Anatomy, phylogeny, and zoogeography in the African land snail family Achatinidae. In: Proceedings of the 12th International Malacological Congress, **Vigo**. 422–423. 1995.

MEAD, A.R. Comparative anatomy establishes correlativity in distributional direction and phylogenetic progression in the Achatinidae. In: Bieler, R. and Mikkelsen, P.M. (eds) Abstracts, World Congress of Malacology, Washington D.C. Field Museum of Natural History, Chicago, for **Unitas Malacologica**, p. 214. 1998.

MENDES, N. M.; PEREIRA, J. P.; SOUZA, C. P. & AZEREDO, M. L. L. Ensaios preliminares em laboratório para verificar a ação moluscicida de algumas espécies da flora brasileira. **Revista de Saúde Pública** 18:348-354. 1984

MMA - MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Lista das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção. 2003. Ibama. Disponível em: <[www.ibama.gov.br/fauna/downloads/lista%20spp.pdf](http://www.ibama.gov.br/fauna/downloads/lista%20spp.pdf)>. Acesso em 10/ago/2007.

MONNEY, K.A. Notable notes on giant African snails. **Snail Farming Research** 5, 1–13. 1994.

MUNIAPPAN R. Use of the planarian, *Platydemus manokwari*, and other natural enemies to control the giant African snail. Pages 179–183 in BAY-PETERSEN J, ed. The Use of Natural Enemies to Control Agricultural Pests. Taipei (Taiwan): **Food and Fertilizer Technology Center for the Asian and Pacific Region**. 1990.

MURRAY, J; MURRAY, E; JOHNSON M. S.; CLARKE, B. The extinction of *Partula* on Moorea. **Pacific Science** 42: 150–153. 1988.

NEW, D.; M. D. LITTLE, AND J. CROSS. **Angiostrongylus cantonensis infection from eating raw snails**. New England Journal of Medicine 332: 1105–1106. 1995.

NISBET, R.H. The life of Achatinidae in London. **Proceedings of the Malacological Society of London** 41, 171–183. 1974.

NORLUND, D. A. AND LEWIS, W. J. Terminology of chemical-releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. **J. Chem. Ecol.** v. 2, p. 211-220, 1976.

NUMASAWA, K. AND KOYANO, S. Investigation of the ecology of giant African snail, *Achatina fulica*, in Ogasawara Islands. **Annual Report of the Ogasawara Subtropical Agriculture Centre**. 106–128. 1987.

OLSON, F.J. The screening of candidate molluscicides against the giant African snail, *Archatina fulica* Bowdich (Stylommatophora: Achatinidae). **Thesis**, University of Hawaii. 1973

OLUFOKUNBI, B., PHILLIPS, E.O., OMIDIJI, J.O., OGBONNA, U.O., MAKINDE, H.T. and APANSILE, O.J The economics of commercial domestication of the African giant land snail *Achatina* (*Calachatina*) *marginata* (Swainson) in Nigeria. In: Henderson, I.F. (ed.) *Slugs and Snails in World Agriculture*. Monograph No. 41, **British Crop Protection Council**, Thornton Heath, pp. 41–48. 1989.

PAWSON, P.A. AND CHASE, R. The life-cycle and reproductive activity of *Achatina fulica* (Bowdich) in laboratory culture. **Journal of Molluscan Studies** 50, 85–91. 1984.

PENA, G. P. M., ANDRADE FILHO, J. S.; ASSIS, S. C. *Angiostrongylus costaricensis*: First Record of Its Occurrence in the State of Espírito Santo, Brazil and Review of its Geographic Distribution. **Rer. Inst. Med. Trop.** 37:369-374. 1995.

PETERSON, G.D. Studies on control of the giant African snail on Guam. *Hilgardia* 26, 643–658. Pilsbry, H.A. (1904) Family Achatinidae. In: Tryon, G.W. and Pilsbry, H.A. (eds) **Manual of Conchology**, Vol. 16. Academy of Natural Sciences, Philadelphia, pp. 205–329. 1957c.

PILSBRY, H.A. Family Achatinidae. In: Tryon, G.W. and Pilsbry, H.A. (eds) *Manual of Conchology*, Vol. 16. **Academy of Natural Sciences**, Philadelphia, pp. 205–329. 1904.

PILSBRY, H.A. (1919) A review of the land mollusks of the Belgian Congo, chiefly based on the collections of the American Museum Congo Expedition, 1909–1915. **American Museum of Natural History Bulletin** 40, 370 pp., 23 pls 1919.

RAUT, S.K. Studies on the aestivating population of *A. fulica* Bowdich (Mollusca: Achatinidae) in West Bengal. **Bulletin of the Zoological Survey of India** 1, 243–246. 1978.

RAUT, S K; BARKER, G M. Capítulo 3: *Achatina fulica* Bowdich and other Achatinidae as Pests in Tropical Agriculture. In: BARKER, G M; **Molluscs as Crop Pests**. New Zealand: Ed. CAB Publishing, 55-114. 2002.

RAUT, S.K. AND GHOSE, K.C. Food preferences and feeding behaviour in two land snails, *Achatina fulica* Bowdich and *Macrochlamys indica* Godwin-Austen. **Records of the Zoological Survey of India** 80, 421–440. 1983a.

RAUT, S.K. and GHOSE, K.C. *Pestiferous Land Snails of India*. Zoological Survey of India No. 11, **Bani Press**, Calcutta, 151 pp. 1984.

RAUT, S.K. Population dynamics of the pestiferous snail *Achatina fulica* (Gastropoda: Achatinidae). **Malacological Review** 24, 79–106. 1991.

RAVIKUMARA J. Evaluation of Attractant Waste Material and Bait for the Management of Giant African Snail, *Achatina fulica* Bowdich. **Agric. Sci.**, 20(2): (288-290) 2007.

- REES, W.J. The giant African snail. **Proceedings of the Zoological Society of London** 120, 577–598. 1951
- REEVE, L.A.. Monograph of the genus *Helix*. **Conchologia Iconica** 7: 210 pls.1854.
- RIOS F.R., JACINAVICIUS F.C., MOLINA F.B.. Taxa de Ecloração em Ovos de *Megalobulimus Aff. Ovatus* (Gastropoda, Pulmonata, Megalobulimidae) Incubados em Laboratório. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.71, (supl.), p.1-749, 2004.
- ROUQUAYROL, M. Z.; SOUZA, M. P. & SILVA, M. J. M. Atividade moluscicida de plantas do nordeste brasileiro (III). **Revista Brasileira de Farmacologia** 53(5):215-220. 1972.
- SAKAE, M. Investigation of giant African snail, *Achatina fulica*, in Amami-Oshima Island, Japan. In: **Annual Report of the Oshima Agricultural Centre**. 106–128. 1968.
- SANTOS, S.B, MONTEIRO, D.P, THIENGO, S.C. *Achatina fulica* (MOLLUSCA, ACHATINIDAE na Ilha Grande, Angra dos Reis, Rio de Janeiro: implicações para saúde ambiental. **Biociências**, 10: 159 – 152. 2002.
- SCHMIDT, N. K. Fisiologia Animal Adaptação e Meio Ambiente. **Editores Santos**: São Paulo, 327 pp. 1996.
- SCHMIDT & NILSEN, K. Fisiologia Animal Adaptação e Meio Ambiente. **Editores Santos**: São Paulo. 327. 1996.
- SCHWANKE, C.; MELO, D. J. Organização de Coleções Didáticas em Paleontologia. In: Encontro Perspectivas do Ensino de Biologia, São Paulo. **Coletânea de Trabalho do VII EPEB**. São Paulo : USP, 2002. p. 1-3. 2002.
- SHOREY, H. H. “Animal Communication by Pheromones”. **New York: Academic Press**.
- SILVA, A. C. A., GRAEFF-TEIXEIRA, C., ZAHA, A. Diagnosis of Abdominal Angiostrongyliasis by PCR from Será of Patients. **Rev. Inst. Med. Trop.** 45:295-297. 2003.
- SILVA, J. C. B.; Testes de Sensibilidade em *Achatina Fulica* Bowdich 1822 (Caramujo Gigante African). **Ciências Biológicas**. 2007
- SILVA, M. J. M.; SOUZA, M. P. & ROUQUAYROL, M. Z. Atividade moluscicida de plantas do nordeste brasileiro II. **Revista Brasileira de Farmácia** 52(3):117-123. 1971.
- SIMIÃO, M. S.; FISCHER, M. L. Estimativa e inferências do método de controle do molusco exótico *Achatina fulica* Bowdich 1822 (Stilommatophora; Achatinidae) em Pontal do Paraná, litoral do Estado do Paraná. **Cadernos da Biodiversidade**, Curitiba, v. 4, p. 74-83, 2004.

SIMBERLOFF, D. & GIBBONS, L. Now you see then, now you don't – population crashes of established introduced species. **Biological Invasions**, 6:161-172, 2004.

SIMONE, L. R. L. Mollusca Terrestres. In: BRANDÃO, R. F.; CANCELLO, E. M. (Ed.). **Invertebrados terrestres**. São Paulo: FAPESP, p. 3-8. (Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil, v. 5). 1999.

SOLEM, A. Endodontoid Land Snails from Pacific Islands (Mollusca: Pulmonata: Sigmurethra), pt. 1: Family Endodontidae. Chicago: **Field Museum of Natural History**. 1976.

SOLEM, A. Biogeographic significance of land snails, Paleozoic to Recent. In: Gray, J. and Boucot, A.J. (eds) Historical Biogeography, Plate Tectonics, and the Changing Environment. **Oregon State University Press**, Corvallis, 277–287. (1979a).

SRIVASTAVA, P.D. Problem of Land Snail Pests in Agriculture: a Study of the Giant African Snail. **Concept Publishing Company**, New Delhi, 234 pp. 1992.

SUZUKI, H. Investigation of ecology and extirpation of giant African snail, *Achatina fulica*, in Okinawa. In: **Annual Report on Applied Zoology at the Okinawa Agricultural Centre**. 47–51. 1981.

SUZUKI, H. AND YASUDA, K. Studies on ecology and control of the giant African snail, *Achatina fulica*, in Okinawa Island. (1) The optimal period for control with metaldehyde. **Annual Report of the Okinawa Agricultural Centre** 8, 43–50. 1983.

RUNHAM, N.W. Snail farming in the UK. In: Henderson, I.F. (ed.) Slugs and Snails in World Agriculture. Monograph 41, **British Crop Protection Council**, Thornton Heath, pp. 49–55. 1989.

TAKEDA, N.; TSURUOKA, H. A sex Pheromone Secreting Gland in the Terrestrial Snail, *Euhadra peliomphala*. **Journal of Experimental Zoology**. 207:17-26. 1979.

TATTERSFIELD, P.; SEDDON, M. B.; MEENA, C.; KAYUMBO N.; KASIGWA, P.; Ecology and Conservation of the Land-snail of the Eastern Arc Mountains. **Journal of East African Natural History** 87: 119-138, 1998.

TELES, H.M.S.; VAZ, J.F.; FONTES, L. R. & DOMINGOS, M F. Registro de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca, Gastropoda) no Brasil: caramujo hospedeiro intermediário da angiostrongilíase. **Rev. Saúde Pública**, 31: 310-312, 1997.

TELES, H. M. S., FONTES, L. R. Angiostrongilíase e escargot: nova ameaça à saúde pública. **Secretários de Saúde** 30:24-26. 1998a.

TELES, H. M. S., FONTES, L. R. Escargot: mais um perigo á mesa. Nova ameaça à saúde pública e à agricultura. **Vetores & Pragmas**, 1:4-8. 1998b.

THIELE, J. Handbuch der Systematischen Weichtierkunde. **Jena**. 778. 1931

THIENGO, S. A. R. C. Pesquisa de larvas do nematódeo *Angiostrongylus costaricensis*, agente etiológico da angiostrongilose abdominal, em amostras do molusco exótico *Achatina fulica* Bowdich, 1822 enviadas pelas **Secretarias Municipais de Saúde do Estado do Rio de Janeiro**. 2003.

THIENGO, S. A. R. C. ; FERNANDEZ, Monica Lemos Ammon . Status of *Melanoides tuberculatus* in Brasil. In: 70th Annual Meeting of the American Malacological Society, 2004, Sanibel, Florida, USA. Anais do 70th **Annual Meeting of the American Malacological Society**, 2004. p. 89.

THOMAS, J. D. & ASSEFA, B. Behavioural responses to amin acids by juvenile *Biomphalaria glabrata*, a snail host of *Schistosoma mansoni*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 63C, 99-108. 1979

THOMAS, J. D.; ASSEFA, B.; COWLEY, C.; OFOSU-BARKO, J. Behavioural responses to amin acids and related compounds, including propionic acid, by adult *Biomphalaria glabrata* (Say), a snail host of *Schistosoma mansoni*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 66C, 17-27. 1980.

TOMIYAMA, K. Homing behavior of the giant African snail, *Achatina fulica* (Ferussac) (Gastropoda; Pulmonata). **J. Ethol.**, 10: 139-147, 1992.

TOMIYAMA, K. Growth and maturation pattern in the African giant snail, *Achatina fulica* (Ferussac) (Stylommatophora: Achatinidae). **Venus** 52,87–100. 1993.

TOMIYAMA, K. Mate-Choice criteria in a protandrous simultaneously hermaphroditic land snail *Achatina fulica* (Ferussac) (Stylommatophora: Achatinidae). **J. Mollscan Stud.**, 62: 101-111, 1996.

TOMIYAMA, K. Age dependency of sexual role and reproductive ecology in a simultaneously hermaphroditic land snail, *Achatina fulica* (Stylommatophora: Achatinidae). **Venus-Tokyo**, 60: 273-283, 2002.

TOMIYAMA, K. & MIYASHITA, K. Variation of egg clutches in the giant African snail, *Achatina fulica* (Ferussac) (Stylommatophora: Achatinidae) in Ogasawara Islands. **Venus** 51, 293–301. 1992.

TOMIYAMA, K. & NAKANE, M. Dispersal patterns of the giant African snail, *Achatina fulica* (Ferussac) (Stylommatophora: Achatinidae), equipped with a radio-transmitter. **J. Molluscan Std.**, 3: 315-322, 1993.

UHAZY, I. S., TANAKA, R.D., MACCINIS, A. J. *Schistosoma mansoni*: Identification of Chemicals that attract or Trap its Snail Vector, *Biomphalaria glabrata*. **Science** 201:924-926. 1978.

UPATHAM, E.S., KRUAETRACHU, M. AND BAIDIKUL, V. Cultivation of the giant African snail, *Achatina fulica*. **Journal of the Science Society of Thailand** 14, 25–40. 1988.

van BRUGGEN, A.C. Studies on the land molluscs of Zululand with notes on the distribution of land molluscs in southern Africa. **Zoologische Verhandelingen Leiden** 103, 1–116. 1969.

van BRUGGEN, A.C. Aspects of the diversity of the land molluscs of the Afrotropical Region. **Revue de Zoologie Africaines** 100, 29–45. 1986.

van BRUGGEN A. C. Biodiversity of Mollusca: Time for a new approach. Pages 1–19 in van Bruggen AC, Wells SM, Kemperman TCM, eds. **Biodiversity and Conservation of the Mollusca**. Oegstgeest-Leiden (The Netherlands): Backhuys. 1995.

van DEER MEER MOHR, J.C. On the reproductive capacity of the giant African or giant land snail, *Achatina fulica* (Fer.). **Treubia** 20, 1–10. 1949a.

van LEEUWEN, D. Notes and comments, conchology, *Achatina fulica*. **Hong Kong Naturalist** 3, 71. 1932.

van WEEL, P.B. Some notes on the African giant snail, *A. fulica* Fer. I. On its spread in the Asiatic tropics. II. On its economic significance. III. On its biological balance and means of destruction. **Chronica Naturae** 104, 241–243, 278–280, 335–336. 1948/49.

VASCONCELLOS, M. C. & PILE, E. Ocorrência de *Achatina fluica* no Vale do Paraíba, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rev. Saúde Pública** 35: 582-584. 2001.

VAUGHT, K.C. A classification of the living Mollusca. American Malacologists, **Inc. Melbourne**. 189p. 1989.

VENTURA, M. U., PANIZZI A. R., PISSINATI, A., SILVA J. J., ARRUDA-GATTI, I., MIKAMI A. Y. Attraction of *Neomegalotomus parvus* (Heteroptera: Alydidae) by Cow Urine and Ammonia. **Science Agricola**. no prelo.

VERDCOURT, B. *Achatina fulica* hamillei (Petit) in the Kavirondo district of Kenya. **Journal of Conchology** 25, 34–35. 1961.

von STANISLAUS, K., MORKRAMER, G., PETERS, K.J. AND WAITKUWAIT, E. Opportunities for utilizing the African giant snail. In: Siegmund, R. (ed.) Untersuchungen für Wachstumsund Reproduktionsleitung Beider Achatschnecke. **Diplomarbeit am Institute für Tierzucht und Hanstiergenetik der Universitat Gottingen, Gottingen**, pp. 60–71. 1987.