



COLOFONIA DE PINÁCEAS CUBANAS PARA EL CONTROL DE ENFERMEDADES TROPICALES TRANSMITIDAS POR MOLUSCOS

ROSIN OF CUBAN PINES FOR THE CONTROL OF TROPICAL ILLNESSES TRANSMITTED BY MOLLUSKS

Y. Arteaga-Crespo¹; L. R. Carballo-Abreu¹; R. Sotolongo-Sospedra¹; Y. Hevia-Jiménez¹; J. E. Tacoronte-Morales²

¹Universidad de Pinar del Río, Calle Martí, 270 Final. Pinar del Río. CUBA. C. P. 20100.

²Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Autopista Novia del Mediodía km 6 ½. Lisa. Ciudad de La Habana, CUBA, A. P. 601.

RESUMEN

La esquistosomiasis, enfermedad tropical transmitida por molusco, ocupa el segundo lugar en enfermedades parasitarias después de la malaria. En Cuba no existe la esquistosomiasis aunque sí el riesgo a contraerla, puesto que en nuestra fauna se encuentran especies que pueden actuar como hospederos intermediarios del tremátodo causante de la enfermedad. El objetivo del trabajo fue evaluar el polvo de colofonia sobre larvas de *Biomphalaria havanensis* para el control de vectores que propagan la esquistosomiasis, según la metodología desarrollada por la Organización Mundial para la Salud (OMS) y descrita por Mott para la evaluación de plantas con acción molusquicida. Los resultados del estudio sugieren la acción molusquicida de colofonia obtenida de pináceas cubanas (*Pinus caribaea* y *Pinus tropicalis*) sobre larvas de *Biomphalaria havanensis* en dosis letales (DL_{50} y DL_{90}) son 44, 33 mg·L⁻¹ y 141, 76 mg·L⁻¹, respectivamente. La ecuación de regresión correspondiente fue: $Y = -0,412 + 1,086 \ln X$ con un valor del coeficiente de correlación R 0,99 y error estándar 0,13. Las dosis revelan la efectividad de los componentes presentes en la colofonia, resultados comparables con publicaciones de extractos de otras especies de plantas.

Recibido: 6 de abril, 2009
 Aceptado: 11 de noviembre, 2009
 doi: 10.5154/r.rchscfa.2009.04.009
<http://www.chapingo.mx/revistas>

PALABRAS CLAVE: colofonia, dosis letal, *Biomphalaria havanensis*.

ABSTRACT

Schistosomiasis is the second most common parasitic disease (after malaria) contracted by humans worldwide. It does not exist in Cuba, although the risk of it developing here is ever-present since there are species in our fauna that can act as intermediate hosts for the trematode responsible for the tropical illness. The objective of this study was to evaluate rosin powder on *Biomphalaria havanensis* larvae for the control of the vectors that spread schistosomiasis, according to the methodology developed by the World Health Organization (WHO) and described by Mott for the evaluation of plants with molluscicidal action. The study results suggest that the molluscicidal action of rosin from Cuban species of pines (*Pinus caribaea* y *Pinus tropicalis*) on *Biomphalaria havanensis* larvae in lethal doses (DL_{50} and DL_{90}) are 44, 33 mg·L⁻¹ and 141, 76 mg·L⁻¹, respectively. The regression equation was: $Y = -0,412 + 1,086 \ln X$ with a value of the correlation coefficient R 0,99 and standard error 0,13. The doses reveal the effectiveness of the components present in rosin; similar results have been reported for other plant extracts.

KEY WORDS: rosin, lethal doses, *Biomphalaria havanensis*.

INTRODUCCIÓN

La esquistosomiasis es la segunda parasitosis, después de la Malaria, (Greenwald, 2005) que afecta a la humanidad a nivel mundial (Bierman *et al.*, 2005). La enfermedad la padecen 200 millones de personas anualmente, con un intervalo de mortalidad estimado en más de 200 mil enfermos por año (Greenwald, 2005; Grobusch *et al.*, 2003). Se considera que existen cerca de 600 millones

INTRODUCTION

Schistosomiasis is the second most common parasitic disease, after malaria (Greenwald, 2005), contracted by humans worldwide (Bierman *et al.*, 2005). The disease affects 200 million people annually, with an estimated mortality rate of more than 200 thousand per year (Greenwald, 2005; Grobusch *et al.*, 2003). Close to 600 million people are considered to be at risk of contracting it, distributed over 74

de personas con riesgo de contraerla, repartida en 74 países de África, las islas del Caribe, América Latina, el Mediterráneo Oriental y el Sudeste Asiático (Corachán, 1995). La esquistosomiasis no existe en Cuba aunque sí el riesgo, puesto que en nuestra fauna malacológica se encuentran especies que pueden actuar como hospederos intermediarios del trematodo causante de la enfermedad (Llop, 2001; Rojas *et al.*, 2008). Estudios parasitológicos y epidemiológicos han demostrado que eliminando al molusco vector, es decir rompiendo al eslabón más débil del ciclo de vida, se puede controlar o eliminar hasta niveles contaminantes no peligrosos (Quintana, 2007). Entre los métodos de control de moluscos el más utilizado es el químico (Paraense, 2001); sin embargo, el elevado costo de los productos químicos, así como su toxicidad para la biota acompañante han hecho que desde hace muchos años los trabajos se orienten hacia la extracción de productos de origen botánico, debido a que son selectivamente activos, biodegradables, ecosostenibles, económicos y fácilmente disponibles en las áreas afectadas por esquistosomiasis (Yong y Rodríguez, 1994).

El empleo de colofonia como potenciales precursores de materias primas estructuralmente interesantes y factibles de transformaciones sintéticas, es una variante que merece la atención, orientada hacia la transformación y obtención de genéricos, denominados, modificados de colofonia, que por su naturaleza constituyen precursores sustentables de novedosos agentes útiles en la agroquímica, química fina farmacéutica y en la química ecológica nacional y territorial, incluyendo el control de vectores de enfermedades tropicales, prioridades de la ciencia y la innovación tecnológica en la proyección 2000-2010 de Cuba (Arteaga *et al.*, 2007).

El mercado internacional del siglo XXI en productos forestales no maderables tiende hacia la producción de derivados con elevados índices y parámetros de calidad, generados a partir de derivados y materias primas renovables, ecológicamente sustentables. Esto orienta hacia el desarrollo y diseño en el mercado de la Industria Forestal Nacional Cubana y sus subproductos no maderables.

El objetivo del estudio fue evaluar el polvo de colofonia sobre larvas de *Biomphalaria havanensis* para el control de vectores que propagan la esquistosomiasis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de las muestras de colofonia

La colofonia se obtiene por destilación de mezclas de resinas de *Pinus caribaea* y *Pinus tropicalis* procedentes de la planta de destilación de resinas, Ciudad Industrial, Pinar del Río, Cuba.

La colofonia se tritura hasta polvo fino entre 0, 1 - 0, 2 mm y se evalúa sobre larvas de *Biomphalaria havanensis*.

African countries, the Caribbean islands, Latin America, the Middle East and Southeast Asia (Corachán, 1995). Schistosomiasis does not exist in Cuba, although the risk of it becoming established here does since there are species in our malacological fauna that can act as intermediate hosts for the trematode responsible for the disease (Llop, 2001; Rojas *et al.*, 2008). Parasitological and epidemiological studies have shown that by eliminating the mollusk vector (that is, breaking the weakest link in the lifecycle), it can be eliminated or controlled to non-dangerous contaminant levels (Quintana, 2007). Among the most-used mollusk control methods is the chemical option (Paraense, 2001); however, the high cost of these chemical products, as well as their toxicity for the accompanying biota, has redirected efforts for several years now towards the extraction of products of botanical origin, since they are selectively active, biodegradable, eco-sustainable, economical and readily available in the areas affected by schistosomiasis (Yong and Rodríguez, 1994). The use of rosin as potential precursors of structurally interesting and feasible raw materials of synthetic transformation is a variant that merits attention, oriented towards the transformation and obtaining of generic compounds (called modified rosin), which by their nature constitute sustainable precursors of innovative, useful agents in agrochemistry, the production of fine pharmaceuticals, and in national and territorial ecological chemistry, including the control of vectors of tropical diseases, priorities of science and technological innovation in Cuba's 2000-2010 projection (Arteaga *et al.*, 2007).

The international market of the XXI century in non-timber forest products is moving towards the production of derivatives with high indices and quality parameters, generated from derivatives and renewable, ecologically sustainable raw materials. As a result of this trend, the Cuban National Forest Industry is stepping up efforts related to the design and development of non-timber byproducts.

The objective of this study was to evaluate rosin powder on *Biomphalaria havanensis* larvae for the control of vectors that spread schistosomiasis.

MATERIALS AND METHODS

Obtaining rosin samples

The rosin is obtained by distilling *Pinus caribaea* y *Pinus tropicalis* resin mixtures from the resin distillation plant, Ciudad Industrial, Pinar del Río, Cuba.

The rosin is ground into fine powder between 0, 1 - 0, 2 mm and is evaluated on *Biomphalaria havanensis* larvae.

Molluscicidal Action

Species of mollusk:

Biomphalaria havanensis: family Planorbidae endemic to

Acción molusquicida

Especie de molusco:

Biomphalaria havanensis: familia *Planorbidae* endémico de Cuba. Fue colectado en la localidad del Instituto "Pedro Kouri" (IPK) en cuerpo de agua muy próximo a las instalaciones y actualmente se mantiene y reproduce en el laboratorio. Se trabaja con el polvo de colofonia según la metodología desarrollada por la OMS y descrita por Mott (1987) para la evaluación de plantas molusquicidas.

Determinación de las dosis letales (DL_{50} y DL_{90})

Se realizan pruebas de efectividad del producto, para ello se colocan cuatro moluscos en peceras de 400 mL y se le adiciona el producto. Se utiliza para dicha prueba la concentración máxima ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) dada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (WHO, 1983; Mott, 1987). Se observa la efectividad del producto (mortalidad) a las 24 h, posteriormente se procede a la determinación de las dosis letales: se prueban siete concentraciones. Cada concentración se replica siete veces, con cuatro moluscos por réplica.

Se utiliza un control por concentración, el cual está compuesto por agua y solución salina fisiológica. Cada control tiene una concentración de solución salina fisiológica equivalente a las concentraciones probadas. La colofonia se diluye en disolución salina fisiológica e hidróxido de sodio hasta una concentración de 1 g en 100 mL. Esta disolución se toma como disolución madre, a partir de la cual se obtienen las concentraciones previstas en agua.

Se utilizan frascos de 400 mL donde se adicionan los caracoles y las soluciones con las concentraciones del estudio.

Los moluscos se exponen al molusquicida durante 24 h, se realiza el conteo de los muertos. Los vivos se colocan en recuperación (peceras con agua (sin tratamiento con cloro), usando una por cada concentración probada) durante 48 h. Pasado este tiempo se observan de nuevo para detectar si existen nuevos moluscos muertos. Esto es posible de determinar por la observación al estereoscopio de los latidos del corazón. Con el número total de muertos se realiza la prueba estadística (Raymond, 1985), que permite determinar las dosis letales (DL_{50} y DL_{90}). Después de determinar las dosis letales se realiza esta prueba tres veces para comparar los resultados mediante un análisis de varianza y demostrar la reproducibilidad de los experimentos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las características de la biología y ecología de la especie *Biomphalaria havanensis*: familia *Planorbidae* endémico de Cuba han sido estudiadas tanto en condiciones

Cuba. It was collected in the vicinity of the Instituto "Pedro Kouri" (IPK) in a nearby water body, and it is now maintained and reproduced in the laboratory. The rosin powder is handled according to the methodology developed by WHO and described by Mott (1987) for the evaluation of molluscicidal plants.

Determination of the lethal doses (DL_{50} y DL_{90})

Product effectiveness tests are carried out in which four mollusks are placed in 400 mL fish tanks, after which the product is added in. For this test, the maximum concentration ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) given by the World Health Organization (WHO) (WHO, 1983; Mott, 1987) is used. Product effectiveness (mortality) is observed at 24 hours, after which the lethal doses are determined. Seven concentrations are tested. Each concentration is replicated seven times, with four mollusks per replicate.

One control per concentration is used, which is composed of water and physiological saline solution. Each control has a concentration of physiological saline solution equivalent to the concentrations tested. The rosin is diluted in physiological saline solution and sodium hydroxide to a concentration of 1 g in 100 mL. This solution is taken as the stock solution, from which the anticipated concentrations in water are obtained.

Bottles of 400 mL are used, in which the snails and the solutions with the study concentrations are added.

The mollusks are exposed to the molluscicide for 24 hours, after which the number of dead is counted. The living ones are placed in recovery (fish tanks with water (without chlorine treatment), using one for each concentration tested) for 48 h. After this time, they are observed again to see if there are additional dead mollusks. This can be determined by using a stereoscope to check for the presence of a heartbeat. With the total number of dead, statistical testing (Raymond, 1985) is performed that allows determining the lethal doses (DL_{50} y DL_{90}). After determining the lethal doses, this test is carried out three times to compare the results through an analysis of variance and to demonstrate the reproducibility of the experiments.

RESULTS AND DISCUSSION

The biological and ecological characteristics of the species *Biomphalaria havanensis*, belonging to the family *Planorbidae* endemic to Cuba, have been studied both in laboratory and natural conditions. The results of the genetic study suggest that this species is very different than the *Biophalaria* sp., although strong morphological associations exist between them (Durand *et al.*, 1998).

The *Biophalaria* is an intermediate host of *Schistosoma mansoni* and a potential host in Cuba. It has a discoid-shaped shell and can measure up to 13 mm in diameter,

de laboratorio como naturales. Los resultados del estudio genético sugiere que esta especie es realmente diferente a la *Biophalaria* sp. aunque existen fuertes asociaciones morfológicas (Durand *et al.*, 1998).

La *Biophalaria* es un hospedero intermediario de *Schistosoma mansoni* hospedero potencial en Cuba. La concha tiene forma discoidal y puede medir hasta 13 mm de diámetro, con un máximo de cinco vueltas (Yong *et al.*, 2001). La localidad tipo es La Habana, aunque también se encuentra en las Antillas, América Central y en el sur de los Estados Unidos de América.

Los resultados obtenidos demuestran el poder molusquicida de la colofonia y destilados de la resina de pináceas *Pinus caribaea* y *Pinus tropicalis* sobre *Biomphalaria havanensis*.

En el Cuadro 1 se muestra las dosis letales (DL_{50} y DL_{90}) de la colofonia al aplicar un análisis de varianza a los datos recogidos en los tres experimentos realizados. La ecuación de regresión hallada fue $Y = -0.412 + 1.086 \ln X$ con un valor del coeficiente de correlación $R = 0.99$ y error estándar 0.13.

CUADRO 1. Dosis letales de colofonia aplicadas a *Biomphalaria havanensis*.

TABLE 1. Lethal doses of rosin applied to *Biomphalaria havanensis*.

	Dosis (mg/L)	Intervalo	Nivel de Confianza
DL_{50}	44.334	36.118 < LC < 53.273	0.95
DL_{90}	141.756	105.067 < LC < 240.418	0.95

En el Cuadro 1 se muestra las dosis letales (DL_{50} y DL_{90}) de la colofonia al aplicar un análisis de varianza a los datos recogidos en los tres experimentos realizados. La ecuación de regresión hallada fue $Y = -0.412 + 1.086 \ln X$ con un valor del coeficiente de correlación $R = 0.99$ y error estándar 0.13.

CUADRO 2. Comparación de la mortalidad teórica según el modelo de regresión y observada de larvas de *Biomphalaria havanensis*.

TABLE 2. Comparison of the theoretical mortality according to the regression model with the observed mortality of the *Biomphalaria havanensis* larvae.

Concentración (mg/L)	Muertos/Expuestos	Mortalidad observada (%)	Mortalidad teórica (%)
5	1/28	3.6	3,8
20	6/28	21.4	17,2
35	7/28	25	31,6
50	14/28	50	46,6
65	18/28	64.3	61,99
80	22/28	78.6	77,65
95	25/28	89.3	93,59

with a maximum of five whorls (Yong *et al.*, 2001). The type locality is Havana, although it is also found in the West Indies, Central America and in the south of the United States.

The results obtained demonstrate the molluscicidal power of the rosin and resin distillates of the pines *Pinus caribaea* y *Pinus tropicalis* on *Biomphalaria havanensis*.

Table 1 shows the lethal doses (DL_{50} y DL_{90}) of the rosin upon applying an analysis of variance to the data collected from the three experiments conducted. The regression equation found was $Y = -0.412 + 1.086 \ln X$ with a value of the correlation coefficient $R = 0.99$ and standard error 0.13.

The results shown in Table 2 suggest that observed mortality ranges from 3.6 to 89.3 %. The experimental results obtained with rosin at different concentrations on *B. havanensis* show similar results to those theoretically determined by the model.

This proposed method for the control of vectors replaces synthetic molluscicides that generally present nonspecific toxicity, high cost (Souza *et al.*, 1987), slow degradation, and the need to be imported (Kloos and McCullough, 1981); therefore, there is a greater tendency towards looking for plant substances with molluscicidal action, as an alternative control method. Rosin is a Cuban industrial product of forest origin; it does not last long in the environment and its pharmacokinetic parameters do not make it very toxic to superior organisms, thereby causing less damage to the environment. According to Ferrer *et al.* (1993) and Yong and Rodríguez (1994), the action of the aqueous extract of *Agave legrilliana* on *Biomphalaria havanensis* has demonstrated its ovicidal action, attributed to the presence of saponins. Some authors point out that there are other plants with proven ovicidal effect, among which are *Ambrosia maritima*, *Phytolacca dodecandra* and *Euphorbia cotinifolia*. In some members of the family Meliaceae, extracts with an extensive pesticidal action attributed to the presence of triterpenoids have been isolated and characterized (Kloss and McCullough, 1987; Toyota *et al.*, 1990).

Other studies into the control of *Biomphalaria glabrata* have been published. For example, one such study examines the use of the latex action of the species *Euphorbia splendns* at varied pH in the control of *Schistosoma mansoni* (Carvalho *et al.*, 2003). Inhibition of reproductive hormones through the use of neuropeptides that induce castration and non-reproduction of the vector has been reported by Si-Ming *et al.* (2009).

CONCLUSIONS

Due to its chemical, low-polluting and biodegradable nature, rosin is an innovative, sustainable precursor and useful agent for the control of *Biomphalaria havanensis* larvae that spread schistosomiasis.

Los resultados que se muestran el Cuadro 2 sugieren que la mortalidad observada oscila entre 3.6 y 89.3 %. Los resultados experimentales obtenidos con la colofonia a diferentes concentraciones sobre *B. havanensis* muestran resultados semejantes con los determinados teóricamente por el modelo.

Este método propuesto para el control de vectores sustituye molusquicidas sintéticos que en general presentan toxicidad inespecífica, elevado costo (Souza *et al.*, 1987), una biodegradación lenta y necesidad de ser importados (Kloos y McCullough, 1981), por lo cual existe una elevada tendencia a buscar sustancias vegetales con actividad molusquicida, como método de control alternativo. La colofonia es un producto industrial cubano de origen forestal, no persiste mucho tiempo en el medio y sus parámetros fármaco-cinéticos los hacen muy poco tóxicos a organismos superiores, provocando menos daños al medio ambiente. La acción del extracto acuoso de *Agave legrelliana* según Ferrer *et al.* (1993) y Yong y McCullough (1994) sobre *Biomphalaria havanensis* ha demostrado su acción ovicida, atribuido a la presencia de saponinas. Algunos autores señalan diferentes plantas con probado efecto ovicida, entre las que se encuentran *Ambrosia maritima*, *Phytolacca dodecandra* y *Euphorbia cotinifolia*. En algunos miembros de la familia *Meliaceae* se han aislado y caracterizado extractos con una amplia acción plaguicida atribuida a la presencia de triterpenoides (Kloss y McCullough, 1987; Toyota *et al.*, 1990)

Se publican otros trabajos para control de *Biomphalaria glabrata* como la acción de látex de la especie *Euphorbia splendns* a diferentes pH en el control de *Schistosoma mansoni* (Carvalho *et al.*, 2003). La inhibición hormonal reproductiva a través del uso de neuropéptidos que inducen a la castración y no reproducción del vector ha sido publicada por Si-Ming *et al.* (2009).

CONCLUSIONES

La colofonia por su naturaleza química, ecológica poco contaminante y biodegradable, constituye un precursor sustentable, novedoso y agente útil para el control de larvas de *Biomphalaria havanensis* que propagan la esquistosomiasis.

AGRADECIMIENTOS

Deseamos expresar nuestro agradecimiento al Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK). Ciudad de La Habana, Cuba.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to express our gratitude to the Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK). Havana City, Cuba.

End of the English Version

LITERATURA CITADA

- ARTEAGA, Y.; CARBALLO, L.; TIOMNO, O.; CASAL, A.; TACORONTE, J. E.; CRUZ, R. 2007. Resina de Pino: Química verde y potencialidades biológicas. Revista Cubana de Química 19(1): 91-93.
- BIERMAN W., F.; WETSTEYN J., C.; VAN G, T. 2005. Presentation and diagnosis of imported schistosomiasis: relevance of eosinophilia, microscopy for ova, and serology. J. Travel. Med. 12: 9-13.
- CARVALHO V., M.; ALBUQUERQUE D. S., J. A.; PAZ DA SILVA I.; FERREIRAL, F. E.; TORRES S., V. 2003. Molluscicidal activity of crown of Christ (*Euphorbia splendens* var. *hislopii*) (*Euphorbiaceae*) latex submitted to pH variation Braz. Arch. Biol. Technol. 46(3).
- CORACHÁN, M. 1995. Schistosomiasis in travelers. J. Travel Med. 2: 1-3.
- DURAND, P.; YONG, M.; PERERA, G.; DUCREUX, A.; POINTIER J., P. 1998. Genetic evidence of two species in the *Biomphalaria* *havanensis* complex (Gastropoda. Planorbidae) from Cuba. Acta Tropica 71: 179-188
- FERRER J., R.; SANCHEZ, R.; PERERA, G.; YONG, M.; SÁNCHEZ, J. 1993. Estudios de la acción molusquicida en el laboratorio del maguey (*Agave legrelliana*), sobre *Biomphalaria havanensis*. Rev. Cub. Med. Trop.45: 118-121.
- GREENWALD, B. 2005. Schistosomiasis: implications for world travellers and healthcare providers. Gastroenterol. Nurs. 28: 203-207.
- GROBUSCH, M. P.; MUHLBERGER, N.; JELINEK, T.; BISOFFI, Z.; CORACHAN, M.; HARMS G. 2003. Imported schistosomiasis in Europe: sentinel surveillance data from Trop. Net. Europ. J. Travel Med.10: 164-9.
- KLOOS, H.; McCULLOUGH F., S. 1981. Plant molluscicides: a review. In: WHO. Schisto Genova, WHO. 81-89.
- KLOOS, H.; McCULLOUGH F. 1987. Plant molluscicides. Published on behalf of the UNDP / World Bank /WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. New York: John Wiley, 45-108.
- LLOP, A. 2001. Microbiología y Parasitología Médicas. Tomo III. Ciudad de La Habana: Editorial de Ciencias Médicas.
- MOTT K., E. 1987. Plant Molluscicides. UNDP/World Bank/WHO. Gran Bretaña: John Wiley & Sons LTD.
- PARAENSE, W. L. 2001. The schistosome vectors in the Americas. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 96(Suppl.), 7-16.
- QUINTANA, M. 2007. Una enfermedad del desarrollo que amenaza a la Argentina. Ciencia Hoy [revista en Internet]. 2000 Abril/Mayo [citado el 2 de febrero de 10(56):[aprox. 3 p.]. Disponible en: <http://www.cienciahoy.org.ar/ln/hoy56/enfermedad.htm>.

- RAYMOND, M. 1985. Presentation d'un programme basic d'analyse log-probit micro-ordinateur. Cah. Orstom. Entomol. Med. Parasitol. 23: 117-21.
- ROJAS R., L.; NÚÑEZ F., F. A.; ROBERTSON J., L. 2008. Cuban parasitology in review: a revolutionary triumph. Trends in Parasitology. 24(10).
- SI-MING, Z.; HONG, N.; BOWANG E., S.; LOKER C., M. A. 2009. Schistosomin from the snail *Biomphalaria glabrata*: Expression studies suggest no involvement in trematode-mediated castration. Molecular & Biochemical Parasitology 165: 79-86
- SOUZA C., P.; MENDES N., M.; ARAUJO, N.; KATZ, N. 1987. Actividade moluscicida do extracto butílico de *Phytolacca dodecandra* (Endod) sobre *Biomphalaria glabrata*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 82: 345-349.
- TOYOTA, M.; MSONTHI, J. D.; HOSTTEMANN, K. 1990. A molluscicidal and antifungal triterpenoid saponin from the roots of *Clerodendrum wildii*. Phytochemistry, 29: 2849-51.
- WHO. 1983. Report of the Scientific Working Group on Plant Molluscicides. Geneva, World Health Organization (TDR/SCH-SWG, 4).
- YONG, M.; RODRÍGUEZ, M. 1994. Evaluación de la acción moluscicida de *Agave legrilliana* sobre *Fossaria cubensis* (Mollusca: Lymnaeidae), principal vector de Fascioliasis en Cuba. Parasitología al Día. 18: 46-50.
- YONG, M.; GUTIÉRREZ, A.; PERERA, G.; DURAND, P.; POINTIER J., P.; 2001. The *Biomphalaria havanensis* complex (*Gastropoda: Planorbidae*) in Cuba: a morphological and genetic study. Journal of Molluscan Studies, 67: 103-111.