

The background of the cover is a microscopic image showing several snails of the genus Biomphalaria. The snails are viewed from above, showing their characteristic oval shape and the internal organs, including the digestive tract and the respiratory organ (lung), which is a prominent feature. The color palette is dominated by shades of yellow, brown, and green, typical of biological specimens under a light microscope.

EDUARDO CYRINO DE OLIVEIRA-FILHO

**EFEITOS DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS SOBRE A
REPRODUÇÃO DE MOLUSCOS DE ÁGUA DOCE:
ESTUDOS COM CARAMUJOS DO GÊNERO *Biomphalaria***

ORIENTADOR PRINCIPAL: FRANCISCO J. R. PAUMGARTTEN

SEGUNDO ORIENTADOR: CESAR K. GRISOLIA

Tese apresentada à Escola Nacional de Saúde
Pública da Fundação Oswaldo Cruz, como
requisito à obtenção do título de Doutor em Saúde
Pública na Área Temática Toxicologia e Saúde.

Rio de Janeiro – 2003

EDUARDO CYRINO DE OLIVEIRA-FILHO

**EFEITOS DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS SOBRE A
REPRODUÇÃO DE MOLUSCOS DE ÁGUA DOCE:
ESTUDOS COM CARAMUJOS DO GÊNERO *Biomphalaria***

ORIENTADOR PRINCIPAL: FRANCISCO J. R. PAUMGARTTEN

SEGUNDO ORIENTADOR: CESAR K. GRISOLIA

Tese apresentada à Escola Nacional de Saúde
Pública da Fundação Oswaldo Cruz, como
requisito à obtenção do título de Doutor em Saúde
Pública na Área Temática Toxicologia e Saúde.

Rio de Janeiro – 2003

EDUARDO CYRINO DE OLIVEIRA-FILHO

**EFEITOS DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS SOBRE A
REPRODUÇÃO DE MOLUSCOS DE ÁGUA DOCE:
ESTUDOS COM CARAMUJOS DO GÊNERO *Biomphalaria***

Banca Examinadora

Prof^a Dr^a Sandra Maria Feliciano de Oliveira e Azevedo - UFRJ

Prof. Dr. Eduardo Bertoletti – CETESB

Prof. Dr. Zilmar Teixeira Tosta - UFF

Prof. Dr. Odir Clécio da Cruz Roque – ENSP/FIOCRUZ

Prof. Dr. Francisco José Roma Paumgarten - Orientador

**Tese apresentada à Escola Nacional de Saúde
Pública da Fundação Oswaldo Cruz, como
requisito à obtenção do título de Doutor em Saúde
Pública na Área Temática Toxicologia e Saúde.**

Rio de Janeiro – 2003

“Our fate is connected with the animals...”

Rachel Carson, 1962.

AGRADECIMENTOS

Tão multidisciplinar quanto a ciência toxicologia, esse trabalho foi concretizado graças ao auxílio, ao suporte e ao incentivo de muitos colaboradores. Assim sendo, gostaria de agradecer a todos os descritos abaixo, além daqueles não citados, mas que de alguma maneira estiveram presentes no decorrer da realização dessa obra.

A todos meus familiares pelo incentivo de sempre;

A todos os amigos do Laboratório de Toxicologia Ambiental da ENSP/FIOCRUZ, pelo apoio durante a execução de todo trabalho, particularmente a técnica Rosângela Ribeiro de Carvalho e a estudante Bárbara Rodrigues Geraldino, pela grande colaboração, pelo companheirismo constante e pelas boas discussões, sempre gerando idéias e reformulações importantes nos métodos propostos;

À minha amiga e colega Dra. Cristina Lúcia Silveira Sisino que desde os primórdios do conhecimento toxicológico vem sendo grande companheira;

Aos técnicos e gerentes da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, particularmente da Gerência Geral de Toxicologia, pela boa recepção em Brasília e pelo constante incentivo à realização do trabalho;

Aos novos colegas do Departamento de Ecologia da UnB, particularmente a Prof^a June Springer de Freitas, o Prof. John Duvall Hay e a técnica Maria da Consolação F. Cruz, pela disponibilização de espaço no Laboratório de Ecologia e pelo suporte técnico oferecido para a realização de grande parte do trabalho;

Ao meu 2º orientador, Dr. Cesar Koppe Grisolia, do Laboratório de Genética da UnB, pelo apoio constante em Brasília e pelas enriquecedoras trocas de informações;

À Chefia e aos colegas da Embrapa Cerrados, que sempre apoiaram e incentivaram a conclusão do trabalho;

Ao meu orientador Francisco José Roma Paumgarten, pela confiança, pela orientação, pelas idéias e pelas boas conversas que sempre foram efetivas para um melhor entendimento do estudo toxicológico;

RESUMO

A poluição das águas vem sendo motivo de crescente preocupação face as previsões de escassez deste recurso natural. Neste contexto, os testes de toxicidade tem sido úteis para nortear atividades regulatórias voltadas para controle da poluição e prevenção de danos aos ecossistemas aquáticos. Os ensaios mais frequentemente empregados para este fim envolvem um reduzido número de espécies e apenas exposições de curta duração. Aspectos mais sutis da toxicidade, como disfunções reprodutivas evidenciadas após exposições prolongadas a baixas concentrações dos poluentes, são em geral negligenciados. Neste trabalho foram realizados dois estudos para avaliar os efeitos de substâncias químicas sobre a reprodução de caramujos do gênero *Biomphalaria*. No primeiro estudo (Capítulo 1) investigou-se a embriotoxicidade de substâncias moluscidas para a *B. glabrata*; e no segundo (Capítulo 2) avaliou-se os efeitos da exposição contínua por mais de uma geração a 3 poluentes, sobre a reprodução da *B. tenagophila*. No primeiro estudo, cerca de 200 ovos (com até 15 horas), foram expostos à 4 moluscidas por 96 horas e observados por mais 6 dias após cessada a exposição. Os resultados mostraram que o látex da *Euphorbia milii* é praticamente desprovido de efeito embrioletal, mas é teratogênico e retarda a eclosão mesmo em baixas concentrações. Os demais moluscidas exibiram acentuado efeito embrioletal (hidróxido de trifetil estanho > niclosamida > sulfato de cobre) mas mostraram-se menos potentes do que o látex como teratógenos. No segundo estudo, caramujos adultos (10 por concentração), foram individualmente expostos às concentrações não agudamente letais de três poluentes (endossulfan, nonilfenol etoxilado e atrazina) por duas gerações consecutivas. Avaliou-se a mortalidade e a fecundidade, por 8 semanas, e o desenvolvimento embrionário da geração subsequente em duas situações: exposição descontinuada e contínua. Os resultados obtidos mostram que alguns efeitos só se manifestam com a continuidade da exposição por mais de uma geração. O estudo multigeração do desempenho reprodutivo de caramujos aquáticos, demonstrou ser sensível para detectar efeitos crônicos de baixas concentrações de poluentes ambientais.

Palavras-chave: testes de toxicidade, ecotoxicologia, poluição, *Biomphalaria*, moluscidas.

ABSTRACT

Pollution of water bodies has been cause for deep concern owing to the limited availability of this natural resource. Within this context toxicity tests have been useful to guide regulatory decisions on pollution control as well as to prevent adverse effects of environmental pollutants on aquatic ecosystems. Current assays in aquatic toxicology involve a limited number of species and – as a rule – only short-term exposures. More subtle aspects of toxicity, such as reproductive impairment after long-term exposures to low concentrations of pollutants, have been to some extent neglected. This study was undertaken to evaluate the effects of chemicals on the reproduction of *Biomphalaria sp.* snails. In the first part (Chapter 1) was investigated the developmental toxicity of molluscicides to *B. glabrata*, and in the second part (Chapter 2) was studied the effects of a two-generation exposure to three environmental pollutants (endosulfan, nonylphenol ethoxylate and atrazine) on the reproductive performance of *B. tenagophila*. In the first study, *B. glabrata* eggs (0 to 15 hours after spawning) were exposed for 96 hours to 4 molluscicides and the embryo development was followed for additional 6 days in absence of exposure. Results showed that *Euphorbia milii* latex was almost devoid of embryolethal effect, but it delayed hatching and was teratogenic at relatively low concentrations. The remaining 3 molluscicides were clearly embryolethal (triphenyltin hidroxis > niclosamide > copper sulfate) but were far less potent than latex as teratogenic agents. In the second study, adult snails (10 per concentration), were individually exposed to non acutely lethal concentrations of three environmental pollutants (endosulfan, nonylphenol ethoxylate and atrazine) for two generations. At each generation, mortality and fecundity were evaluated for eight consecutive weeks and the following generation was evaluated bothe under continued exposure and in the absence of exposure. Results showed that some adverse effects on reproduction were observed only with continuous exposure lasting longer than one generation. The multigeneration study design therefore seems to be a sensitive approach to evaluate chronic effects of environmental pollutants on aquatic snails.

Key-words: toxicity tests, ecotoxicology, pollution, *Biomphalaria*, molluscicides.

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	22
1. Estudo da Ecotoxicidade de Substâncias Químicas	22
2. Critérios para Avaliação de Efeitos em Ecotoxicologia Aquática	24
2.1. Toxicidade Aguda	24
2.2. Toxicidade Crônica	24
2.3. Testes Rápidos de Efeitos sobre Reprodução e Desenvolvimento	27
2.4. A Importância dos Estudos Multigeração	27
3. Estudos para Avaliação de Efeitos Sobre a Reprodução e o Desenvolvimento de Moluscos	29
4. Exigências Regulatórias	29
5. Caracterização do Organismo-Teste	30
II. OBJETIVOS DO ESTUDO	35
III. CAPÍTULO 1	36
1. Introdução	37
1.1. Uso de Moluscidas para Controle da Esquistossomose	37
1.2. Estudos de Toxicidade Durante o Desenvolvimento	38
2. Material e Métodos	39
2.1. Descrição dos Moluscidas Testados	39
2.1.1. Sulfato de Cobre (CuSO ₄)	39
2.1.2. Hidróxido de Trifenil Estanho (TPTH)	39
2.1.3. Niclosamida (NCL)	40
2.1.4. Látex da <i>Euphorbia milii</i> (LAT)	41
2.2. Preparo das Soluções	42
2.3. Desenvolvimento do Teste	44
3. Resultados	46
4. Discussão	51
5. Conclusões	53
IV. CAPÍTULO 2	54
1. Introdução	55
2. Materiais e Métodos	56
2.1. As Substâncias-Teste	56

2.1.1. Endosulfan	56
2.1.2. Nonilfenol Etoxilado	57
2.1.2. Atrazina	58
2.2. Os Solventes Utilizados	59
2.3. Organismo-Teste	60
2.4. Análise Estatística	61
2.5. Desenvolvimento do Estudo	62
2.5.1. Determinação da Toxicidade Aguda	62
2.5.2. Exposição e Manutenção dos Organismos	62
2.5.3. Avaliação do Desempenho Reprodutivo	65
2.5.4. Avaliação do Desenvolvimento Embrionário	65
3. Resultados	69
3.1. Toxicidade Aguda	69
3.2. Mortalidade	71
3.3. Avaliação do Desempenho Reprodutivo	72
3.3.1. Endosulfan Geração F0	72
3.3.2. Endosulfan Geração F1	75
3.3.2.1. Endosulfan Geração F1 – Exposição Descontinuada	76
3.3.2.2. Endosulfan Geração F1 – Exposição Contínua	78
3.3.3. Nonilfenol Etoxilado Geração F0	81
3.3.4. Nonilfenol Etoxilado Geração F1	84
3.3.4.1. Nonilfenol Etoxilado Geração F1 – Exposição Descontinuada	85
3.3.4.2. Nonilfenol Etoxilado Geração F1 – Exposição Contínua	87
3.3.5. Atrazina Geração F0	90
3.3.6. Atrazina Geração F1	92
3.3.6.1. Atrazina Geração F1 – Exposição Descontinuada	93
3.3.6.2. Atrazina Geração F1 – Exposição Contínua	95
3.3.7. Etanol Geração F0	97
3.4. Avaliação dos Efeitos sobre o Desenvolvimento Embrionário	100
3.4.1. Endosulfan F0/F1	100
3.4.2. Endosulfan F1/F2	102
3.4.3. Nonilfenol Etoxilado F0/F1	104
3.4.4. Nonilfenol Etoxilado F1/F2	105
3.4.5. Atrazina F0/F1	107
3.4.6. Atrazina F1/F2	109

3.4.7. Etanol F0/F1	111
4. Discussão	113
4.1. Endosulfan	113
4.2. Nonilfenol Etoxilado	116
4.3. Atrazina	118
4.4. Etanol	121
4.5. Aspectos Gerais	122
5. Conclusões	124
V. CONSIDERAÇÕES FINAIS	125
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127

LISTA DE FIGURAS

Referentes à INTRODUÇÃO

- Figura 1** – Esquema básico de um teste de ecotoxicidade aquática. 23
- Figura 2** – Cronologia para execução de testes crônicos utilizando a Truta Marron (*Salvelinus fontinalis*). (A) Teste com ciclo de vida completo; (B) Teste com ciclo de vida parcial e; (C) Teste com estágios iniciais de vida. 26
- Figura 3** – Anatomia externa do gênero *Biomphalaria*. 33
- Figura 4** – Conchas de *Biomphalaria glabrata* (Escala milimétrica). 34
- Figura 5** – Conchas de *Biomphalaria tenagophila* (Escala milimétrica). 34

Referentes ao CAPÍTULO 1

- Figura 1** – Fórmula estrutural do sulfato de cobre. 39
- Figura 2** – Fórmula estrutural do hidróxido de trifetil estanho. 40
- Figura 3** – Fórmula estrutural da niclosamida. 41

Referentes ao CAPÍTULO 2

- Figura 1** – Estrutura molecular do endosulfan. 57
- Figura 2** – Estrutura molecular do nonilfenol etoxilado. 58
- Figura 3** – Estrutura molecular da atrazina. 59
- Quadro 1** – Descrição esquemática das etapas e da duração do experimento multigeração. 68

LISTA DE FOTOS

Referentes ao CAPÍTULO 1

- Foto 1** – *Euphorbia milii*. 42
- Foto 2** – Retirada do látex para os experimentos. 44
- Foto 3** – Embrião com duplaoftalmia do lado esquerdo. Típica malformação cefálica observada nas maiores concentrações de LAT. Aumento de 66X. 49
- Foto 4** – Embrião com trioftalmia do lado esquerdo. Típica malformação cefálica observada nas maiores concentrações de LAT. Aumento de 66X. 49
- Foto 5** – Comparação entre um embrião normal e um com malformação de concha, ambos eclodidos. Aumento de 66X. 49

Referentes ao CAPÍTULO 2

- Foto 1** – Distribuição dos caramujos em dez réplicas por concentração. 63
- Foto 2** – Preparação do copo para os testes com o respectivo revestimento interno de papel celofane. 64
- Foto 3** – Número de ovos e desovas por indivíduo. Aumento de 16X. 65
- Foto 4** – Número de ovos por desova. Aumento de 50X. 66
- Foto 5** – Viabilidade dos embriões (malformações) e retardo na eclosão dos ovos. Aumento de 66X. 66

LISTA DE TABELAS

Referentes ao CAPÍTULO 1

Tabela 1 – Composição da água mole sintética	43
Tabela 2 – Efeito dos moluscicidas niclosamida (NCL), sulfato de cobre (CuSO_4), trifenil hidróxido de estanho (TPTH) e látex da <i>E. milii</i> (LAT) sobre o desenvolvimento embrionário do caramujo <i>Biomphalaria glabrata</i> . Os valores referem-se a concentrações expressas em mg/L.	47
Tabela 3 – Comparação entre as CL_{50} para embriões obtidas no presente estudo e as CL_{50} para caramujos adultos determinadas em diferentes estudos. Valores expressos em mg/L.	52

Referentes ao CAPÍTULO 2

Tabela 1 – Composição da água mole sintética.	60
Tabela 2 – Composição para preparo de 1 Kg da ração composta.	64
Tabela 3 – Toxicidade aguda (CL_{50} -96 horas e I.C. 95%) e Concentração Máxima Testada em que Não se Observou Efeito Letal (CELNO-96 horas) dos poluentes testados, para o caramujo <i>B. tenagophila</i> de diferentes idades. Valores expressos em mg/L.	70
Tabela 4 – Concentrações de endosulfan, nonilfenol etoxilado e atrazina testadas no estudo multigeração.	70
Tabela 5 – Médias do número de ovos por caramujo entre indivíduos da geração F0, acumuladas após 8 semanas de exposição às diferentes concentrações de endosulfan.	73
Tabela 6 – Médias do número de desovas por caramujo entre indivíduos da geração F0, acumuladas após 8 semanas de exposição às diferentes concentrações de endosulfan.	74
Tabela 7 – Médias do número de ovos por desova, por grupo de caramujos da geração parental (F0), durante as 8 semanas de exposição ao endosulfan.	75
Tabela 8 – Número de ovos por indivíduo, acumulados ao longo de 8 semanas, entre os caramujos não expostos da geração F1, cujos progenitores (F0) foram expostos ao endosulfan.	76
Tabela 9 - Número de desovas por indivíduo, acumulados ao longo de 8 semanas, entre os caramujos não expostos da geração F1, cujos progenitores (F0) foram expostos ao endosulfan.	77
Tabela 10 – Médias do número de ovos por desova em 8 semanas, entre os caramujos da geração F1, em que a exposição ao endosulfan foi descontinuada.	78
Tabela 11 – Número de ovos por indivíduo, acumulados ao longo de 8 semanas, entre os caramujos expostos da geração F1, cujos progenitores (F0) também foram expostos ao endosulfan.	79

Tabela 12 - Número de desovas por indivíduo, acumulados ao longo de 8 semanas, entre os caramujos expostos da geração F1, cujos progenitores (F0) também foram expostos ao endosulfan.	80
Tabela 13 - Médias do número de ovos por desova em 8 semanas, entre os caramujos da geração F1, que continuaram expostos ao endosulfan.	81
Tabela 14 - Médias do número de ovos por caramujo entre indivíduos da geração F0, acumuladas após 8 semanas de exposição às diferentes concentrações de nonilfenol etoxilado.	82
Tabela 15 - Médias do número de desovas por caramujo entre indivíduos da geração F0, acumuladas após 8 semanas de exposição às diferentes concentrações de nonilfenol etoxilado.	83
Tabela 16 - Médias do número de ovos por desova, por grupo de caramujos da geração parental (F0), durante as 8 semanas de exposição ao nonilfenol etoxilado.	84
Tabela 17 - Número de ovos por indivíduo, acumulados ao longo de 8 semanas, entre os caramujos não expostos da geração F1, cujos progenitores (F0) foram expostos ao nonilfenol etoxilado.	85
Tabela 18 - Número de desovas por indivíduo, acumulados ao longo de 8 semanas, entre os caramujos não expostos da geração F1, cujos progenitores (F0) foram expostos ao nonilfenol etoxilado.	86
Tabela 19 – Médias do número de ovos por desova em 8 semanas, entre os caramujos da geração F1, em que a exposição ao nonilfenol etoxilado foi descontinuada.	87
Tabela 20 – Número de ovos por indivíduo, acumulados ao longo de 8 semanas, entre os caramujos expostos da geração F1, cujos progenitores (F0) também foram expostos ao nonilfenol etoxilado.	88
Tabela 21 – Número de desovas por indivíduo, acumulados ao longo de 8 semanas, entre os caramujos expostos da geração F1, cujos progenitores (F0) também foram expostos ao nonilfenol etoxilado.	89
Tabela 22 – Médias do número de ovos por desova em 8 semanas, entre os caramujos da geração F1, que continuaram expostos ao nonilfenol etoxilado.	90
Tabela 23 – Médias do número de ovos por caramujo entre indivíduos da geração F0, acumuladas após 8 semanas de exposição às diferentes concentrações de atrazina.	91
Tabela 24 – Médias do número de desovas por caramujo entre indivíduos da geração F0, acumuladas após 8 semanas de exposição às diferentes concentrações de atrazina.	91
Tabela 25 – Médias do número de ovos por desova, por grupo de caramujos da geração parental (F0), durante as 8 semanas de exposição à atrazina.	92

Tabela 26 – Número de ovos por indivíduo, acumulados ao longo de 8 semanas, entre os caramujos não expostos da geração F1, cujos progenitores (F0) foram expostos à atrazina.	93
Tabela 27 – Número de desovas por indivíduo, acumulados ao longo de 8 semanas, entre os caramujos não expostos da geração F1, cujos progenitores (F0) foram expostos à atrazina.	94
Tabela 28 – Médias do número de ovos por desova em 8 semanas, entre os caramujos da geração F1, em que a exposição à atrazina foi descontinuada.	95
Tabela 29 - Número de ovos por indivíduo, acumulados ao longo de 8 semanas, entre os caramujos expostos da geração F1, cujos progenitores (F0) também foram expostos à atrazina.	95
Tabela 30 – Número de desovas por indivíduo, acumulados ao longo de 8 semanas, entre os caramujos expostos da geração F1, cujos progenitores (F0) também foram expostos à atrazina.	96
Tabela 31 – Médias do número de ovos por desova em 8 semanas, entre os caramujos da geração F1, que continuaram expostos à atrazina.	97
Tabela 32 - Médias do número de ovos por caramujo entre indivíduos da geração F0, acumuladas após 8 semanas de exposição às diferentes concentrações de etanol.	98
Tabela 33 - Médias do número de desovas por caramujo entre indivíduos da geração F0, acumuladas após 8 semanas de exposição às diferentes concentrações de etanol.	99
Tabela 34 - Médias do número de ovos por desova, por grupo de caramujos da geração parental (F0), durante as 8 semanas de exposição ao etanol.	100
Tabela 35 – Comparação entre o valor de CENO, obtido no presente estudo, para o endosulfan e valores obtidos nos tradicionais testes rápidos de reprodução e desenvolvimento. Valores expressos em µg/L.	114
Tabela 36 – Comparação entre o valor de CENO, obtido no presente estudo, para o nonilfenol 9,5 etoxilado e valores obtidos nos tradicionais testes rápidos de reprodução e desenvolvimento, com diferentes formas do nonilfenol. Valores expressos em µg/L.	118
Tabela 37 – Comparação entre o valor de CENO, obtido no presente estudo, para a atrazina e valores obtidos nos tradicionais testes rápidos de reprodução e desenvolvimento. Valores expressos em µg/L.	121

LISTA DE GRÁFICOS

Referentes ao CAPÍTULO 1

Gráfico 1 – Ocorrência dos diferentes tipos de malformações embrionárias no grupo exposto ao látex da *E. milii*. 48

Referentes ao CAPÍTULO 2

Gráfico 1 – Desempenho reprodutivo (média do número de ovos por indivíduo/dados cumulativos), durante 8 semanas consecutivas, da geração parental (F0) de caramujos (*B. tenagophila*) expostos às diferentes concentrações de endosulfan. 72

Gráfico 2 – Desempenho reprodutivo (média do número de desovas por indivíduo/dados cumulativos), durante 8 semanas consecutivas, da geração parental (F0) de caramujos (*B. tenagophila*) expostos às diferentes concentrações de endosulfan. 74

Gráfico 3 – Variação média no número de ovos por desova por indivíduo, durante as 8 semanas consecutivas de exposição da geração parental (F0) às diferentes concentrações de endosulfan. 75

Gráfico 4 – Desempenho reprodutivo (média do número de ovos por indivíduo/dados cumulativos), durante 8 semanas consecutivas, da geração F1 de caramujos (*B. tenagophila*) em que a exposição ao endosulfan foi descontinuada. 76

Gráfico 5 – Desempenho reprodutivo (média do número de desovas por indivíduo/dados cumulativos), durante 8 semanas consecutivas, da geração F1 de caramujos (*B. tenagophila*) em que a exposição ao endosulfan foi descontinuada. 77

Gráfico 6 – Variação média no número de ovos por desova por indivíduo, durante as 8 semanas consecutivas, nos grupos de caramujos da geração F1 que tiveram a exposição ao endosulfan descontinuada. 78

Gráfico 7 – Desempenho reprodutivo (média do número de ovos por indivíduo/dados cumulativos), durante 8 semanas consecutivas, da geração F1 de caramujos (*B. tenagophila*) que continuaram expostos ao endosulfan. 79

Gráfico 8 – Desempenho reprodutivo (média do número de desovas por indivíduo/dados cumulativos), durante 8 semanas consecutivas, da geração F1 de caramujos (*B. tenagophila*) que continuaram expostos ao endosulfan. 80

Gráfico 9 - Variação média no número de ovos por desova por indivíduo, durante as 8 semanas consecutivas, nos grupos de caramujos da geração F1 que continuaram expostos ao endosulfan. 81

Gráfico 10 – Desempenho reprodutivo (média do número de ovos por indivíduo/dados cumulativos), durante 8 semanas consecutivas, da geração parental (F0) de caramujos (*B. tenagophila*) expostos às diferentes concentrações de nonilfenol etoxilado. 82

Gráfico 11 – Desempenho reprodutivo (média do número de desovas por indivíduo/dados cumulativos), durante 8 semanas consecutivas, da geração parental (F0) de caramujos (<i>B. tenagophila</i>) expostos às diferentes concentrações de nonilfenol etoxilado.	83
Gráfico 12 - Variação média no número de ovos por desova por indivíduo, durante as 8 semanas consecutivas de exposição da geração parental (F0) às diferentes concentrações de nonilfenol etoxilado.	84
Gráfico 13 - Desempenho reprodutivo (média do número de ovos por indivíduo/dados cumulativos), durante 8 semanas consecutivas, da geração F1 de caramujos (<i>B. tenagophila</i>) em que a exposição ao nonilfenol etoxilado foi descontinuada.	85
Gráfico 14 - Desempenho reprodutivo (média do número de desovas por indivíduo/dados cumulativos), durante 8 semanas consecutivas, da geração F1 de caramujos (<i>B. tenagophila</i>) em que a exposição ao nonilfenol etoxilado foi descontinuada.	86
Gráfico 15 - Variação média no número de ovos por desova por indivíduo, durante as 8 semanas consecutivas, nos grupos de caramujos da geração F1 que tiveram a exposição ao nonilfenol etoxilado descontinuada.	87
Gráfico 16 - Médias do número de ovos por desova em 8 semanas, entre os caramujos da geração F1, em que a exposição ao nonilfenol etoxilado foi descontinuada.	88
Gráfico 17 - Desempenho reprodutivo (média do número de desovas por indivíduo/dados cumulativos), durante 8 semanas consecutivas, da geração F1 de caramujos (<i>B. tenagophila</i>) que continuaram expostos ao nonilfenol etoxilado.	89
Gráfico 18 - Variação média no número de ovos por desova por indivíduo, durante as 8 semanas consecutivas, nos grupos de caramujos da geração F1 que continuaram expostos ao nonilfenol etoxilado.	89
Gráfico 19 – Desempenho reprodutivo (média do número de ovos por indivíduo/dados cumulativos), durante 8 semanas consecutivas, da geração parental (F0) de caramujos (<i>B. tenagophila</i>) expostos às diferentes concentrações de atrazina.	90
Gráfico 20 – Desempenho reprodutivo (média do número de desovas por indivíduo/dados cumulativos), durante 8 semanas consecutivas, da geração parental (F0) de caramujos (<i>B. tenagophila</i>) expostos às diferentes concentrações de atrazina.	91
Gráfico 21 – Variação média no número de ovos por desova por indivíduo, durante as 8 semanas consecutivas de exposição da geração parental (F0) às diferentes concentrações de atrazina.	92

Gráfico 22 – Desempenho reprodutivo (média do número de ovos por indivíduo/dados cumulativos), durante 8 semanas consecutivas, da geração F1 de caramujos (<i>B. tenagophila</i>) em que a exposição à atrazina foi descontinuada.	93
Gráfico 23 – Desempenho reprodutivo (média do número de desovas por indivíduo/dados cumulativos), durante 8 semanas consecutivas, da geração F1 de caramujos (<i>B. tenagophila</i>) em que a exposição à atrazina foi descontinuada.	94
Gráfico 24 – Variação média no número de ovos por desova por indivíduo, durante as 8 semanas consecutivas, nos grupos de caramujos da geração F1 que tiveram a exposição à atrazina descontinuada.	94
Gráfico 25 – Desempenho reprodutivo (média do número de ovos por indivíduo/dados cumulativos), durante 8 semanas consecutivas, da geração F1 de caramujos (<i>B. tenagophila</i>) que continuaram expostos à atrazina.	95
Gráfico 26 – Desempenho reprodutivo (média do número de desovas por indivíduo/dados cumulativos), durante 8 semanas consecutivas, da geração F1 de caramujos (<i>B. tenagophila</i>) que continuaram expostos à atrazina.	96
Gráfico 27 – Variação média no número de ovos por desova por indivíduo, durante as 8 semanas consecutivas, nos grupos de caramujos da geração F1 que continuaram expostos à atrazina.	97
Gráfico 28 – Desempenho reprodutivo (média do número de ovos por indivíduo/dados cumulativos), durante 8 semanas consecutivas, da geração parental (F0) de caramujos (<i>B. tenagophila</i>) expostos às diferentes concentrações de etanol.	98
Gráfico 29 – Desempenho reprodutivo (média do número de desovas por indivíduo/dados cumulativos), durante 8 semanas consecutivas, da geração parental (F0) de caramujos (<i>B. tenagophila</i>) expostos às diferentes concentrações de etanol.	99
Gráfico 30 – Variação média no número de ovos por desova por indivíduo, durante as 8 semanas consecutivas de exposição da geração parental (F0) às diferentes concentrações de etanol.	99
Gráfico 31 – Letalidade do endossulfan para embriões da geração F1, descendentes de indivíduos da geração F0 expostos por 8 semanas ao endossulfan.	100
Gráfico 32 – Teratogenicidade do endossulfan para embriões da geração F1, descendentes de indivíduos da geração F0 expostos por 8 semanas ao endossulfan.	101
Gráfico 33 – Retardo da eclosão causado pelo endossulfan aos embriões vivos da geração F1, descendentes de indivíduos da geração F0 expostos por 8 semanas ao endossulfan.	101

Gráfico 34 – Letalidade do endosulfan para embriões da geração F2, descendentes de indivíduos das gerações F1 não exposta e exposta ao endosulfan.	102
Gráfico 35 – Teratogenicidade do endosulfan para embriões da geração F2, descendentes de indivíduos das gerações F1 não exposta e exposta ao endosulfan.	103
Gráfico 36 – Retardo da eclosão causado pelo endosulfan aos embriões vivos da geração F2, descendentes de indivíduos das gerações F1 não exposta e exposta ao endosulfan.	103
Gráfico 37 – Letalidade do nonilfenol etoxilado para embriões da geração F1, descendentes de indivíduos da geração F0 expostos por 8 semanas ao nonilfenol etoxilado.	104
Gráfico 38 - Teratogenicidade do nonilfenol etoxilado para embriões da geração F1, descendentes de indivíduos da geração F0 expostos por 8 semanas ao nonilfenol etoxilado.	104
Gráfico 39 – Retardo da eclosão causado pelo nonilfenol etoxilado aos embriões vivos da geração F1, descendentes de indivíduos da geração F0 expostos por 8 semanas ao nonilfenol etoxilado.	105
Gráfico 40 – Letalidade do nonilfenol etoxilado para embriões da geração F2, descendentes de indivíduos das gerações F1 não exposta e exposta ao nonilfenol etoxilado.	106
Gráfico 41 – Teratogenicidade do nonilfenol etoxilado para embriões da geração F2, descendentes de indivíduos das gerações F1 não exposta e exposta ao nonilfenol etoxilado.	106
Gráfico 42 - Retardo da eclosão causado pelo nonilfenol etoxilado aos embriões vivos da geração F2, descendentes de indivíduos das gerações F1 não exposta e exposta ao nonilfenol etoxilado.	107
Gráfico 43 – Letalidade da atrazina para embriões da geração F1, descendentes de indivíduos da geração F0 expostos por 8 semanas à atrazina.	107
Gráfico 44 – Teratogenicidade da atrazina para embriões da geração F1, descendentes de indivíduos da geração F0 expostos por 8 semanas à atrazina.	108
Gráfico 45 – Retardo da eclosão causado pela atrazina aos embriões vivos da geração F1, descendentes de indivíduos da geração F0 expostos por 8 semanas à atrazina.	108
Gráfico 46 – Retardo da eclosão causado pela atrazina aos embriões vivos da geração F1, descendentes de indivíduos da geração F0 expostos por 8 semanas à atrazina.	109

- Gráfico 47** – Teratogenicidade da atrazina para embriões da geração F2, descendentes de indivíduos das gerações F1 não exposta e exposta à atrazina. 110
- Gráfico 48** – Retardo da eclosão causado pela atrazina aos embriões vivos da geração F2, descendentes de indivíduos das gerações F1 não exposta e exposta à atrazina. 110
- Gráfico 49** – Letalidade do etanol para embriões da geração F1, descendentes de indivíduos da geração F0 expostos por 8 semanas ao etanol. 111
- Gráfico 50** – Teratogenicidade do etanol para embriões da geração F1, descendentes de indivíduos da geração F0 expostos por 8 semanas ao etanol. 111
- Gráfico 51** – Retardo da eclosão causado pelo etanol aos embriões vivos da geração F1, descendentes de indivíduos da geração F0 expostos por 8 semanas ao etanol. 112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas.

CELNO – Concentração de Efeito Letal Não Observado.

CENO – Concentração de Efeito Não Observado (Sigla utilizada para expressar resultados de testes ecotoxicológicos crônicos ou rápidos de reprodução e desenvolvimento, com organismos aquáticos).

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo.

CL₅₀ – Concentração Letal para 50% dos organismos expostos. Sigla utilizada para expressar resultados de testes de toxicidade aguda com organismos aquáticos, ou quando a exposição se dá via ar respirado.

cm² – Centímetro quadrado.

CONAMA – Conselho Nacional de Meio Ambiente

CuSO₄ - Sulfato de cobre.

ECHC – “Environment Canada and Health Canada” – Agência canadense responsável por meio ambiente e saúde.

ELS – “Early Life Stages” – Termo utilizado para designar testes utilizando organismos em estágios iniciais de vida.

ENSP – Escola Nacional de Saúde Pública.

F0 – Geração Paterna

F1 – 1^a Geração

F2 – 2^a Geração

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz.

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde.

g – Gramas.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.

LAT – Látex da *Euphorbia milii*.

µg/L – Microgramas por litro. Termo utilizado para expressar a concentração de um soluto por litro de um solvente.

mg – Miligramas.

mg/L – Miligramas por litro. Termo utilizado para expressar a concentração de um soluto por litro de um solvente.

mL – Mililitros.

mm – Milímetro.

NaCl – Cloreto de sódio.

NCL – Niclosamida.

Nº - Número

NOAEL – “No Observed Adverse Effect Level” – Sigla utilizada para expressar resultados de testes toxicológicos crônicos com mamíferos.

NP – Abreviatura do inglês “NonylPhenol”.

TPTH – “Triphenyltin Hydroxide” – Hidróxido de trifenil estanho.

UnB – Universidade de Brasília.

USEPA – “United States Environmental Protection Agency” – Agência de proteção ambiental dos Estados Unidos.

USNLM – “United States National Library of Medicine” – Biblioteca nacional de medicina dos Estados Unidos.

var. – Variedade. Termo equivalente à subespécie dos animais, utilizado para plantas.

WHO – “World Health Organization” – Organização Mundial de Saúde.

I - INTRODUÇÃO

A contaminação ambiental proveniente de atividades humanas tais como a utilização de agrotóxicos e o descarte de resíduos industriais e domésticos, tem sido motivo de preocupação por parte dos órgãos reguladores, da comunidade científica e da população.

De um modo geral, grande parte dos resíduos produzidos, sejam eles lançados na atmosfera ou no solo, acabam tendo como destino final, via chuva e escoamento superficial, os corpos hídricos, ocasionando modificações nas características químicas e biológicas e prejudicando assim, tanto a manutenção da vida aquática quanto o fornecimento de água de boa qualidade.

Os ambientes aquáticos são altamente complexos, possuindo diferentes componentes bióticos e abióticos e incluindo ecossistemas muito diversificados tais como rios, lagos, lagoas, estuários, costas rochosas e águas oceânicas, o que os configura muitas vezes como ambientes únicos, dificultando ainda mais o processo decisório por parte das autoridades reguladoras.

Nesse contexto, além das determinações químicas e análises de parâmetros físico-químicos, os testes de toxicidade com organismos aquáticos foram elaborados para fornecer dados qualitativos e quantitativos sobre os efeitos adversos de substâncias químicas sobre organismos aquáticos, e vem se mostrando muito úteis para orientar decisões de pesquisadores, indústrias e agências ambientais, voltadas para evitar ou minimizar os impactos da poluição hídrica.

1 - ESTUDO DA ECOTOXICIDADE DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS

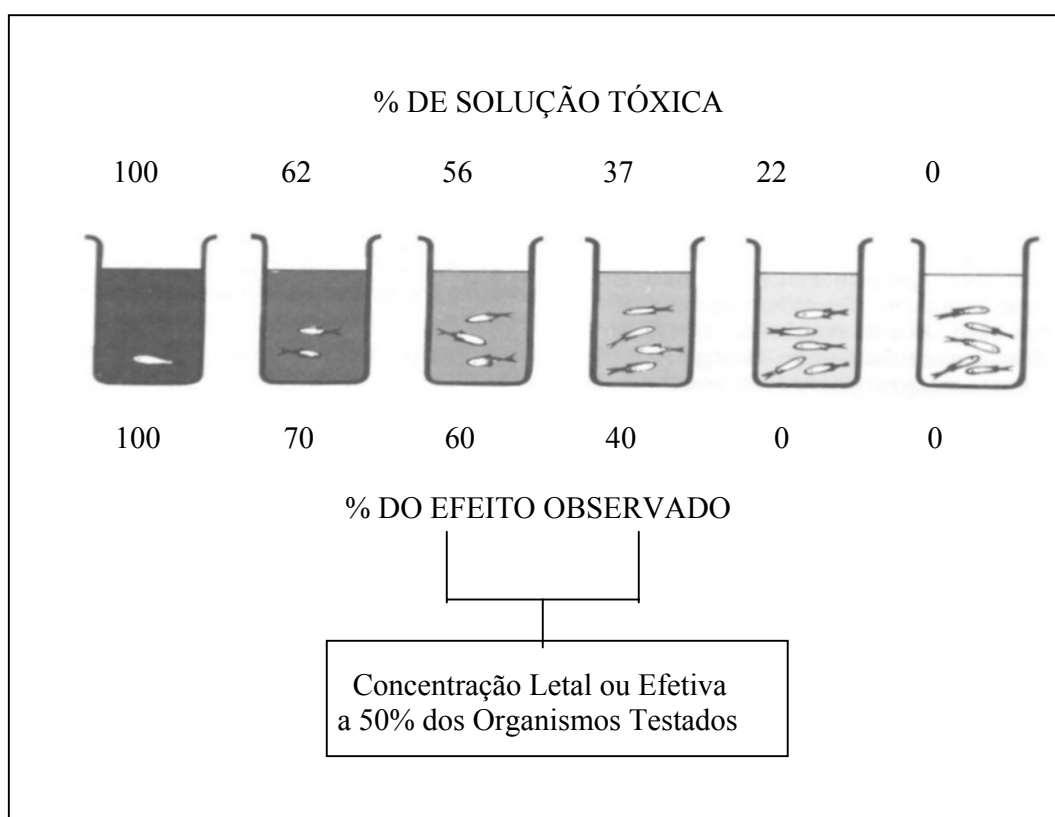
Segundo Parrish (1995), testes de toxicidade aguda com organismos aquáticos têm sido amplamente utilizados para determinar os efeitos de substâncias potencialmente tóxicas (ex. agrotóxicos, metais, efluentes industriais) desde a 2ª Guerra Mundial.

Os testes toxicológicos preditivos cujo foco de interesse não é diretamente a saúde do homem, mas os agravos à "saúde" de ecossistemas, são também denominados de testes ecotoxicológicos ou de ecotoxicidade. O termo ecotoxicologia foi cunhado por René Truhaut em 1969, para designar o ramo da toxicologia voltado especificamente para o estudo dos efeitos de substâncias químicas sobre ecossistemas, e objetivando o estabelecimento de medidas para proteger os vários componentes dos ecossistemas dos efeitos adversos de poluentes ambientais (Truhaut, 1977).

Embora o termo ecotoxicologia seja relativamente recente, os efeitos adversos das substâncias químicas sobre organismos aquáticos vem sendo estudados há muito tempo pela toxicologia aquática, uma ciência formada nas bases da toxicologia de mamíferos.

Os testes de toxicidade aquática, de um modo geral, consistem na exposição de determinados organismos a uma série de concentrações de uma ou mais substâncias, durante um período limitado de tempo, conforme demonstrado na Figura 1.

Figura 1 – Esquema básico de um teste de ecotoxicidade aquática.



Fonte: Gherardi-Goldstein et al, 1992.

2-CRITÉRIOS PARA AVALIAÇÃO DE EFEITOS EM ECOTOXICOLOGIA AQUÁTICA

2.1 - TOXICIDADE AGUDA

Os testes de toxicidade aguda são assim caracterizados pela curta duração da exposição (usualmente 2 a 4 dias), e por terem delineamentos experimentais menos elaborados, nos quais a letalidade e a imobilização de organismos jovens são os indicadores de efeito mais comumente avaliados. Segundo Maltby & Calow (1989), cerca de 80% dos estudos de ecotoxicidade realizados até 1987, envolviam apenas uma espécie e tinham a letalidade, como único critério de efeito tóxico avaliado.

Com o desenvolvimento da ecotoxicologia, é hoje quase consensual entre os ecotoxicologistas que os testes para determinar efeitos agudos, isoladamente, são insuficientes para antecipar danos aos ecossistemas causados por substâncias ou misturas de substâncias (ex. efluentes), mas mesmo assim esses testes continuam sendo ferramentas de grande valia na identificação da periculosidade dessas substâncias.

Pelo fato dos testes de ecotoxicidade padronizados e rotineiramente utilizados envolverem, via de regra, apenas exposições agudas ou sub-crônicas, além da observação de efeitos drásticos como a morte, estes são inadequados para detectar danos mais sutis como, por exemplo, disfunções reprodutivas produzidas por exposições prolongadas a concentrações mais baixas de substâncias químicas presentes no ambiente (Kavlock & Ankley, 1996).

2.2 - TOXICIDADE CRÔNICA

Os testes de toxicidade crônica foram elaborados para evidenciar efeitos adversos resultantes de exposições prolongadas dos organismos à concentrações não letais das substâncias químicas. Esses testes podem ser esquematicamente divididos em três grupos:

- Teste de Toxicidade Crônica com Ciclo de Vida Completo;
- Teste de Toxicidade Crônica com Ciclo de Vida Parcial e;
- Teste de Toxicidade para Estágios Iniciais de Vida (ELS – “Early Life Stages”)

Para a realização de um teste de toxicidade crônica com ciclo de vida completo, o organismo deve permanecer exposto durante um ciclo de vida reprodutivo completo, ou seja, de ovo a ovo, à pelo menos cinco concentrações da substância teste (Rand et al.,

1995). Nesse tipo de teste é avaliado o efeito da substância química sobre a sobrevivência, o crescimento e a reprodução da espécie.

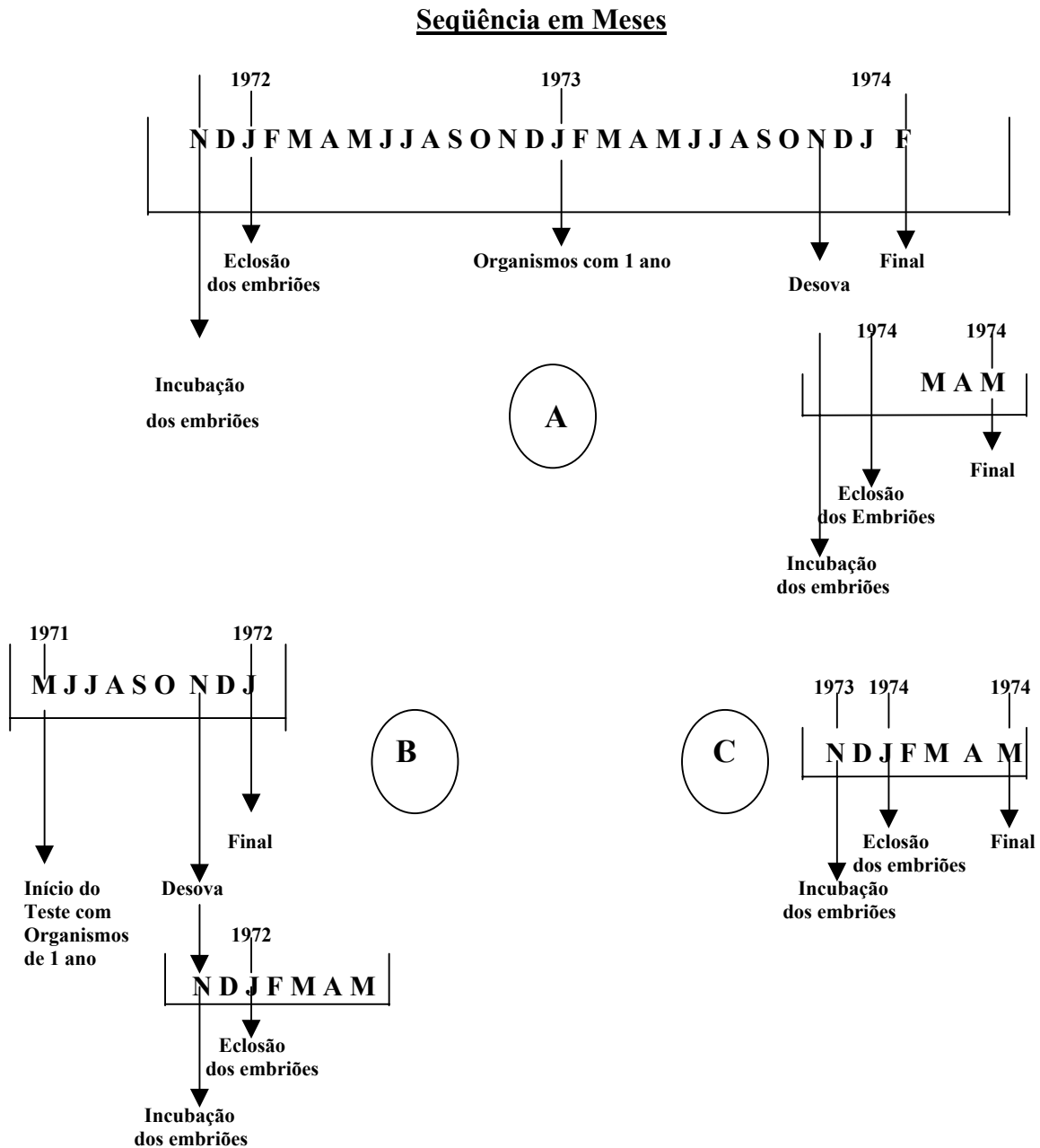
Segundo Cooney (1995), o primeiro teste de toxicidade aquática, voltado para avaliar os efeitos de exposições ao longo do ciclo de vida de um organismo, foi desenvolvido por Mount e Stephan, em 1967, utilizando peixes da espécie *Pimephales promelas*. O tempo de duração desse teste é cerca de 9 meses, sendo o seu custo estimado em aproximadamente 100 mil dólares. Além disso, para a garantia de sucesso na realização desses testes é necessária uma estrita padronização metodológica, além de condições experimentais rigorosamente controladas durante todo o período do experimento.

Posteriormente, foram desenvolvidos testes crônicos de ciclo de vida com alguns invertebrados, entre os quais o microcrustáceo *Daphnia magna* (Biesinger & Christensen, 1972), que por exibir ciclo de vida relativamente curto, tem menor duração (21 a 24 dias), facilitando assim a avaliação de um maior número de substâncias.

Durante a realização dos testes de ciclo de vida completo com algumas substâncias, percebeu-se que alguns estágios de desenvolvimento eram consistentemente mais suscetíveis do que outros. Desse modo, a possibilidade de concentrar esforços em pesquisas sobre os estágios mais suscetíveis prometia sucesso na busca por testes mais rápidos e de menor custo para predizer a toxicidade crônica de substâncias químicas. Assim surgiram os testes crônicos com ciclo de vida parcial, que incluíam apenas os estágios do desenvolvimento particularmente suscetíveis aos efeitos da exposição. Em geral, os testes com ciclo de vida parcial são conduzidos com espécies de peixe que requerem mais de um ano para atingir a maturidade sexual. A exposição tem início com indivíduos juvenis imaturos, no mínimo dois meses antes do desenvolvimento gonadal, continua durante a maturação e reprodução, e só termina cerca de 30 a 60 dias (no caso de salmonídeos) após a eclosão da próxima geração. Os testes envolvendo estágios iniciais de vida tem início com a exposição do ovo fertilizado, continuam durante o desenvolvimento embrionário, larval e juvenil, sendo observados principalmente os efeitos sobre a sobrevivência e o crescimento (McKim, 1995).

A Figura 2 mostra as diferenças relacionadas ao tempo de duração e aos estágios de desenvolvimento do organismo, entre os três tipos de testes crônicos padronizados para peixes.

Figura 2 – Cronologia para execução de testes crônicos utilizando a Truta Marron (*Salvelinus fontinalis*). (A) Teste com ciclo de vida completo; (B) Teste com ciclo de vida parcial e; (C) Teste com estágios iniciais de vida.



Fonte: McKim, 1995.

2.3 - TESTES RÁPIDOS DE EFEITOS SOBRE REPRODUÇÃO E DESENVOLVIMENTO

Como visto no tópico anterior, a duração da exposição e, em muitos casos, outras limitações inerentes ao sistema de exposição e o alto custo do ensaio, restringem a utilização dos testes crônicos, principalmente, quando o objetivo é o monitoramento da toxicidade de efluentes. Nesse caso, testes crônicos prolongados, envolvendo a exposição por todo o ciclo de vida de um organismo, não são práticos para avaliações toxicológicas de rotina. Muitos testes utilizando os Estágios Iniciais de Vida, mesmo sendo bem mais rápidos do que os testes com ciclo de vida parcial, ainda são considerados demorados demais para algumas finalidades. Por esta razão, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), que necessitava de respostas rápidas para as ações regulatórias, formou comissões que desenvolveram 4 testes de curta duração, utilizando estágios iniciais de vida, para estimar os efeitos crônicos de efluentes sobre organismos aquáticos. Esse conjunto de testes foi bem aceito pela comunidade científica internacional, e hoje é referência em termos de avaliação de toxicidade aquática. Esses testes são:

- Teste Semi-Estático de 7 dias, para avaliar a sobrevivência e o crescimento de larvas do peixe *Pimephales promelas*;
- Teste Semi-Estático de 7 dias, para avaliar a sobrevivência e a teratogenicidade na fase embrio-larval do peixe *Pimephales promelas*;
- Teste Semi-Estático de 7 dias, para avaliar a sobrevivência e a reprodução do crustáceo *Ceriodaphnia dubia*;
- Teste Estático de 4 dias, para avaliar a inibição do crescimento da microalga verde *Selenastrum capricornutum*.

2.4 - A IMPORTÂNCIA DOS ESTUDOS MULTIGERAÇÃO

Conforme detalhado na Figura 2 e nos tópicos acima descritos, percebe-se que nenhum dos métodos citados contempla a avaliação dos efeitos reprodutivos em mais de uma geração. O método de avaliação crônica mais longo (teste com ciclo de vida completo), avalia somente os efeitos reprodutivos na geração parental, através da observação quantitativa do número de ovos e do processo de eclosão.

Diferentemente, os estudos multigeração de efeitos sobre a reprodução de mamíferos, normalmente ratos e camundongos, têm sido exigidos para o registro de aditivos alimentares e agrotóxicos no Brasil e em vários países. Esse tipo de estudo é

solicitado para substâncias às quais espera-se que o indivíduo venha a se expor à baixas doses continuamente, ao longo de toda ou grande parte de sua vida. Nesses estudos de exposição continuada por mais de uma geração são avaliados efeitos sobre a fertilidade, gestação, parto, lactação, desenvolvimento e a reprodução dos filhotes das gerações F1 e F2.

A exposição contínua por várias gerações é particularmente interessante para detectar eventuais efeitos cumulativos e tem sido considerada como de alta sensibilidade para evidenciar efeitos adversos sutis, além de permitir a fixação de indicadores como o “NOAEL”. A desvantagem desse delineamento envolvendo a exposição contínua transgeração é a dificuldade, uma vez detectado o efeito, de identificar a fase ou etapa do processo reprodutivo afetado pela substância.

Os estudos multigerção podem ser interessantes, por exemplo, para investigar o impacto de exposições prolongadas à baixas doses de substâncias com atividade hormonal, conhecidas como “desreguladoras endócrinas”, que hoje são foco de um grande número de pesquisas em todo o mundo.

A constatação desse tipo de efeito (endócrino) destaca ainda mais a importância dos estudos multigerção, pois essas substâncias, de um modo geral, são ativas em concentrações muito baixas e a exposição a elas é prolongada. Os efeitos de desreguladores endócrinos muitas vezes só são perceptíveis nas gerações seguintes, como no clássico exemplo do dietilestilbestrol em que a exposição de mães durante a gravidez levou ao aparecimento, décadas mais tarde, de adenocarcinoma de vagina nas suas filhas (Colborn et al., 1997).

Nesse contexto, e com relação aos ambientes aquáticos, tem se dado muita atenção aos efeitos reprodutivos em populações ou espécies de peixes (Harries et al., 1997; Arcand-Hoy & Benson, 1998; Kime & Nash, 1999), mas poucas tem sido as propostas de estudos multigerção (Patyna et al., 1999; Schwaiger et al., 2002).

Os efeitos sobre a reprodução de invertebrados, que representam um elo de grande importância nas cadeias alimentares aquáticas, têm sido muito menos estudados, embora, em geral, sejam organismos de mais fácil manutenção e manipulação em laboratório (Lagadic & Caquet, 1998). As propostas de ensaio multigerção com invertebrados são ainda mais limitadas, destacando-se entre estas os estudos com o microcrustáceo *Daphnia galeata* (Tanaka & Nakanishi, 2002) e com o caramujo *Lymnaea stagnalis* (Czech et al., 2001).

3 - ESTUDOS PARA AVALIAÇÃO DE EFEITOS SOBRE A REPRODUÇÃO E O DESENVOLVIMENTO DE MOLUSCOS

Assim como ocorre com outros invertebrados, os estudos envolvendo efeitos de substâncias químicas sobre a reprodução e o desenvolvimento de moluscos também são escassos, principalmente aqueles em que a exposição continua por mais de uma geração. Nesse aspecto, os moluscos da classe gastrópoda tem sido mais contemplados, porque nesse grupo estão presentes organismos aquáticos e terrestres e também porque no contexto dos desreguladores endócrinos, os gastrópoda tem se mostrado altamente susceptíveis ao tributilestanho, utilizado na pintura de cascos de navios (Matthiessen & Gibbs, 1998). Digno de nota também é o fato de alguns gastrópodes aquáticos (caramujos) serem vetores ou hospedeiros intermediários de parasitas que causam doenças importantes no cenário internacional (ex. esquistossomose). Nesta área destacam-se as pesquisas sobre os efeitos de infecções por parasitas e de substâncias moluscidas no desempenho reprodutivo de gastrópodes vetores (Abdel-Hafez et al., 1997; Zakikhani & Rau, 1998; Dreyfuss et al., 1999; el-Ansary et al., 2001).

Os efeitos de substâncias químicas presentes no ambiente sobre a reprodução e o desenvolvimento de caramujos tem sido menos investigados. Dentre os raros trabalhos que se preocupam com esse tipo de observação, além de propor a utilização da *Biomphalaria glabrata* como organismo-teste ou bioindicador, destacam-se as publicações de Ravera (1977) e Münzinger (1987).

Após a descoberta dos efeitos provocados pelas substâncias desreguladoras do sistema endócrino, o interesse nesse tipo de estudo parece ter aumentado. Nessa área, destacam-se os trabalhos de Tate et al. (1997), Gomot (1998), Oehlmann et al. (2000), Schulte-Oehlmann et al. (2000), Czech et al. (2001) e Tillmann et al. (2001), sendo que desses, apenas o de Tate et al. (1997) com o gastrópodo *Pseudosuccinea columella*, o de Oehlmann et al. (2000), com o gastrópodo do gênero *Marisa* sp. e o de Czech et al. (2001), com o gastrópodo do gênero *Lymnaea*, investigaram os efeitos resultantes da exposição contínua por mais de uma geração.

4 - EXIGÊNCIAS REGULATÓRIAS

A execução de testes com organismos aquáticos para avaliar a toxicidade de efluentes, já é exigida em vários estados do Brasil. A partir de 1995 a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo – CETESB, propôs um

aperfeiçoamento no Índice de Avaliação da Qualidade de Águas (IQA) utilizado no estado, incluindo a realização de testes de toxicidade com organismos aquáticos, com o objetivo de proteger as comunidades aquáticas (Zagatto et al., 1999). Essa inclusão está sendo hoje proposta também ao Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA), por ocasião da revisão da resolução CONAMA Nº20 (Brasil, 1986), que trata da classificação dos corpos hídricos nacionais em função da qualidade de suas águas.

De um modo geral, as exigências para o registro de substâncias químicas, relacionadas à execução de testes de ecotoxicidade, não contemplam a realização de ensaios multigeracional. Para avaliar os efeitos crônicos de substâncias químicas sobre organismos aquáticos, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos exige apenas os estudos de ciclo de vida completo com peixes e com microcrustáceos. No Brasil, a Portaria Nº 84, de 15 de outubro de 1996 (Brasil, 1996), estabelece os procedimentos a serem adotados junto ao Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) para registro e avaliação da periculosidade ambiental de agrotóxicos e afins, e prevê como único teste de efeitos sobre a reprodução de organismos aquáticos, o teste rápido de reprodução e desenvolvimento com o microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia*.

5 - CARACTERIZAÇÃO DO ORGANISMO-TESTE

O organismo-teste escolhido para o presente estudo é o molusco da classe gastrópoda, das espécies *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 e *Biomphalaria tenagophila* Orbigny, 1835.

Os caramujos do gênero *Biomphalaria* são amplamente estudados no Brasil, porque três das suas espécies são hospedeiras intermediárias do *Schistosoma mansoni*, trematódeo causador da esquistossomose mansônica. Segundo Lima (1995) existem 10 espécies e uma subespécie de *Biomphalaria* identificadas no Brasil: *B. glabrata* Say, 1818; *B. tenagophila* Orbigny, 1835; *B. straminea* Dunker, 1848, *B. peregrina* Orbigny, 1835; *B. amazonica* Paraense, 1966; *B. intermedia* Paraense & Deslandes, 1962; *B. occidentalis* Paraense, 1981; *B. schrammi* Crosse, 1864; *B. oligoza* Paraense, 1975; *B. kuhniiana* Clessim, 1883; *B. tenagophila guaiabensis* Paraense, 1984. Entre estas espécies, as mais estudadas no Brasil são: *Biomphalaria tenagophila*, *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria straminea*, pois até a presente data, não foram encontrados caramujos das outras 7 espécies e 1 subespécie com infecção natural por *S. mansoni* (Souza & Lima, 1990).

Nos caramujos do gênero *Biomphalaria*, como em todos os moluscos pulmonados aquáticos típicos, predomina a respiração atmosférica, adquirida pela adaptação dos moluscos branquiados aquáticos ao ambiente terrestre, com perda de brânquias e desenvolvimento de uma cavidade pulmonar. Admite-se que alguns representantes dos novos grupos terrestres regressaram ao ambiente aquático, mantendo a respiração pulmonar (Paraense, 1955).

Esses caramujos pertencem à família Planorbidae, e podem ser encontrados em uma grande variedade de coleções de água doce, paradas ou pouco correntes, tais como lagos, lagoas, poços, cisternas, pântanos, banhados, remansos de rios, riachos, canais de irrigação e de drenagem, plantações de agrião e de arroz, e qualquer área natural ou artificialmente alagada. Eles vivem de preferência em águas rasas, tendo como substrato o leito lodoso ou rochoso e a vegetação enraizada ou flutuante mais próxima das margens (Paraense, 1972).

O regime alimentar depende do substrato. O planorbídeo raspa com a rádula e ingere materiais de vários tipos, entre os quais o limo que se forma nas superfícies submersas e que contém algas, bactérias e outros microrganismos; o lodo rico em matéria orgânica e sais minerais; folhas e outros órgãos de plantas aquáticas; fragmentos de organismos animais e vegetais em decomposição; e excrementos de outros animais. Na maioria dos habitats favoráveis à colonização por esses organismos observa-se alguns traços comuns, como a riqueza de microflora e matéria orgânica, a pouca turbidez, a boa insolação, o pH entre 6 e 8, o baixo teor de NaCl e a temperatura média entre 20 e 25°C (Paraense, 1972).

Como todos os planorbídeos, a *Biomphalaria* é capaz de se reproduzir por autofecundação através de muitas gerações. A ovoposição geralmente é noturna, sendo a massa de ovos ou desova colocada sobre o lado inferior de folhas flutuantes, ou qualquer suporte sólido submerso, como plantas, rochas, conchas de outros moluscos, madeira, etc. A massa de ovos enrijece lentamente em contato com a água, apresentando em menos de meia hora o aspecto de um disco transparente, firme e flexível (Paraense, 1972). A divisão do ovo começa cerca de duas horas após a postura (Kawano et al., 1992), com a eclosão ocorrendo entre sete e dez dias (Oliveira-Filho et al., 1999a).

As características que permitem reconhecer o gênero *Biomphalaria* (Figura 3) são as seguintes: Concha discoidal, hemolinfa vermelha, mandíbula em T, olhos nas bases internas dos tentáculos, dente central da rádula bicúspide e sem denticulo acessório, glândulas salivares por fora do anel nervoso periesofágico, complexo peniano sem órgão

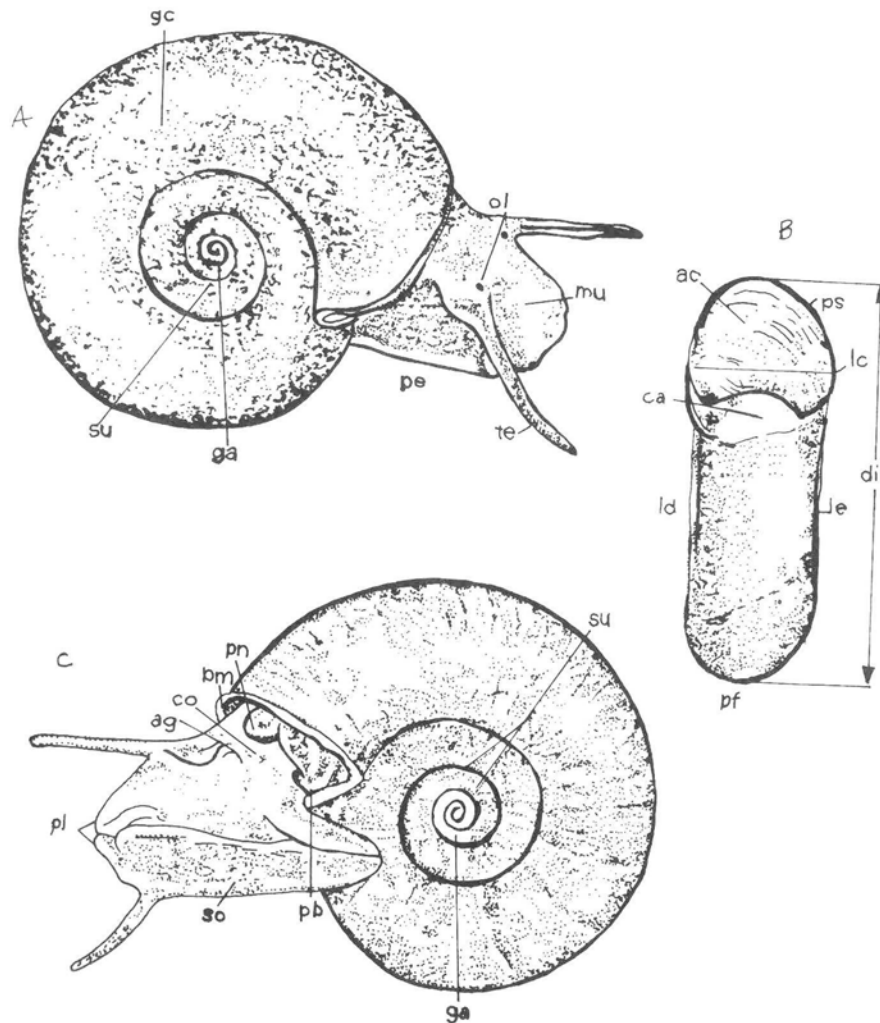
acessórios, pênis simples coincidindo sua ponta com a abertura do canal do esperma (Paraense, 1972).

A *Biomphalaria glabrata* Say, 1818, tem uma concha com até 40 mm de diâmetro e 11 mm de largura, seis a sete giros arredondados, crescendo lentamente em diâmetro; sendo o central mais à esquerda; lado direito mais escavado que o esquerdo; periferia arredondada, tendendo para a direita (Figura 4). É o maior molusco da família Planorbidae e sua distribuição geográfica se dá por cerca de dezesseis estados do Brasil, além do Distrito Federal.

A *Biomphalaria tenagophila* Orbigny, 1835, tem uma concha com até 35 mm de diâmetro e 11 mm de largura, sete a oito giros, crescendo lentamente em diâmetro; com carena em ambos os lados, sendo mais acentuada à esquerda; giro central mais à esquerda; lado esquerdo mais côncavo que o direito; periferia arredondada, tendendo para a direita; abertura deltóide nas conchas mais largas e cordiforme nas mais estreitas (Figura 5). Sua distribuição geográfica é ampla, ocorrendo em cerca de nove estados do Brasil, além do Distrito Federal (Paraense, 1972).

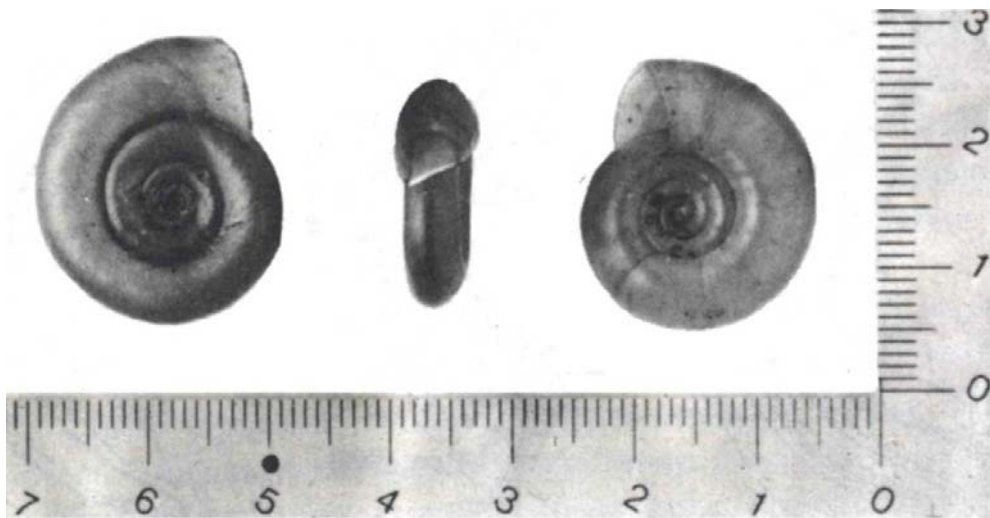
Todo esse conhecimento sobre o organismo, além da fácil manutenção em laboratório justificam a utilização da *Biomphalaria* no presente estudo.

Figura 3 – Anatomia externa do gênero *Biomphalaria*, segundo Paraense (1972).



Legenda: Concha e massa cefalopodal, vistas pela direita (A) e pela esquerda (C). Concha, vista de frente (B). **ac:** abertura da concha; **ag:** abertura genital masculina; **bm:** borda do manto; **ca:** calo; **co:** colo; **di:** diâmetro da concha; **ga:** giro apical ou interno (primeiro giro); **gc:** giro corporal ou externo (último giro); **lc:** largura da concha; **ld:** lado direito; **le:** lado esquerdo; **mu:** mufla; **ol:** olho; **pb:** pseudobrânquia; **pe:** pé; **pf:** periferia; **pl:** palpos labiais; **pn:** pneumóstoma; **ps:** perístoma; **so:** sola do pé; **su:** sutura; **te:** tentáculo.

Figura 4 – Conchas de *Biomphalaria glabrata* (Escala milimétrica).



Fonte: Lima (1995).

Figura 5 – Conchas de *Biomphalaria tenagophila* (Escala milimétrica).



Fonte: Lima (1995).

II - OBJETIVOS DO ESTUDO

O objetivo do presente trabalho é a avaliação dos efeitos de substâncias químicas sobre a reprodução de moluscos de água doce, utilizando caramujos do gênero *Biomphalaria* e duas abordagens distintas: a investigação do potencial embriotóxico e o estudo multigeração dos efeitos sobre a reprodução. Como relatado anteriormente, a escolha da *Biomphalaria* deveu-se ao fato de tratar-se de gênero amplamente estudado, de grande distribuição no território nacional e de fácil manutenção em laboratório, dentre outras características positivas. Este trabalho foi dividido em dois grandes estudos apresentados nos capítulos 1 e 2. No primeiro estudo (Capítulo 1) investigou-se a embriotoxicidade de substâncias moluscicidas, empregando um teste rápido (96 horas e 6 dias pós-exposição) de efeitos sobre o desenvolvimento embrionário da *B. glabrata*. No segundo estudo (Capítulo 2) avaliou-se os efeitos da exposição contínua à substâncias químicas, por mais de uma geração, sobre o desempenho reprodutivo da *B. tenagophila*. Os resultados desses estudos contribuirão para a utilização futura de caramujos do gênero *Biomphalaria* em ensaios para avaliação da toxicidade de substâncias químicas. Além disso, os dados gerados contribuirão também para avaliar se as espécies utilizadas, organismos bentônicos componentes de ambientes límnicos brasileiros, podem vir a ser consideradas espécies sentinelas em determinadas situações. Espera-se que as informações geradas sobre as substâncias estudadas possam subsidiar deliberações de órgãos reguladores nacionais (ex. IBAMA, ANVISA).

III - CAPÍTULO 1

EFEITOS DE MOLUSCICIDAS SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DO CARAMUJO *Biomphalaria glabrata*



1 - INTRODUÇÃO

Moluscidas são utilizados para combater caramujos e outros moluscos que se alimentam de plantas, na agricultura, em hortas e jardins, mas sem dúvida alguma é no âmbito da saúde pública que o uso desses produtos se reveste de importância fundamental. Isto porque alguns parasitas de interesse médico, mais especificamente os helmintos do gênero *Schistosoma*, tem moluscos gastrópodes como hospedeiros intermediários. São cinco as principais espécies do gênero *Schistosoma* consideradas de importância médica no cenário internacional: *S. haematobium*, *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* e *S. mekongi* (WHO, 1993). O único desses helmintos encontrado no Brasil é o *S. mansoni*, que tem três espécies de caramujos do gênero *Biomphalaria* como hospedeiros intermediários: *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* (Souza & Lima, 1990).

Uma das ações recomendadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), para o controle da esquistossomose, além da implementação de medidas de saneamento e do tratamento dos doentes, é o emprego de moluscidas para reduzir as populações do caramujo hospedeiro intermediário, em locais onde a doença é endêmica (WHO, 1993).

1.1 - USO DE MOLUSCIDAS PARA CONTROLE DA ESQUISTOSSOMOSE

Ao longo dos anos, várias substâncias foram empregadas no controle das populações de caramujos. Inicialmente, entre 1913 e 1915, foram utilizados para este fim moluscidas não específicos, tais como o cal, o cianeto de cálcio e o sulfato de cobre (Duncan, 1974). Posteriormente, entre os anos 1945 e 1955, houve um grande esforço de pesquisas direcionadas para o desenvolvimento de moluscidas mais eficazes e específicos. Nesse período, compostos como pentaclorofenol e pentaclorofenato de sódio também foram utilizados com essa finalidade. Após uma revisão dos moluscidas disponíveis, três grupos se destacaram em termos de eficiência, entre eles: compostos do grupo nicotinilida, os compostos organo-estanhosos e o B-2 (2,5-dicloro-4-bromofenol de sódio) (Webbe, 1987). Nos anos 60, surgiu a niclosamida, moluscida hoje amplamente usado e recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), para os programas de controle da esquistossomose (WHO, 1993). No Brasil a niclosamida é registrada para emprego em campanhas de saúde pública (Anvisa, 2003).

Em virtude da toxicidade para espécies não alvo e também dos altos custos, para países em desenvolvimento, demandado pelas substâncias químicas sintéticas, tem havido grande interesse em encontrar moluscicidas de planta que possam substituí-los em campanhas de controle da esquistossomose.

Entre os critérios estabelecidos para um moluscicida ideal, está sua eficiência ovicida, ou seja, sua capacidade de matar os embriões dos caramujos dentro dos ovos (WHO, 1965; Duncan & Sturrock, 1987). Todavia, segundo Duncan & Sturrock (1987), se as concentrações letais para caramujos adultos não matarem os embriões imediatamente, ainda assim é possível que essas mesmas concentrações, impeçam a eclosão dos ovos ou matem os embriões após uma exposição mais prolongada. Essa possibilidade, entretanto, não é investigada durante a triagem de substâncias com atividade moluscicida.

1.2 - ESTUDOS DE TOXICIDADE DURANTE O DESENVOLVIMENTO

Segundo Bantle (1995) o desenvolvimento do embrião pode ser considerado como um “elo fraco” no ciclo de vida de um organismo. Durante este período, processos celulares e moleculares são realizados para gerar um organismo multicelular complexo. Em geral, esses processos são sensíveis e facilmente perturbados por substâncias químicas.

Nesse contexto, alguns ensaios foram elaborados para avaliar os efeitos de xenobióticos sobre o desenvolvimento de organismos aquáticos, principalmente, vertebrados (ex. ensaio embrio-larval de 7 dias com o peixe *Pimephales promelas*; ensaio de teratogênese em 96 horas com embriões de rã – FETAX). Todavia poucas contribuições nesse campo foram geradas utilizando-se invertebrados.

Desse modo, o principal objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos de reconhecidos moluscicidas, testados em concentrações não letais, sobre o desenvolvimento embrionário de caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*, após uma exposição de 96 horas e posterior observação contínua por mais 6 dias.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - DESCRIÇÃO DOS MOLUSCICIDAS TESTADOS

2.1.1 - Sulfato de Cobre (CuSO₄)

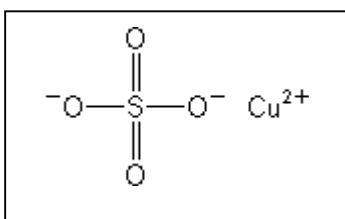
O sulfato de cobre é um potente algicida altamente solúvel em água, cerca de 143 g/L. Sua utilização como fungicida na agricultura também é comum em todo o mundo (WHO, 1998).

Foi um dos primeiros produtos utilizados para o controle de moluscos. No entanto, estudos anteriores mostram a pouca seletividade do sulfato de cobre como moluscicida, exibindo ação letal para microcrustáceos e peixes, além de inibir o crescimento de microalgas, em concentrações inferiores às letais para o caramujo alvo *B. glabrata* (Oliveira-Filho et al., 2004).

O produto utilizado no presente estudo foi o sulfato de cobre anidro da marca Merck, com 99% de pureza (Figura 1).

As concentrações de CuSO₄ utilizados no teste definitivo foram determinadas após ensaios preliminares e variaram de 0,25 a 10 mg/L com intervalos de razão 2.

Figura 1 – Fórmula estrutural do sulfato de cobre anidro.



2.1.2 - Hidróxido de Trifenil Estanho (TPTH)

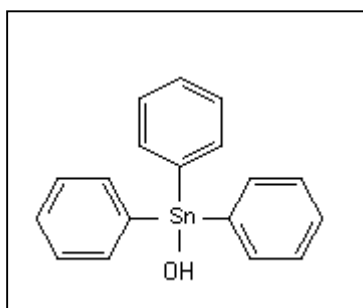
Os compostos organo-estanhos têm sido utilizados como fungicidas, algicidas, moluscicidas e como anti-incrustantes em tintas para cascos de navios e instalações. Durante vários anos o óxido de tributil estanho (TBTO) foi considerado um moluscicida eficiente, mas a sua alta toxicidade para organismos não alvo (WHO, 1999), a imunotoxicidade e os recentes relatos de seus efeitos desreguladores do sistema endócrino, vem desencorajando o uso desse composto no cenário internacional (Mathiessen & Gibbs, 1998). O TPTH, por outro lado, é um eficiente fungicida

registrado no Brasil apenas com fins agrícolas (Anvisa, 2003) (Figura 2). O TPTH possui baixa solubilidade em solução aquosa, cerca de 1 mg/L (WHO, 1999). Por se tratar de um potente moluscicida e ser muito utilizado em misturas com o tributil estanho (TBT), nas tintas anti-incrustantes aplicadas em cascos de navios (WHO, 1999), foi escolhido para ser testado no presente estudo.

O TPTH utilizado é o produto técnico fornecido pela empresa Hoechst-Agrevo, com pureza de 97,3%.

As concentrações do TPTH utilizadas no teste definitivo foram determinadas após ensaios preliminares e variaram de 0,0001 a 50,0 µg/L com intervalos de razão entre 5 e 10.

Figura 2 – Fórmula estrutural do hidróxido de trifenil estanho.

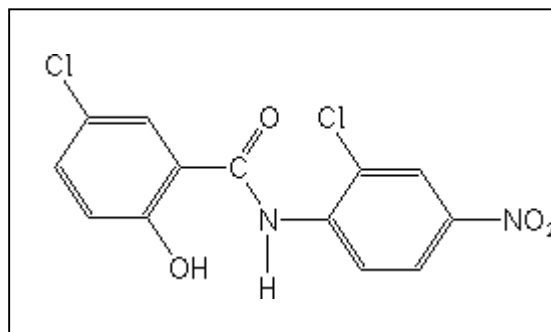


2.1.3 - Niclosamida (NCL)

A niclosamida é atualmente o único moluscicida recomendado pela OMS para uso em programas de controle da esquistossomose. Trata-se do sal de etanolamina 2, 5 – dicloro – 4 – nitrosalicilanilida (Figura 3), um composto com boa solubilidade em água, cerca de 230 mg/L (WHO, 1993) e reconhecido efeito ovicida e cercaricida (Andrews et al., 1983). O produto utilizado no presente estudo foi o Bayluscide® WP70 da empresa Bayer AG, com 70 g/Kg de niclosamida.

As concentrações de NCL utilizadas no teste definitivo foram determinadas após ensaios preliminares e variaram de 0,025 a 0,25 mg/L com intervalos de razão entre 2 e 2,5.

Figura 3 – Fórmula estrutural da niclosamida



2.1.4 - Látex da *Euphorbia milii* (LAT)

Paralelamente ao desenvolvimento dos moluscicidas quimicamente definidos, várias plantas foram investigadas quanto às suas propriedades moluscicidas. Entre as pesquisas desenvolvidas, Vasconcellos & Schall (1986) relataram a atividade moluscicida do látex bruto da Coroa-de-Cristo (*Euphorbia splendens* sinonímia *Euphorbia milii*) (Foto 1). O látex se mostrou extremamente potente, tanto *in natura* (Vasconcellos & Schall, 1986), quanto liofilizado (Oliveira-Filho & Paumgarten, 2000). A seletividade da atividade moluscicida do látex da *E. milii* foi avaliada por Oliveira-Filho & Paumgarten (2000). Esses autores demonstraram que, dentre as espécies de água doce testadas, os moluscos alvo da família Planorbidae foram as mais sensíveis ao efeito agudo do látex. Além disso, um amplo estudo toxicológico evidenciou a ausência de efeitos mutagênicos (Zamith et al., 1996) e teratogênicos (Souza et al., 1997), sendo recentemente relatado que o látex da *E. milii* não exibe efeito promotor de tumor na pele de camundongos (Delgado et al., 2003). Todos esses fatores sugerem que o látex pode vir a ser uma alternativa ao uso dos moluscicidas sintéticos no controle da esquistossomose, embora persistam dúvidas a respeito de possíveis efeitos co-carcinogênicos e indutores do vírus Epstein-Barr, tal como salientado por Delgado et al. (2003).

Uma das características relatadas que limita a utilização do látex como moluscicida, é o seu fraco efeito ovicida, observado somente em concentrações extremamente altas. Segundo Schall et al. (1998) a CL₉₀ em 24 horas, para embriões, é igual a 1200 mg/L.

O látex utilizado no presente estudo foi obtido através de um corte transversal no talo da planta, cerca de 10 cm abaixo do meristema apical. As gotas que brotaram da

incisão foram coletadas em recipientes de vidro contendo pequena quantidade de água (Foto 2). Após a coleta, o vidro foi selado, envolto em folhas de alumínio, transportado ao laboratório e mantido em geladeira à 5°C. Posteriormente o látex foi liofilizado e o líófilo mantido em geladeira, protegido da luz, em dessecador de vidro, até ser utilizado nos ensaios. Os exemplares de *E. milii* utilizados para a extração do látex são provenientes de canteiro exclusivo, mantido no campus da Fundação Oswaldo Cruz.

Alguns estudos sobre a composição química do látex revelaram a presença de vários triterpenos e flavonóides (Pancorbo & Hammer, 1972), lasiodiploidina (Lee et al., 1982), euphorbina (Dias-Baruffi et al., 2000), assim como dois ésteres peptídicos, as miliaminas H e I (Marston & Hecker, 1984) e ésteres diterpenos de ingenol, as miliaminas A-G (Marston & Hecker, 1983), além da miliamina L, provável responsável pelo efeito moluscicida (Zani et al., 1993).

As concentrações de LAT utilizadas no teste definitivo foram determinadas após ensaios preliminares e variaram de 0,1 a 200,0 mg/L com intervalos de razão entre 2 e 2,5.

Foto 1 – *Euphorbia milii*



2.2 - PREPARO DAS SOLUÇÕES

Todos os moluscicidas testados foram diluídos na água mole sintética (Tabela 1), com pH ajustado na faixa de 7,2 a 7,6 e dureza entre 40 e 48 mg/L em CaCO₃, tal como padronizado pela ABNT para testes de toxicidade com organismos aquáticos (ABNT, 1993).

O sulfato de cobre e a niclosamida, por serem facilmente solúveis em água, foram diluídos diretamente na água mole sintética, e as concentrações utilizadas foram preparadas através de diluições seriadas.

Para a diluição do TPTH na concentração de 1 mg/L (solução mãe), foi adicionado 1 mL de etanol em 1 mg de TPTH e posteriormente 999 mL de água mole sintética. Para garantir a diluição completa das partículas em suspensão, empregou-se um aparelho de dispersão ultrassônica por 20 minutos, e em seguida foram feitas as diluições usadas no teste.

No caso do látex liofilizado, também de difícil diluição direta na água, foi utilizada apenas a técnica de dispersão ultrassônica, procedimento este que foi suficiente para a solubilização total. Em seguida foram preparadas as concentrações testadas.

Tabela 1 – Composição da água mole sintética.

REAGENTE	QUANTIDADE
Sulfato de Cálcio ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,03 g
Cloreto de Potássio (KCl)	0,0002 g
Bicarbonato de Sódio (NaHCO_3)	0,048 g
Sulfato de Magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,061 g
Água Destilada	1000 mL

Fonte: ABNT, 1993.

Foto 2 – Retirada do látex para os experimentos.



2.3 - DESENVOLVIMENTO DO TESTE

As desovas de *B. glabrata* foram obtidas em pedaços de papel celofane, dispostos na superfície de aquários do Departamento de Malacologia do Instituto Oswaldo Cruz e, em seguida, transportadas ao Laboratório de Toxicologia Ambiental da ENSP/FIOCRUZ onde os testes foram realizados. Para cada concentração testada foi utilizado um número mínimo de 100 ovos, com até 15 horas (após a postura), estando portanto no período de desenvolvimento máximo correspondente ao estágio blástula (Camey & Verdonk, 1970).

As desovas foram distribuídas em placas de Petri contendo as diversas concentrações das substâncias testadas e expostas a elas por 96 horas. Nesse período foi observado se ocorriam mortes e a possível presença de malformações. Foram calculadas as concentrações letais 50% para os embriões (CL50) em 24 e em 96 horas de exposição. A partir de 96 horas de exposição as desovas foram transferidas para água mole sem moluscidas, e observadas até o 10^o dia após a postura, quando o experimento foi encerrado.

Ao final dos 10 dias (período considerado mais do que suficiente para eclosão dos ovos não expostos) foram avaliadas a embriofetividade, por meio do cálculo da CL50 em 6 dias pós-exposição; a ocorrência de malformações embrionárias (teratogenicidade), por meio do cálculo da concentração efetiva para 50% (CE50) para malformações em 6 dias pós-exposição; e a proporção de ovos que eclodiram (retardo de desenvolvimento), por meio do cálculo da CI50, concentração inibitória para a

eclosão de 50% dos ovos. Todos esses cálculos foram realizados por meio do método dos probitos (Probit), disponível em programa para computador na versão 1.5. Foi determinada também a Concentração Máxima em que Não foi Observado Efeito (CENO). Os grupos expostos foram comparados ao controle não exposto por meio do teste de Dunnett.

Os programas estatísticos utilizados para os cálculos são da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos e estão disponíveis no endereço eletrônico <http://www.epa.gov/neerlerd/stat2.htm>.

Para o registro dos dados nesse estudo foram utilizadas as seguintes definições:

- **Organismos mortos** – Aqueles em que o embrião se mostrou disforme e não desenvolvido, nas primeiras horas após a postura, ou aqueles sem movimento corporal e cardíaco, após estágio de desenvolvimento mais avançado;
- **Organismos vivos** – Aqueles embriões ou caramujos jovens que apresentavam movimentos;
- **Organismos malformados** – Aqueles embriões ou caramujos jovens vivos, que apresentavam morfologia corporal anômala;
- **Organismos eclodidos** – Aqueles caramujos que saíram do ovo com sucesso, mesmo que tenham morrido logo em seguida, ou estivessem malformados.
- **Organismos não eclodidos** – Aqueles embriões vivos, que ainda estavam dentro do ovo no final do experimento (10^o dia).

As malformações embrionárias foram classificadas de acordo com o critério descrito por Geilenkirchen (1966), com pequenas adaptações em: 1 – **Inespecífica (MI)** – quando o embrião se encontrava com morfologia não definida; 2 – **Hidrópica (H)** – quando o embrião se encontrava inchado e cheio de líquido; 3 – **De concha (MCO)** – quando a concha estava visivelmente malformada; e 4 – **Cefálica (MC)** - quando foram observadas alterações na região cefálica, principalmente com relação a formação dos olhos.

3 - RESULTADOS

A tabela 2 mostra, comparativamente, a toxicidade dos diferentes moluscicidas testados. Nessa tabela estão os valores quantitativos (CL_{50} , CI_{50} , e CE_{50}) dos efeitos dos moluscicidas para os três critérios de avaliação de efeito tóxico (embrioletalidade, retardo de eclosão e teratogenicidade) registrados no presente estudo.

Conforme pode ser observado na tabela 2, a exposição às concentrações de NCL não ocasionaram malformações embrionárias, e as poucas observadas nos grupos expostos ao $CuSO_4$ e ao TPTH não diferiram do que foi registrado para o grupo controle. Também não foi possível realizar o cálculo da CI_{50} para eclosão dessas três substâncias, pois devido a significativa letalidade, houve um pequeno número de caramujos vivos não eclodidos, e esse número não foi significativamente diferente do número registrado para o grupo controle. Ressalta-se que, de acordo com as definições descritas nos métodos, os efeitos foram avaliados separadamente, ou seja, para o cálculo de retardo na eclosão, por exemplo, pelo fato de existirem embriões mortos que conseqüentemente não eclodiram, esses não foram incluídos no cálculo.

Desse modo, torna-se possível determinar com maior precisão o critério de avaliação de efeito mais sensível para cada moluscicida, que no caso da NCL, do $CuSO_4$ e do TPTH foi a embrioletalidade.

O látex da *E. milii*, foi o único moluscicida que afetou claramente de forma concentração-dependente todos os critérios de efeito tóxico avaliados (Tabela 2). O LAT foi praticamente desprovido de efeito embrioletal (ovicida) nas primeiras 24 horas, mas apresentou expressivo efeito teratogênico, induzindo malformações nos embriões em concentrações relativamente baixas (Gráfico 1). O gráfico 1 mostra os vários tipos de malformações observadas nos embriões expostos ao látex, a partir da concentração de 1 mg/L, pois nas concentrações menores a frequência de anomalias foi baixa, não diferindo daquela do controle (ex. considerada sem efeito teratogênico), não sendo por isso representadas no gráfico. Como pode ser observado no gráfico 1, muitas vezes um mesmo indivíduo exibiu mais de um tipo de malformação. A malformação de concha (MCO) foi a mais freqüente, aparecendo isoladamente ou em conjunto com hidrópica (H) ou com malformação cefálica (MC). A partir da concentração de 10 mg/L de látex, as malformações foram notadas em 100% dos indivíduos vivos e, nessa mesma concentração, os quatro tipos aparecem em diferentes proporções. A malformação inespecífica (MI) teve um pequeno aumento de frequência com o aumento da concentração de 1 mg/L até 100 mg/L, a partir da qual desaparece. A malformação de

concha associada com a cefálica, exibiu progressivo aumento de frequência a partir da concentração de 50 mg/L até a de 200 mg/L, quando em conjunto com a associação malformação de concha/hidrópica afetam a totalidade dos indivíduos (Gráfico 1). Dentre as malformações cefálicas observadas, prevaleceram os caramujos com duplaftalmia, de um lado ou dos dois lados da cabeça (Foto 3) e até alguns com trioftalmia (Foto 4).

Tabela 2 – Efeito dos moluscicidas niclosamida (NCL), sulfato de cobre (CuSO₄), trifetil hidróxido de estanho (TPTH) e látex da *E. milii* (LAT) sobre o desenvolvimento embrionário do caramujo *Biomphalaria glabrata*. Os valores referem-se a concentrações expressas em mg/L.

Moluscicida	Efeitos Observados					
	Embriofetalidade			Retardo da Eclosão	Teratogenicidade	CENO-6d Pós-Exposição
	CL ₅₀ -24h	CL ₅₀ -96h	CL ₅₀ -6d Pós-Exposição	CI ₅₀ -6d Pós-Exposição	CE ₅₀ -6d Pós-Exposição	
NCL	0,08 0,06-0,11	0,07 0,06-0,08	0,07 0,06-0,08	-----•	-----#	0,025 ⁺
CuSO₄	7,00* 6,91 -7,08	3,67 3,03-4,35	2,19 0,95-3,30	-----•	-----#	0,50 ⁺
TPTH	0,007* 0,0073-0,0078	0,0008* 0,00058-0,0012	0,0003* 0,00027-0,00034	-----•	-----#	0,0001 ⁺
LAT	> 200	86,58 62,76-130,50	38,79 26,71-53,05	5,18 3,29-8,29	2,04 1,17-3,47	0,50 ⁺

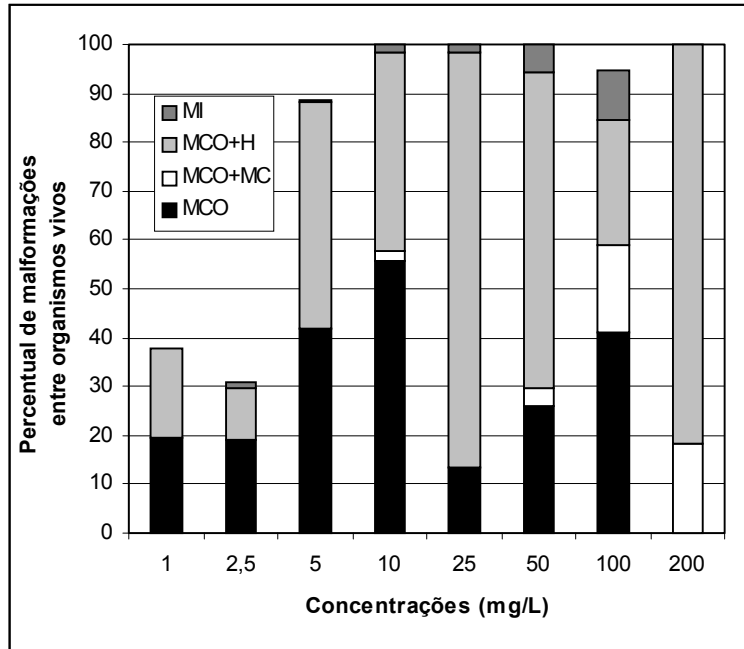
* Valores obtidos pelo método Trimmed Spearman Karber (Hamilton et al., 1977), pois pelo método dos probitos (Probit) não foi possível realizar o cálculo, devido à ausência de efeito entre a maior concentração sem efeito e a menor concentração letal.

+ CENO – Concentração Máxima em que Não foi Observado Efeito, por exemplo, concentrações máximas que não diferiram do grupo controle, de acordo com o teste de Dunnett, para o critério de efeito de maior susceptibilidade.

Não foi possível realizar o cálculo, pois a presença de malformações foi pequena e o número observado nas concentrações testadas não diferiu do controle ao nível de p<0,05 (Teste de Dunnett).

• Devido a alta toxicidade aguda da substância houve acentuada mortalidade e poucos indivíduos não eclodidos vivos. Em virtude do reduzido número de embriões vivos não eclodidos foi inviável o cálculo da CI₅₀ para retardo de eclosão.

Gráfico 1 - Ocorrência dos diferentes tipos de malformações embrionárias no grupo exposto ao látex da *E. milii*.



Conforme definido nos métodos, as malformações foram classificadas em: Inespecífica (MI), de Concha (MCO), Cefálica (MC) e Hidrópica (H).

De um modo geral, entre os embriões malformados, observados nas diferentes concentrações de LAT, vários eclodiram, principalmente aqueles com MCO. Nesses casos a taxa de eclosão foi drasticamente reduzida a partir da concentração de 25 mg/L, quando a letalidade se torna mais freqüente. Os caramujos com anomalias de concha (MCO) não sobrevivem por muito tempo após a eclosão. O aspecto desses indivíduos pode ser visualizado na foto 5.

Foto 3 – Embrião com duplaftalmia do lado esquerdo. Típica malformação cefálica observada nas maiores concentrações de LAT. Aumento de 66X.



Foto 4 – Embrião com trioftalmia do lado esquerdo. Típica malformação cefálica observada nas maiores concentrações de LAT. Aumento de 66X.

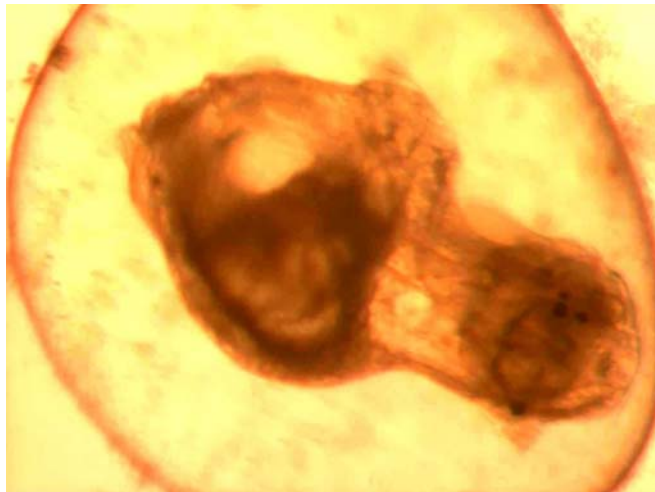


Foto 5 – Comparação entre um embrião normal e um com malformação de concha, ambos eclodidos. Aumento de 66X.



O TPTH, em virtude do efeito embriotal, foi extremamente potente como moluscicida, sendo ativo em concentrações inferiores a 1 µg/L (1 ppb). A CL₅₀ em 6 dias pós-exposição para o TPTH, conforme observada na tabela 2, foi 129.300 vezes menor do que a CL₅₀ para o látex no mesmo período (6 dias pós-exposição).

A niclosamida (NCL) foi letal para os embriões em concentrações menores do que as CL₅₀ determinadas para o sulfato de cobre e para o látex nos mesmos períodos de tempo. Os valores de CL₅₀ para a NCL foram uma a duas ordens de grandeza maiores do que os do TPTH.

O CuSO₄ foi menos potente do que o TPTH e a NCL, mas foi mais potente do que o LAT quanto aos efeitos embrietais. Entretanto, os efeitos inibitórios da eclosão e teratogênicos do látex, fizeram com que os dois moluscicidas tivessem o mesmo valor de CENO.

Devido à embriotalidade dos moluscicidas sintéticos testados, e ao reduzido número de indivíduos vivos, malformados ou não eclodidos, foi inviável calcular as CI₅₀ e CE₅₀ para retardo da eclosão e teratogenicidade, praticamente inexistentes nesses casos.

4 - DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo confirmaram que o látex da *E. milii* é pouco potente em termos de efeito embriotal (ovicida), mas evidenciaram, por outro lado, que ele exibe um expressivo efeito embriotóxico que se manifesta pela indução de malformações (teratogenicidade) e retardo da eclosão. Resultados semelhantes foram obtidos por Kawano e colaboradores com extratos das plantas *Stevia rebaudiana* e *Laurus nobilis* que, em geral, exibiram discreto efeito letal mesmo em altas concentrações, mas induziram malformações e retardo de eclosão nos embriões de *Biomphalaria glabrata* expostos (Kawano & Simões, 1986; Ré & Kawano, 1987).

Neste trabalho observou-se que, em termos de embriotalidade, o TPTH foi o moluscicida mais potente, seguido pela niclosamida, pelo sulfato de cobre e por último pelo látex da *E. milii*. Embora o TPTH tenha potente efeito moluscicida e ovicida, a sua baixa solubilidade aquosa e a considerável toxicidade para organismos não-alvo, limitam a sua utilização para este fim no campo (WHO, 1999).

Nesse contexto, a niclosamida tem vantagem de ter alta solubilidade aquosa (WHO, 1993), mas a desvantagem de apresentar também alta toxicidade para organismos não alvo nas concentrações em que exibe efeito moluscicida (Oliveira-Filho & Paumgarten, 2000).

Os valores de CL_{50} para a niclosamida após 24 e 96 horas de exposição foram muito próximos, ou seja, a mortalidade aumenta pouco com o prolongamento da exposição, o que sugere que o efeito letal tem latência curta e não é cumulativo. A ausência de indução de malformações nos embriões é coerente com essa interpretação, já que a niclosamida não deixa sequelas nos embriões sobreviventes (Tabela 2). O mesmo comportamento (ausência de efeito teratogênicos e de inibição da eclosão) também foi observado nos caso do $CuSO_4$ e do TPTH.

A tabela 3 mostra claramente que a NCL e o TPTH são letais para os embriões em concentrações menores do que aquelas que são necessárias para matar os caramujos adultos. A CL_{50} do $CuSO_4$ para embriões, entretanto, é cerca de 3,8 vezes maior do que a CL_{50} para caramujos adultos. Entre os quatro moluscicidas estudados neste trabalho, portanto, o LAT destacou-se por ser o único praticamente desprovido de efeito embriotal (ovicida).

Como o látex da *E. milii* é potente moluscicida para caramujos adultos (Oliveira-Filho & Paumgarten, 2000) é provável que a maior resistência dos embriões ao efeito letal se deva a fatores cinéticos. É possível que o revestimento do ovo e a massa

gelatinosa que envolve os ovos contidos na desova sejam pouco permeáveis à(s) substância(s) moluscicida(s) presente(s) no látex. A contribuição de fatores toxicodinâmicos, porém, não pode ser inteiramente descartada. Em estudo anterior, por exemplo, observamos que caramujos muito jovens, recém-eclodidos, foram levemente mais susceptíveis do que os organismos mais velhos (Oliveira-Filho et al, 1999b) o que sugere que a susceptibilidade poderia se alterar com o amadurecimento.

É importante destacar que a investigação de outras alterações, além da morte, podem ser importantes para avaliar o efeito de moluscicidas e estimar o impacto do seu uso sobre populações de caramujos. Em recente estudo, Schulte-Oehlmann et al. (2000), demonstraram, a partir de exames histológicos, que o cloreto de trifenil estanho, em concentrações um pouco inferiores às letais, induziu uma série de anomalias reprodutivas em outros moluscos gastrópodos, incluindo a presença do “imposex”, ou seja, a masculinização de fêmeas a partir da formação de um pseudo-pênis. Esses efeitos não letais podem eventualmente levar também a uma drástica redução do sucesso reprodutivo dos caramujos.

Tabela 3 – Comparação entre as CL₅₀ para embriões obtidas no presente estudo e as CL₅₀ para caramujos adultos determinadas em diferentes estudos. Valores expressos em mg/L.

Moluscicida	CL₅₀ 24hs Embriões	CL₅₀ 24 hs Adultos/Espécie/Referência
NCL	0,08	0,16 / <i>B. glabrata</i> / Oliveira-Filho & Paumgarten, 2000
CuSO₄	7,00	1,87 / <i>B. glabrata</i> / Oliveira-Filho et al., 2004
TPTH	0,007	0,05 / <i>B. tenagophila</i> / Grisolia & Bicalho-Valadares, 1997
LAT	> 200	0,27 / <i>B. glabrata</i> / Oliveira-Filho & Paumgarten, 2000

5 - CONCLUSÕES

Os dados obtidos nesse estudo mostraram que o látex da *Euphorbia milii* (LAT) é praticamente desprovido de efeito ovicida (embrioletal) mas, por outro lado, causa malformações e inibe a eclosão de *Biomphalaria glabrata* em concentrações relativamente baixas.

A ausência de efeito embrioletal, contudo, não parece ser um impedimento ao uso do LAT no controle da esquistossomose. Como o caramujo alvo já é vulnerável aos efeitos letais do látex logo após a eclosão (Oliveira-Filho et al., 1999b) pode-se erradicar o hospedeiro intermediário do *S. mansoni* em determinada área, com aplicações periódicas do LAT. Além disso, como demonstrado nesse trabalho, a expressiva atividade embriotóxica do látex, que se manifesta a curtíssimo prazo em efeitos não letais (malformações e retardo da eclosão), pode contribuir também para a diminuição da população de caramujos nas áreas tratadas com esse moluscicida natural, visto que as malformações observadas, mesmo após a eclosão, comprometem a sobrevivência. É importante destacar que, para classificar as malformações, foram utilizados critérios simplesmente anatômicos de visualização externa. Entretanto, como sugerido pelo aspecto do caramujo mostrado na Foto 5, pode-se supor que anomalias internas também ocorram comprometendo ainda mais a sobrevivência dos indivíduos expostos à médio e longo prazo.

Com relação aos demais moluscicidas testados, o hidróxido de trifênil estanho (TPTH) foi o mais potente, apresentando as menores CLs50 e o menor CENO. A niclosamida (NCL) e o sulfato de cobre (CuSO_4), nesta ordem, seguiram-se ao TPTH e precederam o LAT, que foi a menos embriotóxica das substâncias moluscicidas investigadas neste trabalho. O LAT mostrou ser, entre as substâncias testadas, aquela com maior potencial para induzir malformações nos embriões de *B. glabrata*.

Este estudo permitiu também constatar que os moluscicidas afetam os embriões de diferentes formas, podendo, além de causar mortes, induzir malformações e retardar ou inibir sua eclosão, o que, em última análise, pode contribuir para diminuir a população de caramujos alvo nas áreas tratadas. Assim sendo, a triagem de substâncias moluscicidas com efeitos sobre o ovo deve envolver também outras respostas não-letais a curto prazo, como a indução de malformações embrionárias e o retardo ou inibição da eclosão e períodos mais prolongados de exposição e de observação dos indivíduos expostos in ovo.

IV - CAPÍTULO 2

EFEITOS DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS SOBRE A REPRODUÇÃO, A SOBREVIVÊNCIA E O DESENVOLVIMENTO DA *Biomphalaria tenagophila*: UM ESTUDO MULTIGERAÇÃO



1 – INTRODUÇÃO

Os efeitos de substâncias químicas sobre populações de vida aquática vem sendo investigados há bastante tempo.

Atualmente os efeitos provocados pelas substâncias conhecidas como “desreguladoras endócrinas”, tem sido alvo de grande interesse e se tornado o centro de numerosas pesquisas e iniciativas regulatórias (Ankley et al., 1998; van der Schalie, et al., 1999; Hutchinson, 2000). Nesse contexto, muita atenção tem sido dada a observações de efeitos sobre a reprodução de peixes (Harries et al., 1997; Arcand-Hoy & Benson, 1998; Kime & Nash, 1999). Embora os invertebrados representem um elo de grande importância nas cadeias alimentares aquáticas, os efeitos sobre esses organismos têm sido menos estudados (Matthiessen & Gibbs, 1998). Assim, torna-se importante desenvolver métodos que possibilitem detectar a influência da exposição crônica a essas substâncias, sobre a capacidade reprodutiva de espécies representativas desse grupo de organismos.

Em estudo anterior, empregando ovos de caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*, foi possível observar que, em concentrações bem inferiores às letais, algumas substâncias (moluscicidas) causam alterações que muitas vezes não matam de imediato o embrião exposto, mas geram outros efeitos que ao longo do tempo prejudicam e podem inviabilizar o desenvolvimento dos embriões (Oliveira-Filho et al., 1999a; Oliveira-Filho et al., 2000; Geraldino et al., 2001). Os resultados desse estudo foram apresentados no 1º capítulo.

O presente estudo tem como objetivo principal avaliar os efeitos crônicos de substâncias químicas, suspeitas de serem desreguladoras endócrinas ou xenoestrógenos, sobre a sobrevivência, a reprodução e o desenvolvimento do caramujo aquático *B. tenagophila*. Para investigar esses efeitos, os caramujos foram continuamente expostos por mais de uma geração sucessiva, constituindo um estudo multigeração de observação de efeitos sobre a reprodução de moluscos de água doce. Espera-se que os resultados obtidos possam subsidiar órgãos reguladores do país em deliberações sobre o uso dessas substâncias químicas. O desenho experimental adotado permitiu separar as gerações subsequentes em grupos de exposição contínua e descontinuada, visando avaliar a potencial reversibilidade dos efeitos uma vez cessada a exposição.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 – AS SUBSTÂNCIAS-TESTE

As substâncias selecionadas para serem incluídas nesse estudo, tem registros de presença no ambiente aquático, são suspeitas de serem desreguladoras do sistema endócrino e já foram citadas por afetar adversamente a reprodução em outras espécies e modelos experimentais, tal como referido nos trabalhos comentados a seguir.

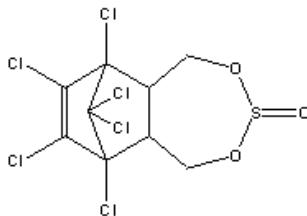
2.1.1 - Endosulfan

O endosulfan é um inseticida do grupo químico ciclodienoclorado, registrado no Brasil para uso agrícola e como preservante de madeira (Figura 1). O endosulfan técnico é uma substância cristalina marrom e contém os isômeros α e β numa proporção de aproximadamente 70:30. Ambas as estruturas são pouco resistentes à fotodegradação. A meia-vida do endosulfan na água é estimada ser de 4 dias, mas em condições anaeróbias e/ou em um baixo pH sua meia-vida pode se prolongar (WHO, 1984).

Embora apresente baixa solubilidade em água, cerca de 0,3 mg/L, o endosulfan contamina ecossistemas aquáticos em virtude, principalmente, da lixiviação de campos agrícolas e pelo despejo em rios próximos à áreas industrializadas onde ocorrem a fabricação e a formulação do inseticida (WHO, 1984). Estudos recentes realizados em território nacional, demonstram a presença de níveis consideráveis de endosulfan em tomates no Estado de Pernambuco (Araújo et al., 1999), água de superfície, água de chuva e em sedimentos na Bacia do Pantanal Matogrossense (Laabs et al., 2002). Além disso, o endosulfan também tem sido relacionado a problemas reprodutivos e do desenvolvimento observados em organismos aquáticos e mamíferos (Sinha et al, 1997; Dalsenter et al, 1999; Wiley & Krone, 2000; Wirth et al, 2001).

O produto utilizado no presente estudo é o endosulfan grau técnico, com 98,7% de pureza, fornecido pela Empresa Hoeschst-Agrevo.

Figura 1 – Estrutura molecular do Endosulfan.



2.1.2 - Nonilfenol Etoxilado

O nonilfenol técnico é uma mistura de isômeros, principalmente o 4-nonilfenol (cerca de 90%) e o 2-nonilfenol. O 4-nonilfenol é um composto alquilfenólico utilizado principalmente como intermediário na indústria química, e tem sido identificado como o principal produto de degradação de um grupo de surfactantes não iônicos chamados de nonilfenol etoxilados (Figura 2), que são utilizados mundialmente na produção de plásticos, agrotóxicos e produtos de limpeza. O uso predominante é na forma de nonilfenol polietoxilado com variações no tamanho das cadeias, constituindo emulsificantes, dispersantes, agentes humidificadores e espumantes, detergentes, na composição de tintas, cosméticos, agrotóxicos, produtos têxteis, acabamentos de metais, espermicidas e como aditivo em óleos lubrificantes (Muller & Schlatter, 1998).

Os nonilfenóis etoxilados são produzidos numa taxa de aproximadamente 350.000 toneladas anuais nos Estados Unidos, Europa Ocidental e Japão (Nichols et al., 2001), e seu uso resulta em grande contaminação de corpos hídricos através da descarga do esgoto urbano (Bennie, 1999; Snyder et al., 1999). Vários estudos tem demonstrado a presença e os efeitos adversos desses compostos em ambientes aquáticos (Jobling & Sumpter, 1993; Harries et al., 1997; Kannan et al., 2003). Segundo a Agência de Proteção Ambiental do Canadá (EHC, 2001) a solubilidade aquosa do nonilfenol, aumenta conforme o tamanho da cadeia e os compostos acima de seis unidades etoxiladas são altamente solúveis. Para se ter uma idéia, o nonilfenol com 5 unidades etoxiladas é solúvel em água na faixa de 9,48 mg/L (Ahel & Giger, 1993).

Em geral, o nonilfenol é mais persistente no ambiente do que seus derivados etoxilados, sendo muitas vezes encontrado em maior quantidade do que estes, provavelmente pelo fato de ser o produto final da degradação dos compostos etoxilados

(Maguire, 1999). Segundo Patterson et al. (1968), em testes de biodegradabilidade realizados no laboratório, o nonilfenol com 9 unidades etoxiladas apresentou uma meia vida de 6 semanas, na concentração inicial de 5 mg/L.

As rotas de exposição de seres humanos são diversas, podendo ocorrer tanto indiretamente através de alimentos contaminados e água potável, como diretamente via absorção dérmica ou inalatória após a aplicação de produtos contendo nonilfenol etoxilado (Muller & Schlatter, 1998).

As propriedades estrogênicas dos compostos para-alkil fenóis foram reconhecidas por Dodds & Lawson (1938) e mais recentemente, observadas em resíduos de materiais plásticos (Soto et al., 1991). Nesse contexto, vários trabalhos têm demonstrado os efeitos do nonilfenol sobre a reprodução de invertebrados, peixes e mamíferos (Toppari et al., 1996; Servos, 1999; Kwak et al., 2001).

No presente estudo foi utilizado o nonilfenol com 9,5 unidades etoxiladas, conhecido comercialmente como RENEX 95 e que contém 99% de nonilfenol de acordo com a ficha de segurança do produto.

Figura 2 – Estrutura Molecular do Nonilfenol Etoxilado.



2.1.3 - Atrazina

A atrazina é um herbicida do grupo químico triazina, registrado no Brasil apenas para uso agrícola (Figura 3).

Trata-se do herbicida mais utilizado em todo o mundo, com cerca de 80.000 toneladas aplicadas anualmente. Nos últimos anos a atrazina tem se tornado alvo de preocupação por parte da comunidade científica em virtude da sua persistência no ambiente e capacidade de contaminar águas subterrâneas e o ambiente aquático como um todo. Neste aspecto vale lembrar que a atrazina tem sido o herbicida mais frequentemente detectado em águas subterrâneas nos Estados Unidos (Graymore et. al., 2001). A solubilidade da atrazina em água à 20°C é de 33 mg/L e sua meia vida em

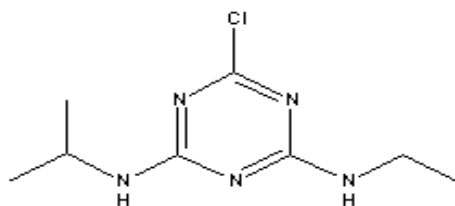
solução aquosa exposta à luz ultra-violeta se encontra em torno de 14,5 dias (USNLM, 2003).

Apesar destes motivos para preocupação, poucos estudos tem sido realizados para avaliar os impactos desse herbicida sobre os ecossistemas aquáticos. Com relação ao seu efeito sobre a reprodução, alguns estudos foram realizadas, com o microcrustáceo *Daphnia pulex* (Schober & Lampert, 1977), com o peixe *Lepomis macrochirus* (Kettle et al., 1987) e com ratos (Simic et al., 1994).

A atrazina tem sido classificada como uma substância desreguladora do sistema endócrino (Colborn et al., 1993), e recentemente Hayes et al. (2002a, 2002b) demonstraram que a atrazina induz a feminização de machos de rã da espécie *Xenopus laevis*, no laboratório, e da espécie *Rana pipiens*, no campo, em diferentes regiões dos Estados Unidos, mesmo em concentrações baixas, anteriormente consideradas como ecologicamente irrelevantes.

O produto utilizado no presente estudo é a atrazina técnica com 97,1% de pureza.

Figura 3 – Estrutura Molecular da Atrazina



2.2 - OS SOLVENTES UTILIZADOS

As substâncias químicas utilizadas nos ensaios foram dissolvidas em água mole sintética (Tabela 1), tal como padronizado pela Associação Brasileira de Normas Técnicas, para ensaios de toxicidade com organismos aquáticos, com pH ajustado entre 7,2 e 7,6 e dureza na faixa de 40 a 48 mg/L em CaCO₃ (ABNT, 1993). Na realização dos ensaios foram utilizadas concentrações nominais das substâncias-teste, obtidas por meio de diluições seriadas.

Devido à dificuldade de diluição em meio aquoso, o endossulfan e a atrazina foram inicialmente dissolvidos em álcool etílico P.A. (etanol), da marca VETEC, com 99% de pureza. Essas substâncias em solução alcoólica, foram posteriormente diluídas em água mole sintética, por meio da lenta adição de água, até completar o volume final.

Durante todos os ensaios foi incluído um controle negativo, só com água mole sintética, e para se determinar a possível influência do etanol sobre a reprodução dos organismos foi realizado um experimento onde utilizou-se apenas o etanol diluído em água, nas proporções presentes nas maiores concentrações das substâncias testadas, ou seja, no caso do endossulfan, cerca de 0,0025% v/v de etanol, e no caso da atrazina, cerca de 0,25% v/v de etanol. Para efeito complementar, foi utilizada ainda a concentração intermediária de 0,025% v/v, presente na concentração de atrazina 1,0 mg/L.

Tabela 1 – Composição da água mole sintética.

REAGENTE	QUANTIDADE
Sulfato de Cálcio (CaSO ₄ .2H ₂ O)	0,03 g
Cloreto de Potássio (KC l)	0,0002 g
Bicarbonato de Sódio (NaHCO ₃)	0,048 g
Sulfato de Magnésio (MgSO ₄ .7H ₂ O)	0,061 g
Água Destilada	1000 mL

Fonte: ABNT, 1993.

2.3 – ORGANISMO-TESTE

Os caramujos utilizados no presente estudo são provenientes de colônia mantida no Laboratório de Malacologia (Departamento de Ecologia) da Universidade de Brasília (UnB), há mais de 10 anos.

Embora no estudo anterior tenha-se trabalhado com a espécie *B. glabrata*, optou-se na presente investigação pela *B. tenagophila*, em virtude de haver maior disponibilidade dessa espécie no laboratório e sobretudo por ela ser muito semelhante à *B. glabrata* em termos de sensibilidade à substâncias químicas (Oliveira-Filho & Paumgarten, 2000).

2.4 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para cálculo das concentrações letais 50% e respectivos intervalos de confiança de 95% no teste de toxicidade aguda das substâncias (CL_{S50}), foi utilizado o método Trimmed Spearman-Karber (Hamilton et. al., 1977), disponível em programa de computador. O método Trimmed Spearman-Karber é um procedimento não paramétrico que assume a distribuição monotônica dos percentuais de efeitos observados.

Para comparar as diferentes concentrações testadas com o controle, tanto na avaliação do desempenho reprodutivo como na avaliação do desenvolvimento embrionário, foi empregada a ANOVA seguida do Teste de Dunnett (Dunnett, 1955). Este teste permite comparar as médias dos grupos tratados com a média do grupo controle, de duas maneiras opcionais: médias das proporções (após transformação arco-seno das proporções) das respostas em cada desova (ex. desenvolvimento embrionário) ou por meio da média das contagens/medidas (ex. número de ovos por caramujo). O programa utilizado é o programa Dunnett (Versão 1.5) da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, e realiza os seguintes cálculos:

- Análise de variância (ANOVA), antes de realizar o teste de Dunnett;
- Comparação das médias dos diversos grupos com a média do grupo controle (Procedimento Dunnett);
- Cálculo da diferença mínima entre as médias obtidas nos grupos tratados e a média do grupo controle, que poderia ser detectada como estatisticamente significativa, além de testar a validade da homogeneidade da variância, utilizando o teste de Bartlett;
- Caso haja diferenças entre o número de réplicas das concentrações, testes T são efetuados por meio do ajuste de Bonferroni ao nível de alfa.

Ambos os programas utilizados estão disponibilizados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) no endereço eletrônico <http://www.epa.gov/nerleerd/stat2.htm>.

Em todos os casos a hipótese de nulidade foi rejeitada quando $p < 0,05$.

2.5 - DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO

2.5.1 - Determinação da Toxicidade Aguda

A toxicidade aguda foi previamente avaliada para selecionar as concentrações utilizadas no teste multigeração de efeito sobre a reprodução. Os testes para determinação das concentrações letais tiveram duração de 96 horas (sistema de exposição estático) e envolveram os seguintes estágios de desenvolvimento da *B. tenagophila*: embriões (por meio da exposição das desovas), indivíduos recém-eclodidos (0 a 24 horas) e indivíduos adultos (aproximadamente 3 meses de idade). Foi calculada a concentração letal 50% (CL₅₀) e determinada a concentração máxima em que não se observou efeito letal agudo (Concentração de Efeito Letal Não Observado – CELNO). A partir da obtenção da CELNO, as concentrações utilizadas no estudo crônico foram definidas da seguinte forma: CELNO (concentração mais alta), CELNO/10 (concentração intermediária) e CELNO/100 (concentração inferior).

Os testes de toxicidade aguda foram realizados de acordo com métodos empregados em experimentos anteriores realizados no Laboratório de Toxicologia Ambiental da ENSP/FIOCRUZ (Oliveira-Filho et al., 1999a; Oliveira-Filho et al., 1999b; Oliveira-Filho & Paumgarten, 2000). Ressalta-se que para a realização do teste agudo, todos os organismos e desovas utilizados eram virgens de tratamento.

2.5.2 - Exposição e Manutenção dos Organismos

Por tratar-se de um caramujo hermafrodita, os experimentos de desempenho reprodutivo tiveram início com a exposição individual de 10 organismos sexualmente maduros (10 réplicas), com aproximadamente 3 meses de idade, por 8 semanas, à cada uma das concentrações das substâncias testadas (Foto 1).

A definição do tempo de duração da exposição da geração F0 (8 semanas) foi baseada no mesmo período escolhido por Czech et al. (2001) em estudo com o caramujo *Lymnaea stagnalis*, e nos dados de Andrade & Carvalho (1972), que mostram um acompanhamento da *B. tenagophila* por 20 semanas, a 8^a semana como uma das de maior pico reprodutivo da espécie mantida em laboratório.

Durante o período de exposição foram realizadas duas renovações da solução-teste por semana. A cada renovação era fornecida a alimentação dos indivíduos e a inspeção dos copos para o registro do número de desovas e de ovos por desova.

Visando otimizar a reprodução e o crescimento dos organismos durante os experimentos a alimentação consistiu de 0,20 mg de uma ração composta elaborada por Freitas et al. (1997) (Tabela 2) e cerca de 1 cm² de alface fresca, fornecidos a cada indivíduo, na ocasião das renovações de solução-teste. A utilização da ração baseou-se nos experimentos de Andrade & Carvalho (1972), que observaram aumento significativo na fecundidade da *B. tenagophila* alimentada com ração comercial para peixes de aquário e alface.

Como recipientes-teste foram utilizados copos de vidro, com capacidade de 300 mL (Foto 1), revestidos internamente com papel celofane, de tamanho maior ou igual a altura e o diâmetro do copo (Foto 2), além de um pequeno quadrado de papel celofane de 4 cm², colocado na superfície da solução, de modo a facilitar as posturas.

Para evitar a proliferação de insetos vetores de doença e, principalmente, a fuga dos caramujos expostos, todos os copos permaneceram cobertos com fina malha de tecido, conforme demonstrado na Foto 1.

Foto 1 – Distribuição dos caramujos em dez réplicas por concentração.



Para efeito de registro das desovas e dos ovos, a totalidade das posturas foi considerada, inclusive aquelas que, eventualmente, se encontravam fixadas no vidro

(por trás do papel celofane), sendo neste caso contabilizadas por meio da utilização de uma lupa manual.

A cada renovação de solução-teste o papel celofane era trocado, sendo aquele retirado encaminhado para a leitura do número de ovos e de desovas em um estereomicroscópio.

Tabela 2 – Composição para preparo de 1 Kg da ração composta.

COMPONENTES	QUANTIDADE
Leite em Pó	171,88 g
Terra Esterilizada (90°) e enriquecida com Bicarbonato de Sódio	326,25 g 80 g
Germen de Trigo	228,3 g
Carbonato de Cálcio em Pó	87 g
Alfafa Seca e Triturada	106,22 g
Vitamina E	0,35 g

Fonte: Freitas et al., 1997.

Foto 2 – Preparação do copo para os testes com o respectivo revestimento interno de papel celofane.



2.5.3 - Avaliação do Desempenho Reprodutivo

Durante o período de exposição, o desempenho reprodutivo dos organismos (F0) e (F1) foi avaliado quanto ao número de ovos por indivíduo (Foto 3); número de desovas por indivíduo (Foto 3); número de ovos por desova (Foto 4); viabilidade dos embriões (malformações) e retardo na eclosão dos ovos (Foto 5).

Foto 3 - Número de ovos e desovas por indivíduo. Aumento de 16X.



2.5.4 - Avaliação do Desenvolvimento Embrionário

Para a avaliação dos efeitos sobre o desenvolvimento embrionário e determinação da viabilidade dos embriões e do retardo na eclosão dos ovos, foram utilizadas somente as massas de ovos coletadas na última semana de registros reprodutivos da geração parental (F0 ou F1), quando não havia mais a preocupação com o registro dos outros parâmetros reprodutivos. Assim sendo, foi possível dar total atenção à avaliação do desenvolvimento embrionário, além de ter a certeza de que os embriões então obtidos, teriam sido gerados durante a exposição do progenitor, e nesse caso tinham todas as condições de serem avaliados como representantes da geração F1/F2. Com esse objetivo, as desovas eram marcadas, para que só aquelas de mesma idade, fossem utilizadas na avaliação do desenvolvimento embrionário, possibilitando assim maior rigor na comparação entre os indivíduos expostos e não expostos (grupo

controle). Os critérios para comparação foram descritos no 1º capítulo e trata-se de um curto experimento, com duração de 10 dias (tempo mais que suficiente para a eclosão de todos os ovos em condições normais). Nesse contexto, utilizou-se desovas depositadas de até 15 horas, que permaneceram em exposição e os embriões foram avaliados com relação a mortalidade, a presença de malformações e o retardo para eclosão em até 10 dias. Para todos esses parâmetros foi realizada a comparação com os embriões gerados pelo grupo controle. A diferença entre o método descrito no capítulo 1 e o aqui utilizado, é que no modelo anterior a exposição era de apenas 4 dias (96 horas) e neste é de 10 dias seguidos, até o final do período de observação.

Foto 4 - Número de ovos por desova. Aumento de 50X.

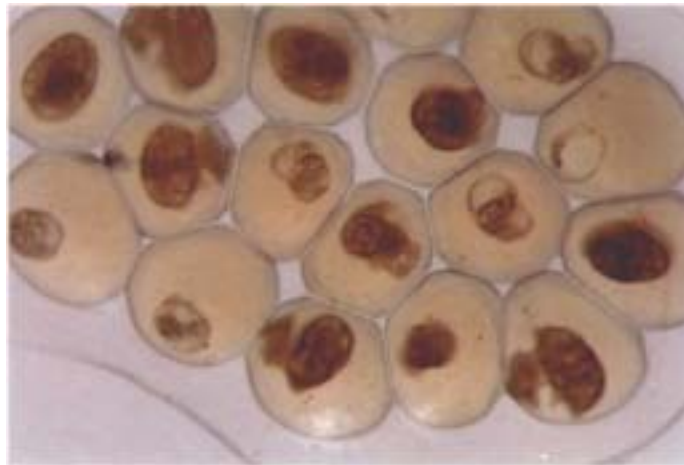
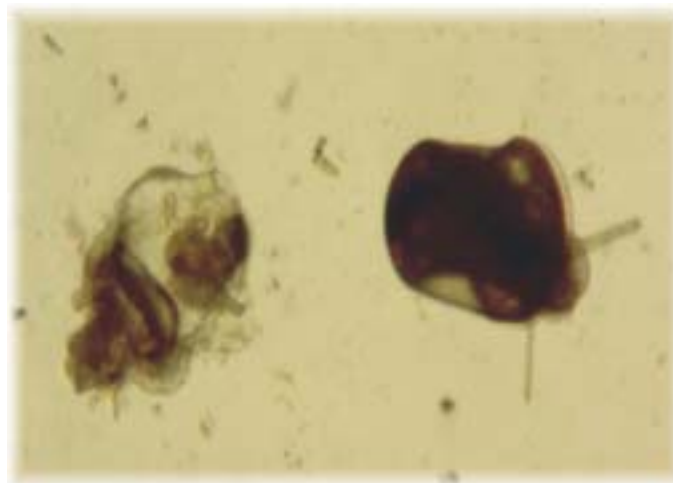


Foto 5 – Viabilidade dos embriões (malformações) e retardo na eclosão dos ovos. Aumento de 66X.



Os embriões gerados por progenitores F0 e selecionados aleatoriamente para serem acompanhados (geração F1), foram separados em dois grupos, sendo o primeiro mantido exposto nas mesmas concentrações da respectiva geração parental, e o segundo transferido para água mole sintética limpa, sem a presença da substância em estudo.





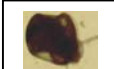



Ambos os grupos foram acompanhados - por período de tempo equivalente ao da exposição da geração parental - nas mesmas condições de luz, temperatura e alimentação, e avaliados quanto ao desenvolvimento, desempenho reprodutivo e geração dos indivíduos F2.

Deve ser ressaltada a importância do isolamento dos indivíduos a partir dos 2 meses de idade, pois no momento em que os caramujos se tornam sexualmente maduros, o que pode ocorrer antes dos 3 meses, torna-se possível a fecundação cruzada. No contexto do presente estudo, julgou-se importante evitar a fecundação cruzada, pois segundo Freitas (1994), caramujos do gênero *Biomphalaria*, tem a capacidade de armazenar os espermatozoides do parceiro por longos períodos e utilizá-los para gerar ovos, mesmo em condição de isolamento.

Na fase de crescimento e maturação sexual dos filhotes, a frequência da renovação da solução-teste e do alimento foi semanal, de modo a minimizar o estresse dos organismos em fase de desenvolvimento.

O delineamento do estudo, incluindo suas etapas e o tempo de duração, está sumarizado no Quadro 1.

Quadro 1 – Descrição esquemática das etapas e da duração do experimento multigeração

Etapas do Trabalho	Imagem	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6	Mês 7	Mês 8
Geração F0 Exposição de 10 adultos com ± 3 meses de idade		↓							
Coleta de desovas e registro dos parâmetros reprodutivos									
- Avaliação do desenvolvimento embrionário, letalidade, malformações e taxa de eclosão dos embriões em 10 dias.									
Geração F1 - Separação das desovas obtidas em dois grupos: Exposição continuada e Exposição descontinuada									
- Período de crescimento e maturação sexual dos jovens nos dois grupos									
Escolha aleatória de 10 adultos para representarem a Geração F1 na avaliação reprodutiva									
Coleta de desovas e registro dos parâmetros reprodutivos									
Avaliação do desenvolvimento embrionário, letalidade, malformações e taxa de eclosão dos embriões (Geração F2) em 10 dias									

3 - RESULTADOS

3.1 - TOXICIDADE AGUDA

Como descrito anteriormente, os testes de toxicidade aguda foram realizados para determinar as concentrações a serem utilizadas no estudo multigeração. Os resultados obtidos foram expressos em termos de Concentração Letal para 50% dos organismos (CL_{50}), em 96 horas de exposição e de concentração máxima testada em que não foi observado o efeito letal (Concentração de Efeito Letal Não Observado - CELNO) e podem ser visualizados na tabela 3. A toxicidade aguda foi avaliada em diferentes estágios de desenvolvimento (idades) do caramujo. Na tabela 3 pode-se observar que os embriões, protegidos no interior dos ovos e pela massa que os envolve, foram menos suscetíveis que os caramujos adultos e jovens (recém-eclodidos). Por outro lado, pode-se notar também que os caramujos jovens (recém-eclodidos) foram claramente mais suscetíveis do que os indivíduos maduros (adultos).

A partir desses resultados foram definidas as concentrações utilizadas posteriormente nos ensaios de multigeração (tabela 4). É importante destacar que o limite superior do intervalo de concentrações escolhido para o teste multigeração, foi igual à maior concentração não-letal (CELNO) obtida para adultos, mas superior à CELNO determinada com caramujos jovens (recém-eclodidos). A concentração intermediária, no entanto, foi igual ou menor do que a concentração máxima não-letal (CELNO) para indivíduos recém-eclodidos (tabela 4). Uma opção mais conservadora na escolha do intervalo de concentrações poderia ter sido feita tomando os recém eclodidos como referência, contudo essa escolha ocultaria um possível efeito tóxico não-letal sobre os indivíduos adultos.

Tabela 3 – Toxicidade aguda (CL₅₀ - 96 horas e I.C. 95%) e Concentração Máxima Testada em que Não se Observou Efeito Letal (CELNO - 96 horas) das substâncias testadas, para o caramujo *B. tenagophila* de diferentes idades. Valores expressos em mg/L.

Substância	CL ₅₀ - 96 horas mg/L			CELNO – 96 horas mg/L		
	Adultos	Recém Eclodidos	Embriões	Adultos	Recém Eclodidos	Embriões
Endosulfan	0,89 0,46-1,71	0,11 0,06-0,19	4,96 4,23-5,82	0,1	0,01	1,0
Nonilfenol Etoxilado	6,39 4,16-9,82	1,57 0,88-2,81	25,34 23,04-27,86	1,0	0,1	15
Atrazina	25,62 18,01-36,46	14,35 12,93-15,94	> 50	10,0	5,0	> 50

Tabela 4 – Concentrações de endosulfan, nonilfenol etoxilado e atrazina testadas no estudo multigeração.

Substâncias	Concentrações (mg/L)			
Endosulfan	Controle (0)	0,001	0,01	0,1
Nonilfenol 9,5 Etoxilado	Controle (0)	0,01	0,1	1,0
Atrazina	Controle (0)	0,1	1,0	10,0

Como as maiores concentrações do endosulfan, do nonilfenol etoxilado e da atrazina, ficaram muito próximas das concentrações letais e acima dos valores de CELNO determinados no teste agudo para caramujos recém-eclodidos, esperava-se alguma mortalidade de recém eclodidos da geração F1 expostos à essas concentrações, o que realmente ocorreu. Devido a fatos como esse separou-se um número de embriões maior do que o necessário, com o objetivo de obter um mínimo de dez indivíduos jovens para avaliar o desempenho reprodutivo da geração F1.

3.2 - MORTALIDADE

Na geração F0 exposta ao endosulfan houve uma morte na maior concentração testada (0,1 mg/L), o que não prejudicou as etapas subsequentes do experimento.

Durante o crescimento da geração F1 exposta ao endosulfan ocorreram, como previsto, mortes devido a maior suscetibilidade dos indivíduos recém eclodidos. Assim, no grupo exposto à concentração de 0,1 mg/L (valor superior à CELNO para recém-eclodidos), em que o número de ovos obtidos já havia sido menor, em virtude da clara inibição da fecundidade (Gráfico 1), restaram apenas 6 indivíduos, que foram mantidos em exposição, avaliados e computados.

No grupo F1 exposto à menor concentração do endosulfan (0,001 mg/L), também houve uma morte, logo no início da avaliação do desempenho reprodutivo. Como não havia organismos disponíveis para substituí-lo, esse grupo passou a ter apenas 9 indivíduos.

No caso do nonilfenol, como ocorreram duas mortes antes do início da exposição da geração F0, e não havia caramujos suficientes para substituí-los, optou-se por deixar o grupo controle (0 mg/L) e o grupo exposto à menor concentração (0,01 mg/L) somente com 9 organismos. Com relação à geração F1, não ocorreram mortes em ambos os grupos (exposição contínua e descontinuada).

Durante a exposição da geração F0 à atrazina ocorreram 3 mortes na concentração de 10 mg/L. Nesse grupo, a geração de embriões foi muito pequena e as desovas separadas para a geração da F1 não eclodiram. Desse modo, a avaliação do desempenho reprodutivo da geração F1 foi realizada apenas com as concentrações de 0,1 e 1,0 mg/L de atrazina.

Quanto à geração F1 exposta à concentração de 0,1 mg/L de atrazina foram observadas duas mortes. Na primeira, o indivíduo morto foi encontrado fora d'água, próximo a tela protetora, o que nos leva a crer que a morte tenha ocorrido em virtude da dessecação e não devido ao tratamento. No segundo caso a morte ocorreu no interior do líquido o que não nos permitiu tirar a mesma conclusão. No grupo exposto à concentração de 1,0 mg/L também foram observadas duas mortes, nesse caso provavelmente, ambas foram relacionadas ao tratamento. No grupo controle e no grupo que teve a exposição descontinuada não houve mortalidade.

Na geração F0 exposta ao etanol, foram observadas duas mortes na maior concentração testada (0,25% v/v), uma também creditada à tentativa de escape do

indivíduo (dessecação), encontrado fora do líquido, e a outra provavelmente relacionada à exposição.

3.3 – AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO REPRODUTIVO

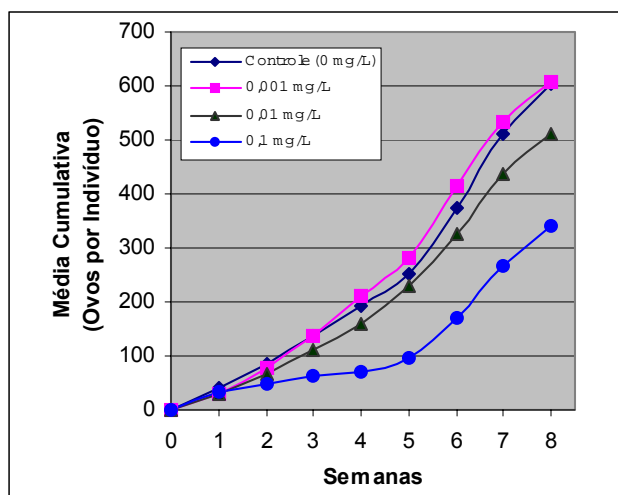
O desempenho reprodutivo dos indivíduos das gerações F0 e F1 foi avaliado até a 8ª semana, os resultados são descritos a seguir, de acordo com a substância química testada.

3.3.1 – Endosulfan Geração F0

Como pode ser visualizado no gráfico 1, o endosulfan, nas duas maiores concentrações testadas (0,01 e 0,1 mg/L), causou redução do número de ovos por indivíduo.

Para verificar se as diferenças entre os grupos testados e o grupo controle eram estatisticamente significativas, foi realizado o Teste de Dunnett (Dunnett, 1955).

Gráfico 1 – Desempenho reprodutivo (média do número de ovos por indivíduo/dados cumulativos), durante 8 semanas consecutivas, da geração parental (F0) de caramujos (*B. tenagophila*) expostos às diferentes concentrações de endosulfan.



Na tabela 5 são apresentadas as médias do número de ovos por indivíduo por grupo, em 8 semanas de exposição da geração F0 ao endosulfan. Como assinalado na tabela 5, houve uma redução significativa do número de ovos por indivíduo do grupo F0 exposto à maior concentração de endosulfan (0,1 mg/L).

Tabela 5 – Médias do número de ovos por caramujo entre indivíduos da geração F0, acumuladas após 8 semanas de exposição às diferentes concentrações de endosulfan.

Concentração (mg/L)	Número de Organismos	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
Controle	10	580,1	107,1	18,5
0,001	10	622,7	95,5	15,3
0,01	10	510,1	158,4	31,0
0,1	9	335,4*	84,9	25,3

*Média significativamente menor do que a média do grupo controle ao nível de $p < 0,05$ (Teste de Dunnett).

Cabe ressaltar que as diferenças entre os grupos de menor concentração de endosulfan (0,001 mg/L e 0,01 mg/L) e o grupo controle, quanto ao número de ovos por indivíduo que aparecem no gráfico 1, não foram estatisticamente significantes (Tabela 5).

O gráfico 2 mostra a média cumulativa do número de desovas por indivíduo durante as 8 semanas de exposição da geração F0 ao endosulfan, e na tabela 6 pode-se constatar que, na maior concentração testada (0,1 mg/L), o endosulfan reduziu significativamente o número de desovas por indivíduo. Assim sendo, pode-se dizer que a maior concentração de endosulfan (0,1 mg/L) diminuiu tanto o número de ovos quanto o de desovas por indivíduo da geração F0 (tabelas 5 e 6, gráficos 1 e 2).

Gráfico 2 – Desempenho reprodutivo (média do número de desovas por indivíduo/dados cumulativos), durante 8 semanas consecutivas, da geração parental (F0) de caramujos (*B. tenagophila*) expostos às diferentes concentrações de endosulfan.

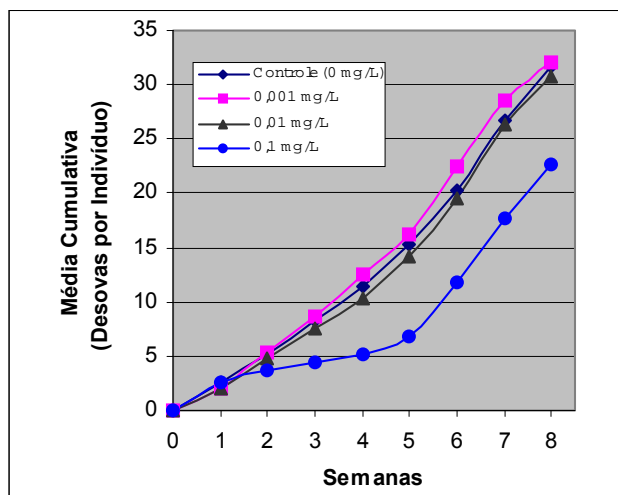


Tabela 6 – Médias do número de desovas por caramujo entre indivíduos da geração F0, acumuladas após 8 semanas de exposição às diferentes concentrações de endosulfan.

Concentração (mg/L)	Número de Organismos	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
Controle	10	30,8	7,0	22,7
0,001	10	32,9	5,6	16,9
0,01	10	30,7	8,4	27,4
0,1	9	23,4*	4,0	17,1

* Média significativamente menor do que a média do grupo controle ao nível de $p < 0,05$ (Teste de Dunnett).

Como pode ser visto no gráfico 3, a média do número de ovos por desova nas 8 semanas de exposição dos caramujos da geração F0, às várias concentrações de endosulfan, estiveram sempre próximas, contudo na avaliação de diferenças significativas pelo teste de Dunnett, as médias dos grupos expostos às concentrações de 0,01 e 0,1 mg/L foram consideradas menores que a do grupo controle (Tabela 7).

Gráfico 3 – Variação média no número de ovos por desova por indivíduo, durante as 8 semanas consecutivas de exposição da geração parental (F0) às diferentes concentrações de endosulfan.

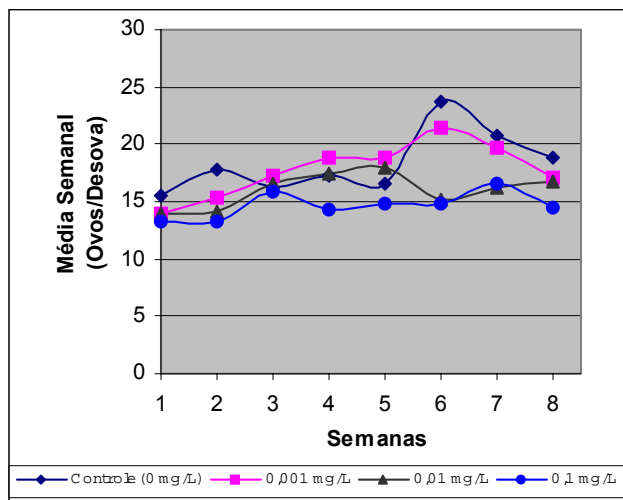


Tabela 7 – Médias do número de ovos por desova, por grupo de caramujos da geração parental (F0), durante as 8 semanas de exposição ao endosulfan.

Concentração (mg/L)	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
Controle	18,4	2,8	15,0
0,001	17,8	2,5	13,7
0,01	16,0*	1,5	9,2
0,1	14,7*	1,2	7,9

* Médias significativamente menores do que a média do grupo controle ao nível de $p < 0,05$ (Teste de Dunnett).

3.3.2 – Endosulfan Geração F1

Os indivíduos da geração F1, descendentes de geração F0 exposta, foram divididos ao acaso em dois grupos, que foram avaliados separadamente. O primeiro (exposição descontinuada) foi mantido em água limpa, enquanto o segundo continuou exposto às mesmas concentrações em que foram expostos os progenitores (geração F0).

3.3.2.1 – Endosulfan Geração F1 – Exposição Descontinuada

O gráfico 4 mostra o número de ovos por indivíduo (média, dados cumulativos), ao longo de 8 semanas, nos quatro grupos em que a exposição foi descontinuada. A tabela 8 mostra o número total de ovos por caramujo (média) relativos a esses grupos ao final de 8 semanas. Pode se observar no gráfico 4 e na tabela 8 que o grupo cuja geração F0 havia sido exposta à concentração de 0,1 mg/L de endosulfan, produziu um número de ovos maior do que a média do grupo controle não exposto. Os demais grupos não diferiram do grupo controle.

Gráfico 4 – Desempenho reprodutivo (média do número de ovos por indivíduo/dados cumulativos), durante 8 semanas consecutivas, da geração F1 de caramujos (*B. tenagophila*) em que a exposição ao endosulfan foi descontinuada.

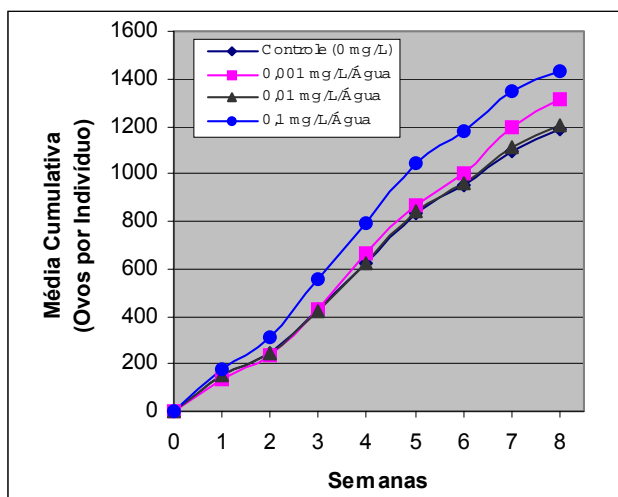


Tabela 8 – Número de ovos por indivíduo, acumulados ao longo de 8 semanas, entre os caramujos não expostos da geração F1, cujos progenitores (F0) foram expostos ao endosulfan.

Concentração (mg/L)	Número de Organismos	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
Controle	10	1182,5	221,3	18,7
0,001/Água	10	1344,2	223,3	16,6
0,01/Água	10	1196,2	220,5	18,4
0,1/Água	10	1400,9*	244,7	17,5

* Média significativamente maior do que a média do grupo controle ao nível de $p < 0,05$ (Teste de Dunnett).

O gráfico 5 mostra o número de desovas por indivíduo, ao longo de 8 semanas, nos caramujos não expostos da geração F1. Nesse gráfico e na tabela 9, pode-se notar

que, a média do número de desovas por indivíduo nos caramujos da geração F1 não-exposta, descendentes da geração F0 exposta à concentração de 0,1 mg/L, foi maior do que a média do número de desovas por indivíduo no grupo controle.

Gráfico 5 – Desempenho reprodutivo (média do número de desovas por indivíduo/dados cumulativos), durante 8 semanas consecutivas, da geração F1 de caramujos (*B. tenagophila*) em que a exposição ao endosulfan foi descontinuada.

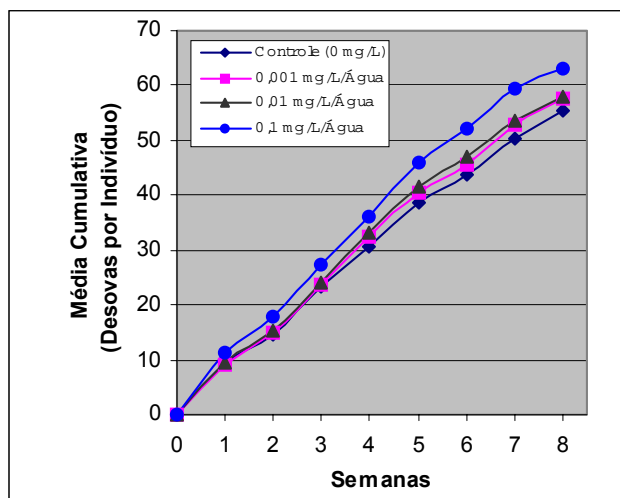


Tabela 9 – Número de desovas por indivíduo, acumulados ao longo de 8 semanas, entre os caramujos não expostos da geração F1, cujos progenitores (F0) foram expostos ao endosulfan.

Concentração (mg/L)	Número de Organismos	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
Controle	10	55,2	5,3	9,6
0,001/Água	10	59,2	8,2	13,9
0,01/Água	10	59,0	7,6	12,9
0,1/Água	10	63,6*	7,9	13,0

* Média significativamente maior do que a média do grupo controle ao nível de $p < 0,05$ (Teste de Dunnett).

Embora o gráfico 5 e a tabela 9 mostrem aumento do número de desovas por indivíduo nesse grupo, o gráfico 6 e a tabela 10 mostram que não houve alteração do número médio de ovos por desova. Em conjunto esses resultados sugerem que no grupo de geração F1 não exposta, que descende de progenitores (F0) expostos à 0,1 mg de endosulfan/L, houve um aumento do número de ovos por caramujo resultante, principalmente, do maior número de desovas por indivíduo.

Gráfico 6 – Variação média no número de ovos por desova por indivíduo, durante as 8 semanas consecutivas, nos grupos de caramujos da geração F1 que tiveram a exposição ao endosulfan descontinuada.

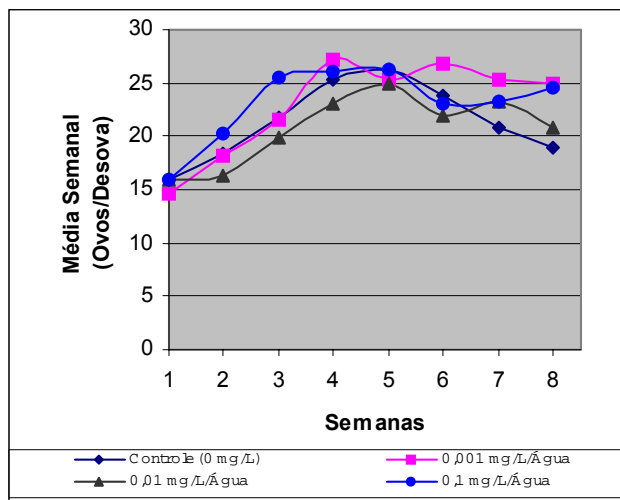


Tabela 10 – Médias do número de ovos por desova em 8 semanas, entre os caramujos da geração F1, em que a exposição ao endosulfan foi descontinuada.

Concentração (mg/L)	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
Controle	21,4	3,6	17,0
0,001/Água	23,0	4,5	19,6
0,01/Água	20,8	3,3	15,6
0,1/Água	23,1	3,5	15,2

* Não há médias significativamente diferentes da média do grupo controle ao nível de $p < 0,05$ (Teste de Dunnett).

3.3.2.2 – Endosulfan Geração F1 – Exposição Contínua

Os indivíduos da geração F1, que continuaram expostos, também foram observados até a 8ª semana. Pode-se observar no gráfico 7 e na tabela 11, que ocorreu uma nítida inibição no número de ovos por indivíduo entre os caramujos expostos à maior concentração de endosulfan. Pode-se observar na tabela 11 que o número de organismos diminuiu, devido à ocorrência de mortes, principalmente entre os caramujos expostos à maior concentração de endosulfan (0,1 mg/L).

Gráfico 7 – Desempenho reprodutivo (média do número de ovos por indivíduo/dados cumulativos), durante 8 semanas consecutivas, da geração F1 de caramujos (*B. tenagophila*) que continuaram expostos ao endosulfan.

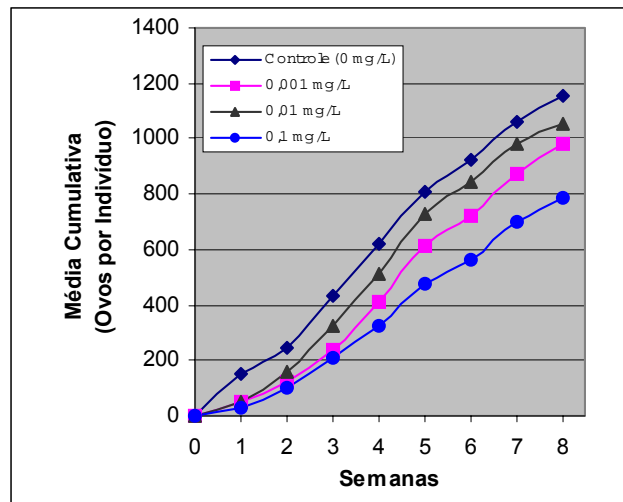


Tabela 11 – Número de ovos por indivíduo, acumulados ao longo de 8 semanas, entre os caramujos expostos da geração F1, cujos progenitores (F0) também foram expostos ao endosulfan.

Concentração (mg/L)	Número de Organismos	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
Controle	10	1182,5	221,3	18,7
0,001	9	1000,7	454,5	45,4
0,01	10	1124,6	238,9	21,2
0,1	6	781,8*	241,8	30,9

* Média significativamente menor do que a média do grupo controle ao nível de $p < 0,05$ (Teste de Dunnett).

O gráfico 8 mostra o número de desovas por indivíduo entre os caramujos da geração F1, que continuaram expostos ao endosulfan. Nesse gráfico e na tabela 12 pode ser observado que no grupo exposto à maior concentração de endosulfan (0,1 mg/L) houve uma diminuição do número de desovas por caramujo.

Gráfico 8 – Desempenho reprodutivo (média do número de desovas por indivíduo/dados cumulativos), durante 8 semanas consecutivas, da geração F1 de caramujos (*B. tenagophila*) que continuaram expostos ao endosulfan.

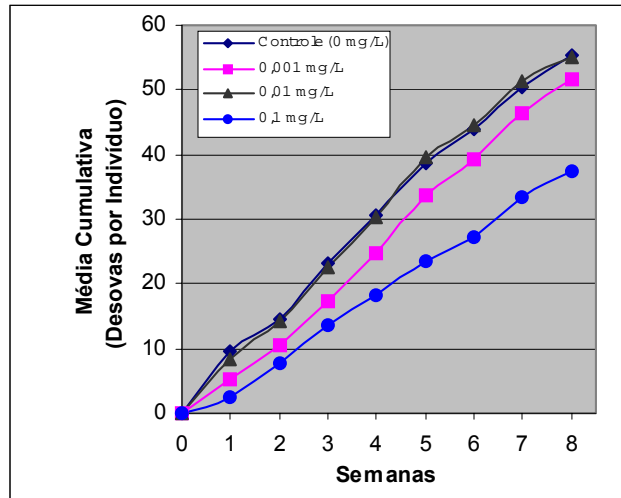


Tabela 12 – Número de desovas por indivíduo, acumulados ao longo de 8 semanas, entre os caramujos expostos da geração F1, cujos progenitores (F0) também foram expostos ao endosulfan.

Concentração (mg/L)	Número de Organismos	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
Controle	10	55,2	5,3	9,6
0,001	9	51,9	14,1	27,2
0,01	10	55,3	7,7	14,0
0,1	6	37,5*	8,7	23,1

* Média significativamente menor do que a média do grupo controle ao nível de $p < 0,05$ (Teste de Dunnett).

Embora o número total de ovos e de desovas por indivíduo tenha sido reduzido nos grupos expostos à maior concentração de endosulfan, não ocorreram alterações na média de ovos por desova (gráfico 9 e tabela 13).

Gráfico 9 – Variação média no número de ovos por desova por indivíduo, durante as 8 semanas consecutivas, nos grupos de caramujos da geração F1 que continuaram expostos ao endosulfan.

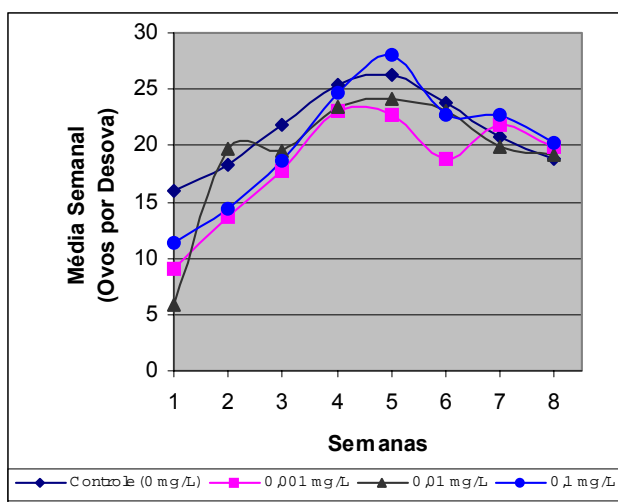


Tabela 13 – Médias do número de ovos por desova em 8 semanas, entre os caramujos da geração F1, que continuaram expostos ao endosulfan.

Concentração (mg/L)	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
Controle	21,4	3,6	17,0
0,001	18,4	4,8	26,4
0,01	19,4	5,8	30,0
0,1	20,4	5,5	26,9

* Não há médias significativamente diferentes da média do grupo controle ao nível de $p < 0,05$ (Teste de Dunnett).

3.3.3 – Nonilfenol Etoxilado Geração F0

Ocorreu uma clara diminuição do número de ovos por indivíduo entre os caramujos da geração F0 expostos às duas maiores concentrações de nonilfenol etoxilado (0,1 e 1,0 mg/L), nas 8 semanas consecutivas. Tal inibição pode ser visualizada no gráfico 10 e foi confirmada pela análise estatística (teste de Dunnett) como mostrado na tabela 14.

Na tabela 14 são apresentadas as médias do número de ovos por indivíduo de cada grupo, acumulados ao longo de 8 semanas. Nessa tabela pode ser visualizado que houve redução significativa do número de ovos por indivíduo – em relação ao controle – entre os caramujos expostos às duas maiores concentrações de nonilfenol etoxilado (0,1

mg/L e 1,0 mg/L). O gráfico 10 mostra que a diferença entre os grupos expostos às maiores concentrações de nonilfenol, e o grupo controle, começaram a se tornar mais evidentes a partir da 3ª semana. Como assinalado na tabela 14, nos grupos controle e 0,01 mg/L foram avaliados os dados de 9 caramujos. As mortes ocorridas nesses dois grupos estão descritas no item mortalidade e não foram relacionadas ao tratamento.

Gráfico 10 – Desempenho reprodutivo (média do número de ovos por indivíduo/dados cumulativos), durante 8 semanas consecutivas, da geração parental (F0) de caramujos (*B. tenagophila*) expostos às diferentes concentrações de nonilfenol etoxilado.

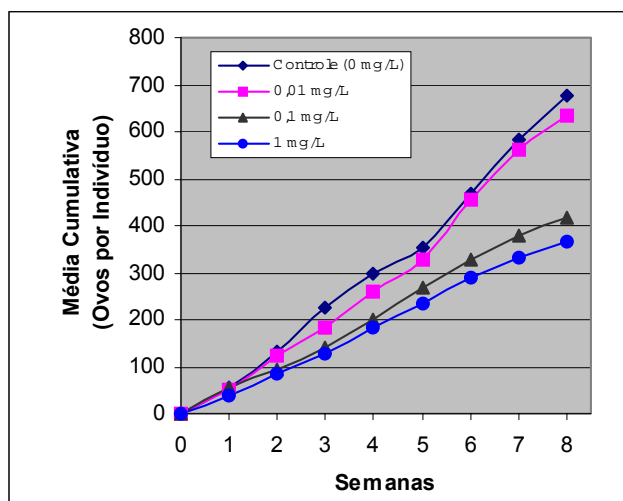


Tabela 14 – Médias do número de ovos por caramujo entre indivíduos da geração F0, acumuladas após 8 semanas de exposição às diferentes concentrações de nonilfenol etoxilado.

Concentração (mg/L)	Número de Organismos	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
Controle	9	675,6	107,1	18,5
0,01	9	594,7	95,5	15,3
0,1	10	417,6*	158,4	31,0
1,0	10	362,1*	84,9	25,3

* Médias significativamente menores do que a média do grupo controle ao nível de $p < 0,05$ (Teste de Dunnett).

O gráfico 11 mostra as médias do número de desovas acumuladas por indivíduo, entre os caramujos expostos ao nonilfenol etoxilado durante 8 semanas consecutivas.

Nas duas maiores concentrações de nonilfenol etoxilado houve redução do número de desovas por indivíduo em relação ao grupo controle (Gráfico 11 e Tabela 15).

Gráfico 11 – Desempenho reprodutivo (média do número de desovas por indivíduo/dados cumulativos), durante 8 semanas consecutivas, da geração parental (F0) de caramujos (*B. tenagophila*) expostos às diferentes concentrações de nonilfenol etoxilado.

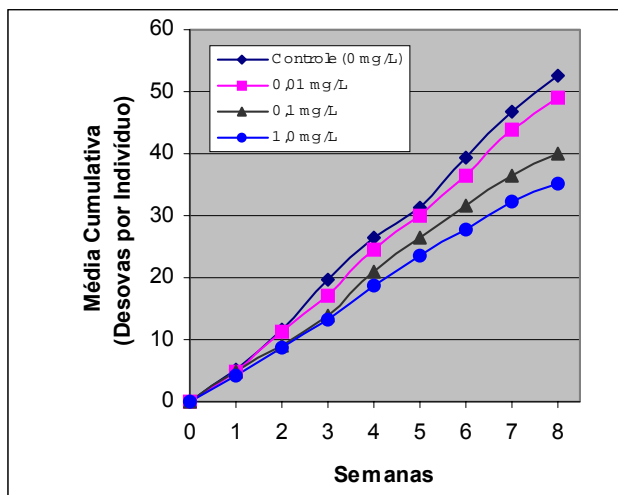


Tabela 15 – Médias do número de desovas por caramujo entre indivíduos da geração F0, acumuladas após 8 semanas de exposição às diferentes concentrações de nonilfenol etoxilado.

Concentração	Número de Organismos	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
Controle	9	52,7	8,3	15,8
0,01	9	49,1	6,5	13,2
0,1	10	39,8*	7,0	17,7
1,0	10	35,0*	4,2	12,0

* Médias significativamente menores do que a média do grupo controle ao nível de $p < 0,05$ (Teste de Dunnett).

O gráfico 12 e a tabela 16 mostram que não ocorreram alterações na média de ovos por desova dos quatro grupos testados, durante as 8 semanas de exposição ao nonilfenol etoxilado.

Gráfico 12 – Variação média no número de ovos por desova por indivíduo, durante as 8 semanas consecutivas de exposição da geração parental (F0) às diferentes concentrações de nonilfenol etoxilado.

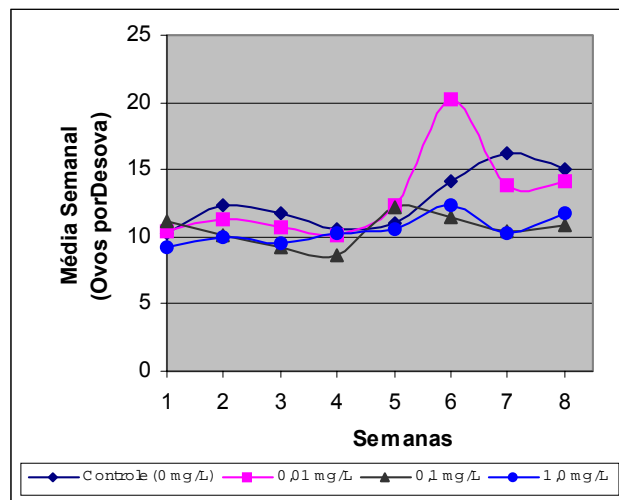


Tabela 16 – Médias do número de ovos por desova, por grupo de caramujos da geração parental (F0), durante as 8 semanas de exposição ao nonilfenol etoxilado.

Concentração (mg/L)	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
Controle	12,7	2,2	17,4
0,01	12,9	3,4	26,0
0,1	10,5	1,2	11,2
1,0	10,5	1,0	10,0

*Não há médias significativamente diferentes da média do grupo controle ao nível de $p < 0,05$ (Teste de Dunnett).

3.3.4 – Nonilfenol Etoxilado Geração F1

Os indivíduos da geração F1, descendentes da geração F0 exposta ao nonilfenol etoxilado, foram divididos em dois grupos: um que foi mantido em água limpa e outro que continuou exposto às mesmas concentrações a que havia sido exposta a geração anterior.

3.3.4.1 – Nonilfenol Etoxilado Geração F1 – Exposição Descontinuada

Como pode ser visto no gráfico 13 e na tabela 17, não houve diferenças, durante as 8 semanas de seguimento, quanto ao número de ovos por indivíduo entre os caramujos descendentes dos F0 controles e aqueles descendentes dos vários grupos da geração F0 expostos ao nonilfenol etoxilado.

Gráfico 13 – Desempenho reprodutivo (média do número de ovos por indivíduo/dados cumulativos), durante 8 semanas consecutivas, da geração F1 de caramujos (*B. tenagophila*) em que a exposição ao nonilfenol etoxilado foi descontinuada.

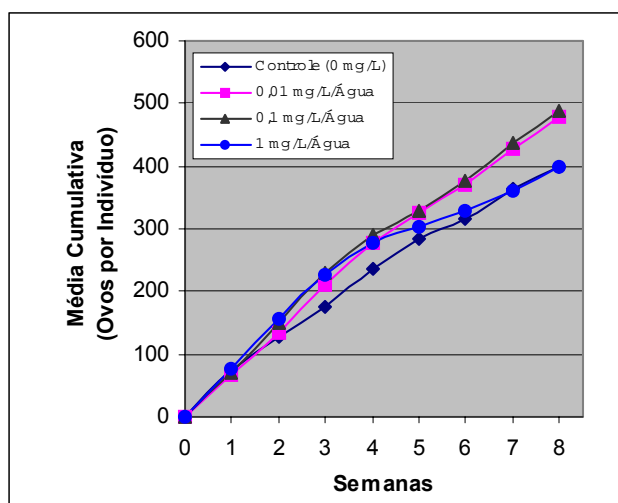


Tabela 17 – Número de ovos por indivíduo, acumulados ao longo de 8 semanas, entre os caramujos não expostos da geração F1, cujos progenitores (F0) foram expostos ao nonilfenol etoxilado.

Concentração (mg/L)	Número de Organismos	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
Controle	10	398,8	86,0	21,6
0,01/Água	10	479,2	85,1	17,8
0,1/Água	10	489,4	185,2	37,9
1,0/Água	10	397,1	265,5	66,9

* As médias dos vários grupos não diferem da média do grupo controle ($p < 0,05$, Teste de Dunnett).

Em relação ao número de desovas por indivíduo também não foram detectadas diferenças entre descendentes de controle e de expostos ao nonilfenol etoxilado (Gráfico 14 e Tabela 18).

Gráfico 14 – Desempenho reprodutivo (média do número de desovas por indivíduo/dados cumulativos), durante 8 semanas consecutivas, da geração F1 de caramujos (*B. tenagophila*) em que a exposição ao nonilfenol etoxilado foi descontinuada.

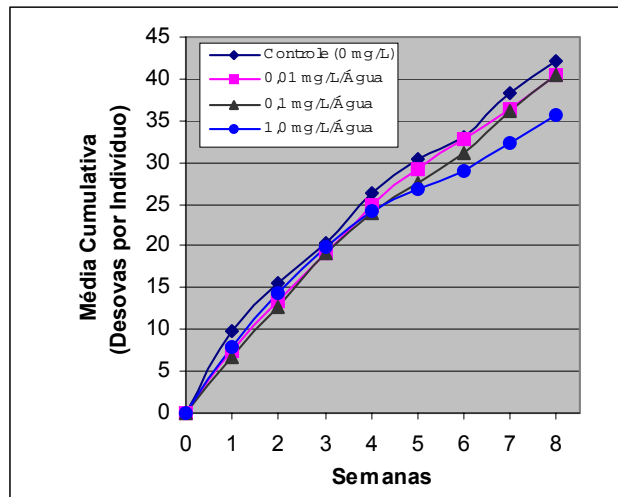


Tabela 18 – Número de desovas por indivíduo, acumulados ao longo de 8 semanas, entre os caramujos não expostos da geração F1, cujos progenitores (F0) foram expostos ao nonilfenol etoxilado.

Concentração (mg/L)	Número de Organismos	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
Controle	10	42,1	5,3	12,7
0,01/Água	10	41,0	8,0	19,5
0,1/Água	10	40,5	8,5	29,9
1,0/Água	10	35,7	16,3	45,8

* As médias não diferem da média do grupo controle ($p < 0,05$, Teste de Dunnett).

Diferentemente das tendências demonstradas pelos itens número de ovos por indivíduo e número de desovas por indivíduo, as médias de ovos por desova dos indivíduos da geração F1, nos grupos em que a exposição ao nonilfenol etoxilado foi descontinuada, nas concentrações de 0,01/Água e 0,1/Água, foram considerados maiores do que a média do grupo controle (Gráfico 15, Tabela 19).

Gráfico 15 – Variação média no número de ovos por desova por indivíduo, durante as 8 semanas consecutivas, nos grupos de caramujos da geração F1 que tiveram a exposição ao nonilfenol etoxilado descontinuada.

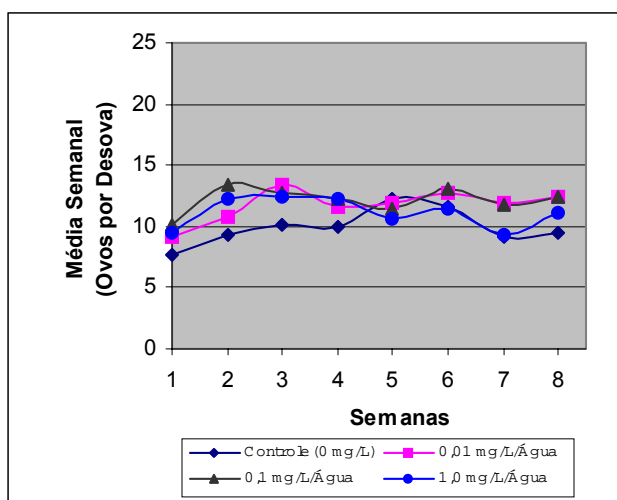


Tabela 19 – Médias do número de ovos por desova em 8 semanas, entre os caramujos da geração F1, em que a exposição ao nonilfenol etoxilado foi descontinuada.

Concentração (mg/L)	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
Controle	9,9	1,5	14,9
0,01/Água	11,8*	1,3	11,3
0,1/Água	12,2*	1,1	8,6
1,0/Água	11,1	1,3	11,4

* Médias significativamente maiores do que a média do grupo controle ao nível de $p < 0,05$ (Teste de Dunnett).

3.3.4.2 – Nonilfenol Etoxilado Geração F1 – Exposição Contínua

Os caramujos da geração F1 que foram mantidos em exposição às mesmas concentrações de nonilfenol etoxilado a que haviam sido expostos seus progenitores F0, apresentaram alteração concentração-relacionada da fecundidade.

Como pode ser visto no gráfico 16 e tabela 20, o número de ovos por caramujo do grupo exposto à 0,01 mg/L de nonilfenol etoxilado foi maior que o registrado no grupo controle. Por outro lado, o grupo exposto à concentração intermediária (0,1 mg/L)

não diferiu do controle e aquele exposto à maior concentração (1 mg/L) exibiu uma clara redução do número de ovos por indivíduo (Gráfico 16, Tabela 20).

Gráfico 16 – Desempenho reprodutivo (média do número de ovos por indivíduo/dados cumulativos), durante 8 semanas consecutivas, da geração F1 de caramujos (*B. tenagophila*) que continuaram expostos ao nonilfenol etoxilado.

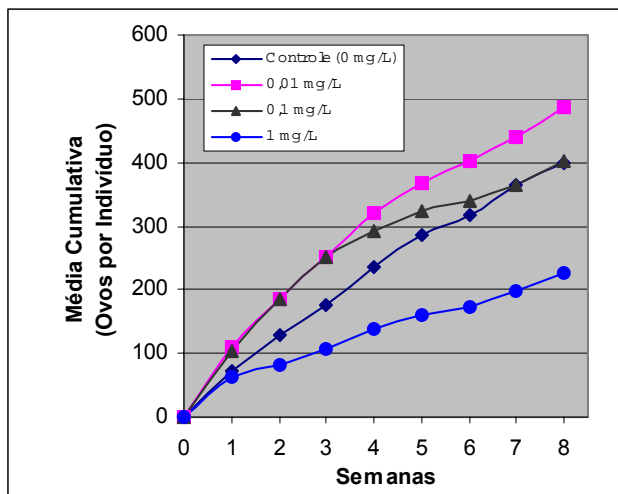


Tabela 20 – Número de ovos por indivíduo, acumulados ao longo de 8 semanas, entre os caramujos expostos da geração F1, cujos progenitores (F0) também foram expostos ao nonilfenol etoxilado.

Concentração (mg/L)	Número de Organismos	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
Controle	10	398,8	86,0	21,6
0,01	10	486,3*	66,2	13,6
0,1	10	398,4	122,8	30,8
1,0	10	225,7**	58,0	25,7

*Média significativamente maior do que a média do grupo controle ao nível de $p < 0,05$ (Teste de Dunnett).

** Média significativamente menor do que a média do grupo controle ao nível de $p < 0,05$ (Teste de Dunnett).

O delineamento das curvas observado com relação ao número de ovos por indivíduo foi semelhante ao do número de desovas por indivíduo. Tal semelhança entre as curvas, podem ser observadas nos gráficos 16 e 17. Todavia, após a análise estatística realizada, somente o grupo exposto à concentração de 1,0 mg/L teve número significativamente menor que o grupo controle (Tabela 21). Quando o parâmetro avaliado passa a ser a média de ovos por desova nas 8 semanas, pode-se observar no gráfico 18 e na tabela 22 que não há diferenças entre os grupos expostos e o grupo controle.

Gráfico 17 – Desempenho reprodutivo (média do número de desovas por indivíduo/dados cumulativos), durante 8 semanas consecutivas, da geração F1 de caramujos (*B. tenagophila*) que continuaram expostos ao nonilfenol etoxilado.

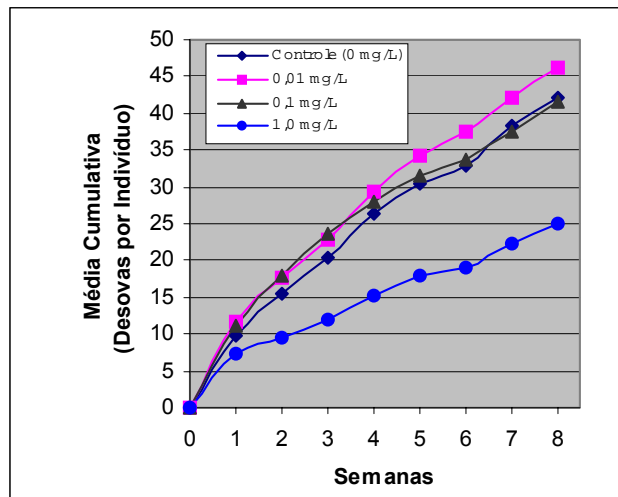


Tabela 21 – Número de desovas por indivíduo, acumulados ao longo de 8 semanas, entre os caramujos expostos da geração F1, cujos progenitores (F0) também foram expostos ao nonilfenol etoxilado.

Concentração (mg/L)	Número de Organismos	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
Controle	10	42,1	5,3	12,7
0,01	10	46,1	5,9	12,8
0,1	10	41,4	5,2	12,6
1,0	10	25,1*	4,8	19,1

* Média significativamente menor do que a média do grupo controle ao nível de $p < 0,05$ (Teste de Dunnett).

Gráfico 18 – Variação média no número de ovos por desova por indivíduo, durante as 8 semanas consecutivas, nos grupos de caramujos da geração F1 que continuaram expostos ao nonilfenol etoxilado.

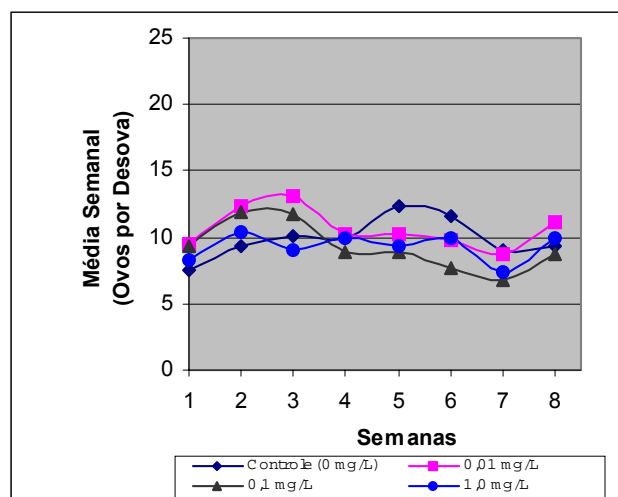


Tabela 22 – Médias do número de ovos por desova em 8 semanas, entre os caramujos da geração F1, que continuaram expostos ao nonilfenol etoxilado.

Concentração (mg/L)	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
Controle	9,9	1,5	19,9
0,01	10,6	1,5	18,5
0,1	9,3	1,8	23,6
1,0	9,3	1,0	19,0

* Não há médias significativamente diferentes da média do grupo controle ao nível de $p < 0,05$ (Teste de Dunnett).

3.3.5 – Atrazina Geração F0

A atrazina foi entre as substâncias testadas aquela que exibiu menor toxicidade aguda, o que permitiu testar concentrações maiores na avaliação do desempenho reprodutivo. A atrazina causou, na faixa de concentrações testada, drástica redução no número de ovos por caramujo (Gráfico 19 e Tabela 23). É importante ressaltar que na maior concentração (10 mg/L) três organismos morreram durante as semanas de observação e no final do experimento o grupo ficou reduzido a apenas 7 caramujos (Tabela 23).

Gráfico 19 – Desempenho reprodutivo (média do número de ovos por indivíduo/dados cumulativos), durante 8 semanas consecutivas, da geração parental (F0) de caramujos (*B. tenagophila*) expostos às diferentes concentrações de atrazina.

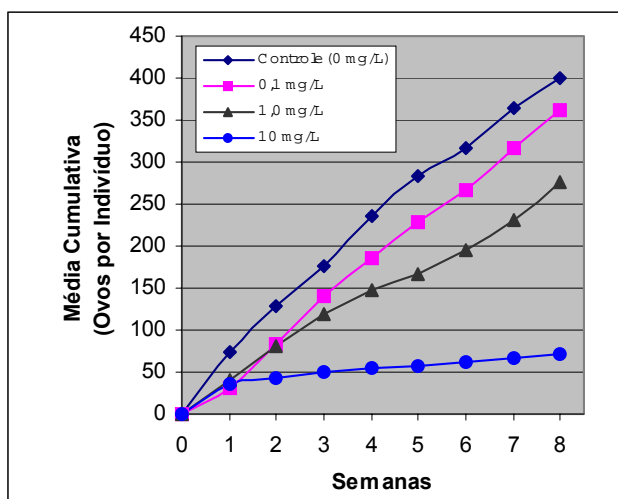


Tabela 23 – Médias do número de ovos por caramujo entre indivíduos da geração F0, acumuladas após 8 semanas de exposição às diferentes concentrações de atrazina.

Concentração (mg/L)	Número de Organismos	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
Controle	10	398,8	85,9	21,6
0,1	10	367,6	73,4	20,0
1,0	10	278,1*	79,7	28,7
10,0	7	76,4*	32,2	42,1

* Médias significativamente menores do que a média do grupo controle ao nível de $p < 0,05$ (Teste de Dunnett).

A análise do número de desovas por indivíduo (Gráfico 20 e Tabela 24) também mostra um acentuado efeito inibitório da atrazina relacionado à concentração.

Gráfico 20 – Desempenho reprodutivo (média do número de desovas por indivíduo/dados cumulativos), durante 8 semanas consecutivas, da geração parental (F0) de caramujos (*B. tenagophila*) expostos às diferentes concentrações de atrazina.

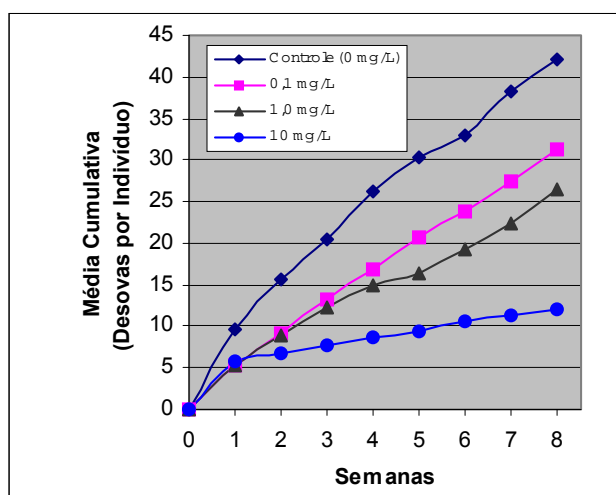


Tabela 24 – Médias do número de desovas por caramujo entre indivíduos da geração F0, acumuladas após 8 semanas de exposição às diferentes concentrações de atrazina.

Concentração (mg/L)	Número de Organismos	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
Controle	10	42,1	5,3	12,7
0,1	10	31,2*	5,8	18,6
1,0	10	26,4*	9,4	35,6
10,0	7	12,9*	4,0	31,2

* Médias significativamente menores do que a média do grupo controle ao nível de $p < 0,05$ (Teste de Dunnett).

A atrazina alterou o número de ovos por desova, aumentando o tamanho da desova na menor concentração (0,1 mg/L) e diminuindo-o na maior concentração testada (1,0 mg/L) (Gráfico 21 e Tabela 25).

Gráfico 21 – Variação média no número de ovos por desova por indivíduo, durante as 8 semanas consecutivas de exposição da geração parental (F0) às diferentes concentrações de atrazina.

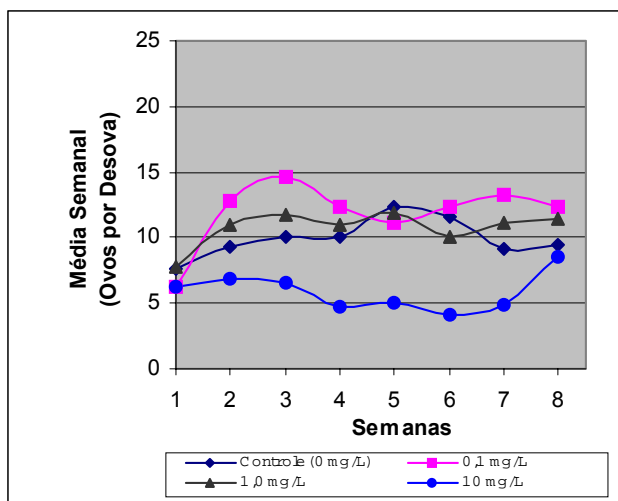


Tabela 25 – Médias do número de ovos por desova, por grupo de caramujos da geração parental (F0), durante as 8 semanas de exposição à atrazina.

Concentração (mg/L)	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
Controle	9,9	1,5	14,9
0,1	11,9*	2,5	21,0
1,0	10,8	1,4	12,6
10,0	5,9**	1,5	24,9

* Média significativamente maior do que a média do grupo controle ao nível de $p < 0,05$ (Teste de Dunnett).

** Média significativamente menor do que a média do grupo controle ao nível de $p < 0,05$ (Teste de Dunnett).

3.3.6 – Atrazina Geração F1

Seguindo a proposta metodológica prevista na elaboração do estudo, os indivíduos da geração F1, descendentes de geração F0 exposta, foram divididos em dois grupos, e avaliados separadamente. O primeiro grupo teve sua exposição descontinuada e foi mantido em água limpa, e o segundo grupo continuou exposto nas mesmas

concentrações em que foram gerados. Deve-se destacar que no caso da atrazina, o grupo F0 exposto à maior concentração (10 mg/L), não gerou descendentes e por isso não foi incluído na avaliação reprodutiva da geração F1.

3.3.6.1 – Atrazina Geração F1 – Exposição Descontinuada

Pode-se observar no gráfico 22, que nos grupos onde a exposição à atrazina foi descontinuada, praticamente não há diferenças entre o número de ovos por indivíduo. Essa inexistência de diferença, assim como os valores médios de cada grupo, estão apresentados na tabela 26. No gráfico 23 e tabela 27 observa-se que os números de desovas por indivíduo, também não diferem entre os grupos. O gráfico 24 e a tabela 28 confirmam as mesmas tendências apresentadas com relação à média de ovos por desova nas 8 semanas de experimento.

Gráfico 22 – Desempenho reprodutivo (média do número de ovos por indivíduo/dados cumulativos), durante 8 semanas consecutivas, da geração F1 de caramujos (*B. tenagophila*) em que a exposição à atrazina foi descontinuada.

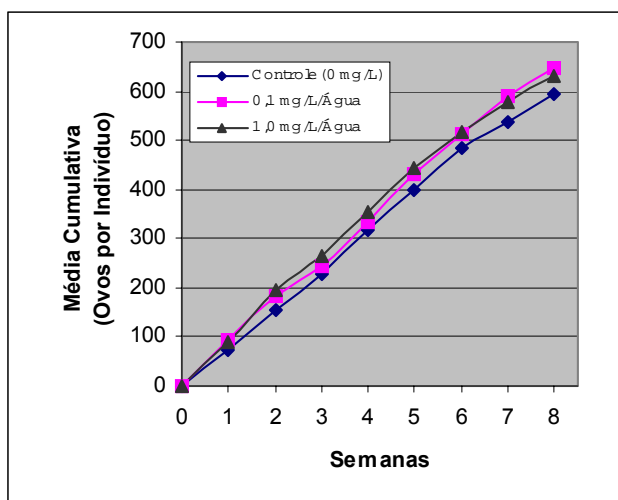


Tabela 26 – Número de ovos por indivíduo, acumulados ao longo de 8 semanas, entre os caramujos não expostos da geração F1, cujos progenitores (F0) foram expostos à atrazina.

Concentração (mg/L)	Número de Organismos	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
Controle	10	591,7	97,4	16,5
0,1/Água	10	650,8	122,9	18,9
1,0/Água	10	631,7	160,5	25,4

* Não há médias significativamente diferentes da média do grupo controle ao nível de $p < 0,05$ (Teste de Dunnett).

Gráfico 23 – Desempenho reprodutivo (média do número de desovas por indivíduo/dados cumulativos), durante 8 semanas consecutivas, da geração F1 de caramujos (*B. tenagophila*) em que a exposição à atrazina foi descontinuada.

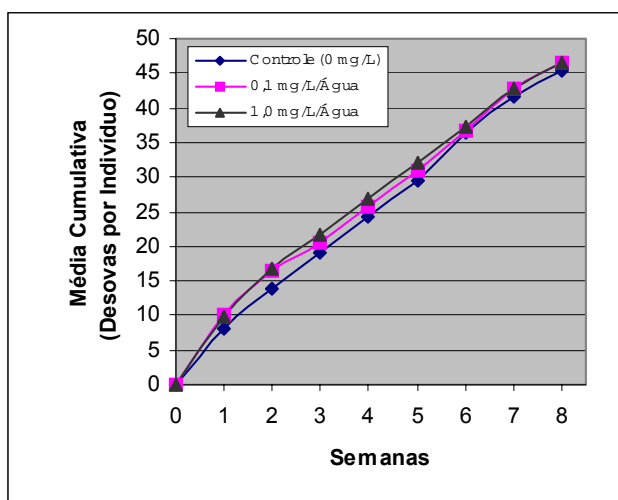


Tabela 27 – Número de desovas por indivíduo, acumulados ao longo de 8 semanas, entre os caramujos não expostos da geração F1, cujos progenitores (F0) foram expostos à atrazina.

Concentração (mg/L)	Número de Organismos	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
Controle	10	45,5	8,5	18,7
0,1/Água	10	45,9	7,1	15,4
1,0/Água	10	47,1	10,0	21,2

* Não há médias significativamente diferentes da média do grupo controle ao nível de $p < 0,05$ (Teste de Dunnett).

Gráfico 24 – Variação média no número de ovos por desova por indivíduo, durante as 8 semanas consecutivas, nos grupos de caramujos da geração F1 que tiveram a exposição à atrazina descontinuada.

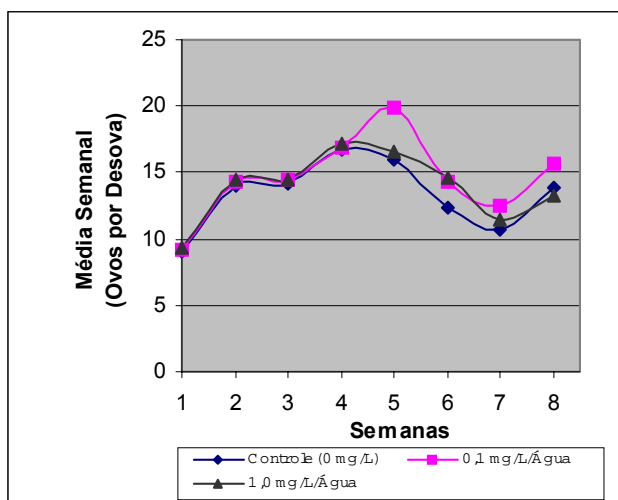


Tabela 28 – Médias do número de ovos por desova em 8 semanas, entre os caramujos da geração F1, em que a exposição à atrazina foi descontinuada.

Concentração (mg/L)	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
Controle	13,3	2,6	19,3
0,1/Água	14,7	3,1	21,3
1,0/Água	13,9	2,6	18,3

* Não há médias significativamente diferentes da média do grupo controle ao nível de $p < 0,05$ (Teste de Dunnett).

3.3.6.2 – Atrazina Geração F1 – Exposição Contínua

O gráfico 25 e a tabela 29 mostram que nos indivíduos que foram mantidos em exposição, a fecundidade (ovos por indivíduo) foi drasticamente reduzida no grupo exposto à concentração de 1,0 mg/L de atrazina.

Gráfico 25 – Desempenho reprodutivo (média do número de ovos por indivíduo/dados cumulativos), durante 8 semanas consecutivas, da geração F1 de caramujos (*B. tenagophila*) que continuaram expostos à atrazina.

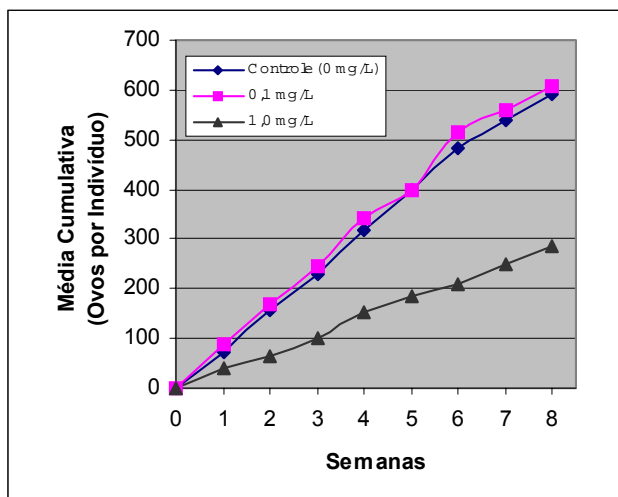


Tabela 29 – Número de ovos por indivíduo, acumulados ao longo de 8 semanas, entre os caramujos expostos da geração F1, cujos progenitores (F0) também foram expostos à atrazina.

Concentração (mg/L)	Número de Organismos	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
Controle	10	591,7	97,4	16,5
0,1	8	629,6	131,4	20,9
1,0	8	307,4*	140,2	45,6

*Média significativamente menor que a média do grupo controle ao nível de $p < 0,05$ (Teste de Dunnett).

Essa drástica redução também é visualizada quando se avalia o número de desovas por indivíduo (Gráfico 26, Tabela 30), todavia na média do número de ovos por desova em 8 semanas de experimento, a diferença existente não é considerada significativa (Gráfico 27, Tabela 31).

Gráfico 26 – Desempenho reprodutivo (média do número de desovas por indivíduo/dados cumulativos), durante 8 semanas consecutivas, da geração F1 de caramujos (*B. tenagophila*) que continuaram expostos à atrazina.

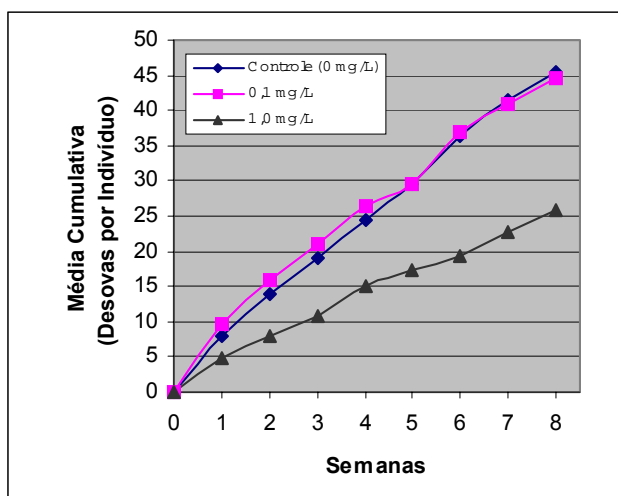


Tabela 30 – Número de desovas por indivíduo, acumulados ao longo de 8 semanas, entre os caramujos expostos da geração F1, cujos progenitores (F0) também foram expostos à atrazina.

Concentração (mg/L)	Número de Organismos	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
Controle	10	45,5	8,5	18,7
0,1	8	45,3	6,3	14,0
1,0	8	27,4*	10,1	37,0

*Média significativamente menor que a média do grupo controle ao nível de $p < 0,05$ (Teste de Dunnett).

Gráfico 27 – Variação média no número de ovos por desova por indivíduo, durante as 8 semanas consecutivas, nos grupos de caramujos da geração F1 que continuaram expostos à atrazina.

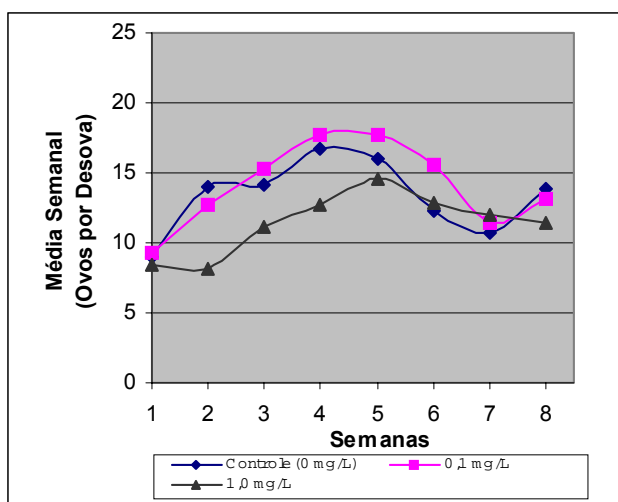


Tabela 31 – Médias do número de ovos por desova em 8 semanas, entre os caramujos da geração F1, que continuaram expostos à atrazina.

Concentração (mg/L)	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
Controle	13,3	2,6	19,3
0,1	14,1	3,0	21,2
1,0	11,4	2,2	19,4

* Não há médias significativamente diferentes da média do grupo controle ao nível de $p < 0,05$ (Teste de Dunnett).

3.3.7 – Etanol Geração F0

Embora não seja considerado um poluente, o etanol foi testado por se tratar do solvente utilizado nas diluições de endossulfan e atrazina. As concentrações de etanol testadas foram as mesmas utilizadas no experimento com atrazina, sendo a menor (0,0025% v/v) a mesma utilizada para a diluição da maior concentração de endossulfan (0,1 mg/L) e da menor concentração de atrazina (0,1 mg/L).

O gráfico 28 e a tabela 32 mostram o número de ovos por indivíduo nos grupos de caramujos expostos às diferentes concentrações de etanol.

Gráfico 28 – Desempenho reprodutivo (média do número de ovos por indivíduo/dados cumulativos), durante 8 semanas consecutivas, da geração parental (F0) de caramujos (*B. tenagophila*) expostos às diferentes concentrações de etanol.

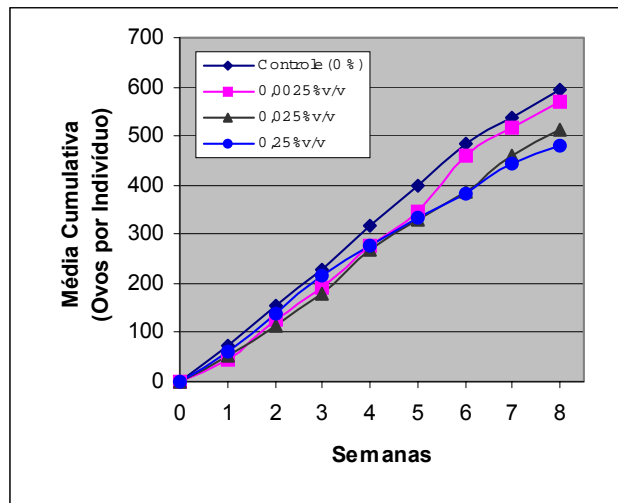


Tabela 32 – Médias do número de ovos por caramujo entre indivíduos da geração F0, acumuladas após 8 semanas de exposição às diferentes concentrações de etanol.

Concentração (%)	Número de Organismos	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
Controle	10	591,7	97,4	16,5
0,0025	10	574,0	174,5	30,4
0,025	10	515,2	217,5	42,2
0,25	8	517,1	72,8	14,1

* Não há médias significativamente diferentes da média do grupo controle ao nível de $p < 0,05$ (Teste de Dunnett).

Embora as diferenças observadas no gráfico 28 e na tabela 32, entre os grupos expostos às maiores concentrações de etanol e o grupo controle, não tenham sido consideradas estatisticamente diferentes, no gráfico 29 (desovas por indivíduo) e na tabela 33 tais diferenças se tornam mais evidentes, revelando assim a inibição significativa do número de desovas por indivíduo nas duas maiores concentrações de etanol.

O gráfico 30 e a tabela 34 mostram que para a média de ovos por desova nas 8 semanas, a diferença existente também não foi considerada significativa.

Gráfico 29 – Desempenho reprodutivo (média do número de desovas por indivíduo/dados cumulativos), durante 8 semanas consecutivas, da geração parental (F0) de caramujos (*B. tenagophila*) expostos às diferentes concentrações de etanol.

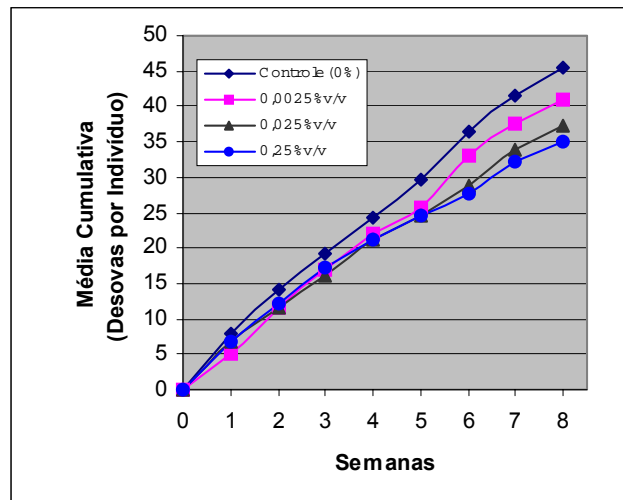


Tabela 33 – Médias do número de desovas por caramujo entre indivíduos da geração F0, acumuladas após 8 semanas de exposição às diferentes concentrações de etanol.

Concentração (%)	Número de Organismos	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
Controle	10	45,5	8,5	18,7
0,0025	10	40,8	7,1	17,4
0,025	10	37,3*	8,0	21,4
0,25	8	35,9*	3,6	9,9

* Médias significativamente menores que a média do grupo controle ao nível de $p < 0,05$ (Teste de Dunnett).

Gráfico 30 – Variação média no número de ovos por desova por indivíduo, durante as 8 semanas consecutivas de exposição da geração parental (F0) às diferentes concentrações de etanol.

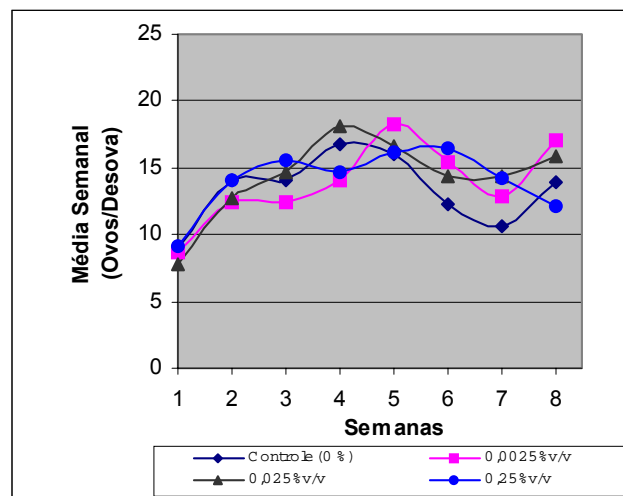


Tabela 34 – Médias do número de ovos por desova em 8 semanas, entre os caramujos da geração parental (F0) expostos ao etanol.

Concentração (%)	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
Controle	13,4	2,6	19,3
0,0025	13,9	3,0	21,5
0,025	14,3	3,1	21,6
0,25	14,1	2,4	17,0

* Não há médias significativamente diferentes da média do grupo controle ao nível de $p < 0,05$ (Teste de Dunnett).

3.4 – AVALIAÇÃO DOS EFEITOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

Essa etapa do trabalho objetivou determinar os efeitos sobre o desenvolvimento de embriões gerados por indivíduos expostos ou não expostos, no caso da geração F1 que teve a exposição descontinuada.

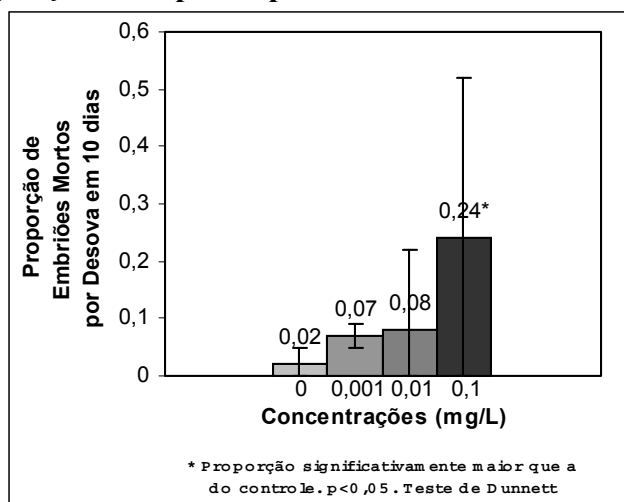
Nesse contexto, os resultados são descritos a seguir de acordo com a substância química testada, relacionando-se a viabilidade embrionária das gerações F1 e F2.

3.4.1 – Endosulfan F0/F1

Os resultados apresentados a seguir referem-se aos embriões da geração F1 descendentes de indivíduos da geração F0 expostos ao endosulfan.

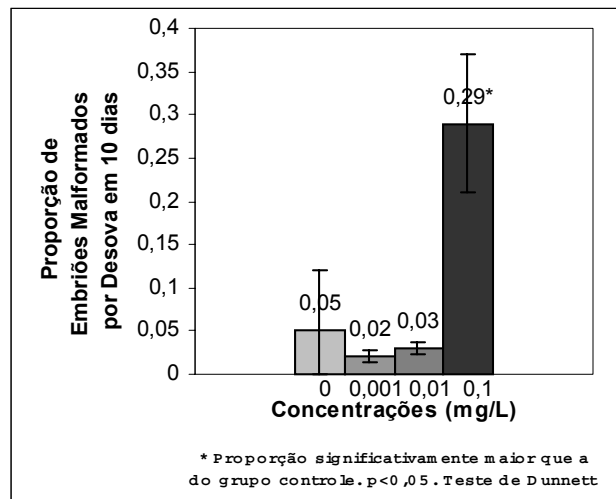
A embriofetalidade nos diferentes grupos é mostrada no gráfico 31. O grupo exposto à maior concentração (0,1 mg/L) apresentou uma mortalidade embrionária maior do que o grupo controle ($p < 0,05$, Teste de Dunnett).

Gráfico 31 – Letalidade do endosulfan para embriões da geração F1, descendentes de indivíduos da geração F0 expostos por 8 semanas ao endosulfan.



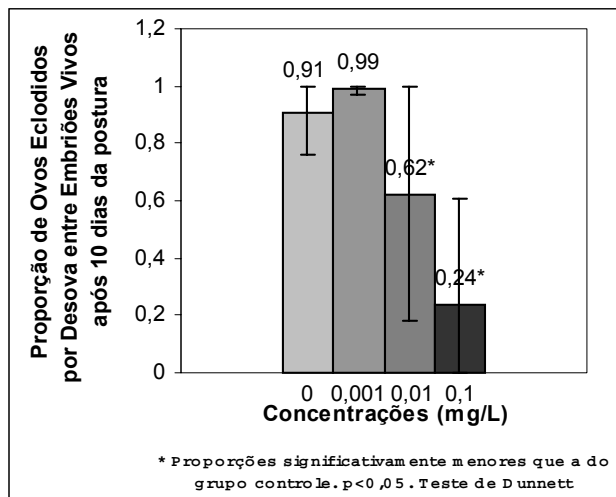
Com relação à presença de malformações embrionárias, a concentração de 0,1 mg/L também apresentou proporção maior que a do grupo controle, demonstrado visualmente no gráfico 32 e comprovado estatisticamente pelo teste de Dunnett.

Gráfico 32 – Teratogenicidade do endossulfan para embriões da geração F1, descendentes de indivíduos da geração F0 expostos por 8 semanas ao endossulfan.



Em se tratando da taxa de eclosão dos ovos em 10 dias, observa-se no gráfico 33, que a proporção de ovos eclodidos nas duas maiores concentrações de endossulfan (0,01 e 0,1 mg/L) foi significativamente menor do que a do controle.

Gráfico 33 – Retardo da eclosão causado pelo endossulfan aos embriões vivos da geração F1, descendentes de indivíduos da geração F0 expostos por 8 semanas ao endossulfan.

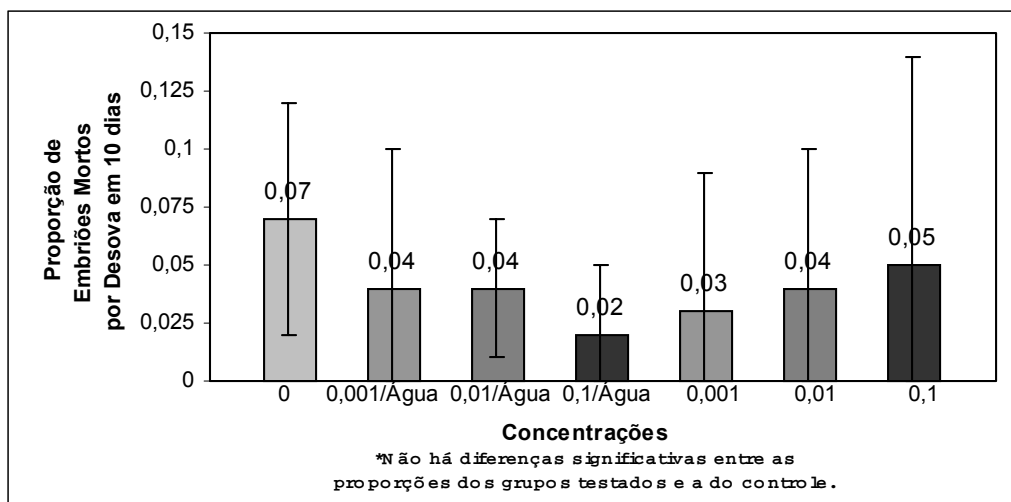


3.4.2 – Endosulfan F1/F2

Os dados relatados a seguir dizem respeito aos embriões da geração F2, descendentes de indivíduos da geração F1. Como relatado anteriormente, os indivíduos da geração F1 foram divididos em dois grupos, um que não permaneceu exposto e o outro que continuou exposto.

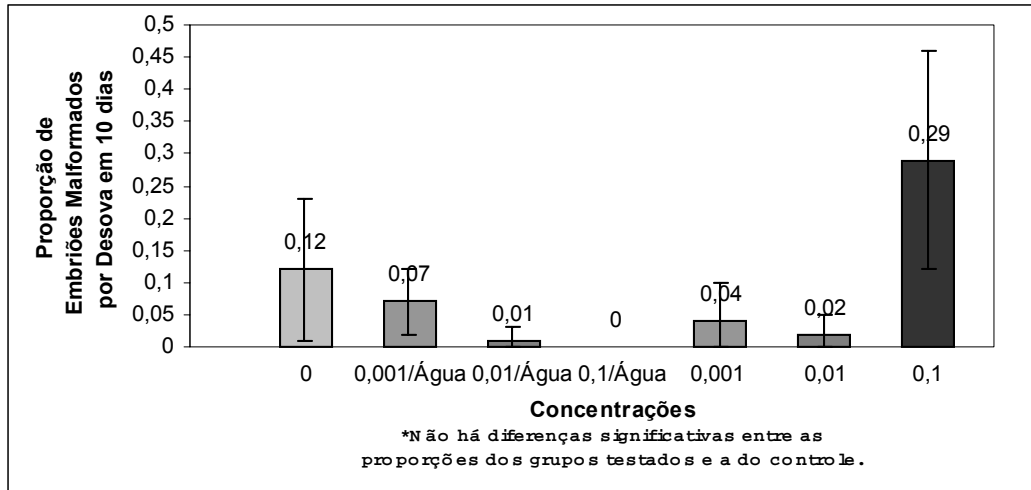
Em se tratando de mortalidade, o gráfico 34 mostra que não houve diferenças significativas entre o grupo controle e os grupos que tiveram a exposição descontinuada e contínua (Gráfico 34).

Gráfico 34 – Letalidade do endosulfan para embriões da geração F2, descendentes de indivíduos das gerações F1 não exposta e exposta ao endosulfan.



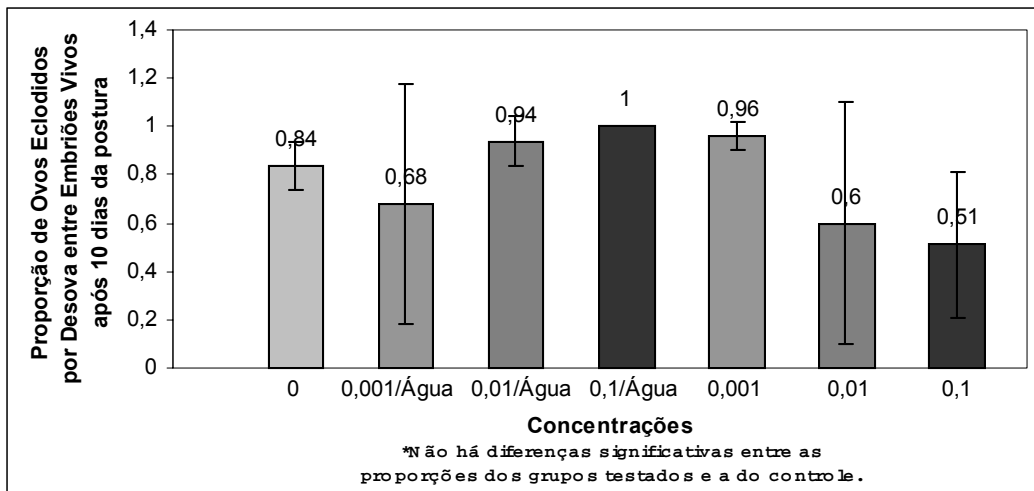
Com relação ao número de embriões da geração F2 malformados, também não houve diferenças significativas entre o grupo controle e os grupos descendentes de F1 não expostos e expostos, conforme visualizado no gráfico 35.

Gráfico 35 – Teratogenicidade do endosulfan para embriões da geração F2, descendentes de indivíduos das gerações F1 não exposta e exposta ao endosulfan.



Quanto à taxa de eclosão dos ovos o mesmo se repete, não havendo diferenças significativas entre os grupos descendentes de F1 não expostos e expostos e o respectivo grupo controle (Gráfico 36).

Gráfico 36 – Retardo da eclosão causado pelo endosulfan aos embriões vivos da geração F2, descendentes de indivíduos das gerações F1 não exposta e exposta ao endosulfan.



3.4.3 – Nonilfenol Etoxilado F0/F1

Com relação à mortalidade dos embriões da geração F1, descendentes de caramujos expostos ao nonilfenol etoxilado, pode-se perceber que não houve diferença significativa entre os grupos expostos e o grupo controle (Gráfico 37). Quanto a ocorrência de malformações embrionárias, na maior concentração de nonilfenol etoxilado (1,0 mg/L), a proporção de embriões malformados foi maior do que no grupo controle (Gráfico 38).

Não houve diferenças estatisticamente significativas quanto a proporção de ovos eclodidos entre os grupos descendentes de expostos ao nonilfenol etoxilado os descendentes do grupo controle (Gráfico 39).

Gráfico 37 – Letalidade do nonilfenol etoxilado para embriões da geração F1, descendentes de indivíduos da geração F0 expostos por 8 semanas ao nonilfenol etoxilado.

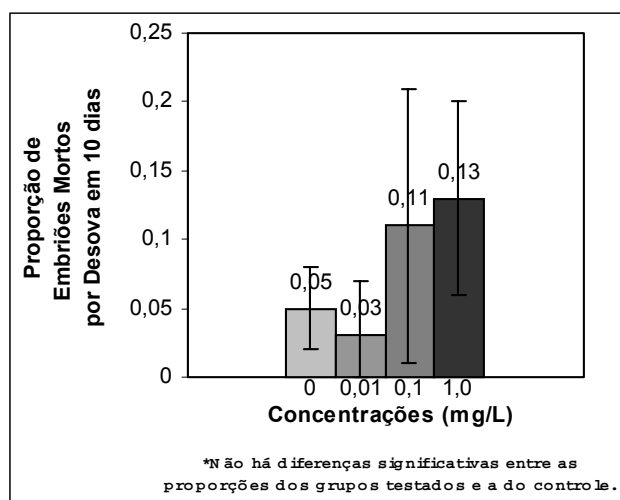


Gráfico 38 – Teratogenicidade do nonilfenol etoxilado para embriões da geração F1, descendentes de indivíduos da geração F0 expostos por 8 semanas ao nonilfenol etoxilado.

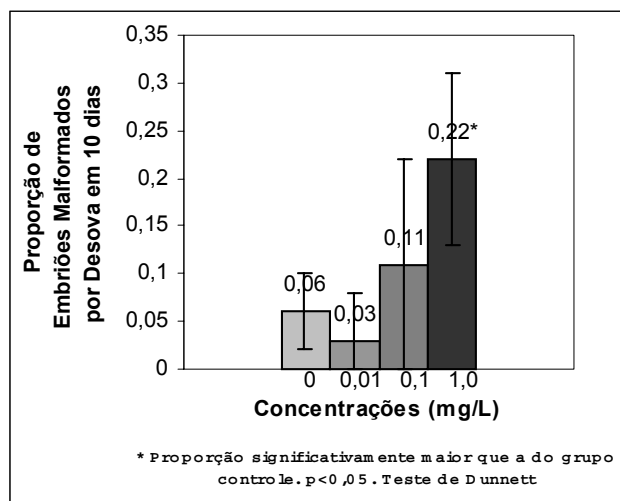
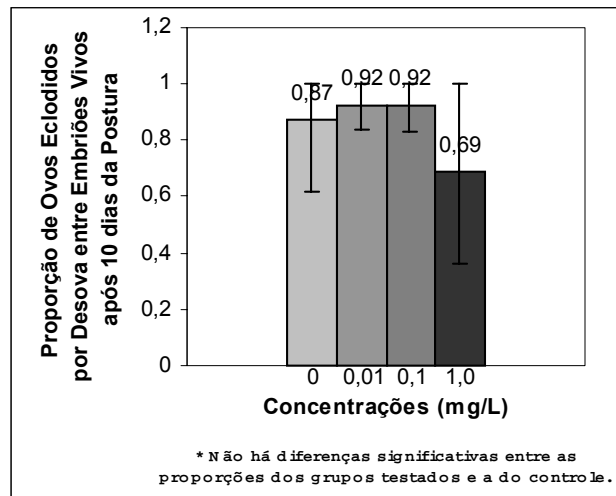


Gráfico 39 – Retardo da eclosão causado pelo nonilfenol etoxilado aos embriões vivos da geração F1, descendentes de indivíduos da geração F0 expostos por 8 semanas ao nonilfenol etoxilado.



3.4.4 – Nonilfenol Etoxilado F1/F2

Em se tratando dos embriões F2 descendentes de indivíduos F1 que tiveram a exposição ao nonilfenol etoxilado descontinuada e contínua, pode-se observar no gráfico 40 que não houve diferença significativa entre os grupos e o respectivo grupo controle para o parâmetro mortalidade. Todavia no gráfico 41 pode-se observar que a ocorrência de malformações embrionárias nos descendentes do grupo que permaneceu exposto à maior concentração de nonilfenol etoxilado foi considerada significativamente maior do que no grupo controle.

O gráfico 42 mostra diminuição concentração relacionada da proporção de ovos eclodidos, conforme o aumento da concentração de nonilfenol etoxilado em que o embrião foi gerado, sendo que entre o grupo gerado por indivíduos não expostos, somente a proporção do grupo gerado na concentração 1,0/Água, foi significativamente menor que a do grupo controle.

Gráfico 40 – Letalidade do nonilfenol etoxilado para embriões da geração F2, descendentes de indivíduos das gerações F1 não exposta e exposta ao nonilfenol etoxilado.

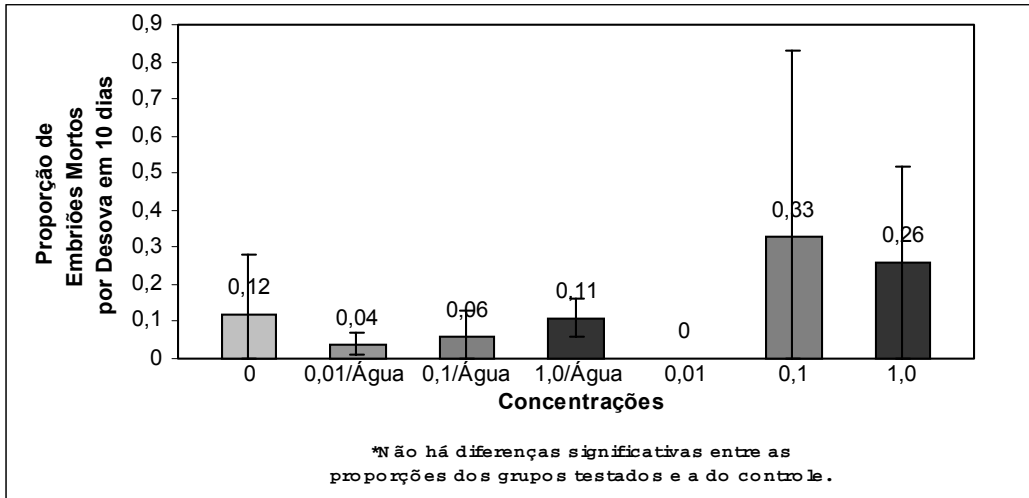


Gráfico 41 – Teratogenicidade do nonilfenol etoxilado para embriões da geração F2, descendentes de indivíduos das gerações F1 não exposta e exposta ao nonilfenol etoxilado.

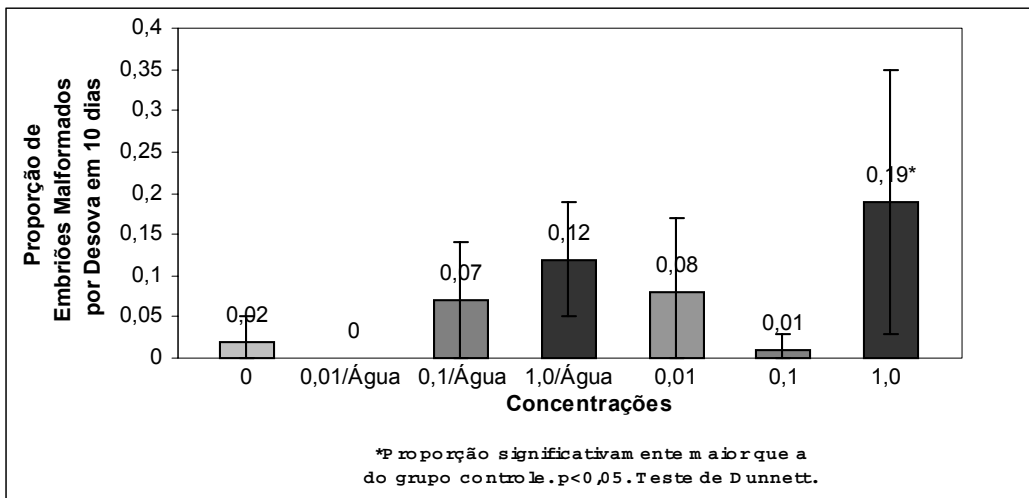
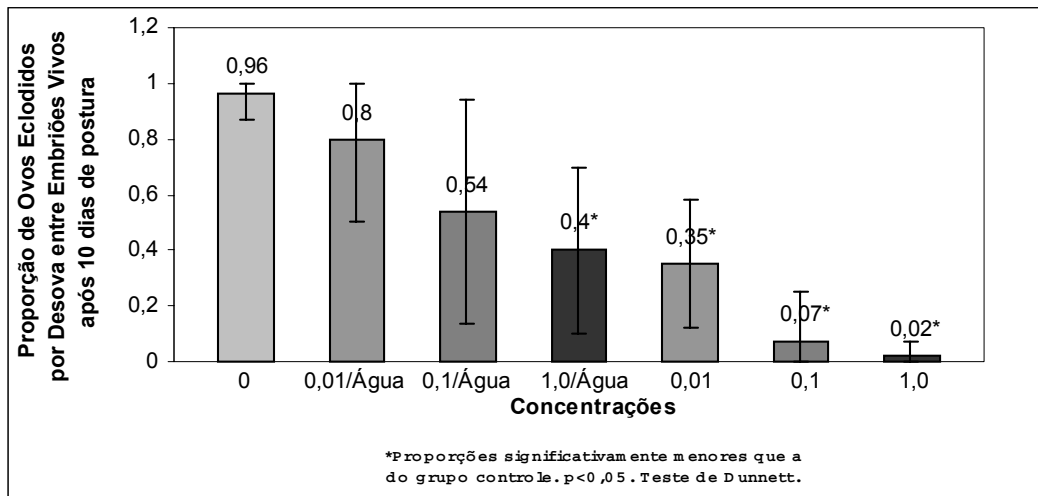


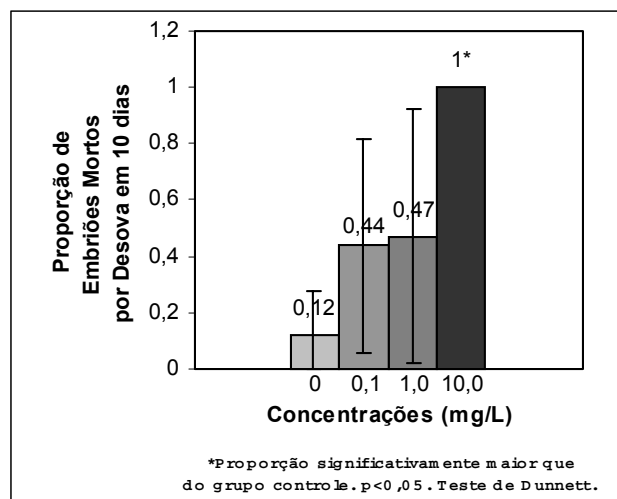
Gráfico 42 – Retardo da eclosão causado pelo nonilfenol etoxilado aos embriões vivos da geração F2, descendentes de indivíduos das gerações F1 não exposta e exposta ao nonilfenol etoxilado.



3.4.5 – Atrazina F0/F1

A atrazina, na maior concentração testada matou 100% dos embriões descendentes de indivíduos da geração F0. Como pode ser visualizado no gráfico 43, embora todas as concentrações de atrazina tenham exibido efeito embrioletal, apenas a mortalidade observada na concentração de 10 mg/L foi significativamente maior do que a do grupo controle, de acordo com o Teste de Dunnett.

Gráfico 43 – Letalidade da atrazina para embriões da geração F1, descendentes de indivíduos da geração F0 expostos por 8 semanas à atrazina.



A ocorrência de malformações embrionárias foi baixa em todos os grupos, não havendo diferenças significativas entre as proporções dos grupos descendentes de indivíduos expostos à atrazina e a do grupo controle (Gráfico 44). Por outro lado, como pode ser visto no gráfico 45, a eclosão dos ovos foi retardada pela atrazina, sendo inibida em relação ao grupo controle, nos dois grupos descendentes de expostos às maiores concentrações (1 e 10 mg/L).

Gráfico 44 – Teratogenicidade da atrazina para embriões da geração F1, descendentes de indivíduos da geração F0 expostos por 8 semanas à atrazina.

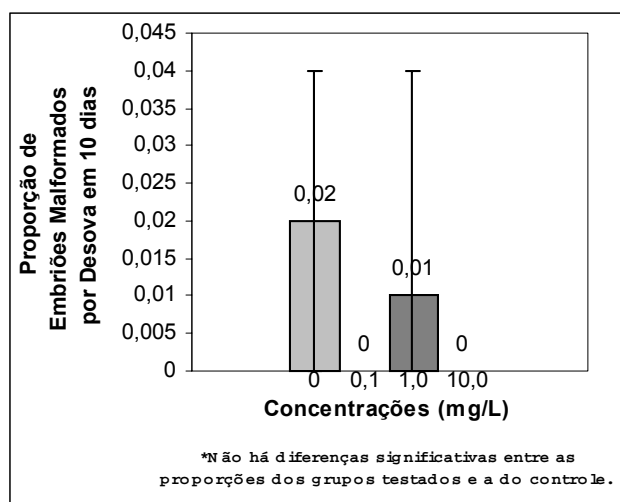
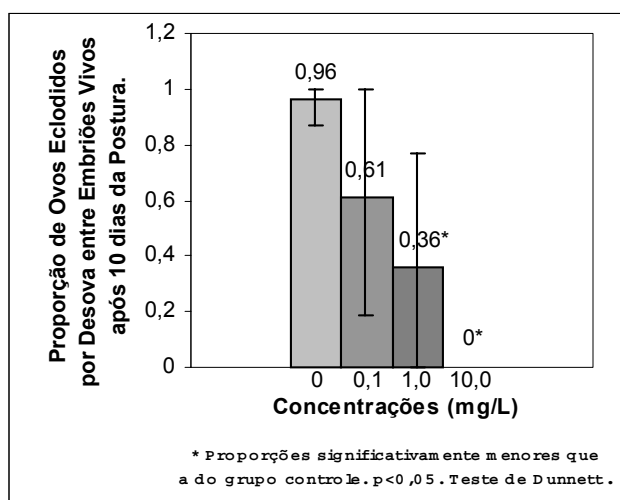


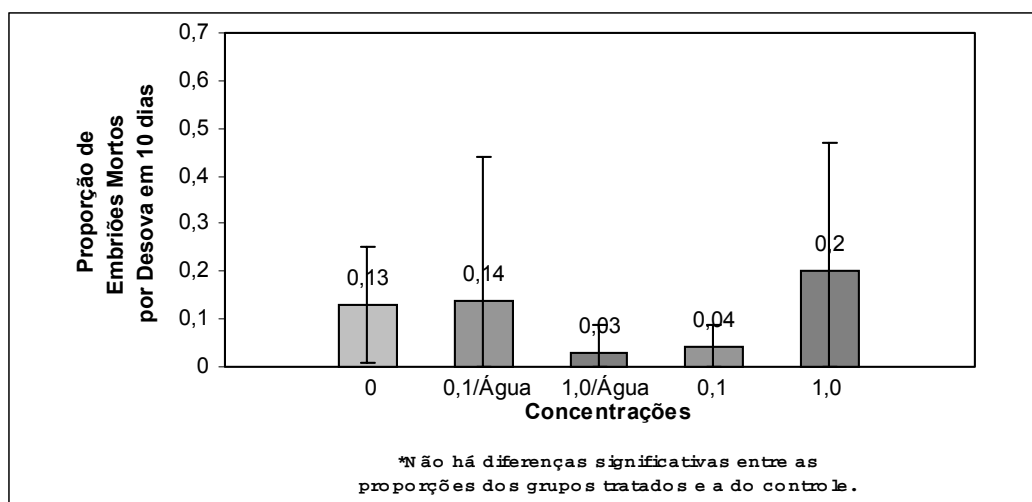
Gráfico 45 – Retardo da eclosão causado pela atrazina aos embriões vivos da geração F1, descendentes de indivíduos da geração F0 expostos por 8 semanas à atrazina.



3.4.6 – Atrazina F1/F2

Conforme mostrado nos gráficos 43 e 45, todos os embriões expostos à maior concentração de atrazina morreram, não havendo portanto eclosões. Assim sendo, por não haver indivíduos na geração F1 descendentes daqueles expostos à concentração de 10 mg/L, os resultados aqui apresentados referem-se somente as outras duas concentrações 0,1 e 1,0 mg/L, nas condições de exposição descontinuada e contínua. Nos grupos em que a exposição à atrazina foi descontinuada e contínua não houve diferenças significativas entre os grupos o respectivo grupo controle com relação à mortalidade (gráficos 46).

Gráfico 46 – Letalidade da atrazina para embriões da geração F2, descendentes de indivíduos das gerações F1 não exposta e exposta à atrazina.



Os gráficos 47 e 48 mostram que em relação às malformações embrionárias e ao retardo para eclodir somente a geração F1 que permaneceu exposta à maior concentração de atrazina (1,0 mg/L) gerou mais indivíduos malformados e teve um retardo na eclosão mais significativo do que os descendentes da geração F1 controle.

Gráfico 47 – Teratogenicidade da atrazina para embriões da geração F2, descendentes de indivíduos das gerações F1 não exposta e exposta à atrazina.

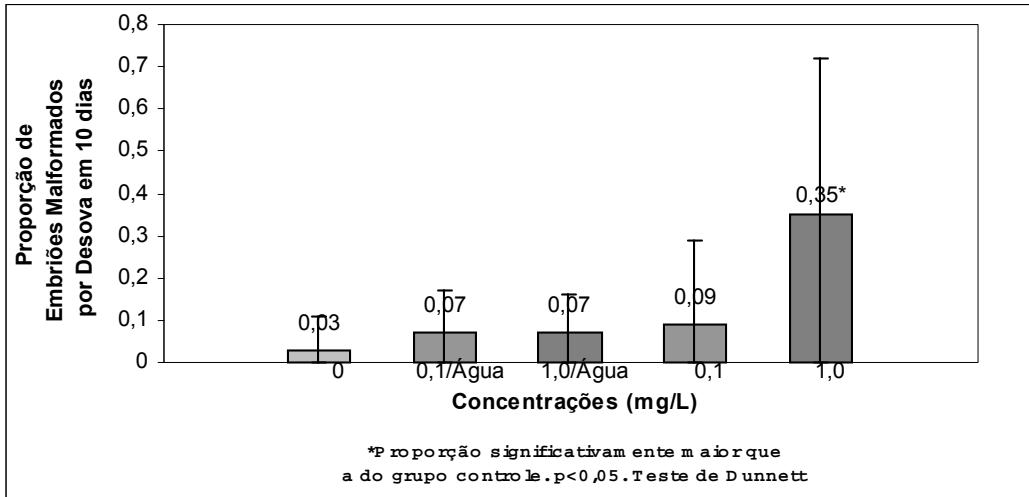
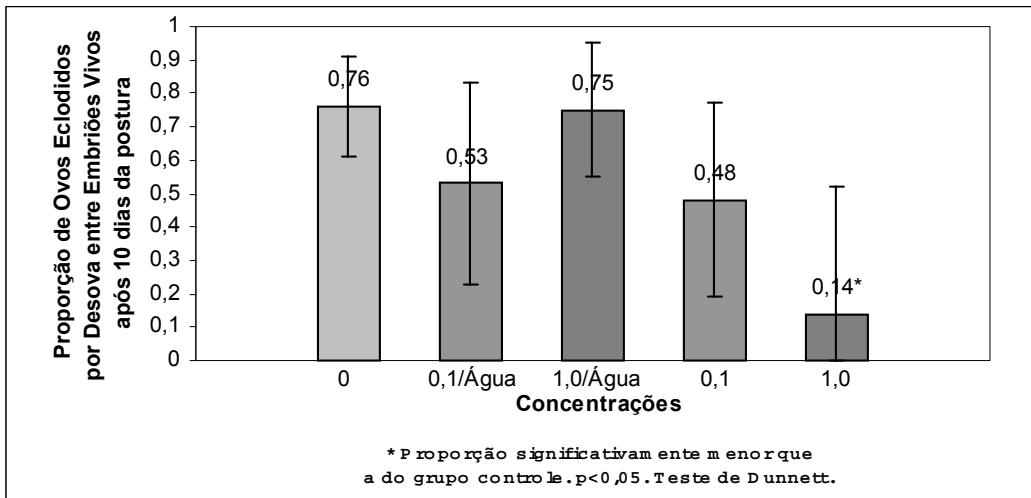


Gráfico 48 – Retardo da eclosão causado pela atrazina aos embriões vivos da geração F2, descendentes de indivíduos das gerações F1 não exposta e exposta à atrazina.



3.4.7 – Etanol F0/F1

Com relação ao solvente etanol as determinações foram realizadas seguindo o mesmo padrão aplicado às outras substâncias.

Nos gráficos 49, 50 e 51 pode-se notar que não houve diferença entre o grupo controle e os grupos testados no que diz respeito aos efeitos sobre os embriões gerados.

Gráfico 49 – Letalidade do etanol para embriões da geração F1, descendentes de indivíduos da geração F0 expostos por 8 semanas ao etanol.

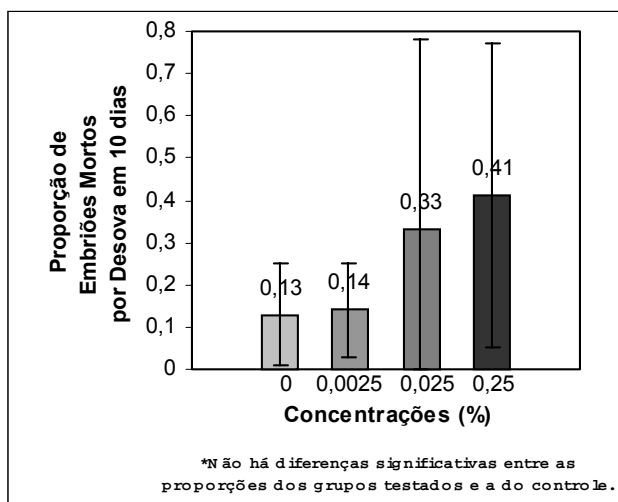


Gráfico 50 – Teratogenicidade do etanol para embriões da geração F1, descendentes de indivíduos da geração F0 expostos por 8 semanas ao etanol.

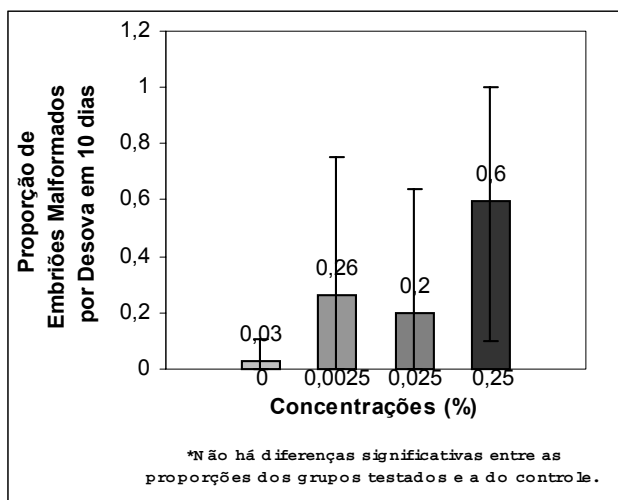
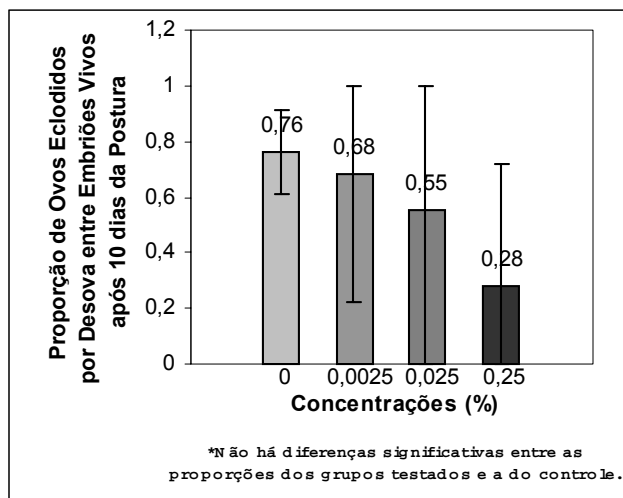


Gráfico 51 – Retardo da eclosão causado pelo etanol aos embriões vivos da geração F1, descendentes de indivíduos da geração F0 expostos por 8 semanas ao etanol.



4 - DISCUSSÃO

Diversos estudos relatando os efeitos do endosulfan, do nonilfenol etoxilado e da atrazina sobre a reprodução de diferentes espécies podem ser encontrados na literatura toxicológica. Estas investigações, pelo menos as mais recentes, tem sido motivadas, em grande parte, pelo fato dessas três substâncias estarem presentes em praticamente todas as listas já publicadas de agentes químicos com suposta atividade sobre o sistema endócrino, ou “desreguladores endócrinos” (Colborn et al., 1993; Colborn, 1998; Kime, 1999). São raras, entretanto, as observações de efeitos sobre a reprodução de moluscos e mais raras ainda, ou praticamente inexistentes, aquelas realizadas com planorbídeos.

Os estudos de toxicidade reprodutiva envolvendo exposição continuada por mais de uma geração (“estudos multigeração”) são, em geral, realizados com mamíferos (ratos e camundongos) como parte da avaliação de segurança de aditivos alimentares intencionais (ex. corantes, aromatizantes, conservantes) e não-intencionais (ex. resíduos de agrotóxicos). Neste contexto, estão certamente situados entre os estudos mais caros, complexos e demorados, sendo porém de grande relevância para fixação da IDA (ingestão máxima diária aceitável). Os estudos multigeração com outras espécies de vertebrados e invertebrados são muito menos frequentes e raríssimos aqueles realizados com moluscos. Assim sendo, quando possível, procuramos comparar os dados quantitativos obtidos neste estudo com o que tem sido publicado para efeitos crônicos/reprodutivos em outras espécies.

4.1 - ENDOSULFAN

O endosulfan, na maior concentração testada (0,1 mg/L), apresentou um claro efeito inibitório sobre a reprodução da *B. tenagophila*. Digno de nota também foi que esta inibição, cessada a exposição (ex. geração F1 não exposta), deu lugar a um aparente efeito rebote, quanto aos parâmetros relacionados à fecundidade (ovos por indivíduo e desovas por indivíduo) (Gráficos 4 e 5). Esse desempenho positivo sugere após o término da exposição, não só a inibição é revertida como há também uma estimulação compensatória.

Quanto aos efeitos sobre o desenvolvimento embrionário, a inibição ou retardo na eclosão foi o indicador de efeito mais sensível, e isto pode ser visualizado na geração F0 (embriões F1). A eclosão dos ovos das desovas postas pela geração F0 foi retardada pelo endosulfan na concentração de 0,01 mg/L (Gráfico 33). Esse efeito não foi

observado nas desovas da geração F1 (embriões F2) sugerindo que a continuidade da exposição causou uma adaptação ou tolerância à este efeito da substância. Levando-se em conta os parâmetros avaliados e as concentrações testadas nesse trabalho, pode-se dizer que a concentração máxima em que não foi observado efeito (CENO) foi 0,001 mg de endosulfan por L (1 µg/L ou 1 ppb).

Como mostrado na Tabela 35 que reúne valores de CENO para diferentes estudos de exposição continuada ao endosulfan realizados com outras espécies, o CENO obtido neste ensaio multigeração com *B. tenagophila* foi um dos mais baixos, só sendo superior àquele obtido para redução no crescimento do peixe *Pimephales promelas*. Esta comparação sugere que o estudo multigeração com *B. tenagophila* é muito sensível, sendo capaz de detectar efeitos de concentrações de endosulfan que não causaram alterações em vários trabalhos realizados com outras espécies.

Tabela 35 – Comparação entre o valor de CENO do endosulfan, obtido no presente estudo, e valores obtidos nos tradicionais testes rápidos de efeitos sobre a reprodução e o desenvolvimento. Valores expressos em µg/L.

Espécie	Efeito Observado e Duração	CENO	Referência
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> *	Inibição do Crescimento (96 hrs)	130	DeLorenzo et al., 2002
<i>Daphnia magna</i>	Inibição da Reprodução (21 dias)	150	Fernández-Casalderrey et al., 1993
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Inibição da Reprodução (14 dias)	10	Sunderam et al., 1994
<i>Pimephales promelas</i>	Sobrevivência e Redução no Crescimento (7 dias)	0,2	USEPA, 2002
<i>Biomphalaria tenagophila</i>	Reprodução e Desenvolvimento Embrionário (8 semanas)	1	<u>Presente Estudo.</u>

* Microalga também conhecida como *Selenastrum capricornutum*.

Na legislação brasileira relacionada à qualidade de água, a Resolução CONAMA N° 20/86 (Brasil, 1986) estabelece a concentração máxima de 0,056 µg/L de endosulfan, para garantir dentre outras coisas a proteção das comunidades aquáticas (Águas Classes 1 e 2). Esse limite máximo é, inferior aos CENOs listados na tabela 35, sendo portanto

respaldado pela evidência disponível. Com relação à água para consumo humano e seus padrões de potabilidade, a Portaria N° 1.469, da FUNASA (Brasil, 2001), estabelece a concentração máxima permitida de 20 µg/L, limite este que é superior aos vários valores de CENO apresentados na tabela 35. Entretanto, como o objetivo dessa última norma é a proteção da saúde humana, e não a de ecossistemas aquáticos, esse limite máximo certamente foi estabelecido com base em estudos realizados com mamíferos.

Sobre a natureza dos efeitos reprodutivos observados neste trabalho, algumas comparações com outros estudos e espécies são interessantes. Em um experimento crônico de 35 dias com o camarão *Palaemonetes pugio*, Wirth et al. (2001) observaram que o endossulfan, na concentração de 0,2 µg/L, não afetou o sucesso da eclosão dos embriões (exposição materna), mas induziu um aumento significativo no tempo para eclodir, tal como verificou-se no presente estudo com os embriões F1 gerados por indivíduos (F0) expostos à concentração de 10 µg/L. Entretanto, como o camarão foi afetado pela concentração de 0,2 µg/L, inferior ao CENO registrado no presente estudo com a *B. tenagophila*, este planorbídeo parece ter sido menos susceptível do que o crustáceo.

Os autores Wiley & Krone (2001), avaliaram a influência do endossulfan sobre as células germinativas primordiais de embriões do peixe *Danio rerio* e detectaram que esse agrotóxico altera a distribuição das células antes da gônada se diferenciar morfológicamente.

Hemmer et al. (2001) não detectaram indução ou expressão da vitelogenina no soro de peixes machos da espécie *Cyprinodon variegatus* (“sheepshead minnows”), expostos por mais de 40 dias ao endossulfan em concentrações de 0,01 a 0,4 µg/L. Por se tratar de um ensaio *in vivo*, os autores compararam esse resultado negativo em peixes ao obtido por Shelby et al. (1996), no Ensaio Uterotrófico com Camundongos. A ausência de efeitos sugestivos de “desregulação endócrina” nesses experimentos *in vivo* contrastam com os resultados de estudos anteriores realizados em condições *in vitro* (Soto et al., 1995; Petit et al., 1997). Essa inconsistência entre resultados *in vivo* e *in vitro* sugere que, embora o endossulfan possa se ligar ao receptor estrogênico, exibindo efeitos *in vitro* em altas concentrações, alguns fatores toxicocinéticos, tais como absorção, metabolismo e distribuição/concentração nos tecidos alvo, poderiam fazer com que este fraco efeito estrogênico do endossulfan não ocorra *in vivo*.

4.2 – NONILFENOL ETOXILADO

O nonilfenol etoxilado reduziu, nas duas maiores concentrações testadas (0,1 e 1,0 mg/L), a fecundidade da geração F0 (ovos por indivíduo e desovas por indivíduo) (Gráfico 10). Esse resultado é comparável ao que foi recentemente relatado para outra espécie de caramujo. Czech et al. (2001), num experimento semelhante, observaram diminuição significativa do número de desovas de caramujos da espécie *Lymnaea stagnalis* expostos à concentração de 0,1 mg/L do 4-nonilfenol. Deve-se destacar que Czech et al. (2001) trabalharam com o 4-nonilfenol, diferentemente do presente estudo, em que foi utilizado o nonilfenol com 9,5 unidades etoxiladas. Efeitos dessa substância sobre a reprodução de invertebrados foram investigados também por Tanaka & Nakanishi (2002) que observaram redução da fecundidade na primeira geração do microcrustáceo *Daphnia galeata* exposta à 0,07 mg/L do 4-nonilfenol ou *p*-nonilfenol.

Foi registrado também, nos embriões gerados por indivíduos F0 (embriões F1) um aumento significativo de malformações no grupo exposto à maior concentração (1,0 mg/L) do nonilfenol etoxilado (Gráfico 38). Os embriões malformados não eclodiram até o final do período de observação (10 dias). Entretanto, embora tenha havido aumento da ocorrência de malformações, a mortalidade e a proporção de ovos eclodidos não diferiram significativamente das registradas no grupo controle não exposto (Gráficos 37 e 39). Na literatura há relato de que a exposição ao nonilfenol, em baixas concentrações, também afeta adversamente o microcrustáceo *Daphnia galeata mendotae*. Segundo Shurin & Dodson (1997) os microcrustáceos mostraram alterações no número de fêmeas produzidas e apresentaram anomalias morfológicas nos embriões, principalmente os expostos à concentração de 0,1 mg/L.

Sobre a geração F1 não exposta, o único efeito digno de nota foi um retardo concentração-dependente da eclosão dos embriões F2. A análise estatística, todavia, só detectou uma proporção menor de eclosões, em comparação com os respectivos controles, entre os embriões oriundos de indivíduos gerados na concentração de 1,0 mg/L de nonilfenol etoxilado (1,0/Água) (Gráfico 42). A observação desse tipo de efeito sugere a possibilidade da ocorrência de transferência do nonilfenol entre diferentes gerações, pois no grupo mantido em exposição, todas as concentrações testadas inibiram drasticamente a eclosão dos ovos, e esse fato poderia justificar a inibição da eclosão dos ovos no grupo 1,0/Água (Gráfico 42), mesmo que a quantidade transferida fosse até 100 vezes menor do que a exposta inicialmente.

Segundo Servos (1999), a possibilidade do nonilfenol se concentrar na biota aquática é de baixa a moderada, com o fator de bioconcentração variando de 0,9 para carpas (*Cyprinus carpio*) até 4120 para mexilhões (*Mytilus edulis*). Investigando a acumulação e o metabolismo do nonilfenol na truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), Coldham et al. (1998) evidenciaram um depósito substancial de 4-nonilfenol nos tecidos musculares. Entretanto, estudos destacando a transferência do nonilfenol entre níveis tróficos ou entre gerações sucessivas são praticamente inexistentes.

Quanto à geração F1 que continuou exposta ao nonilfenol etoxilado, os resultados foram bem diferentes. De modo similar ao que ocorreu com a geração F0, o grupo exposto à maior concentração (1,0 mg/L) teve a sua fecundidade reduzida, tanto em termos de ovos por indivíduo quanto de desovas por indivíduo (Gráficos 16 e 17). Por outro lado, o grupo exposto à menor concentração (0,01 mg/L ou 10 µg/L) teve a fecundidade significativamente aumentada em relação à do grupo controle (Gráfico 16, Tabela 20). Em estudo com o caramujo *Lymnaea stagnalis*, Czech et al. (2001) não observaram diferenças entre o número de desovas por indivíduo nos grupos controle e 10 µg/L de nonilfenol. A ocorrência de malformações também foi superior a do grupo controle, na maior concentração testada (1,0 mg/L) (Gráfico 41), enquanto que a eclosão foi retardada nas três concentrações testadas, quase não ocorrendo eclosões nas concentrações de 0,1 e 1,0 mg/L (Gráfico 42).

De um modo geral, os efeitos adversos do nonilfenol sobre a reprodução de organismos aquáticos (relacionada à atividade estrogênica) têm sido detectados em estudos *in vitro* (Soto et al., 1995; Shelby et al., 1996; Petit et al., 1997) e em estudos *in vivo* pela observação de alterações em parâmetros bioquímicos ou morfológicos, tais como a indução da vitelogenina ou alteração em tecidos/órgãos reprodutivos (Shelby et al., 1996; Hemmer et al., 2001). A hipótese de que o aumento na fecundidade, observado no presente trabalho, se deve a atividade estrogênica do nonilfenol merece ser investigada. Trabalhando com o nematóide *Caenorhabditis elegans*, Hoss et al. (2002) observaram aumento progressivo da fecundidade dos organismos expostos à concentrações de 40,2 até 235,2 µg/L de 4-nonilfenol. Interessante notar que a concentração que foi “estimulatória” no presente estudo (10 µg/L) com *B. tenagophila* está um pouco abaixo da menor testada por Hoss et al. (2002) com o nematóide.

Um efeito do tipo estimulatório do nonilfenol foi observado também por Jumel et al. (2002). Esses autores relataram que o nonilfenol atenuava os efeitos adversos do herbicida fomesafen sobre a reprodução do caramujo *Lymnaea stagnalis*.

A tabela 36 permite comparar o CENO obtido no presente estudo com os valores de CENO determinados nos clássicos testes rápidos de efeitos sobre a reprodução e desenvolvimento.

Embora o nonilfenol tenha sido detectado em águas superficiais em vários países e seja considerado um “desregulador endócrino”, nenhuma regulamentação limita os teores dessa substância nos corpos hídricos brasileiros, quer para a proteção das comunidades aquáticas, quer para a proteção da população humana.

Tabela 36 – Comparação entre o valor de CENO, obtido no presente estudo, para o nonilfenol 9,5 etoxilado e valores obtidos nos tradicionais testes rápidos de efeitos sobre reprodução e desenvolvimento, com diferentes formas do nonilfenol. Valores expressos em µg/L.

Nonilfenol (NP)	Espécie	Efeito Observado e Duração	CENO	Referência
NP9	<i>Selenastrum capricornutum</i>	Inibição do Crescimento (96 hrs)	8000	Dorn et al., 1993
NP	<i>Selenastrum capricornutum</i>	Inibição do Crescimento (96 hrs)	92	Servos, 1999
NP9	<i>Daphnia magna</i>	Inibição do Crescimento (7 dias)	10000	Dorn et al, 1993
NP	<i>Daphnia magna</i>	Inibição da Reprodução (21 dias)	100	Servos, 1999
NP	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Inibição da Reprodução (7 dias)	89	Servos, 1999
NP9	<i>Pimephales promelas</i>	Sobrevivência e Redução no Crescimento (7 dias)	1000	Dorn et al., 1993
NP9,5	<i>Biomphalaria tenagophila</i>	Reprodução e Desenvolvimento Embrionário (8 semanas)	< 10	<u>Presente Estudo.</u>

4.3 – ATRAZINA

A exposição da geração F0 à atrazina produziu, na maior concentração testada (10 mg/L), alterações em praticamente todos os parâmetros avaliados. O número de ovos e de desovas por indivíduo foi reduzido nas concentrações de 1 e 10 mg/L

(Gráficos 19 e 20). Todavia, a média de ovos por desova em 8 semanas, na menor concentração testada (0,1 mg/L), foi maior do que a média do grupo controle (Tabela 25). Mais uma vez parece ter ocorrido um aumento compensatório, pois embora o grupo tenha tido número menor de desovas por indivíduo (Gráfico 20), essa diferença foi compensada pela maior média de ovos por desova (Gráfico 21).

Em experimento em que o microcrustáceo *Daphnia pulex* foi exposto por 28 dias, Schober & Lampert (1977) também observaram redução da fecundidade do grupo exposto à concentração de 10 mg/L de atrazina, mas não detectaram alterações no grupo exposto à 1 mg/L.

Interessante relatar que, pelo fato do composto testado ser um herbicida, ensaios de toxicidade em campo ou mesmo em laboratório com herbívoros podem ser comprometidos pela dificuldade na alimentação. Após experimento com a atrazina em tanques, Kettle et al. (1987) relacionaram a diminuição do sucesso reprodutivo do peixe *Lepomis macrochirus* (Bluegill) à carência alimentar e à dificuldade em encontrar macrófitas que normalmente servem de abrigo para os ovos.

No presente estudo, todos os embriões do grupo exposto à concentração de 10 mg/L morreram, o que indica que os embriões foram mais suscetíveis do que os caramujos adultos utilizados nos testes agudos. Como consequência deste fato, não restaram indivíduos jovens para compor a geração F1 na concentração de 10 mg/L. Nos outros grupos expostos à atrazina (0,1 e 1 mg/L) a embriofetalidade não diferiu da do grupo controle (Gráfico 43). Um resultado similar foi obtido com embriões do peixe *Danio rerio* (zebrafish), que apresentaram alta mortalidade após exposição à concentração de 9,1 mg/L de atrazina, por 35 dias e mortalidade significativa entre os expostos à 1,3 mg/L (Görge & Nagel, 1990).

Quanto a reprodução da geração F1 que teve sua exposição descontinuada, em todos os parâmetros avaliados não houve diferenças em relação ao grupo controle (Gráficos 22, 23 e 24), o mesmo sendo observado para o desenvolvimento dos embriões gerados por esse grupo (Gráficos 46, 47 e 48). O desempenho reprodutivo da geração F1 mantida em exposição, por outro lado, foi afetado, pois os indivíduos expostos à concentração de 1,0 mg/L tiveram a fecundidade (Gráficos 25 e 26) reduzida e o desenvolvimento dos embriões nas suas desovas comprometido (Gráficos 47 e 48).

Os mecanismos subjacentes às alterações do desempenho reprodutivo dos caramujos (*B. tenagophila*) causadas pela atrazina não são claros. A exposição à atrazina tem sido relacionada com o declínio de populações de rãs nos Estados Unidos (Hayes et al., 2002a, 2002b). Hayes e colaboradores relataram que em concentrações da

ordem de 0,1 µg/L podem ser observados efeitos tais como retardo no desenvolvimento gonadal e hermafroditismo, entre outros (Hayes et al., 2003). Segundo Kiesecker (2002) o declínio das populações desses anfíbios na natureza está relacionado a um sinergismo entre exposição à substâncias químicas (ex. atrazina) e infecção por trematódeos. Segundo esses autores a exposição à atrazina, e a outros poluentes, diminuiria a capacidade imunológica do organismo, facilitando assim a infecção por parasitas.

Como já mencionado anteriormente vários trabalhos em todo o mundo incluindo o Brasil, relacionam a diminuição do desempenho reprodutivo de caramujos hospedeiros intermediários de doenças, com a sua carga parasitária, todavia em recente pesquisa, Russo & Lagadic (2004) demonstram que a atrazina, em baixas concentrações, pode modular vários aspectos da função imune no caramujo *Lymnaea stagnalis*, facilitando as infecções e conseqüentemente reduzindo sua capacidade reprodutiva. Se a exposição à atrazina torna a *B. tenagophila* mais vulneráveis a infecções e se estas, por sua vez, afetam negativamente o desempenho reprodutivo do caramujo, esse poderia ser um mecanismo – indireto – para explicar os efeitos observados nesse trabalho. Contudo, ações diretas desse herbicida não podem, entretanto, ser descartadas. Vale ressaltar que, segundo Vos et al. (2000), as disfunções imunológicas se encontram entre os principais efeitos não-reprodutivos de substâncias desreguladoras do sistema endócrino.

A tabela 37 apresenta alguns resultados dos tradicionais testes ecotoxicológicos rápidos, comparando com o CENO obtido no presente estudo multigeração com *B. tenagophila*.

De acordo com a Portaria nº 1.469 (Brasil, 2001), o nível máximo de atrazina permitido para água potável está na faixa de 2 µg/L. Pelos dados obtidos no presente estudo, esse limite máximo de atrazina estaria abaixo do nível de efeito observado para a *Biomphalaria*. No entanto, se levarmos em conta os dados explicitados no estudo de Hayes et al. (2003), esse valor deveria ser revisto, ou pelo menos novos experimentos deveriam ser realizados, particularmente com mamíferos, para verificar se o valor estabelecido na portaria é suficientemente baixo para assegurar adequada proteção à população.

Tabela 37 – Comparação entre o valor de CENO, obtido no presente estudo, para a atrazina e valores obtidos nos tradicionais testes rápidos de reprodução e desenvolvimento. Valores expressos em µg/L.

Espécie	Efeito Observado e Duração	CENO	Referência
<i>Selenastrum capricornutum</i>	Inibição do Crescimento (96 hrs)	< 167	Van Der Heever & Grobbelaar, 1996
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Inibição da Reprodução (7 dias)	3500	Oris et al., 1991
<i>Daphnia magna</i>	Inibição da Reprodução (21 dias)	140	USEPA, 2003
<i>Danio rerio</i>	Sobrevivência e Crescimento Larval (35 dias)	300	Görge & Nagel, 1990
<i>Biomphalaria tenagophila</i>	Reprodução e Desenvolvimento Embrionário em Duas Gerações (8 semanas)	< 100	<u>Presente Estudo.</u>

4.4 – ETANOL

Os resultados obtidos com o etanol demonstraram que este solvente, nas concentrações empregadas para solubilizar as substâncias tiveram efeito sobre o desempenho reprodutivo dos caramujos. As concentrações de etanol testadas nesse trabalho corresponderam às concentrações finais alcançadas na solubilização da atrazina. A menor concentração de etanol (0,0025%) correspondeu à concentração final desse solvente empregada para solubilizar a maior concentração de endossulfan (0,1 mg/L). A avaliação do desempenho reprodutivo mostra que o etanol nas concentrações de 0,025% e 0,25% reduziu o número de desovas por indivíduo. Uma inibição semelhante a essa foi observada nos caramujos da geração F0 expostos às concentrações de 1,0 e 10,0 mg/L de atrazina, que continham os níveis de etanol relatados anteriormente. Esse fato indica que o etanol utilizado para solubilizar a atrazina pode ter sido responsável pelo efeito observado.

Todavia, nem todas as alterações registradas no experimento em que os caramujos foram expostos à atrazina podem ser atribuídas apenas à presença do etanol.

O aumento no número de ovos por desova do grupo exposto à menor concentração de atrazina (0,1 mg/L), não foi repetido na concentração de 0,0025% de etanol, e nesse caso o efeito estimulatório poderia ser devido apenas à atrazina ou a uma interação entre a atrazina e o etanol. A alta embriofetalidade e o retardo para eclodir registrados com atrazina, não foram observados em nenhuma concentração do solvente apenas. O etanol por si só, como visto, não comprometeu o desenvolvimento embrionário dos descendentes da geração F0 (embriões F1) (Gráficos 49, 50 e 51) . Essa ausência de efeitos na concentração de 0,0025% de etanol, correspondente à utilizada para solubilizar o endossulfan (0,1 mg/L), sugere que o solvente não foi responsável pelas alterações de desempenho reprodutivo notadas com esse agrotóxico.

Calabrese & Baldwin (2003) analisaram minuciosamente os efeitos hormonais do etanol, observados em seres humanos e em animais, ressaltando que este álcool frequentemente produz efeitos bifásicos (estímulo/inibição). No presente estudo foi observado o efeito inibitório do etanol sobre a reprodução da *B. tenagophila* (desovas por indivíduo) nas concentrações de 0,025% (Gráfico 29, Tabela 33). Zhang et al. (2003), contudo, observaram que o etanol, na concentração de 0,0008% causou um aumento na fecundidade do microcrustáceo *Daphnia magna*. Ressalta-se que a concentração testada por Zhang et al. (2003) foi cerca de trinta vezes menor que a menor concentração em que se observou efeito inibitório no presente estudo.

Se a relação entre a concentração de etanol e as alterações do desempenho reprodutivo de *B. tenagophila* é uma curva do tipo bifásico, tal como mostrado por Calabrese & Baldwin (2003) para outras situações, é possível que concentrações menores que as que testamos evidenciassem um efeito estimulatório deste solvente. Esta possibilidade merece ser investigada em experimentos planejados especificamente para este fim, ou seja para evidenciar possíveis efeitos horméticos de doses baixas.

4.5 – ASPECTOS GERAIS

Vários estudos tem mostrado que a exposição a substâncias com atividade estrogênica (xenoestrógenos ou estrógenos ambientais) causam anomalias nas gônadas em várias espécies (Willey & Krone, 2001). Não está claro, porém, se os efeitos dessas substâncias sobre o sistema reprodutivo estão relacionadas às suas propriedades hormonais. Há evidências, por exemplo, de que o estresse pode reduzir a qualidade dos gametas produzidos em peixes (Campbell et al., 1992, 1994). Guillette et al. (1995) sugerem, por outro lado, que as alterações quimicamente induzidas das funções

reprodutivas, quimicamente induzidas, podem ser produzidas de modo ativacional ou organizacional. Os efeitos ativacionais ocorreriam durante a idade adulta e são normalmente transitórios, não envolvendo as células germinativas preliminares dos indivíduos expostos. Os efeitos organizacionais, entretanto, ocorreriam no início do desenvolvimento, durante períodos críticos de suscetibilidade, e poderiam causar alterações morfológicas permanentes. O modelo organizacional sugere que pequena quantidade de uma substância com atividade sobre o sistema endócrino, administrada durante um período específico do desenvolvimento embrionário, poderia modificar a organização do sistema reprodutivo (Guillette et al., 1995).

Os resultados observados no presente estudo poderiam se enquadrar nos dois modelos propostos por Guillette et al. (1995), mas não foi investigado se os efeitos detectados nos indivíduos expostos são permanentes.

O efeito estimulatório na reprodução observado com as três substâncias testadas (Gráfico 4 – Endossulfan, Gráfico 16 – Nonilfenol Etoxilado, Gráfico 21 – Atrazina), parece ser uma reação compensatória a uma prévia inibição, às vezes na geração anterior. Chapman (2001) define “Hormesis” como um efeito estimulatório que ocorre quando uma substância produz efeitos negativos em altas doses/concentrações (ex. inibição do crescimento ou da fecundidade), e produz efeitos positivos em baixas doses (ex. estímulo no crescimento ou da fecundidade). Segundo Stebbing (1998) a “hormesis” tem sido interpretada como uma super compensação à uma alteração na homeostasia do organismo. É importante salientar, todavia, que as definições de efeitos positivos ou negativos nesse contexto e as implicações desse fenômeno para as avaliações ecotoxicológicas e de risco ecológico ainda necessitam ser melhor compreendidas. Não se tratando, como destacado por Chapman (2001) de processo de fácil entendimento e aceitação.

5 - CONCLUSÕES

Existem poucas avaliações de efeitos sobre a reprodução, de longa duração, com organismos aquáticos e, ainda menos quando se fala de efeitos multigeração em caramujos. A partir dos resultados desse trabalho, pode-se dizer que, o estudo multigeração de desempenho reprodutivo com caramujos, tal como aqui apresentado, mostrou-se sensível para detectar agravos não letais causados por xenobióticos.

Em virtude da maior toxicidade aguda, o endosulfan foi testado em concentrações menores que as outras substâncias. O etanol foi utilizado para solubilizar o endosulfan, mas este álcool nas concentrações finais máximas alcançadas, não parece ter interferido com o desempenho reprodutivo da *B. tenagophila*. No caso da atrazina, no entanto, foram necessárias concentrações mais elevadas de etanol e é possível que alguns dos efeitos observados tenham sido devido ao solvente e não ao herbicida. Nos dois casos, o emprego do etanol objetivou possibilitar o teste de concentrações mais elevadas do que as que poderiam ser obtidas sem o uso do solvente, em virtude da baixa solubilidade aquosa das substâncias. O teste em laboratório com concentrações mais altas do que as que se espera encontrar em situações de campo, é via de regra necessário para o estabelecimento com segurança da CENO, valor de referência a ser empregado nas avaliações de risco. Pode-se argumentar, todavia, que essas concentrações mais elevadas, além daquelas permitidas pela solubilidade aquosa, e obtidas apenas com o auxílio de solventes, dificilmente serão encontradas em corpos hídricos.

Situação diferente é aquela do nonilfenol etoxilado cujos efeitos foram observados em concentrações passíveis de serem encontradas em corpos hídricos contaminados. No caso do nonilfenol etoxilado, vale lembrar que esta foi a substância que exibiu o menor valor de CENO no teste multigeração empregando a *Biomphalaria tenagophila*. Do ponto de vista ambiental, não se conhece registro de níveis, ou de investigações sobre a presença do nonilfenol em ambientes aquáticos no Brasil. Os dados aqui obtidos mostram que maior atenção deve ser dispensada a esse poluente, de modo à incluí-lo nas regulamentações sobre a qualidade da água, principalmente, quando o objetivo maior for a proteção das comunidades aquáticas.

Em conclusão, os resultados aqui apresentados sugerem que, com alguns pequenos ajustes, o estudo multigeração com caramujos pode vir a se tornar uma interessante alternativa para a avaliação dos efeitos crônicos de substâncias químicas sobre organismos aquáticos.

V – CONSIDERAÇÕES FINAIS

A fase embrionária é considerada como uma das etapas do desenvolvimento mais suscetíveis aos efeitos adversos de substâncias químicas. Entretanto, em alguns casos, podem existir mecanismos naturais que protegem o embrião do efeito desses xenobióticos. No caso dos moluscos, particularmente os gastrópodos utilizados no presente estudo, verificou-se que os indivíduos adultos foram mais suscetíveis ao efeito letal das substâncias investigadas, do que os embriões. Nesse caso, provavelmente a massa que envolve os ovos contidos em uma desova, tem importante papel na proteção embrionária, e deve atuar como uma barreira física à penetração de alguns compostos potencialmente nocivos. Algumas substâncias químicas como a niclosamida ou o hidróxido de trifetil estanho, por exemplo, atravessam com facilidade esta barreira, sendo mais tóxicos para o embrião do que para o adulto. Essa característica as torna eficientes moluscidas, pois apresentam também o efeito embrioletal (ovicida). Outras substâncias, provavelmente pela dificuldade em atingir o embrião no interior da massa de ovos, exigem concentrações mais elevadas e um período mais prolongado de exposição para causar efeitos adversos.

Segundo Benkendorff et al. (2001), a barreira física oferecida pelas massas de ovos dos moluscos não é suficiente, em muitos casos, para proteger os embriões de infecções por microrganismos presentes no ambiente aquático. Neste contexto, vários autores tem investigado as propriedades antibacterianas das massas de ovos. As massas de ovos são compostas principalmente por proteínas e polissacarídeos, o que as torna, em princípio, adequadas para a proliferação de microrganismos. Benkendorff et al. (2001) afirmam, baseado em outros estudos, que a necessidade de proteção antimicrobiana é maior nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário dos moluscos, e que a perda da atividade antibiótica durante o crescimento do embrião pode ter um importante papel no processo de eclosão dos ovos e liberação dos caramujos jovens. Poder-se-ia esperar portanto, que a exposição à uma substância que apresente toxicidade para microrganismos, de certo modo, retardaria a eclosão dos ovos, não por um efeito direto sobre o embrião, mas por um efeito indireto, eliminando os “consumidores” da massa de ovos.

Wirth et al. (2001), relevam as implicações ecológicas para um simples retardo na eclosão dos ovos. Para alguns organismos esse processo biológico estaria intimamente relacionado à ciclos lunares ou de marés. Assim, o atraso no

desenvolvimento poderia afetar a estrutura da população no decorrer de determinado tempo, uma vez que, se a população continuar exibindo retardo até o período propício para o acasalamento, os seus integrantes deverão estar mais jovens do que os de uma população normal, e isso poderia levar ao declínio desse grupo em um ambiente contaminado. Por esse ponto de vista, o retardo da eclosão em si, mesmo que o embrião dê origem a um jovem caramujo viável, é um indicador de efeito importante para a população afetada.

Todos esses aspectos ressaltam a importância dos efeitos tóxicos não letais avaliados no presente estudo, incluindo o desempenho reprodutivo propriamente dito, por se tratar de uma função fisiológica essencial para a sobrevivência das espécies. Deve-se destacar que a reprodução particularmente em animais de clima temperado, é sincronizada sazonalmente por fatores ambientais tais como: temperatura, fotoperíodo, etc., e que retardos ou adiantamentos deste ciclo comprometem a função reprodutiva e podem levar a um declínio populacional da espécie.

Além disso, merece destaque também o fato da sensibilidade dos testes propostos nos capítulos 1 e 2, ter sido comparável, ou em alguns casos superior à dos tradicionais testes rápidos para a detecção de efeitos sobre a reprodução e o desenvolvimento. Essa observação, sugere que ensaios com base nesses protocolos poderiam ser aperfeiçoados, padronizados e incluídos em baterias de testes ecotoxicológicos para a avaliação de moluscidas e eventuais contaminantes ambientais.

VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Hafez, A.M., Zidan, Z.H., Abdel-Megeed, M.I., el-Emam, M.A., Ragab, F.M. & el-Deeb, F.A., 1997. Effect of the plant *Azolla pinnata* on survival, growth rate, fecundity and hatchability of egg-masses of *Biomphalaria alexandrina* snails. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 27(3): 825-841.
- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), 1993. *Água – Ensaio de toxicidade aguda com Daphnia similis Claus, 1876 (Cladocera, Crustacea)*, NBR 12713. Rio de Janeiro: ABNT.
- Ahel, M. & Giger, W., 1993. Aqueous solubility of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates. *Chemosphere*, 26(8): 1461-1470.
- Andrade, R.M. & Carvalho, O.S., 1972. Alimentação e fecundidade de planorbídeos criados em laboratório. I: *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835) (Pulmonata, Planorbidae). *Revista Brasileira de Biologia*, 32(2):225-233.
- Andrews, P., Thyssen, J. & Lorke, D., 1983. The biology and toxicology of molluscicides, Bayluscide®. *Pharmacology and Therapeutics*, 19: 245-295.
- Ankley, G., Mihaich, E., Stahl, R., Tillitt, D., Colborn, T., McMaster, S., Miller, R., Bantle, J., Campbell, P., Denslow, N., Dickerson, R., Folmar, L., Fry, M., Giesy, J., Earl Gray, L., Guiney, P., Hutchinson, T., Kennedy, S., Kramer, V., LeBlanc, G., Mayes, M., Nimrod, A., Patino, R., Peterson, R., Purdy, R., Ringer, R., Thomas, P., Touart, L., Van Der Kraak, G. & Zacharewski, T., 1998. Overview of a workshop on screening methods for detecting potential (anti-)estrogenic/androgenic chemicals in wildlife. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(1): 68-87.
- Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), 2003. *Toxicologia - monografias de produtos agrotóxicos*. 22 maio 2003. <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/index.htm>.
- Araújo, A.C.P., Telles, D.L., Gorni, R. & Lima, L.L.A., 1999. Endosulfan residues in brazilian tomatoes and their impact on public health and the environment. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 62: 671-676.
- Archand-Hoy, L.D. & Benson, W. H., 1998. Fish reproduction: An ecologically relevant indicator of endocrine disruption. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(1):49-57.
- Bantle, J.A., 1995. FETAX – A developmental toxicity assay using frog embryos. In: *Fundamentals of aquatic toxicology: Effects, environmental fate, and risk assessment*. (G.M.Rand), pp. 207-230, Washington: Taylor & Francis.
- Benkendorff, K., Davis, A.R. & Bremner, J.B., 2001. Chemical defense in the egg masses of benthic invertebrates: An assessment of antibacterial activity in 39 mollusks and 4 polychaetes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 78: 109-118.

- Bennie, D.T., 1999. Review of the environmental occurrence of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates. *Water Quality Research Journal of Canada*, 34(1): 79-122.
- Biesinger, K.E. & Christensen, G.M., 1972. Effects of various metals on survival, growth, reproduction and metabolism of *Daphnia magna*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 29: 1691-1700.
- Brasil, 1986. Conselho Nacional do Meio Ambiente. *Resolução Conama n° 20*, de 18 de junho de 1986. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 30 de junho de 1986. 15 novembro 2002.
<<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res86/res2086.html>>.
- Brasil, 1996. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. *Portaria Normativa IBAMA n° 84*, de 15 de outubro de 1996. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 23 de outubro de 1996. 19 agosto 2003. <<http://www.ibama.gov.br>>.
- Brasil, 2001. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Portaria n° 1.469, de 29 de dezembro de 2000. *Controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade*. Brasília, DF: Fundação Nacional de Saúde, 2001. 32p.
- Calabrese, E.J. & Baldwin, L.A., 2000. Chemical hormesis: its historical foundations as a biological hypothesis. *Human and Experimental Toxicology*, 19(1): 2-31.
- Calabrese, E.J. & Baldwin, L.A., 2003. Ethanol and hormesis. *Critical Reviews in Toxicology*, 33(3&4): 407-424.
- Camey, T. & Verdonk, N.H., 1970. The early development of the snail *Biomphalaria glabrata* (Say) and the origin of the head organs. *Netherlands Journal of Zoology*, 20(1): 93-121.
- Campbell, P.M., Pottinger, T.G. & Sumpter, J.P., 1992. Stress reduces the quality of gametes produced by rainbow trout. *Biology of Reproduction*, 47: 1140-1150.
- Campbell, P.M., Pottinger, T.G. & Sumpter, J.P., 1994. Preliminary evidence that chronic confinement stress reduces the quality of gametes produced by brown and rainbow trout. *Aquaculture*, 120: 151-169.
- Chapman, P.M., 2001. The implications of hormesis to ecotoxicology and ecological risk assessment. *Human and Experimental Toxicology*, 20(10): 499-505.
- Colborn, T., 1993. Development effects of endocrine-disrupting chemicals in wild-life and humans. *Environmental Health Perspectives*, 101(5): 378-384.
- Colborn, T., 1998. Endocrine disruption from environmental toxicants. In: *Environmental and Occupational Medicine* (W. N. Rom), pp. 807-816, Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Colborn, T., Dumanoski, D. & Myers, J.P., 1997. *O Futuro Roubado*. Tradução Buchweitz, C., Porto Alegre: L&PM, 354p.

- Coldham, N.G., Sivapathasundaram, S., Dave, M., Ashfield, L.A., Pottinger, T.G., Goodall, C. & Sauer, M.J., 1998. Biotransformation, tissue distribution, and persistence of 4-nonylphenol residues in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Drug Metabolism and Disposition*, 26(4): 347-354.
- Cooney, J.D., 1995. Freshwater tests. In: *Fundamentals of aquatic toxicology: Effects, environmental fate and risk assessment* (G. M. Rand), pp. 71-102, Washington: Taylor & Francis.
- Czech, P., Weber, K. & Dietrich, D.R., 2001. Effects of endocrine modulating substances on reproduction in the hermaphroditic snail *Lymnaea stagnalis* L. *Aquatic Toxicology* 53: 103-114.
- Dalsenter, P.R., Dallegrave, E., Mello, J.R., Langeloh, A., Oliveira, R.T. & Faqi, A.S., 1999. Reproductive effects of endosulfan on male offspring of rats exposed during pregnancy and lactation. *Human and Experimental Toxicology*, 18(9): 583-589.
- Delgado, I.F., De-Carvalho, R.R., De-Oliveira, A.C.A.X., Kuriyama, S.N., Oliveira-Filho, E.C., Souza, C.A.M. & Paumgarten, F.J.R., 2003. Absence of tumor promoter activity of *Euphorbia milii* latex on the mouse back skin. *Toxicology Letters*, 145: 175-180.
- DeLorenzo, M.E., Taylor, L.A., Lund, S.A., Pennington, P.L., Strozier, E.D. & Fulton, M.H., 2002. Toxicity and bioconcentration potential of the agricultural pesticide endosulfan in phytoplankton and zooplankton. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 42: 173-181.
- Dias-Baruffi, M., Sakamoto, M., Rosseto, S., Vozari-Hampe, M.M. & Roque-Barreira, M.C., 2000. Neutrophil migration and aggregation induced by euphorbin, a lectin from the latex of *Euphorbia milii*, var. *milii*. *Inflammation Research*, 49: 732-736.
- Dodds, E.C. & Lawson, W., 1938. Molecular structure in relation to oestrogenic activity. Compounds without a phenanthrene nucleus. *Proceedings of the Royal Society of London (Series B)*, 125: 222-232.
- Dorn, P.B., Salanitro, J.P., Evans, S.H. & Kravetz, L., 1993. Assessing the aquatic hazard of some branched and linear nonionic surfactants by biodegradation and toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12: 1751-1762.
- Dreyfuss, G., Rondelaud, D., Varelle-Morel, C., 1999. Oviposition of *Lymnaea truncatula* infected by *Fasciola hepatica* under experimental conditions. *Parasitology Research*, 85(7): 589-593.
- Duncan, J., 1974. A review of the development and application of molluscicides in schistosomiasis control. In: *Molluscicides in schistosomiasis control*. (T. C. Cheng), pp. 9-40, London: Academic Press.
- Duncan, J. & Sturrock, R.F., 1987. Laboratory evaluation of potential plant molluscicides. In: *Plant molluscicides*. (K. E. Mott), pp. 251-265, New York: John Wiley & Sons.

- Dunnett, C.W., 1955. Multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *Journal of American Statistical Association*, 50: 1096-1121.
- ECHC (Environment Canada and Health Canada), 2001. *Priority Substances List Assessment Report – Nonylphenol and its ethoxylates*. Canadian Environment Protection Act, 1999. 97p.
- el-Ansary, A., Sammour, E.M., Soliman, M.S., Gawish, F.A., 2001. In vivo, attenuation of schistosome cercarial development and disturbance of egg laying capacity in *Biomphalaria alexandrina* using sublethal concentrations of plant molluscicides. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 31(3): 657-669.
- Fernández-Casalderrey, A., Ferrando, M.D. & Andreu-Moliner, E., 1993. Effects of endosulfan on survival, growth and reproduction of *Daphnia magna*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 106C(2): 437-441.
- Freitas, J.S., 1994. *Dinâmica de genes e estratégias reprodutivas em grupos de Biomphalaria tenagophila (Orbigny) (Mollusca, Planorbidae)*. Tese de Doutorado, São Paulo: Universidade de São Paulo, 118p.
- Freitas, J.S., Paula, D.P. & Cariello, M.O. 1997. The influence of self-fertilization performance and copulation behavior in reproduction by cross-fertilization in groups of *Biomphalaria tenagophila* (Mollusca, Planorbidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 92(6): 739-743.
- Geilenkirchen, W.L.M., 1966. Cell division and morphogenesis of *Lymnaea* eggs after treatment with heat pulses at successive stages in early division cycles. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 16(2): 321-337, 1966.
- Geraldino, B.R., Oliveira-Filho, E.C., De-Carvalho, R.R., Coelho, D.R. & Paumgarten, F.J.R., 2001. Efeitos do TPTH sobre desovas de *Biomphalaria glabrata*. In: XVI Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental – FESBE, *Anais*, p. Caxambu: Minas Gerais.
- Gherardi-Goldstein, E., Bertoletti, E., Zagatto, P.A., Araújo, R.P.A. & Ramos, M.L.L.C. 1992. *Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos*. São Paulo: CETESB, 17p.
- Gomot, A., 1998. Toxic effects of cadmium on reproduction, development, and hatching in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* for water quality monitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 41: 288-297.
- Görge, G. & Nagel, R., 1990. Toxicity of lindane, atrazine, and deltamethrin to early life stages of zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 20: 246-255.
- Graymore, M., Stagnitti, F. & Allinson, G., 2001. Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Environment International*, 26: 483-495.
- Grisolia, C.K. & Bicalho-Valadares, M., 1997. Toxicity and genotoxicity of the fungicide triphenyltin hydroxide. *Brazilian Journal of Genetics*, 20(2): 243-246.

- Guillette, L.J.Jr, Crain, D.A., Rooney, A.A. & Pickford, D.B., 1995. Organization versus activation: the role of endocrine disrupting contaminants (EDCs) during embryonic development in wildlife. *Environmental Health Perspectives*, 103 (Suppl. 7): 157-164.
- Hamilton, M.A., Russo, R.C. & Thurston, R.V., 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science and Technology*, 11(7): 714-719.
- Harries, J.E., Sheahan, D.A., Jobling, S., Matthiessen, P., Neall, P., Sumpter, J.P., Tylor, T. & Zaman, N., 1997. Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16(3): 534-542.
- Hayes, T.B., Collins, A., Lee, M., Mendoza, M., Noriega, N., Stuart, A.A. & Vonk, A., 2002a. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(8): 5476-80.
- Hayes, T.B., Haston, K., Tsui, M., Hoang, A., Haeffele, C., Vonk, A., 2002b. Herbicides: feminization of male frogs in the wild. *Nature*, 419(6910): 895-896.
- Hayes, T.B., Haston, K., Tsui, M., Hoang, A., Haeffele, C., Vonk, A., 2003. Atrazine-induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American leopard frogs (*Rana pipiens*): Laboratory and field evidence *Environmental Health Perspectives*, 111(4): 568-575.
- Hemmer, M.J., Hemmer, B.L., Bowman, C.J., Kroll, K.J., Folmar, L.C., Marcovich, D., Högglund, M.D. & Denslow, N.D., 2001. Effects of p-nonylphenol, methoxychlor, and endosulfan on vitellogenin induction and expression in sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(2): 336-343.
- Hoss, S., Jüttner, I., Traunspurger, W., Pfister, G., Schramm, K.W. & Steinberg, C.E.W., 2002. Enhanced growth and reproduction of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda) in the presence of 4-nonylphenol. *Environmental Pollution*, 120: 169-172.
- Hutchinson, T.H., Brown, R., Brugger, K.E., Campbell, P.M., Holt, M., Länge, R., McCahon, P., Tattersfield, L.J. & van Egmond, R., 2000. Ecological risk assessment of endocrine disruptors. *Environmental Health Perspectives*, 108(11): 1007-1014.
- Jobling, S., Casey, D., Rodgers-Gray, T., Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Pawlowski, S., Baunbeck, T., Turner, A.P. & Tyler, C.R., 2003. Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquatic Toxicology*, 65:205-220.
- Jobling, S. & Sumpter, J.P., 1993. Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicology*, 27:361-372.

- Jumel, A., Coutellec, M.A., Cravedi, J.P. & Lagadic, L., 2002. Nonylphenol polyethoxylate adjuvant mitigates the reproductive toxicity of fomesafen on the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* in outdoor experimental ponds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(9): 1876-1888.
- Kannan, K., Keith, T.L., Naylor, C.G., Staples, C.A., Snyder, S.A. & Giesy, J.P., 2003. Nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in fish, sediment, and water from the Kalamazoo river, Michigan. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 44: 77-82.
- Kavlock, R.J. & Ankley, G.T., 1996. A perspective on the risk assessment process for endocrine disruptive effects on wildlife and human health. *Risk Analysis*, 16(6):731-739.
- Kawano, T., Okazaki, K. & Ré, L., 1992. The principal stages of the embryonic development of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Planorbidae): Pratical guide. *Malacologia*, 34: 33-40.
- Kawano, T. & Simões, L.C.G., 1986. Efeito da *Stevia rebaudiana* em *Biomphalaria glabrata*. *Revista Brasileira de Biologia*, 46(3): 555-562.
- Kettle, W.D., deNoyelles, F.Jr., Heacock, B.D. & Kadoum, A.M., 1987. Diet and reproductive success of bluegill recovered from experimental ponds treated with atrazine. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 38(1): 47-52.
- Kiesecker, J.M., 2002. Synergism between trematode infection and pesticide exposure: A link to amphibian limb deformities in nature? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(15): 9900-9904.
- Kime, D.E., 1999. Environmentally induced endocrine abnormalities in fish. In: *Endocrine disrupting chemicals* (R. E. Hester & R. M. Harrison). Issues in Environmental Science and Technology (12). pp. 27-48. Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Kime, D.E. & Nash, J.P., 1999. Gamete viability as an indicator of reproductive endocrine disruption in fish. *The Science of the Total Environment*, 233: 123-129.
- Kwak, H., Bae, M., Lee, M., Lee, Y., Lee, B., Kang, K., Chae, C., Sung, H., Shin, J., Kim, J., Mar, W., Sheen, Y. & Cho, M. , 2001. Effects of nonylphenol, bisphenol A, and their mixture on the viviparous swordtail fish (*Xiphophorus helleri*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(4):787-795.
- Laabs, V., Amelung, W., Pinto, A.A., Wantzen, M., Silva, C.J. & Zech, W., 2002. Pesticides in surface water, sediment, and rainfall of the northeastern Pantanal basin, Brazil. *Journal of Environmental Quality*, 31: 1636-1648.
- Lagadic, L., & Caquet, T., 1998. Invertebrates in testing of environmental chemicals: Are they alternatives? *Environmental Health Perspectives*, 106(Suppl. 2): 593-611.
- Lee, K.H., Hayashi, N., Okano, M., Hall, I.R., Wu, R.Y. & McPhail, A.T., 1982. Lasiodiplodin, a potent antileukemic macrolide from *Euphorbia splendens*. *Phytochemistry*, 21: 1119-1121.

- Lima, L.C., 1995. Família Planorbidae. In: *Tópicos em Malacologia Médica* (F. S. Barbosa), pp. 90-112, Rio de Janeiro: Fiocruz.
- Maguire, R.J., 1999. Review of the persistence of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in aquatic environments. *Water Quality Research Journal of Canada*, 34(1): 37-78.
- Maltby, L & Calow, P., 1989. The application of bioassays in the resolution of environmental problems; past, present and future. *Hydrobiologia*, 188/189: 65-76.
- Marston, A. & Hecker, E., 1983. On the active principles of the Euphorbiaceae. VI. Isolation and biological activities of seven milliamines from *Euphorbia milii*. *Planta Medica*, 47: 141-147.
- Marston, A. & Hecker, E., 1984. On the active principles of the Euphorbiaceae. VII. Milliamines H and I, peptide esters of 20-deoxy-5 epsilon-hydroxyphorbol from *Euphorbia milii*. *Planta Medica*, 50: 319-322.
- Matthiessen, P. & Gibbs, P.E., 1998. Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(1): 37-43.
- McKim, J.M., 1995. Early life stages toxicity tests. In: *Fundamentals of aquatic toxicology: Effects, environmental fate and risk assessment* (G. M. Rand, ed.), pp. 974-1011, Washington: Taylor & Francis.
- Mount, D.I. & Stephan, C.E., 1967. A method for establishing acceptable toxicant limits for fish - malathion and butoxyethanol ester of 2,4-D. *Transactions of the American Fisheries Society*, 96:185-193.
- Muller, S. & Schlatter, C., 1998. Oestrogenic potency of nonylphenol *in vivo*-a case study to evaluate the relevance of human non-occupational exposure. *Pure & Applied Chemistry*, 70(9):1847-1853.
- Münzinger, A., 1987. *Biomphalaria glabrata* (Say), a suitable organism for a biotest. *Environmental Technology Letters*, 8: 141-148.
- Nichols, K.M., Snyder, E.M., Snyder, S.A., Pierens, S.L., Miles-Richardson, S.R. & Giesy, J.P., 2001. Effects of nonylphenol ethoxylate exposure on reproductive output and bioindicators of environmental estrogen exposure in fathead minnows, *Pimephales promelas*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(3): 510-522.
- Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Tillmann, M. & Markert, B., 2000. Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part I: Bisphenol A and octylphenol as xeno-estrogens. *Ecotoxicology*, 9: 383-397.
- Oliveira-Filho, E.C., De-Carvalho, R.R., Geraldino, B.R. & Paumgarten, F.J.R., 2000. Efeitos embriotóxicos de moluscidas em *Biomphalaria glabrata*. In: VI Encontro de Ecotoxicologia – ECOTOX, *Anais*, p. 132, São Carlos: São Paulo.

- Oliveira-Filho, E.C., De-Carvalho, R.R. & Paumgarten, F.J.R., 1999a. Effects of *Euphorbia milii* latex on the development of *Biomphalaria glabrata* embryos. In: VII International Symposium on Schistosomiasis, *Anais*, p. 159, Rio de Janeiro: RJ.
- Oliveira-Filho, E.C., De-Carvalho, R.R. & Paumgarten, F.J.R., 1999b. The influence of environmental factors on the molluscicidal activity of *Euphorbia milii* latex. *Journal of Environmental Science and Health Part B - Pesticides, Food And Agricultural Wastes*, B34(2): 289-303.
- Oliveira-Filho, E.C. & Paumgarten, F.J.R., 2000. Toxicity of *Euphorbia milii* latex and niclosamide to snails and nontarget aquatic species. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 46: 342-350.
- Oliveira-Filho, E.C., Matos, R.L. & Paumgarten, F.J.R., 2004. Comparative study on the susceptibility of freshwater species to copper-based pesticides. *Chemosphere*, no prelo.
- Oris, J.T., Winner, R.W. & Moore, M.V., 1991. A four-day survival and reproduction toxicity test for *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10: 217-224.
- Pancorbo, S. & Hammer, R.H., 1972. Preliminary phytochemical investigation of *Euphorbia milii*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 61(6): 954-957.
- Paraense, W.L., 1955. Autofecundação e fecundação cruzada em *Australorbis glabratus*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 53: 277-284.
- Paraense, W.L., 1972. Fauna planorbídica do Brasil. In: *Introdução à geografia médica do Brasil* (C. S. Lacaz, R. G. Baruzzi & J. W. Siqueira), pp. 213-239, São Paulo: Edgar Blucher.
- Parrish, P.R., 1995. Acute toxicity tests. In: *Fundamentals of aquatic toxicology: Effects, environmental fate and risk assessment* (G. M. Rand), pp. 947-973, Washington: Taylor & Francis.
- Patterson, S.J., Scott, C.C. & Tucker, K.B.E., 1968. Nonionic detergent degradation. II. Thin-layer chromatography and foaming properties of alkyl phenol polyethoxylates. *Journal of the American Oil Chemistry Society*, 45: 529-532.
- Patyna, P.J, Davi, R.A., Parkerton, T.F., Browm, R.P. & Cooper, K.R., 1999. A proposed multigeneration protocol for Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to evaluate effects of endocrine disruptors. *The Science of the Total Environment*, 233: 211-220.
- Petit, F., Le Goff, P., Cravedi, J.P., Valotair, Y. & Pakdel, F., 1997. Two complementary bioassays for screening the estrogenic potency of xenobiotics: Recombinant yeast for trout estrogen receptor and trout hepatocyte cultures. *Journal of Molecular Endocrinology*, 19:321-335.
- Rand, G.M., Wells, P.G. & McCarty, L.S., 1995. Introduction to aquatic toxicology. In: *Fundamentals of aquatic toxicology: Effects, environmental fate and risk assessment* (G. M. Rand), pp. 3-67. Washington: Taylor & Francis.

- Ravera, O., 1977. Effects of heavy metals (cadmium, copper, chromium and lead) on a freshwater snail: *Biomphalaria glabrata* Say (Gastropoda, Prosobranchia). *Malacologia*, 16(1): 231-236.
- Ré, L. & Kawano, T., 1987. Effects of *Laurus nobilis* on *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 82 Suppl. IV: 315-320.
- Russo, J. & Lagadic, L., 2004. Effects of environmental concentrations of atrazine on hemocyte density and phagocytic activity in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata). *Environmental Pollution*, 127: 303-311.
- Schall, V.T., Vasconcellos, M.C., Souza, C.P. & Baptista, D.F., 1998. The molluscicidal activity of "Crown of Christ" (*Euphorbia splendens* var. *hislopii*) latex on snails acting as intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 58: 7-10.
- Schober, U. & Lampert, W., 1977. Effects of sublethal concentrations of the herbicide atrazin on growth and reproduction of *Daphnia pulex*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 17(3): 269-277.
- Schulte-Oehlmann, U., Tillmann, M., Markert, B., Oehlmann, J., Watermann, B. & Scherf, S., 2000. Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part II: Triphenyltin as a xeno-androgen. *Ecotoxicology*, 9: 399-412.
- Schwaiger, J., Mallow, U., Ferling, H., Knoerr, S., Braunbeck, Th., Kalbfus, W. & Negele, R.D., 2002. How estrogenic is nonylphenol? A transgenerational study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a test organism. *Aquatic Toxicology*, 59: 177-189.
- Servos, M.R., 1999. Review of the aquatic toxicity, estrogenic responses and bioaccumulation of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates. *Water Quality Research Journal of Canada*, 34(1): 123-177.
- Shelby, M.D., Newbold, R.R., Tully, D.B., Chae, K., Davis, V.L., 1996. Assessing environmental chemicals for estrogenicity using a combination of in vitro and in vivo assays. *Environmental Health Perspectives*, 104:1296-1300.
- Shurin, J.B. & Dodson, S.I., 1997. Sublethal effects of cyanobacteria and nonylphenol on environmental sex determination and development in *Daphnia*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16: 1269-1276.
- Simic, B., Kniewald, J. & Kniewald, Z., 1994. Effects of atrazine on reproductive performance in the rat. *Journal of Applied Toxicology*, 14(6): 401-404.
- Sinha, N., Narayan, R. & Saxena, D.K., 1997. Effect of endosulfan on the testis of growing rats. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 58(1):79-86.
- Snyder, S.A. Villeneuve, D.L., Verbrugge, D. & Giesy, J.P., 1999. Analytical methods for detection of selected estrogenic compounds in aqueous mixtures. *Environmental Science and Technology*, 33: 2814-2820.

- Soto, A.M., Justicia, H., Wary, J.W. & Sonnenschein, C., 1991. *p*-Nonylphenol: An estrogenic xenobiotic released from “modified” polystyrene. *Environmental Health Perspectives*, 92:167-173.
- Soto, A.M., Sonnenschein, C., Chung, K.L., Fernandez, M.F., Olea, N. & Serrano, F.O., 1995. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: An update on estrogenic environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives*, 103 (Suppl): 113-122.
- Souza, C.A.M., De-Carvalho, R.R., Kuriyama, S.N., Araújo, I.B., Rodrigues, R.P., Vollmer, R.S., Alves, E.N. & Paumgarten, F.J.R., 1997. Study of the embryofetotoxicity of “Crown-of-Thorns” (*Euphorbia milii*) latex, a natural molluscicide. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30: 1325-1332.
- Souza, C.P. & Lima, L.C., 1990. *Moluscos de interesse parasitológico no Brasil*. Belo Horizonte: Fiocruz, 76p.
- Stebbing, A.R.D., 1998. A theory for growth hormesis. *Mutation Research*, 403: 249-258.
- Sunderam, R.I.M., Thompson, G.B., Chapman, J.C. & Cheng, D.M.H., 1994. Acute and chronic toxicity of endosulfan to two Australian cladocerans and their applicability in deriving water quality criteria. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 27(4): 541-545.
- Tanaka, Y. & Nakanishi, J., 2002. Chronic effects of *p*-nonylphenol on survival and reproduction of *Daphnia galeata*: Multigenerational life table experiment. *Environmental Toxicology*, 17: 487-492.
- Tate, T.M., Spurlock, J.O. & Christian, F.A., 1997. Effect of glyphosate on the development of *Pseudosuccinea columella* snails. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 33: 286-289.
- Tillmann, M., Schulte-Oehlmann, U., Duft, M., Markert, B., Oehlmann, J., 2001. Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part III: Cyproterone acetate and vinclozolin as antiandrogens. *Ecotoxicology*, 10(6): 373-388.
- Toppari, J., Larsen, J.C., Christiansen, P., Giwercman, A., Grandjean, P., Guillette Jr., L.J., Jégou, B., Jensen, T.K., Jouannet, P., Keiding, N., Leffers, H., McLachlan, J.A., Meyer, O., Muller, J., Rajpert-De Meyts, E., Scheike, T., Sharpe, R., Sumpter, J. & Skakkebaek, N.E., 1996. Male reproductive health and environmental estrogens. *Environmental Health Perspectives*, 104 Suppl. 4: 741-803.
- Truhaut, R., 1977. *Ecotoxicology: Objectives, principles and perspectives*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1: 151-173.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency), 2003. Pesticide Ecotoxicity Databank. 20 julho 2003.
<<http://www.epa.gov/oppefed1/general/databasesdescription.htm#ecotoxicity>>.

- USEPA (United States Environmental Protection Agency), 2002. Reregistration eligibility decision for endosulfan. 08 julho 2003. <http://www.epa.gov/oppsrd1/REDs/endosulfan_red.pdf>.
- USNLM (United States National Library of Medicine), 2003. *Hazardous Substances Databank*. Bethesda, MD. 07 abril 2003. <<http://www.toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>>.
- Van der Heever, J.A. & Grobbelaar, J.U., 1996. The use of *Selenastrum capricornutum* growth potential as a measure of toxicity of a few selected compounds. *Water SA*, 22(2): 183-191.
- Van der Schalie, W.H., Gardner Jr., H.S., Bantle, J.A., De Rosa, C.T., Finch, R.A., Reif, J.S., Reuter, R.H., Backer, L.C., Burger, J., Folmar, L. & Stokes, W.S., 1999. Animals as sentinels on human health hazards of environmental chemicals. *Environmental Health Perspectives*, 107(4): 309-315.
- Vasconcellos, M.C. & Schall, V.T., 1986. Latex of “Coroa de Cristo” (*Euphorbia splendens*): An effective molluscicide. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 81: 475-476.
- Vos, J.G., Dybing, E., Greim, H.A., Ladefoged, O., Lambré, C., Tarazona, J.V., Brandt, I. & Vethaak, D., 2000. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the european situation. *Critical Reviews in Toxicology*, 30(1): 71-133.
- Webbe, G., 1987. Molluscicides in the control of schistosomiasis. In: *Plant molluscicides*. (K. E. Mott), pp. 1-26, New York: John Wiley & Sons.
- Willey, J.B. & Krone, P.H., 2001. Effects of endosulfan and nonylphenol on the primordial germ cell population in pre-larval zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology*, 54:113-123.
- Wirth, E.F., Lund, S.A., Fulton, M.H. & Scott, G.I., 2001. Determination of acute mortality in adults and sublethal embryo responses of *Palaemonetes pugio* to endosulfan and methoprene exposure. *Aquatic Toxicology*, 53:9-18.
- WHO (World Health Organization), 1998. *Copper*. Environmental Health Criteria 200. IPCS-International Programme on Chemical Safety, Geneva: WHO.
- WHO (World Health Organization), 1984. *Endosulfan*. Report of WHO Expert Committee. WHO Environmental Health Criteria 40, Geneva: WHO, 64 p.
- WHO (World Health Organization), 1965. Molluscicide screening and evaluation. *Bulletin of the World Health Organization*, 33: 567-581, 1965.
- WHO (World Health Organization), 1993. *The control of schistosomiasis*. WHO Technical Report Series 830. Geneva: WHO.
- WHO (World Health Organization), 1999. *Triphenyltin compounds*. CICAD-Concise International Chemical Assessment Document 13. Geneva: WHO.

- Zagatto, P.A., Lorenzetti, M.L, Lamparelli, M.C., Salvador, M.E.P., Menegon Jr., N. & Bertolotti, E., 1999. Aperfeiçoamento de um índice de qualidade de águas. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 11(2): 111-126.
- Zakikhani, M. & Rau, M.E., 1998. Effects of *Plagiorchis elegans* (Digenea: Plagiorchiidae) infection on the reproduction of *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata: Planorbidae). *Journal of Parasitology*, 84(5): 927-930.
- Zamith, H.P.S., Paumgarten, F.J.R. & Speit, G., 1996. Evaluation of the mutagenicity of the molluscicidal latex of “Christ’s Crown” (*Euphorbia milii* var. *hislopii*) in mammalian cells in vitro and in vivo. *Mutation Research*, 368:15-20.
- Zani, C.L., Marston, A., Hamburger, M. & Hostettmann, K., 1993. Molluscicidal milliamines from *Euphorbia milii* var. *hislopii*. *Phytochemistry*, 34: 89-95.
- Zhang, L., Gible, R. & Baer, K.N., 2003. The effects of 4-nonylphenol and ethanol on acute toxicity, embryo development and reproduction in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55: 330-337.