

JBSE

**JOURNAL OF THE BRAZILIAN SOCIETY OF
Ecotoxicology**

VOLUME 2, NUMBER 1, JAN.-MAR. 2007

EDITORS

Evaldo Luiz Gaeta Espíndola
University of São Paulo
Brazil

Gilberto Fillmann (Editor-in-Chief)
University Foundation of Rio Grande
Brazil

José Maria Monserrat
University Foundation of Rio Grande
Brazil

Maria Beatriz C. Bohrer-Morel
IPEN-CNEN/SP
Brazil



SETAC – Brazil

A quarterly publication of the Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia (SETAC Brazil)

EDITORS

Evaldo Luiz Gaeta Espíndola
University of São Paulo
Brazil

Gilberto Fillmann (Editor-in-Chief)
University Foundation of Rio Grande
Brazil

José Maria Monserrat
University Foundation of Rio Grande
Brazil

Maria Beatriz C. Bohrer-Morel
IPEN-CNEN/SP
Brazil

EDITORIAL BOARD
(PROVISIONAL)

Dr. Adalto Bianchini
University Foundation of
Rio Grande/RS – Brazil

Dr. Juan López-Barea
University of Córdoba – Spain

Dr. Afonso C. D. Bairy
University of Santa Catarina/SC – Brazil

Dr. Maria J. Bebianno
University of Algarve – Portugal

Dr. Ana Rosa L. Arias
FIOCRUZ/RJ – Brazil

Dr. Marisa Domingos
Institute of Botany/SP – Brazil

Dr. Angela de L. R. Wagener
PUC/RJ – Brazil

Dr. Olaf Malm
UFRJ/RJ – Brazil

Dr. Eduardo Bertoletti
CETESB/SP – Brazil

Dr. Paule Vasseur
University of Metz – France

Dr. Francesco Regoli
University of Ancona – Italy

Dr. Ricardo Barra
University of
Concepción – Chile

Dr. Francisco Radler de A. Neto
UFRJ/RJ – Brazil

Dr. Richard J. Wenning
ENVIRON Int.
Corporation – USA

Dr. G. Allen Burton
Wright State University – USA

Dr. Gisela de A. Umbuzeiro
CETESB/SP – Brazil

Dr. Rui Ribeiro
University of
Coimbra – Portugal

Dr. Iracema A. do Nascimento
University of Bahia/BA – Brazil

Dr. Vera M. F. Vargas
FEPAM/RS – Brazil

Dr. Itamar S. de Melo
EMBRAPA/SP – Brazil

Dr. Wilson de F. Jardim
University of
Campinas/SP – Brazil

Dr. James W. Readman
Plymouth Marine Laboratory –
England

BRAZILIAN SOCIETY OF ECOTOXICOLOGY (2007-2009)

President: Vera M. F. Vargas (FEPAM)

1° Vice-President: Alexandre Arenzon (UFRGS)

2° Vice-President: Adalto Bianchini (FURG)

1° Director: Ciro A. O. Ribeiro (UFPR)

2° Director: Eduardo B. Platte (PETROBRAS)

1° Secretary: Cintia B. Pedroso (INST. PESCA)

2° Secretary: Regina S. Sáfyadi (TECAM)

1° Treasurer: Clarice T. de Lemos (FEPAM)

2° Treasurer: Gilberto Fillmann (FURG)

Permanent Financial Board:

Evaldo L. G. Espíndola (USP)

Márcia R. Gasparro (USP)

Paulo S. M. Carvalho (UFPE)

Substitute Financial Board:

Antonio A. Mozeto (UFSCar)

Eduardo Bertoletti (CETESB)

Sueli Borrely (IPEN)

Consulting Board:

Afonso C. D. Bainy (UFSC)

Pedro A. Zagatto (BIOAGRI)

Maria Beatriz C. Bohrer-Morel (IPEN)

Maria T. R. Rodrigues (UFRGS)

Helena C. S. de Assis (UFPR)

Eleine F. de A. Lima (PETROBRAS)

Eduardo M. da Silva (UFBA)

Edvinety C. de Souza (USP)

Denis M. de S. Abessa (UNESP)

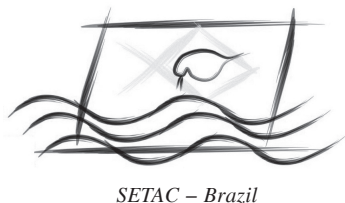
CONTENTS

Volume 2

January-March, 2007

Number 1

Avaliação Toxicopatológica em Ratos Expostos à <i>Pseudomonas putida</i>	1
V. L. S. S. de Castro & I. S. de Melo	
Utilização de Larvas do Cirripedia <i>Megabalanus coccopoma</i> (Darwin, 1854) como Organismo-teste na Avaliação de Toxicidade Aguda	7
R. Camargo Souza, F. Poleza, M. V. Máximo & C. Resgalla Jr.	
Efecto Toxicológico del “Sachayoco”, <i>Paullinia clavigera</i> (Sapindaceae) sobre <i>Daphnia magna</i> y sobre Dos Controladores Biológicos de Plagas Agrícolas	15
J. Iannacone, L. Alvaríño, J. C. Soto & C. Salcedo	
Comparação de Testes Ecotoxicológicos com <i>Biomphalaria tenagophila</i> (Orbigny, 1835) e <i>Daphnia magna</i> (Straus, 1820) Utilizando Remazol Brilliant Blue R e Água de Arroio Urbano	27
R. Lanzer, M. Müller, M. Dumcke & K. Raserá	
Efecto de Malatión y de Maca (<i>Lepidium meyenii</i>) sobre la Espermatogenesis del Ratón (<i>Mus musculus</i>)	33
E. Bustos-Obregón, T. Diederichs, F. Costa del Río & L. Sarabia	
Kidney Histology of Mice After Seven Days Oral Intake of Cyanobacterial Extract	39
E. G. Carvalho, R. B. Sotero-Santos, C. B. R. Martinez, E. C. Freitas, N. Fenerich-Verani, M. J. Dellamano-Oliveira & O. Rocha	
O Ensaio Cometa na Avaliação da Genotoxicidade Induzida por Poluentes Atmosféricos Utilizando como Biomonitor o Molusco <i>Cantareus aspersus</i> (Müller, 1774)	45
J. da Silva, N. Simeoni, A. A. Groff, M. Ianistcki, V. Benvegnú & N. T. Schröder	
Biochemical Biomarkers in Individual Larvae of <i>Chironomus xanthus</i> (Rempel, 1939) (Diptera, Chironomidae)	53
L. B. Printes, E. L. G. Espíndola & M. N. Fernandes	
Mussel Reference Material Preparation Proposal as a Quality Assurance Tool for Brazilian Seashore Biomonitoring	61
E. G. Moreira, M. B. A. Vasconcellos, V. A. Maihara, M. G. M. Catharino & M. Saiki	
Mercúrio no Plâncton de um Lago Natural Amazônico, Lago Puruzinho (Brasil)	67
E. L. Nascimento, J. P. O. Gomes, R. Almeida, W. R. Bastos, J. V. E. Bernardi & R. K. Miyai	
Preliminary Appraisal of Imposex in Areas Under the Influence of Southern Brazilian Harbors	73
I. B. de Castro, C. E. Bemvenuti & G. Fillmann	
Imposex in Two Muricid Species (Mollusca: Gastropoda) from the Northeastern Brazilian Coast	81
I. B. Castro, A. F. Alves de Lima, A. R. C. Braga & C. A. Rocha-Barreira	



Avaliação Toxicopatológica em Ratos Expostos à *Pseudomonas putida*

V. L. S. S. DE CASTRO* & I. S. DE MELO

Embrapa Meio Ambiente, Rodovia SP 340, km 127,5, CEP 13820-000, Jaguariúna, SP, Brasil

(Received August 15, 2006; Accepted November 22, 2006)

RESUMO

A bactéria *Pseudomonas putida* tem se mostrado hábil na degradação de vários xenobióticos, porém são poucos os estudos a respeito da segurança de seu uso para a saúde humana. A fim de avaliar os possíveis efeitos toxicopatológicos da bactéria, uma linhagem de *P. putida*, envolvida na biodegradação do herbicida propanil, foi administrada a ratos, em suspensões de 10^8 ufc mL⁻¹ via oral. Os animais foram observados diariamente, não havendo alterações clínicas ou quaisquer lesões em órgãos internos após a exposição à bactéria. Os animais também foram submetidos à necropsia em diferentes intervalos após a administração, com a retirada de vários órgãos para verificar a presença da bactéria nesses tecidos. A bactéria não cresceu nas amostras biológicas após 3 e 24 h da exposição, mas sim após 16 h, no pulmão no grupo tratado com a bactéria ativa. A confirmação em nível de espécie das colônias isoladas nos órgãos foi realizada pela análise do perfil dos ácidos graxos de membrana. O protocolo utilizado mostrou-se adequado para analisar a segurança de uso dessa bactéria em mamíferos.

Palavras-chave: efeitos toxicopatológicos, exposição de ratos, *P. putida*, biopesticidas, biorremediação.

ABSTRACT

Toxicopathological evaluation of rats exposed to *Pseudomonas putida*

Pseudomonas putida has been show useful for the bioremediation of various xenobiotics, but there is little information related to its security to human health. It was investigated the effects of *P. putida* involved in the herbicide propanil biodegradation in rats, in order to evaluate possible toxicopathological effects promoted by the bacteria exposure. Rats were exposed at a single oral dose of 10^8 cfu mL⁻¹. The animals were observed daily, not having clinical alterations at different intervals after the exposure. They were sacrificed and necropsied at these intervals and samples of various organs were removed to verify the bacteria presence on them. *P. putida* was not able to grow after 3 and 24 hours after exposure. However it was founded colonies of the agent 16 h after the exposure in lung homogenates. Confirmation of the diversity of bacteria was performed with the fatty acid methyl esters procedure. The protocol utilized showed to properly evaluate the security of this agent to mammals.

Key words: toxicopathological effects, rats exposure, *P. putida*, biopesticides, bioremediation.

INTRODUÇÃO

Uma vez que a sustentabilidade é uma direção a ser seguida, a política agrícola deve envolver ações que contribuam para isso. O interesse pelo uso de alternativas economicamente viáveis e menos agressivas ao ambiente tem crescido consideravelmente de modo a favorecer a conservação e o uso sustentável dos recursos biológicos. Nesse sentido, o uso de microrganismos tem se mostrado uma prática efetiva e adequada tanto em relação ao controle de pragas (biopesticidas) como

na conservação dos recursos biológicos e na recuperação de áreas poluídas e degradadas (biorremediação).

Além de sua eficácia, vários fatores atuam na demanda por esses produtos, tais como: a regulamentação de seu uso, a relação custo-benefício e o manejo adotado pelo agricultor com menor risco de toxicidade (Uri, 1999). Durante a década de 1990, ocorreu significativo incremento em relação ao número de produtos biológicos avaliados no Brasil quanto à segurança ambiental visando ao registro para fins comerciais. Esse aumento pode ser creditado à utilização de protocolos de avaliação e

*Corresponding author: Vera Lúcia S. S. de Castro, e-mail: castro@cnpma.embrapa.br.

implementação de leis específicas brasileiras, em harmonia com a regulamentação internacional. Assim, a concessão de registro desses produtos pelos órgãos federais brasileiros está sujeita à prévia apresentação de dados que indiquem conclusivamente que o produto, quando usado de acordo com as prescrições, não causará efeitos significativamente adversos aos seres humanos ou ao ambiente. De forma similar ao controle biológico, a recuperação de áreas poluídas e degradadas pode ser efetuada por meio da biorremediação, com o uso de organismos vivos.

As bactérias do gênero *Pseudomonas* são encontradas comumente no solo e no filoplano. Embora algumas espécies de *Pseudomonas* sejam fitopatogênicas, outras podem ser benéficas para plantas, como *P. fluorescens* e *P. putida*, que são rizobactérias promotoras de crescimento (Fonseca *et al.*, 2001). Elas são apontadas como rizobactérias promotoras de crescimento em plantas de alto potencial para utilização no controle biológico, tanto por sua grande capacidade de colonização de raízes, rápida e agressiva, prevenindo a invasão de patógenos (O'Sullivan & O'Gara, 1992), como pela produção de metabólitos secundários (sideróforos, β -1,3-glucanase, quitinases, antibióticos e ácido cianídrico) que inibem outros microrganismos deletérios (Leisinger & Margraff, 1978; Thomashow *et al.*, 1990). As *Pseudomonas* também podem se mostrar hábeis na degradação de uma gama de xenobióticos como alquilbenzoatos (Glazer & Nikaido, 1995), bifenis policlorados (PCBs) e nitrofenóis (Guo & Houghton, 1999), além do tolueno (Vercellone-Smith & Herson, 1997; Walia *et al.*, 2002).

Por sua vez, podem ocorrer efeitos adversos diretos e indiretos em organismos não-alvo da comunidade local, decorrentes da introdução de microrganismos no ambiente. Os efeitos adversos potenciais são a possibilidade de sobrevivência, multiplicação, persistência, disseminação, patogenicidade e toxicidade do microrganismo.

A avaliação de impacto decorrente do uso dos biopesticidas requer conhecimento do produto e de seus metabólitos e de sua interação com os alvos específicos e com o ambiente onde ele será aplicado. Como os agentes microbiológicos são mais complexos do que os produtos químicos convencionais, observam-se diferentes aspectos relacionados a efeitos prejudiciais potenciais, como a produção de toxina ou a infectividade em um organismo.

O esquema de avaliação do risco da introdução desses microrganismos biodegradadores é feito, à semelhança dos agentes de controle biológico, em sistema de fases consecutivas. Dessa forma, se houver evidência de patogenicidade ou toxicidade, procede-se à fase seguinte e assim sucessivamente, visando avaliar o risco à saúde humana. Os impactos ambientais causados por esses microrganismos atualmente são estimados por meio de testes que utilizam uma "dose desafio" (ao redor de 1×10^8 unidades infectantes) do produto na Fase I, considerada de risco máximo (Castro *et al.*, 1999; Castro *et al.*, 2001). Os testes usados para a avaliação desses

microrganismos em relação à saúde humana, no tocante à toxicidade, patogenicidade e infectividade do produto, são baseados na extrapolação de resultados interespecies entre a espécie utilizada, geralmente um roedor, e o homem.

Diante da escassez de dados a respeito da segurança de uso dessa bactéria, o objetivo do presente trabalho foi verificar os possíveis efeitos toxicopatológicos da *P. putida*, selecionada como biodegradadora do herbicida propanil, em organismos não-alvo, visando determinar a segurança para o ser humano.

MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos para a avaliação toxicopatológica em animais de laboratório seguiram o esquema de Fases (USEPA, 1989; Castro *et al.*, 1999), que estabelece diretrizes para a condução de testes com mamíferos. Esses testes foram conduzidos considerando os aspectos de infectividade, toxicidade e patogenicidade do microrganismo.

Animais – Foram utilizados ratos Wistar, de aproximadamente 230 g, mantidos em condições padronizadas de luz (ciclo claro/escuro 12 h) e temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). Todos os animais foram mantidos individualmente em gaiolas de polipropileno. Foram expostos três animais em cada ponto.

Condições experimentais – Superfícies, material cirúrgico, equipamentos (autoclave, homogeneizador e câmara de fluxo laminar) e outros materiais como recipientes de vidro, cânulas de metal e pipetas sofreram monitoramento quanto ao controle de descontaminação.

Características da colônia de P. putida – A colônia é de cor amarelo-esbranquiçada, gram negativa, sensível à tetraciclina e kanamicina, apresentando fluorescência. Ela foi identificada por métodos moleculares (seqüenciamento da subunidade 16S rDNA) com similaridade de 98% e confirmada pelo método de identificação por cromatografia gasosa dos ácidos graxos da membrana celular.

Obtenção do isolado – O isolado foi inicialmente repicado, ficando armazenado em BOD até seu crescimento. Na fase exponencial, 18 h após o semeio em placa, o isolado foi centrifugado por 15 min em 5000 g, lavado em solução tampão fosfato (pH 7,0) e ressuspenso no tampão (Chobchuenchom *et al.*, 1996).

Doses e tratamentos – A linhagem testada foi administrada a ratos em suspensões de 10^8 células mL^{-1} via oral em 1,0 mL de suspensão utilizando-se uma cânula metálica adequada. As células bacterianas foram colhidas do meio de cultura, foi preparada uma suspensão concentrada e realizadas várias diluições. A concentração da suspensão administrada foi ajustada com auxílio de espectrofotômetro ($A_{600} = 0,3$) que correspondia a 10^8 ufc mL^{-1} , segundo Lelliott & Stead (1987). Foram utilizados três tratamentos para cada via: bactéria ativa, bactéria inativada e o veículo de administração da bactéria, este como controle. A água e a ração foram retiradas 24 horas antes da administração da suspensão teste.

DISCUSSÃO

Os testes pertinentes à legislação, para o registro de microrganismos com perfil biodegradador e biopesticida, têm por objetivo obter informações a respeito desses produtos no sentido de conhecer a possibilidade de prejuízos ambientais, incluindo plantas, animais e homem. As informações disponíveis, em sua maioria, referem-se a biopesticidas, principalmente o *Bacillus thuringiensis* e o Baculovirus. As informações referentes a outras bactérias, fungos e nematóides vêm sendo realizadas a partir do início da década de 1990, embora observações ambientais em longo prazo decorrentes do uso desses produtos sejam mais difíceis de ser obtidas.

O monitoramento dos agentes antagônicos liberados em campo é de fundamental importância para a avaliação do impacto destes sobre os demais organismos presentes na área tratada, e o estudo do impacto sobre organismos não-alvo é necessário para que a eficiência do agente antagonista seja comprovada em termos de segurança ambiental.

Observou-se que a metodologia utilizada para a avaliação da possível toxicidade, patogenicidade e/ou infectividade decorrente da exposição da *P. putida* em roedores foi adequada em relação à quantificação temporal do microrganismo nos vários tecidos animais. Assim, foi possível identificar o intervalo no qual ela permaneceu detectável no organismo. De forma similar, a metodologia utilizada permitiu verificar a possibilidade de infectividade da bactéria no organismo animal por meio do conseqüente aumento do número de colônias identificadas nas placas semeadas com amostras dos órgãos retirados durante a necropsia. Como após 24 horas da administração as colônias da bactéria não são mais encontradas, pode-se supor que em mamíferos a *P. putida* é rapidamente eliminada do organismo e que, portanto, não persiste e assim não infecta os tecidos. A seqüência desses testes em ratos confirmará ou não esta hipótese.

Portanto, com base nos presentes resultados, não houve infectividade da bactéria nos tecidos nem foram encontradas evidências de patogenicidade e toxicidade durante a necropsia dos animais. Esses fatos concordam com a observação clínica dos animais, que não demonstraram sinais e/ou sintomas de prejuízos à sua saúde.

O fato de terem sido encontradas células da bactéria nos pulmões possivelmente é decorrente de contaminação durante a exposição por cânula pela via oral, apesar de todos os procedimentos de desinfecção adotados durante a realização dos testes. Recomenda-se, assim, especial cuidado e treinamento por parte do analista com a forma de exposição do animal, a manipulação das amostras e a assepsia, a fim de evitar qualquer tipo de contaminação.

Levando-se em consideração os dados observados no presente trabalho, pôde-se concluir que o protocolo utilizado – observação clínica, observação de lesões na necropsia, quantificação nos tecidos e confirmação das colônias por análise de

perfil de ácidos graxos – mostrou-se adequado para analisar a segurança de uso deste produto para mamífero. De igual forma, em trabalhos anteriores (Castro *et al.*, 2001; Castro *et al.*, 2000), o método mostrou-se adequado à análise da infectividade e persistência do microrganismo nas várias amostras coletadas do organismo animal.

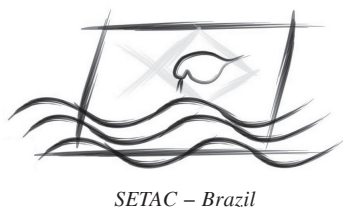
Por sua vez, o estabelecimento de critérios mais específicos para avaliar os possíveis efeitos prejudiciais nesses organismos pode desempenhar importante papel na avaliação de risco, a fim de obter decisões com adequada capacidade de predição, uma vez que em alguns casos os esporos de fungos podem permanecer viáveis nos tecidos (Castro *et al.*, 2001) e os de bactérias, nas fezes ou no ambiente (Castro *et al.*, 2000). Contudo, a *P. putida* não parece ocasionar efeitos prejudiciais a organismos não-alvo como os insetos (Schneider & Dorn, 2001).

Com a execução e o aprimoramento desses protocolos haverá mais subsídios técnicos para gerenciar os possíveis riscos envolvidos na liberação e/ou uso de determinado produto. Os resultados obtidos, além de sua aplicação na identificação de efeitos prejudiciais à saúde ambiental, poderão subsidiar e orientar avaliações de *P. putida* por agências reguladoras quanto ao seu uso comercial para fins de biorremediação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BACON, C. W., HINTON, D. M. & HINTON JR., A., 2006, Growth-inhibiting effects of concentrations of fusaric acid on the growth of *Bacillus mojavensis* and other biocontrol *Bacillus* species. *Journal of Applied Microbiology*, 100: 185-194.
- CASTRO, V., CAPALBO, D., MORAES, G., NARDO, E. & OLIVEIRA, M., 1999, *Protocolos de avaliação de agentes microbianos de pragas para registro como biopesticidas*, v. 2 – Testes toxicopatológicos em mamíferos. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna (Embrapa Meio Ambiente, Documentos, 10).
- CASTRO, V., CAPALBO, D., CHAIM, A., LARANJEIRA, A. & SOARES, C., 2000, Métodos para avaliação de risco ambiental e ecotoxicológico de biopesticidas, Pesticidas. *Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 10, jan./dez.
- CASTRO, V., JONSSON, C., MELO, I. & NUNES, F., 2001, Avaliação de risco ecotoxicológico de *Trichoderma stromaticum* usado como biopesticida. *Ecotoxicology and Environmental Restoration*, 4(1): 18-24.
- CHOBCHUENCHOM, W., MONGKOLSUK, S. & BHUMIRATANA, A., 1996, Biodegradation of 3-chlorobenzoate by *Pseudomonas putida* 10.2. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 12: 607-614.
- FONSECA, M., ZAGO, V., DE-POLLI, H. & RUMJANEK, N., 2001, *Levantamento e caracterização morfológica de isolados de Pseudomonas spp. fluorescentes presentes em cultivos do SIPA – Sistema Integrado de Produção Agroecológica*. Embrapa Agrobiologia, 35p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 143).
- GEELS, F. & SCHIPPERS, B., 1983, Reduction of yield depression in high frequency potato cropping soil after seed tuber treatment with antagonistic fluorescent, *Pseudomonas* spp. *Phytopathology Z.*, 108: 207-214.
- GLAZER, A. N. & NIKAIIDO, H., 1995, Environmental applications. In: W. H. Freeman *et al.* (eds.), *Microbial biotechnology*. New York, p. 561-620.

- GUO, Z. & HOUGHTON, J., 1999, PcaR-mediated activation and Repression of *pca* genes from *Pseudomonas putida* are Propagated by Binding to both the 35 and the 10 Promoter Elements. *Molecular Microbiology*, 32: 253-265.
- KAUR, A., CHAUDHARY, A., KAUR, A., CHOUDHARY, R. & KAUSHIK, R., 2005, Phospholipid fatty acid – a bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecosystem. *Current Science*, 89: 1103-1112.
- LEISINGER, I. & MARGRAFF, R., 1978, Secondary metabolites of fluorescent pseudomonads. *Microbiology Reviews*, 43: 422.
- LELLIOTT, R. A. & STEAD, D. E., 1987, *Methods for the diagnosis of bacterial plant disease*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 216p.
- O'SULLIVAN, D. & O'GARA, F., 1992, Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiology Reviews*, 56: 662-674.
- SCHNEIDER, M. & DORN, A., 2001, Differential infectivity of two *pseudomonas* species and the immune response in the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus* (Insecta: Hemiptera). *Journal of Invertebrate Pathology*, 78: 135-140.
- SVEC, P., STEGNEROVA, H., DURNOVA, E. & SEDLACEK, I., 2004, Characterization of esculin-positive *Pseudomonas fluorescens* strains isolated from an underground brook. *Folia Microbiologica (Praha)*, 49(6): 725-730.
- THOMASHOW, L. S., WELLER, D. M., BONSALE, R. F. & PIERSON III, L. S., 1990, Production of the phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* species in rhizosphere of wheat. *Applied Environmental Microbiology*, 56: 908-912.
- URI, N., 1999, The implications of US Government policy on the development and use of biopesticides. *International Journal of Environment and Pollution*, 11: 117-132.
- USEPA, 1989, *Pesticide Assessment Guidelines*. 192p. Subdivision M. Microbial Pest Control Agents and Biochemical Pest Control Agents, Washington: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Pesticides and Toxic Substances (disponível também em <http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/regtools>).
- VERCELLONE-SMITH, P. & HERSON, D., 1997, Toluene elicits a carbon starvation response in *Pseudomonas putida* mt-2 containing the tol plasmid pww0. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(5): 1925-1932.
- WALIA, S., ALI-SADAT, S., BRAR, R. & CHAUDHRY, G., 2002, Identification and mutagenicity of dinitrotoluene metabolites produced by strain *Pseudomonas putida* OU83. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 73: 131-139.



Utilização de Larvas do Cirripedia *Megabalanus coccopoma* (Darwin, 1854) como Organismo-teste na Avaliação de Toxicidade Aguda

R. CAMARGO SOUZA, F. POLEZA, M. V. MÁXIMO & C. RESGALLA JR.*

CTTMar/UNIVALI, C.P. 360, CEP 88.302-202, Itajaí, SC, Brasil

(Received August 30, 2006; Accepted November 11, 2006)

RESUMO

No Brasil, a Ecotoxicologia é uma ciência relativamente nova e com poucas espécies de uso rotineiro em testes de toxicidade. Larvas (Naupliu) de craca têm sido utilizadas por diferentes grupos de pesquisa no mundo como organismo-teste e com uma variedade de métodos e aplicações. Esse organismo tem como vantagens sua facilidade de obtenção em campo, disponibilidade ao longo do ano e fácil manipulação em laboratório. O uso desses organismos, no Brasil, ainda é limitado a testes da atividade de substâncias antiincrustantes e praticamente nada foi feito para investigar sua sensibilidade para uso na Ecotoxicologia. Este trabalho apresenta um protocolo de teste agudo utilizando larvas do Cirripedia *Megabalanus coccopoma*, um dos maiores exemplares da Subordem Balanomorpha e de ampla distribuição na costa brasileira. Foi investigada a sensibilidade de Naupliu II ante o sulfato de zinco e seu efeito sobre a mobilidade e a mortalidade. Naupliu de *M. coccopoma* foram obtidos de lamelas ovígeras de adultos e utilizados em testes de toxicidade sob efeito de sulfato de zinco, em experimentos estáticos de 48 horas e com a quantificação de organismos de baixa mobilidade e mortos a cada 12 horas. Nos testes de mobilidade a CE_{50} Incipiente de $0,24 \text{ mg L}^{-1}$ (Zn) foi obtida em 24 horas, enquanto a CL_{50} Incipiente de $0,27$ e $0,22 \text{ mg L}^{-1}$ (Zn) ocorreu em 36 e 48 horas, respectivamente. Observou-se que não houve diferença significativa entre os valores de CE_{50} e CL_{50} , o que permite o desenvolvimento dos testes em 24 horas para mobilidade ou de 48 horas para o de mortalidade. Os valores de CE_{50} e CL_{50} para a espécie demonstram sensibilidade similar ao misidáceo *Mysidopsis juniae* e ao Copepoda *Acartia lilljeborgi*.

Palavras-chave: Cirripedia, *Megabalanus coccopoma*, testes de toxicidade, Naupliu.

ABSTRACT

Barnacle larvae of *Megabalanus coccopoma* (Darwin, 1854) as toxicity test organisms

In Brazil, Marine Ecotoxicology is a relatively new science with few species routinely used in toxicity tests. Barnacle larvae (Naupliu) have been used for different research groups in the world as test organisms with a variety of methods and applications. These organisms have the advantages of easy obtainment in the field, availability throughout the year and easy manipulation in the lab. The use of these organisms in Brazil is still limited to tests of the activity of anticrustant substances and few work has been done to investigate their sensitivity as test-organisms in Ecotoxicology. This work presents a standard operating procedure to perform toxicity tests with naupliu of the barnacle *Megabalanus coccopoma* one of the biggest exemplars of the subordem Balanomorpha and of great distribution around the Brazilian coast. The sensitivity of naupliu II to Zinc (Zn) was evaluated through mobility and mortality endpoints. Nauplius of the *M. coccopoma* were obtained from egged lamels of adults and used in 48 hours toxicity tests to assess the effect of zinc sulphate in static experimental conditions; poorly mobile and dead organisms were quantified every 12 hours. On the mobility tests, the EC_{50} of 0.24 mg L^{-1} (Zn) was obtained following 24 hours exposure; whilst the LC_{50} of 0.27 and 0.22 mg L^{-1} (Zn) were obtained following 36 and 48 hours of exposure, respectively. Significant differences were not observed between the EC_{50} and LC_{50} values for zinc therefore allowing the development of 24 h mobility and 48 h mortality tests. The EC_{50} : 24 h and LC_{50} : 48 h for zinc demonstrate similar sensitivity between the studied species the mysids *Mysidopsis juniae* and the copepod *Acartia lilljeborgi*.

Key words: barnacle, Naupliu, *Megabalanus coccopoma*, acute tests.

*Corresponding author: Charrid Resgalla Jr., e-mail: cresgalla@univali.br.

INTRODUÇÃO

Megabalanus coccopoma é uma espécie de Cirripedia originária da costa leste do pacífico tropical da América Central e Sul e tem sido introduzida com sucesso no Sudeste brasileiro em águas rasas e fixas em estruturas disponibilizadas pelo homem (ACME, 2001). Segundo Young (1995), *M. coccopoma* vem competindo diretamente com a espécie nativa *M. tintinnabulum*. *M. coccopoma* apresenta, hoje, densidades superiores às da espécie nativa na área do sublitoral brasileiro. De qualquer forma, a invasão de *M. coccopoma* não parece ser um processo recente, já que foi registrada para a costa de Santa Catarina, na baía de Zimbros, desde 1961 (Young, 2000).

Em um estudo de larvas de Cirripedia na enseada da Armação do Itapocoroy, litoral norte de Santa Catarina, Severino (2000) e Severino & Resgalla Jr. (2005) observaram a dominância de *M. coccopoma* entre as espécies de cracas na região, assim como sua ocorrência contínua ao longo de todo o ano. Esse ciclo reprodutivo, sem sazonalidade marcada, é de fundamental importância nos estudos ecotoxicológicos. As facilidades de obtenção de embriões ou estágios larvais de invertebrados marinhos em laboratório é uma das principais técnicas necessárias ao desenvolvimento de testes ecotoxicológicos. Além disso, Severino (2000) e Severino & Resgalla Jr. (2005) realizaram detalhado estudo sobre as descrições morfológicas de cada estágio de desenvolvimento, assim como o tempo necessário para a sua obtenção em condições laboratoriais.

Testes de toxicidade com o uso de larvas de Cirripedia têm sido realizados por diferentes autores, assim como variações em suas metodologias. Blundo (1978) utilizou larvas de Cirripedia para avaliar a toxicidade de derivados de petróleo em testes agudos de curta duração. Efeitos nas taxas de assentamento das larvas de Cirripedia têm sido utilizados pela CCME (2001) para avaliar a toxicidade de surfactantes. As mesmas substâncias foram utilizadas por Cox (1996) para avaliar o efeito letal sobre larvas de cracas. Entretanto, os estudos mais frequentes, utilizando larvas de Cirripedia, envolvem alterações comportamentais, como a sua fototaxia (Wu et al., 1997a; 1997b; Lam et al., 2000).

No Brasil, o grupo de pesquisa do IEAPM (Marinha do Brasil) vem utilizando essas larvas para estudos de substâncias naturais antiincrustantes, com aplicação direta em tintas *antifouling* de embarcações da marinha brasileira e da marinha mercante (Valentin & Coutinho, 1988). Nesses estudos é investigada a inibição de acatamento das larvas em substratos artificiais tratados com substâncias inibidoras ou *antifouling*.

Em função de sua ampla utilização e características biológicas, o presente estudo investigou a sensibilidade das larvas de *M. coccopoma* ante o sulfato de zinco e propôs um protocolo para a execução de testes de toxicidade de curta duração.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de reprodutores e de larvas de Megabalanus coccopoma

Os reprodutores ou adultos de cracas da espécie *Megabalanus coccopoma* foram obtidos no sistema *long-line* de cultivo de moluscos marinhos da enseada da Armação do Itapocoroy, litoral norte de Santa Catarina (Brasil), em 13 coletas realizadas entre fevereiro de 2005 e março de 2006. Ovos fecundados e em estágios avançados de desenvolvimento foram obtidos de cracas adultas segundo o método de Costlow & Bookhout (1960) e Rice & Williamson (1970) para crustáceos, que consistiu em:

1. Retirada das lamelas ovíferas de adultos de cracas por rompimento da carapaça calcária. Para isso foram utilizados no mínimo 50 organismos adultos obtidos em campo.
2. Seleção das lamelas com ovos em estágio avançado de desenvolvimento.
3. Lavagem das lamelas em água do mar filtrada e esterilizada.
4. Manutenção das lamelas em frascos de 200 mL com água do mar natural filtrada e esterilizada a 20°C e 30‰, com fraca aeração até a eclosão dos ovos.

O tempo de espera para a eclosão dos ovos variou de 24 a 72 horas. Após a eclosão, as larvas foram concentradas em beakers de 200 mL com água do mar filtrada e esterilizada (20°C e 30‰) para imediata utilização nos testes de toxicidade. O volume de manutenção foi ajustado para densidade de 10 a 20 larvas por mL.

Testes agudo com larvas de Megabalanus coccopoma

Foram executados 13 testes de toxicidade utilizando a substância de referência sulfato de zinco ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$). Como *end point* dos experimentos, foram avaliados os percentuais de redução da mobilidade de natação dos nauplius e a sua mortalidade. Para avaliação da mobilidade de natação, foram consideradas com efeito larvas com movimento mas sem apresentar deslocamento vertical e horizontal. O tempo de exposição máxima dos experimentos foi de 48 horas e com avaliação de efeito a cada 12 horas.

Os testes foram realizados em placas multipoços com um volume final de 2 mL da solução-teste em seis concentrações mais o controle e com três réplicas por concentração. A água de diluição utilizada foi a mesma de manutenção. Em cada poço foram transferidos de 10 a 20 nauplius de *M. coccopoma* recém-eclodidos (Estágio II). Foram considerados válidos os testes cujos resultados ao final do período de exposição apresentaram redução da mobilidade e mortalidade inferior a 20% nos poços-controle, caso contrário o teste era considerado inválido. Os testes foram executados nas condições-padrão de salinidade a 30‰ e na temperatura de 20°C e fotoperíodo de 12:12.

Foram ainda realizados experimentos de sobrevivência das larvas em diferentes salinidades e avaliada a sensibilidade ante o sulfato de zinco em duas condições de salinidade (20 e 30‰) e temperatura (20 e 25°C).

Após o estabelecimento do protocolo dos testes de toxicidade com o nauplius de *M. coccopoma* foram realizados testes de toxicidade com outras substâncias de referência de uso comum em experimentos marinhos, incluindo dodecil sulfato de sódio (DSS), dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), sulfato de cobre ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) e cloreto de amônia (NH_4Cl) para a comparação de sua sensibilidade com outros organismos-teste.

Os valores de CE_{50} e CL_{50} foram estimados pelo método Trimmed Spearman-Kärber utilizando-se o programa TSK versão 1.5 (EPA, Cincinnati, Ohio). As cartas-controle foram elaboradas segundo USEPA (2002), modificadas segundo recomendações de Greenberg *et al.* (1992).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Disponibilidade de lamelas ovígeras e tempo de eclosão

Das 13 coletas realizadas em um ano de amostragem apenas 3 não apresentaram desovas viáveis para a execução dos experimentos, com percentuais de efeito superiores a 20% no controle. Estes resultados indicam que há disponibilidade de material biológico para a execução dos testes de toxicidade durante todos os meses do ano, confirmando a ausência de sazonalidade em seu ciclo reprodutivo, destacado por Severino (2000) e Severino & Resgalla Jr. (2005).

O tempo necessário para a eclosão dos ovos em laboratório foi de menos de 24 horas a 72 horas, sendo o tempo predominante de 24 a 48 horas de espera para uso das larvas em testes de toxicidade. Uma prática que auxiliou a reduzir o tempo de espera foi a aeração das lamelas após a retirada dos adultos.

Tempo de teste e end point

Através dos testes realizados com o tóxico de referência sulfato de zinco, foi determinado o tempo mínimo de execução dos experimentos. Segundo os resultados apresentados na Figura

1, são necessárias 24 horas para a realização dos testes de mobilidade e 36 horas para os de mortalidade. Esses tempos foram determinados a partir da estabilização dos valores de CE_{50} e CL_{50} , que indicam as concentrações incipientes para cada experimento. Para os experimentos de mortalidade, o tempo de exposição adotado foi de 48 horas por questões de praticidade de trabalho entre o início e o término dos experimentos. O tempo de teste estabelecido é equivalente ao protocolo de 48 horas para Copepodas (CETESB, 1992a) e mais rápido que o de Mysidáceos com 96 horas (CETESB, 1992b).

Observou-se também grande similaridade entre os valores de CE_{50} e CL_{50} obtidos nos experimentos de mobilidade em 24 horas e de mortalidade em 36 e 48 horas. Nos testes de mobilidade, a CE_{50} média foi de 1,06 mg L⁻¹ (sulfato de zinco), enquanto a CL_{50} foi de 1,19 mg L⁻¹ em 36 horas e 0,99 mg L⁻¹ em 48 horas (Tabela 1). Segundo os resultados da ANOVA (para $p < 0,05$), não há diferenças significativas entre esses valores, permitindo a execução dos diferentes experimentos sem comprometer o resultado final. Deve-se, entretanto, ser avaliado o tipo de efeito em função das características do produto a ser testado, evitando o uso do efeito de mobilidade em substâncias que interferem nessa atividade (por exemplo, alta viscosidade ou a formação de precipitados).

Segundo Axiak (1991), é de conhecimento, em Ecotoxicologia, que os efeitos subletais precedem a letalidade e que ocorrem em menor concentração mas com maior tempo de exposição. O clássico trabalho de Pyefinch & Mott (1948) destaca essa característica utilizando larvas de *Balanus balanoides* sob efeito de sulfato de cobre com CE_{50} de 0,01 a 0,024 mg L⁻¹ em 7 a 8 dias de teste e CL_{50} de 0,34 a 0,46 mg L⁻¹ para 6 horas de exposição. Entretanto, os resultados obtidos no presente trabalho, sob efeito de zinco, demonstram concentrações similares para efeitos subletais e letais, mas com tempo de exposição menor para os efeitos subletais. A variabilidade observada pode ser atribuída ao tipo de efeito subletal considerado e, principalmente, às condições de execução dos testes de toxicidade.

Tabela 1 – Valores médios de CE_{50} (mobilidade) e CL_{50} (mortalidade) e desvio-padrão (DP) para o sulfato de zinco (mg L⁻¹) em experimentos de mobilidade e mortalidade utilizando larvas de *M. coccopoma* em diferentes tempos de exposição.

Tempo (horas)	CE_{50} (DP)	CL_{50} (DP)
12	2,88 (0,89)	5,28 (1,10)
24	1,06 (0,43)	2,53 (0,98)
36	0,71 (0,41)	1,19 (0,59)
48	0,65 (0,42)	0,99 (0,46)

Carta-control de sensibilidade

Observou-se que a variação dos valores de CL_{50} nos testes de mortalidade foram maiores que os de CE_{50} nos testes de mobilidade, apresentando limites superior e inferior mais amplos (Figura 2). Além disso, o número de testes fora dos limites da amplitude de variação foram 2 nos testes de mobilidade (25%) e 3 nos testes de mortalidade (30%). Os coeficientes de variação (CV) foram de 32,26% e 38,99% para os testes de mobilidade e mortalidade, respectivamente. Estes resultados demonstram que os testes de mobilidade apresentam maior precisão e que há certa variabilidade dos experimentos, a qual pode ser reduzida com melhor treinamento do operador e maior número de larvas por poço-teste. Segundo USEPA (2002), valores de CV de até 45% são observados em estudos de precisão intra e interlaboratorial.

Variações de sensibilidade com a salinidade e temperatura

Larvas de *M. coccopoma* apresentaram alta resistência quanto às variações de salinidade, mostrando sobrevivência acima de 80% em salinidades superiores a 20‰ (Figura 3). As características eurihalinas de nauplius de Cirripedia têm sido destacadas por Bougis (1976) e Raymond (1983), sendo por isso um organismo meroplânctônico típico de regiões

estuarinas. Larvas de Cirripedia são também euritérmicas, principalmente pelo fato de que sua liberação natural frequentemente está relacionada a processos de choques térmicos, comuns entre as estações do ano (Severino & Resgalla Jr., 2005).

Testes com a substância de referência sulfato de zinco na salinidade extrema de sobrevivência (20‰) e a 25°C (Tabela 2) apresentaram resultados de CE_{50} (testes de mobilidade) e CL_{50} (testes de mortalidade) dentro da faixa de aceitação segundo a carta-control de sensibilidade (Figura 2). Esse fato destaca a possibilidade de execução dos experimentos em ampla faixa de aplicação, envolvendo tanto as características dos efluentes a serem testados quanto a distribuição geográfica de ocorrência da espécie.

Protocolo dos testes agudos com nauplius de *Megabalanus coccopoma*

Um protocolo de execução de teste de toxicidade para larvas de *M. coccopoma* é proposto com base nos resultados obtidos nos experimentos de tempo de exposição, carta-control e sensibilidade ante a salinidade e a temperatura. Na Tabela 3 são apresentados os requisitos básicos para a execução dos testes de mobilidade e mortalidade.

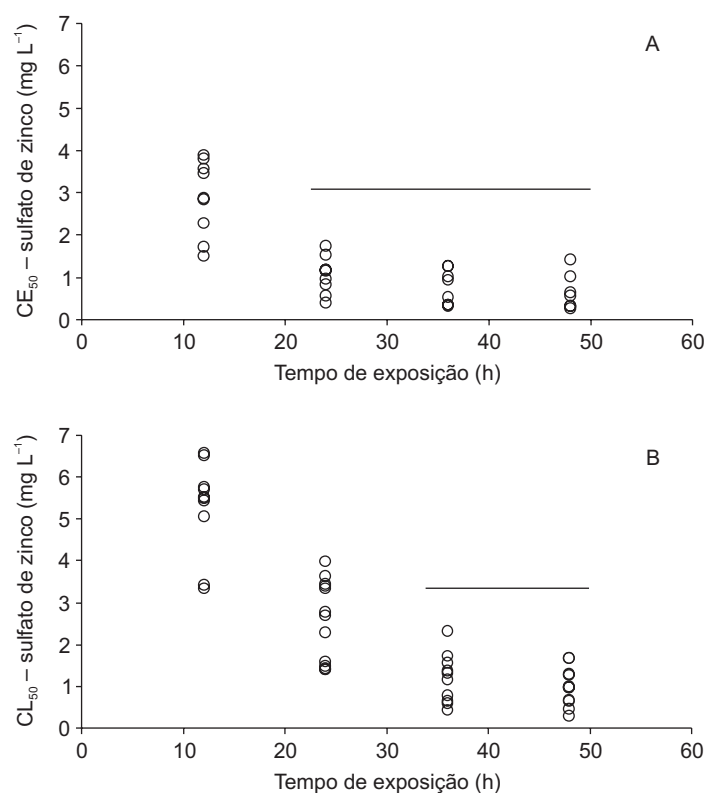
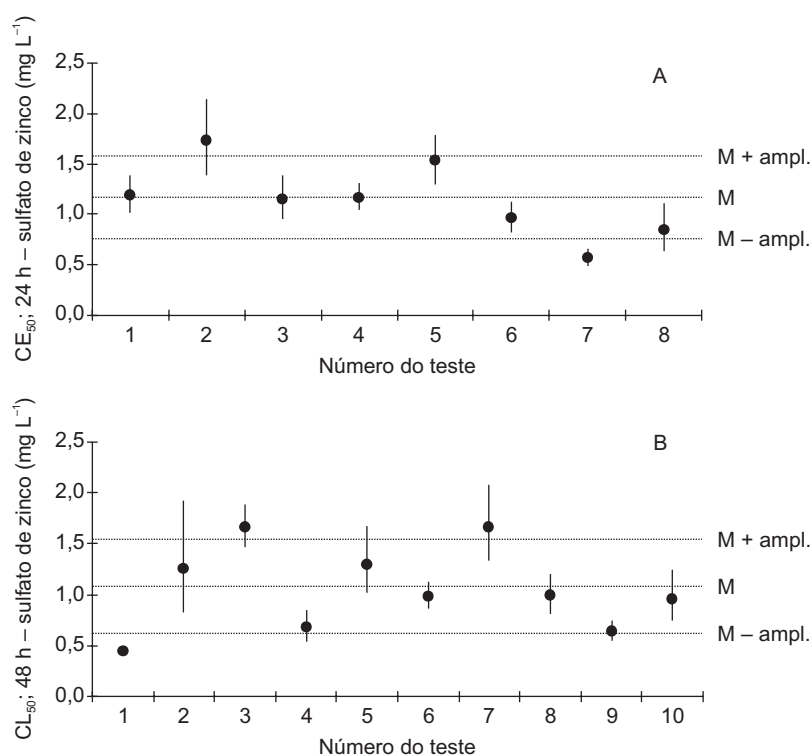


Figura 1 – Relação entre o tempo de exposição ou duração do teste e os valores de CE_{50} (A – mobilidade) e CL_{50} (B – mortalidade) sob efeito do sulfato de zinco ($mg L^{-1}$). A barra indica os tempos significativamente semelhantes segundo ANOVA e teste de Tukey *a posteriori* para $p < 0,05$.

Tabela 2 – Valores de CE_{50} ; 24 h e CL_{50} ; 48 h (e intervalo de confiança de 95%) de larvas de *M. coccopoma* sob efeito de sulfato de zinco em experimentos a 20‰ (a 20°C) e a 25°C (a 30‰).

	Mobilidade CE_{50}; 24 horas	Mortalidade CL_{50}; 48 horas
Salinidade (20‰-20°C)	1,03 mg L ⁻¹ (0,92-1,16)	0,78 mg L ⁻¹ (0,70-0,87)
Temperatura (25°C-30‰)	–	0,92 mg L ⁻¹ (0,84-1,00)



Comparativamente, o protocolo proposto apresenta uma definição quanto ao tempo de duração do experimento, já que há, para larvas de Cirripedia, falta de padronização, podendo variar de 6 a 96 horas para testes letais (Lang *et al.*, 1981).

Sensibilidade de nauplius de *Megabalanus coccopoma* em testes agudos

A sensibilidade dos nauplius de *M. coccopoma* ante diferentes tóxicos de referência, como zinco, cobre, cromo, o detergente dodecil sulfato de sódio (DSS) e amônia não ionizada, está representada na Tabela 4. Na mesma tabela são também apresentados resultados obtidos com diferentes crustáceos planctônicos que vêm sendo utilizados em testes de toxicidade no Brasil. *M. coccopoma* tem mostrado

sensibilidade comparada a outros crustáceos, incluindo outras espécies de Cirripédios como *Balanus improvisus*.

CONCLUSÕES

Em função das características biológicas, as larvas de Cirripedia apresentam grande potencial de aplicabilidade de uso em testes de toxicidade, destacando-se:

1. São organismos abundantes, de ampla distribuição na costa brasileira e de importância ecológica no sistema bentônico de substratos duros.
2. Apresentam reprodução contínua ao longo do ano, conseqüentemente, há disponibilidade de larvas em qualquer período.

3. Há conhecimento de sua biologia e histórico no uso de testes de toxicidade.
4. São de fácil obtenção no meio e manutenção sem a necessidade de seu cultivo e de custo elevado em laboratório.
5. Podem ser utilizados em amplo intervalo de salinidade (> 20‰) e temperatura (20 e 25°C).
6. Apresentam sensibilidade similar a outros crustáceos planctônicos.

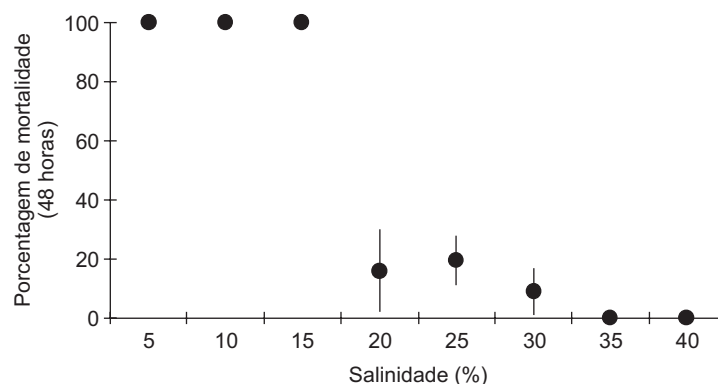


Figura 3 – Porcentagem de mortalidade de larvas de *M. coccopoma* mantidas por 48 horas em diferentes salinidades.

Tabela 3 – Protocolo de teste de toxicidade aguda com nauplius de *Megabalanus coccopoma*.

Requisitos	Condições	
Tipo de ensaio	Estático	
Organismo-teste	Nauplius II de <i>Megabalanus coccopoma</i>	
Água de diluição	Água natural marinha filtrada	
Volume mínimo da solução-teste	2 mL	
Número mínimo de replicatas por diluição	3	
Número de organismos por replicata	Mínimo de 10 e máximo de 20	
Aeração	não	
Alimentação	não	
pH	7 a 9	
Salinidade	20 a 35‰	
Temperatura	20 a 25°C	
Fotoperíodo	12 h luz e 12 h escuro	
Efeito observado	Mobilidade	Mortalidade
Duração do teste	24 horas	48 horas
Período para a quantificação do número de organismos afetados	Não necessita	A cada 24 horas
Validade do teste	Máximo de 20% de efeito no controle	

Tabela 4 – Valores de CL₅₀ em mg L⁻¹ para diferentes substâncias utilizando nauplius de *Megabalanus coccopoma* e de outros crustáceos utilizados em testes de toxicidade segundo diferentes autores.

Organismo-teste	Tempo de teste	Zn	Cu	Cr	DSS	NH ₃	Autores
<i>Acartia lilljeborgi</i> (Copepoda)	48 horas	0,32 a 0,89	0,24	–	1,4 a 2,6	–	Nipper <i>et al.</i> (1993) e Resgalla Jr. & Laitano (2002)
<i>Temora stylifera</i> (Copepoda)	48 horas	0,03 a 1,56	0,02	–	2,31 a 3,0	–	Nipper <i>et al.</i> (1993) e Resgalla Jr. & Laitano (2002)
<i>Mysidopsis juniae</i> (Mysidacea)	96 horas	0,34 a 0,41	0,03	3,66	2,3	0,42	Nipper <i>et al.</i> (1993) e Resgalla Jr. & Laitano (2002)
<i>Balanus improvisus</i> (Cirripedia)	48 horas	–	0,01 a 0,10	–	–	–	Lang <i>et al.</i> (1981)
<i>Megabalanus coccopoma</i> (Cirripedia)	48 horas	0,06 a 0,44	< 0,06	1,9	1,7	0,21	Este trabalho

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACME, 2001, Advisory Committee on the Marine Environment. *Report of the working group on introductions and transfers of marine organisms*. Barcelona, Spain. ICES CM 2001/ACME:08 Ref. E, F. 104p.
- AXIAK, V., 1991, Sublethal toxicity test: physiological responses. In: P. D. Abel & AXIAK V. (eds.), *Ecotoxicology and the marine environment*. Ellis Horwood Limited.
- BLUNDO, R., 1978, The toxic effects of the water soluble fractions of No. 2 fuel oil and of three aromatic hydrocarbons on the behavior and survival of barnacle larvae. *Contr. Mar. Sci.*, 21: 25-37.
- BOUGIS, P., 1976, *Marine plankton ecology*. North Holland. Publ. Comp., Amsterdam, 355p.
- CCME, 2001, Canadian Council of Ministers of the Environment. *Canadian water quality guidelines of the protection of aquatic life. Nonylphenol and its Ethoxylates*. EPPC – Agenda #8 – Att 2. 8p.
- CETESB, 1992a, *Água do mar – teste de toxicidade aguda com Acartia lilljeborgi Giesbrecht, 1892*. L5.024, 21p.
- CETESB, 1992b, *Água do mar – teste de toxicidade aguda com Mysidopsis juniae Silva, 1979*. L5.251, 19p.
- COSTLOW, J. D. & BOOKHOUT, C. G., 1960, A method for developing Brachyuran eggs in vitro. *Limnol. Oceanogr.*, 5: 212-215.
- COX, C., 1996, *Inert ingredient fact sheet. Nonyl Phenol and related chemical*. *J. Pesticide Reform.*, 16: 15-20.
- GREENBERG, A. E., CLESCERI, L. S. & EATON, A. D., 1992, *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 18. ed. American Public Health Association, Washington, D. C. 400p.
- LAM, P. K. S., WO, K. T. & WU, R. S. S., 2000, Effects of cadmium on the development and swimming behavior of barnacle larvae *Balanus amphitrite* Darwin. *Env. Toxicol.*, 15: 8-13.
- LANG, W. H., MILLER, D. C., RITACCO, P. J. & MARCY, M., 1981, The effects of copper and cadmium on the behavior and development of barnacle larvae, pp. 165-203. In: F. J. Vernberg, A. Calabrese, F. P. Thurberg & W. B. Vernberg (eds.), *Biological Monitoring of Marine Pollutants*, Academic Press.
- NIPPER, M. G., BADARÓ-PEDROSO, C., JOSÉ, V. F. & MELO, S. L. R., 1993, Toxicity testing with coastal species of southeastern Brazil. Mysis and Copepods. *Bull. Envirom. Contam. Toxicol.*, 51: 83-95.
- PYEFINCH, K. A. & MOTT, J. C., 1948, The sensitivity of barnacles and their larvae to copper and mercury. *J. Exp. Biol.*, 25: 276-298.
- RAYMOND, J. E. G., 1983, *Plankton and productivity in the oceans*. 2. ed. Vol. 2. Zooplankton. Pergamon Press, Oxford, 382p.
- RESGALLA Jr., C. & LAITANO, K., 2002, Sensibilidade dos organismos marinhos utilizados em testes de toxicidade no Brasil. *Notas Téc. Facimar*, 6: 153-163.
- RICE, A. L. & WILLIAMSON, D. I., 1970, Methods for rearing larval decapod Crustacea. *Helgoländer wiss. Meer.*, 20: 417-434.
- SEVERINO, A. & RESGALLA Jr., C., 2005, Descrição dos estágios larvais de *Megabalanus coccopoma* (Darwin, 1854) e sua variação temporal na enseada de Itapocoroy (Santa Catarina, Brasil). *Rev. Atlântica*, 27: 5-16.
- SEVERINO, A., 2000, *Taxonomia e variação temporal de larvas de Cirripedia na praia de Armação, Penha, Santa Catarina*. Trabalho de Conclusão de Curso, Graduação em Oceanografia, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, SC, 43p.
- USEPA, 2002, *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms*. 3. ed. Washington. EPA-821-R-02-014.
- VALENTIN, J. L. & COUTINHO, R., 1988, Programa de Biologia Marinha e a participação do IEAPM em estudos de incrustação. *Publicação do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM)*, 211: 123-136.

- WU, R. S. S., LAM, P. K. S. & ZHOU, B. S., 1997a, A phototaxis inhibition assay using barnacle larvae. *Environ. Toxicol. Water Qual.*, 12: 231-236.
- WU, R. S. S., LAM, P. K. S. & ZHOU, B. S., 1997b, Effects of two oil dispersants on phototaxis and swimming behaviour of barnacle larvae. *Hydrobiologia*, 352: 9-16.
- YOUNG, P. S., 1995, New interpretations of South American patterns of barnacle distribution. In: F. R. Schran & J. T. Hoeg (eds.), *New frontiers in barnacles evolution. Crustacean Issues*, 10: 229-253.
- YOUNG, P. S., 2000, Cirripedia thoracica (Crustacea) collected during the *Campagne de La Calypso (1961-1962)* from the Atlantic shelf of South America. *Zoosystema*, 22: 85-100.



Efecto Toxicológico del “Sachayoco”, *Paullinia clavigera* (Sapindaceae) sobre *Daphnia magna* y sobre Dos Controladores Biológicos de Plagas Agrícolas

J. IANNAONE,^{1,2*} L. ALVARIÑO,² J. C. SOTO² & C. SALCEDO²

¹Laboratorio de Invertebrados, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma (URP), Lima, Perú,

²Laboratorio de Ecofisiología Animal, Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Universidad Nacional Federico Villarreal (UNFV), Lima, Perú

(Received September 9, 2006; Accepted December 21, 2006)

RESUMEN

Paullinia clavigera Simpson (Sapindaceae) “Sachayoco” es usada como insecticida artesanal en la Amazonía Peruana. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto toxicológico de *P. clavigera* procedente de Pucallpa, Perú, sobre *Daphnia magna* Strauss, 1820 (Crustácea: Daphniidae), y sobre dos controladores biológicos de plagas agrícolas: *Copidosoma koehleri* Blanchard, 1940 (Hymenoptera: Encyrtidae), y *Chrysoperla externa* (Hagen 1861) (Neuroptera: Chrysopidae). En *D. magna* (CL₅₀ a 48 h de exposición), los mayores efectos se encontraron en los extractos clorofórmicos de hoja (CL₅₀ = 237 mg L⁻¹) y de corteza (CL₅₀ = 398 mg L⁻¹). En *C. koehleri* (CL₅₀ a 48 h y emergencia de adultos), solo los extractos hexánico de hoja (CL₅₀ = 145 mg L⁻¹; 38,9%) y de corteza (CL₅₀ = 298,6 mg L⁻¹; 16,8%) produjeron efectos sobre los adultos y sobre la emergencia de adultos, respectivamente. No se encontró efectos toxicológicos del extracto clorofórmico botánico de corteza sobre las larvas de *C. externa* (a 96 h de exposición). Los extractos hidroalcohólicos de *P. clavigera* tuvieron el mayor potencial para su uso en el manejo integrado de plagas (MIP) porque fueron menos tóxicos y selectivos para el control biológico y para *D. magna* en el ambiente acuático.

Palabras claves: bioensayo, *Chrysoperla*, *Copidosoma*, *Daphnia*, extracto botánico, plaguicidas naturales.

ABSTRACT

Toxicological effect of soapberry, *Paullinia clavigera* (Sapindaceae) on *Daphnia magna* and on two biological control of agriculture pests

Soapberry, *Paullinia clavigera* Simpson (Sapindaceae) is used as a craft insecticide in Peruvian Amazon. The aim of the current research was to evaluate the toxicological effect of *P. clavigera* proceeding of Pucallpa, Peru, on *Daphnia magna* Strauss, 1820 (Crustacea: Daphniidae), and on two biological controls of agriculture pests: *Copidosoma koehleri* Blanchard, 1940 (Hymenoptera: Encyrtidae), and *Chrysoperla externa* (Hagen 1861) (Neuroptera: Chrysopidae). In *D. magna* (LC₅₀ at 48 h exposure), the highest effects were found with leaves (LC₅₀ = 237 mg L⁻¹) and stem cortex (LC₅₀ = 398 mg L⁻¹) chlorophormic extracts. In *C. koehleri* (LC₅₀ at 48 h exposure and emergence of adults), only hexanic extracts of leaves (LC₅₀ = 145 mg L⁻¹; 38.9%) and stem cortex (LC₅₀ = 298.6 mg L⁻¹; 16.8%) produced effects on mortality and emergency of adults, respectively. Toxicological effects of stem cortex chlorophormic botanic extracts on larvae of *C. externa* (at 96 h of exposure) were not found. Leaves and stem cortex ethanolic extracts had the most potential for use in an integrated pest management (IPM) because they were less toxic and selective to biological control and for *D. magna* in the freshwater environment.

Key words: bioassays, botanical extracts, *Chrysoperla*, *Copidosoma*, *Daphnia*, natural pesticides.

*Corresponding author: José Iannacone, e-mail: joseiannacone@yahoo.es.

INTRODUCCIÓN

La agricultura del nuevo milenio debe establecer nuevas alternativas de control que produzcan menor impacto y riesgo ambiental, que permitan reducir significativamente el uso de plaguicidas sintéticos, los cuales, por su elevado costo, representan una limitante en su uso. La degradación del habitat por efecto de los pesticidas es un campo de preocupación de los biólogos conservacionistas y de los toxicólogos ambientales (Hansen & Johnson, 1999; Iannacone & Alvaríño, 2002). La utilización de extractos vegetales para el control de plagas representa una alternativa para el manejo integrado de los cultivos, debido a su bajo costo y al menor impacto sobre el ambiente al conservar la biodiversidad (Castiglioni et al., 2002; De Oliveira et al., 2003). Las plantas se utilizan en extractos crudos o en algunos casos como productos naturales derivados (Iannacone & Lamas, 2003a). Podríamos mencionar que en el Perú entre los primeros plaguicidas botánicos usados tenemos a la nicotina, extraída del fruto de *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae); a la piretrina, extraída del piretro, *Chrysanthemum cinerariaefolium* Benth & Hook (Asteraceae); a la rotenona, extraída de *Derris* spp. y *Lonchocarpus* spp. (Fabaceae); a la sabatina, extraída de sabadilla, *Schoenoeaulon officinale* A. Gray ex Benth (Liliaceae); y a la rianodina, extraída de *Ryania speciosa* Monach (Flacuortiaceae) (Iannacone & Lamas, 2003b).

El género *Paullinia* está representado en la flora amazónica, con varias especies que tienen beneficios al hombre. *Paullinia clavigera* Simpson (Sapindaceae) es una planta amazónica promisoría como biocida. Las poblaciones naturales de *P. clavigera* se localizan en ecosistemas de altura Amazónica, formando parte del bosque primario y en planicies que requieren de poca luminosidad, de moderada a alta humedad relativa y de altitudes de 150 a 2000 m. Esta especie prefiere suelos arcillosos. Su raíz se utiliza como ictiotóxico para la pesca, y presenta actividad antifúngica y molusquicida. El contenido de taninos (principalmente el ácido catecutánico y el catecol) es muy alto, por lo que provoca efectos en el sistema nervioso central. Asimismo presenta gran cantidad de cafeína, que varía de 3% a 5% del peso seco, y una saponina llamada timbonina con propiedades ictiotóxicas se encuentra en cantidades pequeñas. En la especie congénérica *Paullinia pinnata* se han registrado actividades antioxidantes y molusquicidas contra *Biomphalaria glabrata*, hospedero intermediario de *Schistosoma mansoni* (Melendez & Carriles, 2002; Zamble et al., 2006). En *Paullinia cupana* "Guarana" se ha evaluado su importancia como remedio herbal natural y etnobotánico (Myerscough, 1998) y se ha evaluado la toxicidad del extracto acuoso sobre células de ovario de hamster y sobre la bacteria *Vibrio fisheri*, encontrándose que dosis altas pudieran ser dañinas para la salud humana (Santa María et al., 1998). Extractos acuosos de *P. cupana* han mostrado actividad genotóxica y mutagénica en células bacterias de *Escherichia coli* (da Fonseca et al., 1994). Altas concentraciones

de cafeína se han encontrado en *Paullinia yoco* y *P. cupana* (Schultes, 1994; Cipollini 2000). Plotkin (1988) señala a *P. cupana* como una fuente potencial de plaguicida biodegradable. Por ende, para una adecuada evaluación biológica de *P. clavigera*, se requiere el empleo de bioensayos toxicológicos (Nano et al., 2002). La toxicidad aguda y la mortalidad son parámetros ecotoxicológicos de gran importancia (Iannacone & Alvaríño, 2002).

Daphnia magna Strauss, 1820 (Crustácea: Daphniidae), es una especie partenogenética usada extensivamente en pruebas de toxicidad para evaluar sustancias químicas puras, aguas residuales domésticas e industriales, aguas superficiales o subterráneas, agua potable, lixiviados, entre otros. Esto es debido a su: 1) importante papel en la comunidad zooplanctónica, 2) facilidad de cultivo y 3) corto ciclo de vida con la producción de un alto número de crías (Castillo, 2004; Kallqvist et al., 2006). En el Perú, el Manual Técnico Andino (26/2/2002) es la norma legal para el registro de plaguicidas de uso agrícola. Este manual indica como requerimiento realizar bioensayos ecotoxicológicos con *D. magna* para evaluar el riesgo ambiental acuático, a pesar que el crustáceo *D. magna* no es una especie neotropical. Sin embargo, Wernersson (2004) ha evaluado la ecotoxicidad de las aguas tropicales amazónicas en Ecuador empleando a *D. magna*.

Copidosoma koehleri Blanchard, 1940 (Hymenoptera: Encyrtidae), es una microavispa poliembriónica parasitoide obligatoria a nivel de huevo y larva, nativo de Sudamérica (Iannacone & Lamas, 2003a,b). Este parasitoide actúa preferentemente sobre huevecillos del complejo de polillas de la papa, como *Symmetrischema plaesiosema* (Turner, 1919), *Tuta absoluta* y *Phthorimaea operculella* (Zeller, 1873) (Ramán et al., 1993).

Chrysoperla externa (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae) es un eficiente depredador en el manejo ecológico e integrado de plagas. Sus larvas y adultos son considerados depredadores muy voraces, oófagos y larvífagos, alimentándose de amplia diversidad de presas, tales como pulgones, moscas blancas, cochinillas, huevos y larvas de lepidópteros, como *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797), *Spodoptera eridania* (Cramer, 1782), *Tuta absoluta* Meyrick, 1917, *Helicoverpa zea* Boddie, 1850, *Heliothis virescens* Fabricius, 1777, *Cydia pomonella* (Linnaeus, 1758) y *Phyllocnistis citrella* Stainton, 1856, en varios cultivos (Iannacone & Reyes, 2001). *C. externa* tiene amplia distribución en la costa y sierra del Perú con presencia de adultos a través de todo el año, fácil crianza en cautiverio, potencial para adaptarse a varios ambientes de cultivos. En adición se ha evaluado su sensibilidad a varios plaguicidas (Schumuck, 1997; Iannacone & Lamas, 2002; Carvalho et al., 2002; Godoy et al., 2004).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto toxicológico de *P. clavigera* procedente de Pucallpa, Perú, sobre *D. magna* y sobre dos controladores biológicos de plagas agrícolas: *C. koehleri* y *C. externa*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los bioensayos toxicológicos se realizaron en el Laboratorio de Invertebrados, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma, Distrito de Santiago de Surco, Lima, Perú, durante el 2005.

Extracto botánico

Las lianas de *P. clavigera* (PC) fueron colectadas del km 83 del Caserío “Señor de los Milagros”, jurisdicción del distrito de Irazola, Provincia de Padre Abad, Ucayali, Perú, ubicada en el km 12,400. Las lianas de PC fueron secadas directamente al sol por espacio de dos semanas aproximadamente y se trituraron en un molino de martillo. Se prepararon los extractos hexánico, clorofórmico e hidroalcohólico según los procedimientos descritos en el screening fitoquímico. Se prepararon las concentraciones empleando un factor de dilución de 0,5.

Screening fitoquímico

La preparación de los extractos hexánico, clorofórmico e hidroalcohólico de la corteza y hoja de *P. clavigera* fue realizado en el Laboratorio de Investigación en Productos Naturales Antiparasitarios de la Amazonía “Gabriel de la Fuente Martín” de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP). El screening fotoquímico de la corteza fue realizado en la UNAP y el de la hoja en el Laboratorio de análisis químico de la Pontificia Universidad Católica del Perú (PUCP). A partir de 100 g de muestra seca y molida de *P. clavigera* se extrajo con hexano (solvente apolar) hasta agotamiento con renovación de solvente cada 48 h, después de eliminar el solvente en rotavapor a presión reducida se obtuvo los extractos hexánicos. Al residuo se le adicionó cloroformo (CHCl_3) (solvente medianamente polar) y se extrajo hasta agotamiento con renovación de solvente cada 48 h, el solvente se eliminó hasta sequedad en rotavapor a presión reducida, de esta forma se obtuvo los extractos clorofórmicos. Finalmente, al residuo se adiciona etanol-agua (70:30), solventes polares, y se procedió como en los casos anteriores, obteniéndose los extractos hidroalcohólicos. Procedimientos estándares para la marcha fitoquímica fueron determinados para alcaloides (Dragendorff/Mayer), aminoácidos (Ninhidrina), saponinas (producción de espuma), esteroides (Liebermann Burchard), triterpenos (Liebermann Burchard), taninos (Gelatina/ FeCl_3), fenoles/leucoantocianidinas (Rosenheim), flavonoides (Shinoda), cumarinas (revelado con vainilla y ácido ortofosfórico) y quinonas (Borntrager). Se detectó su presencia en tres categorías: – = reacción negativa, \pm = reacción muy poco positiva y + = reacción positiva.

Organismos prueba

Daphnia magna

Hembras adultas de esta especie fueron obtenidas del acuario “Cleo” procedente del distrito de Lince, Lima, Perú,

y fueron llevadas al Laboratorio de Invertebrados en recipientes plásticos de 2 L de capacidad. Hembras partenogenéticas fueron colocadas en el medio nutritivo ADaM. La preparación del medio se realizó de la siguiente forma: 9,9 g de sales obtenidas por evaporación del agua de mar fueron adicionadas a 60 L de agua de grifo de clorinada (Tabla 1), reposadas y hiperoxigenada durante 24 h. Luego se agregó 138 mL de una solución de cloruro de calcio ($117,6 \text{ g L}^{-1}$), 132 mL de una solución de bicarbonato de sodio ($25,2 \text{ g L}^{-1}$) y 6 mL de una solución de óxido de selenio ($0,07 \text{ g L}^{-1}$) (Klüttgen *et al.*, 1994). Posteriormente se procedió a realizar dos análisis fisicoquímicos de medio ADaM (Tabla 1). Los cultivos parciales se mantuvieron a una temperatura de $21 \pm 2^\circ\text{C}$ y a un fotoperiodo aproximadamente de 12L:12O. El oxígeno disuelto tuvo una concentración sobre 6 mg L^{-1} (Castillo, 2004). Para el desarrollo de la prueba de toxicidad aguda con *D. magna* se emplearon cohortes de neonatos ($< 24 \text{ h}$ de nacidos). La duración total de la prueba fue de 48 h de exposición. Las concentraciones empleadas fueron 625, 1250, 2500 y 5000 mg L^{-1} del extracto hexánico, clorofórmico e hidroalcohólico de *P. clavigera*. Para todos los casos se empleó un control con la máxima concentración de solvente empleado para la dilución. Se empleó un factor de dilución de 0,5. A cada envase cuadrangular de $4 \text{ cm} \times 4 \text{ cm} \times 4 \text{ cm}$ a los que se transfirieron diez neonatos de *D. magna*. Se usó como criterio de mortalidad la carencia de movilidad o la ausencia de ritmo cardiaco a 15 s de observación al microscopio estereoscópico. Antes de efectuar las lecturas se agitaron los envases en forma circular para reactivar el movimiento de los organismos que se posaban inmóviles en el fondo (Castillo, 2004).

Copidosoma koehleri

Microavispa de esta especie se obtuvieron de una colonia mantenida durante diez años del Programa Nacional de Control Biológico, Servicio Nacional de Sanidad Agraria (PNCB-SENASA) ($12^\circ 01' 18'' \text{LS}$, $76^\circ 54' 57'' \text{LO}$). Las condiciones de cría para *C. koehleri* siguió lo descrito por Iannacone & Lamas (2003a). Se realizaron ensayos de toxicidad por inmersión para larvas momificadas de *P. operculella* parasitadas por *C. koehleri* y por contacto-residual para adultos. La temperatura del ensayo fue de $21 \pm 2^\circ\text{C}$.

Toxicidad por inmersión: Las características del ensayo por inmersión siguió el protocolo indicado por Iannacone & Lamas (2003a). Se trataron 8 larvas parasitadas por concentración evaluada. Las concentraciones empleadas fueron 312,5, 625, 1250, 2500 y 5000 mg L^{-1} del extracto hexánico, clorofórmico e hidroalcohólico de *P. clavigera*. Las lecturas se hicieron hasta la emergencia en el agua destilada y en el respectivo control de solvente de más del 65% de los adultos de *C. koehleri* de las larvas momificadas de *P. operculella*. El porcentaje de emergencia de *C. koehleri* se calculó contando el número de microavispa emergidas de una larva momificada de *P. operculella*, dividiéndolo por el número total de cámaras parasitadas.

Tabla 1 – Características físico-químicas del agua de grifo y del medio ADaM (Aachener Daphnien Medium) empleados en los bioensayos con *Daphnia magna*.

Parámetro Físico-químico	Agua de grifo	ADaM
	mg L ⁻¹	
pH ¹	7,2	8,15
CE ²	0,86	1,42
Calcio	123,6	148,4
Magnesio	15,3	13,7
Potasio	3,90	7,81
Sodio	4,70	20,5
Nitratos	3,10	0,62
Carbonatos	0	0,9
Bicarbonatos	216,5	184,2
Sulfatos	110,4	149,8
Cloruros	85,1	308,4
Boro	0,5	1,1
Fe	ND	0,02
Cu	ND	0,01
Zn	ND	0,05
Mn	ND	0,001
Dureza cálcica	362	ND

Los resultados indicados corresponden al promedio aritmético de dos análisis físico-químicos de agua. ¹ = no aplica unidades mg L⁻¹. ² = dS m⁻¹. ND = no determinado.

Toxicidad por contacto-residual para adultos: Las características del ensayo por contacto residual siguió el protocolo indicado por Iannacone & Lamas (2003a). El tratamiento control consistió en agua destilada y en el solvente hexano. Se usaron 20 adultos por sustancia evaluada y un total de 5 adultos por repetición (Hassan, 1992). Las lecturas se continuaron siempre y cuando la mortalidad en el control no fuera superior a 20%. Las concentraciones empleadas fueron 312,5, 625, 1250, 2500 y 5000 mg L⁻¹ del extracto hexánico de *P. clavigera*.

Chrysoperla externa

Las condiciones de cría para *C. externa* para la obtención de larvas siguió lo descrito por Iannacone & Lamas (2002). Los adultos obtenidos se alimentaron bajo ocho dietas artificiales en envases cilíndricos de plástico de 30 cm de altura × 20 cm de diámetro (Tabla 2). La dieta estándar o dieta control (L) fue la utilizada por el PNCB-SENASA en la alimentación de adultos de *C. externa*. Las otras siete dietas variaron en su composición de maca, kiwicha y soya (Tabla 2). Luego de los

huevos obtenidos procedentes de los adultos de *C. externa* bajo las ocho dietas se obtuvieron las larvas, las cuales fueron empleadas en los bioensayos ecotoxicológicos.

Para los bioensayos, fue empleado el primer estadio larval obtenido de los adultos alimentados con las ocho dietas. Las larvas fueron alimentadas *ad libitum* con huevos de *S. cerealella*, pegados a cartulinas de 5 × 5 mm. Se emplearon cohortes de especímenes entre 24 y 48 h de edad. Las pruebas de sensibilidad se realizaron bajo condiciones de oscuridad, para evitar el efecto de fotólisis. El indicador para las pruebas de mortalidad fue el indicado por Iannacone & Lamas (2002).

Toxicidad por contacto-residual: Los ensayos se llevaron a cabo para las larvas de primer estadio, alimentadas previamente con huevos de *S. cerealella* y obtenidos de los adultos alimentados con la dieta 1. En *C. externa* solo se evaluó el extracto clorofórmico de la corteza de *P. clavigera*, disuelto en agua destilada y aplicado sobre envases plásticos de 4 × 3,5 × 3 cm, esparcido en forma homogénea en el interior. Las características del ensayo por contacto residual siguió el protocolo indicado por Iannacone & Lamas (2002).

Toxicidad por incorporación en la dieta: Se realizó aplicaciones tópicas por inmersión sobre huevos de *S. cerealella* con los que se alimentó a las larvas del primer estadio de *C. externa* procedentes de cada una de las ocho dietas artificiales para la alimentación de los adultos. Las características del ensayo por incorporación en la dieta siguió el protocolo indicado por Iannacone & Lamas (2002). Se utilizó 56 larvas del primer estadio de *C. externa* para cada tipo de dieta, ocho larvas por concentración, haciendo un total de 448 larvas para las ocho dietas. Se observó la mortalidad acumulada a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición (Iannacone y Lamas, 2003a).

Para los bioensayos de toxicidad por contacto-residual y de incorporación en la dieta, se preparó una solución madre de 1 g del extracto de *P. clavigera* en 1 ml del solvente (cloroformo al 96% de pureza), el cual finalmente se llevó a un volumen de 1 L con agua destilada. Posteriormente, para *C. externa* se preparó cinco concentraciones 6,25, 12,5, 25, 50 y 100 mg L⁻¹ de extracto con factor de dilución de 0,5. En adición, se preparó dos controles, uno con agua destilada y otro con el respectivo solvente a la más alta concentración empleada.

Análisis de datos

Las pruebas de toxicidad de los extractos hexánico, clorofórmico e hidroalcohólico de corteza y hoja de Sachayoco sobre *D. magna* se evaluó en cuatro concentraciones más el control de agua destilada y el solvente, con cuatro

repeticiones, en un diseño de Bloque Completo al Azar (DBCA): 6 × 4. En *C. koehleri*, para evaluar los porcentajes de emergencia y la mortalidad de los adultos, se evaluó en cinco concentraciones más el control de agua destilada y del solvente, con cuatro repeticiones, en un diseño de Bloque Completo al Azar (DBCA): 7 × 4. En *C. externa* para evaluar la mortalidad larvaria por contacto-residual y de incorporación en la dieta se evaluó en cinco concentraciones más el control de agua destilada y del solvente, así como el efecto de las ocho dietas, en un diseño Factorial de Bloque Completo al Azar (DBCA): 7 × 4 × 8. La eficacia de los tratamientos y las repeticiones se evaluó a través de un análisis de varianza (ANDEVA) de dos vías, previa transformación de los datos a raíz cuadrada del arcoseno. En el caso de existir diferencias significativas entre los tratamientos y entre las repeticiones se realizó la prueba de Tukey. Los cálculos de la mortalidad corregida se realizó mediante la fórmula de Abbott en caso de muerte natural en el grupo testigo cuando sea menor al 20% (Macedo *et al.*, 1997). La Concentración Letal media (CL₅₀) se calculó usando el programa computarizado Probit versión 1,5. El modelo de regresión fue verificado usando el estadístico Chi-cuadrado. Los resultados fueron analizados mediante el paquete estadístico SPSS (versión 12,0). Se empleó la clasificación toxicológica de la IOBC para determinar el efecto en los porcentajes de mortalidad y de reducción de la emergencia de *C. koehleri* (Hassan, 1992).

Tabla 2 – Dietas artificiales para alimentación de adultos de *Chrysoperla externa*.

Ingredientes	Dietas (g)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
	L	L+M	L+S	L+K	M+S	M+K	S+K	M+S+K
Maca (<i>Lepidium peruvianum</i>)		17,5			8,75	8,75		7
Kiwicha (<i>Amaranthus caudatus</i>)				17,5		8,75	8,75	7
Soya (<i>Glycine max</i>)			17,5		8,75		8,75	7
Levadura de cerveza	35	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	21
Polen	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	3,5
Miel	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	21
Agua	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	21

Para la preparación de las ocho dietas se usó como medida una cucharadita de aproximadamente 3,5 g. L = levadura de cerveza; M = maca; S = soya; K = kiwicha. La dieta estándar para adultos de *C. externa* usada en el PNCB-SENASA es la n° 1.

RESULTADOS

El screening fitoquímico de los extractos hexánicos, clorofórmicos e hidroalcohólicos de corteza y de hoja de *P. clavigera* obtuvo los resultados señalados en la Tabla 3. El extracto hexánico de corteza y hoja presentó triterpenos. Solo el extracto hexánico de corteza tuvo flavonoides y quinonas. El extracto clorofórmico de corteza y hojas presentó esteroides. Solo el extracto clorofórmico de corteza presentó saponinas, cumarinas, flavonoides y quinonas. En cambio, el extracto clorofórmico de hoja solo tuvo triterpenos. Los extractos hidroalcohólico de corteza y hoja presentaron fenoles-antocianidinas y flavonoides (Tabla 3).

Se encontró la siguiente secuencia en orden descendente de toxicidad aguda (CL_{50} en $mg L^{-1}$) de los extractos de *P. clavigera* sobre *D. magna* a 24 y 48 h de exposición: cloroformo de hoja > cloroformo de corteza > hidroalcohol de hoja > hexánico de hoja > hexánico de corteza > hidroalcohol de corteza (Tabla 4).

No existieron diferencias significativas en el promedio del número de cámaras de *C. koehleri* expuestas a los extractos hexánico, clorofórmico e hidroalcohólico de corteza y de hoja *P. clavigera* evaluados por concentraciones ($F = 0,25-1,51$; $P = 0,19-0,95$) y por repeticiones ($F = 0,28-1,78$; $P = 0,12-0,94$) (Tabla 5). Con relación al porcentaje de emergencia de *C. koehleri* expuestos a los extractos hexánico, clorofórmico e hidroalcohólico de corteza y hoja *P. clavigera* evaluados por concentración, solo

existieron diferencias significativas en los dos extractos hexánicos entre $5000 mg L^{-1}$ y el control ($F = 5,16-8,53$; $P = 0,00$) (Tabla 5). Estos dos extractos hexánicos a $5000 mg L^{-1}$ fueron considerados según la IOBC como ligeramente peligrosos (categoría 2). En cambio, los extractos clorofórmicos e hidroalcohólicos fueron catalogados como de menor peligrosidad (categoría 1). En adición, no existieron diferencias significativas en relación a las repeticiones ($F = 0,92-2,70$; $P > 0,05$) (Tabla 5).

Al encontrarse efectos significativos en la emergencia de adultos de *C. koehleri* con los extractos hexánicos de corteza y hoja de *P. clavigera*, se procedió a realizar bioensayos de mortalidad de adultos de *C. koehleri* a 48 h de exposición solo con estos dos extractos, y se observó diferencias significativas con el control desde la concentración más baja de los extractos a $312,5 mg L^{-1}$ (Tabla 6). A 48 h de exposición, el extracto hexánico de corteza presentó en términos de CL_{50} mayor toxicidad que el hexánico de hoja (Tabla 6). Estos dos extractos hexánicos a $5000 mg L^{-1}$ fueron considerados según la IOBC como peligrosos (categoría 4).

Al evaluar la mortalidad a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición a las cinco concentraciones utilizadas del extracto clorofórmico de la corteza de *P. clavigera* se observó que estas no produjeron ningún efecto de mortalidad sobre las larvas de primer estadio de *C. externa*, tanto en los bioensayos por incorporación a la dieta provenientes de adultos alimentados con ocho dietas a base de maca, kiwicha y soya, así como en los bioensayos de contacto residual.

Tabla 3 – Características fitoquímicas de los extractos hexánicos, clorofórmicos e hidroalcohólicos de la corteza y hoja de *Paulinia clavigera*.

Características fitoquímicas	Extracto de corteza			Extracto de hoja		
	hexánico	clorofórmico	hidroalcohólico	hexánico	clorofórmico	hidroalcohólico
Prueba de						
Alcaloides	–	–	–	–	–	–
Saponinas	–	±	+	ND	ND	ND
Esteroides	–	+	–	+	+	–
Triterpenos	+	–	–	+	+	–
Taninos	–	–	–	–	–	–
Fenoles/Antocianidinas	–	–	+	–	–	+
Flavonoides	+	+	+	–	–	+
Cumarinas	–	+	+	ND	ND	ND
Quinonas	±	±	+	–	–	–
Aminoácidos	ND	ND	ND	–	–	+

Leyenda: reacción: – = negativa; ± = muy poco positiva; + = positiva.

Tabla 4 – Toxicidad aguda de los extractos hexánicos, clorofórmicos e hidroalcohólicos de *Paullinia clavigera* procedentes de Pucallpa, Ucayali, Perú, sobre *Daphnia magna* a 24 y 48 h de exposición.

Concentración (mg del extracto L ⁻¹)	Hexano corteza (%)*		Hexano hoja (%)*		Cloroformo corteza (%)*		Cloroformo hoja (%)*		Hidroalcohol corteza (%)*		Hidroalcohol hoja (%)*	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
	Control: H ₂ O destilada	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
solvente	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
625	2,8	6,8	1,5	20,4	0	17,5	0	47,7	0	0	4,8	40,8
1250	13,7	32,3	28,1	31,8	13,1	62,9	42,0	65,1	2,5	33,9	25,9	55,6
2500	62,2	77,4	62,7	85,8	49,3	71,1	45,4	86,9	23,1	57,9	62,9	85,2
5000	86,5	88,7	84,0	97,2	81,9	95,9	82,9	95,6	64,1	100	94,7	100
CL ₅₀	2272	1697	2097	1384	874	398	747	237	3979	1912	1918	956

* = Porcentaje de mortalidad.

Tabla 5 – Promedio de número de cámaras y porcentajes de emergencia de *Copidosoma koehleri* con los extractos hexánicos, clorofórmicos e hidroalcohólicos de *Paullinia clavigera*.

mg extracto L ⁻¹	N ^o cámaras		Emergencia (%)	
	X	DE	X	DE
Hexano corteza				
Control H ₂ O destilada	61,0a	22,8	86,4a	15,4
Control hexano	52,8a	21,9	79,5a	32,8
312,5	47,3a	9,7	75,5a	16,9
625	47,0a	21,3	88,1a	8,5
1250	46,9a	22,0	83,1a	16,3
2500	42,4a	16,4	78,4a	13,0
5000	58,9a	20,1	38,9b	30,9
Hexano hoja				
Control H ₂ O destilada	61,0a	22,8	86,4a	15,4
Control hexano	52,8a	21,9	79,5a	32,8
312,5	48,0a	9,8	69,8a	25,7
625	44,6a	18,8	78,5a	17,6
1250	63,3a	26,1	85,4a	13,8
2500	55,5a	29,1	66,7a	37,3
5000	55,7a	21,2	16,8b	11,8
Cloroformo corteza				
Control H ₂ O destilada	26,4a	10,7	67,9a	31,4
Control cloroformo	36,5a	10,2	72,1a	31,7
312,5	32,7a	11,2	87,4a	9,9
625	30,5a	15,2	81,9a	25,5
1250	28,0a	10,5	80,3a	11,7

Tabla 5 – (Continuación).

mg extracto L ⁻¹	Nº cámaras		Emergencia (%)	
	X	DE	X	DE
Cloroformo corteza				
2500	34,8a	13,0	79,1a	25,9
5000	31,4a	12,8	78,1a	15,9
Cloroformo hoja				
Control H ₂ O destilada	26,4a	10,7	67,9a	31,4
Control cloroformo	36,5a	10,2	72,1a	31,7
312,5	28,3a	10,8	67,1a	38,2
625	24,0a	9,9	42,1a	34,7
1250	33,6a	11,3	67,7a	30,6
2500	26,8a	13,9	67,3a	36,3
5000	27,9a	12,7	66,8a	22,9
Hidroalcohol corteza				
Control H ₂ O destilada	31,0a	13,8	74,4b	32,6
Control etanol	29,0a	9,7	86,4a	14,3
312,5	30,3a	11,7	70,1a	33,4
625	25,9a	8,5	79,9a	18,8
1250	35,6a	11,6	77,2a	17,4
2500	36,3a	16,0	84,0a	18,6
5000	41,6a	12,8	81,9a	18,7
Hidroalcohol hoja				
Control H ₂ O destilada	31,0a	13,8	74,4b	32,6
Control etanol	29,0a	9,7	86,4a	14,3
312,5	31,8a	10,8	72,6a	33,6
625	34,1a	15,3	93,6a	3,9
1250	34,4a	14,5	70,8a	34,6
2500	35,1a	11,4	83,6a	16,7
5000	31,4a	9,2	76,0a	10,4

Letras minúsculas iguales en sentido vertical indican que los porcentajes de mortalidad son estadísticamente iguales.

DISCUSIÓN

Los insectos depredadores y parasitoides, así como la fauna no destinataria del ambiente acuático, pudieran ser afectados por las aplicaciones de plaguicidas en muchas formas. Los controladores biológicos pudieran exponerse a los plaguicidas indirectamente por alimentarse de presas

contaminadas o directamente por la aspersión de un plaguicida o por el contacto residual con la planta tratada. La fauna acuática no destinataria puede ser afectada cuando los plaguicidas llegan al ambiente dulceacuícola (Medina *et al.*, 2003). En este estudio evaluamos el efecto y la compatibilidad del uso de seis extractos botánicos de *P. clavigera* para el control de plagas con *D. magna*, *C. koehleri* y *C. externa*.

Tabla 6 – Efecto de los extractos hexánico de corteza y hoja de *Paullinia clavigera* sobre la mortalidad de adultos de *Copidosoma koehleri* a 48 h de exposición.

mg extracto L ⁻¹	% mortalidad	
	Extracto hexano corteza	Extracto hexano hoja
Control: H ₂ O destilada	0a	0a
solvente	0a	0a
312,5	81,2b	52,3b
625	87,5bc	85,7bc
1250	100c	91,4c
2500	100c	96,7c
5000	100c	100c
CL ₅₀	145,4	298,6

Letras minúsculas iguales en sentido vertical indican que los porcentajes de mortalidad son estadísticamente iguales.

La efectividad de los insecticidas vegetales es dependiente de algunos factores extrínsecos, tales como la especie y variedad de la planta, época de recolección, parte cosechada y forma de preparación, extracción y aplicación (Iannacone *et al.*, 2002). Amadiola (2000) señala que las diferencias en la toxicidad de diferentes extractos pudieran deberse a la solubilidad de sus compuestos activos en los solventes, a la presencia de inhibidores activos en los solventes o a la presencia de inhibidores de principios insecticidas. En el presente estudio, se emplearon extractos hexánicos, clorofórmicos e hidroalcohólicos precedentes de la corteza y hoja de *P. clavigera*.

Se ha encontrado que el extracto hidroalcohólico de *Paullinia elegans* Cambess tiene efecto sobre el crecimiento de promastigotes de *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911 y de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909. En adición, no se encontró en este extracto efecto antimolusquicida sobre el vector de *Schistosoma mansoni* Sambon 1907, *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Truitt *et al.*, 2005). En la especie *Paullinia pinnata* L. se han registrado actividades molusquicidas contra *B. glabrata*, hospedero intermediario de *S. mansoni*, posiblemente debido a flavonas glicosiladas (Meléndez & Carriles, 2002). Nuestros resultados indican efectos de los extractos clorofórmicos de corteza y hoja de *P. clavigera* sobre *D. magna*.

Pérez & Iannacone (2004) señalan propiedades antifúngicas y molusquicidas del Sachayoco, *P. clavigera*, debido a la concentración de las saponinas. Probablemente las saponinas encontradas en el extracto clorofórmico de corteza contribuyeron a los efectos tóxicos sobre *D. magna* (Tabla 3). Con relación a los artrópodos acuáticos, Pérez & Iannacone (2004) señalan propiedades insecticidas del extracto acuoso de *P. clavigera* sobre formas larvarias de *Anopheles benarrochi* Gabaldon, Cova García y López, 1941 (Diptera). En adición,

se ha encontrado que el extracto hidroalcohólico de *P. clavigera* tuvo alta actividad sobre *Chironomus calligraphus* (Goeldi, 1905) (Pérez *et al.*, 2004). Se ha encontrado toxicidad del extracto etanólico de *Magonia pubescens* Trunk (Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Arruda *et al.*, 2003). En el presente trabajo se ha observado que las hojas y corteza de cloroformo tuvieron mayor efecto toxicológico agudo sobre *D. magna* en comparación a los otros cuatro extractos, posiblemente por la presencia de reacciones positivas a esteroides (Tabla 3). La toxicidad del insecticida nim (*Azadirachta indica* A.Juss) y de las plantas acuáticas *Ruppia maritima* L. and *Potamogeton natans* L. (Potamogetonaceae) ha sido evaluada sobre *D. magna* (Cangiano *et al.*, 2002; Iannacone *et al.*, 2002). Una especie congénérica *Daphnia pulex* ha sido explorada como alternativa a *Artemia salina* para la evaluación biológica fitoquímica (Morrow *et al.*, 2001).

La toxicidad aguda y subaguda observada en el extracto hexánico de corteza y hoja de *P. clavigera* sobre la mortalidad y la emergencia de adultos de *C. koehleri* pudiera deberse a la presencia de triterpenos, los cuales no se encontraron en los extractos hidroalcohólicos de *P. clavigera* (Tablas 3, 4 y 6). Asimismo, Schultes & Raffauf (1990) indican la presencia de triterpenos, β -sitosterol y de aceites etéreos en una planta de la misma familia, *Serjania* (Jacq.) Willd (Sapindaceae), determinando que los primeros son responsables de actividad ictiotóxica. Iannacone & Lamas (2003a) encontraron que los extractos hexánicos de molle, *Schinus molle* L., y de lantana, *Lantana camara* L., tuvieron efectos en la emergencia de adultos de *C. koehleri* en comparación a los extractos acuosos y acetónicos y al control. En adición, el extracto acuoso de *P. clavigera* produjo efectos significativos en comparación con el control sobre la mortalidad y repelencia larvaria de *Rhynchophorus palmarum* L. a 24 h de exposición (Pérez & Iannacone, 2006).

Una reducción significativa de la emergencia de adultos en *C. koehleri* fue observada bajo la acción de 5000 mg L⁻¹ de los extractos hexánicos de corteza y de hoja de *P. clavigera*. Estos dos extractos hexánicos ocasionaron mortalidad prematura de los parasitoides al inhibir la emergencia, por estar en contacto con la superficie externa de la larva momificada parasitada por *C. koehleri*. En adición, algunos adultos del parasitoide se intoxican y no terminan de emerger, esto se produce cuando tratan de emerger y de cortar la cubierta externa de la larva momificada expuesta al extracto con sus mandíbulas y al examinar la superficie externa con sus antenas. Esta reducción en la emergencia de adultos concuerda con los obtenidos en los himenópteros parasitoides *Diaretiella rapae* McIntosh y *Aphidius matricariae* Hal bajo la acción del insecticida sintético deltametrina (Desneux et al., 2006). En cambio, los extractos clorofórmicos y hexánicos de corteza y hoja de *P. clavigera* no produjeron efectos significativos en la emergencia de adultos en *C. koehleri*. Los resultados aquí presentados con estos últimos cuatro extractos botánicos sobre el parasitoide *C. koehleri* pueden ser útiles tanto en evaluaciones regulatorias para el futuro registro de *P. clavigera* como plaguicida botánico en el Perú cuanto en la selección de los extractos con efectos plaguicidas para su integración en el manejo integrado de plagas.

Efectos en la mortalidad de los adultos de *C. koehleri* fueron observados bajo la acción de los extractos hexánicos de corteza y de hoja de *P. clavigera*. Estos dos extractos tendrían efecto sobre los parasitoides adultos cuando al buscar su plaga hospedera caminan sobre las hojas tratadas con estos dos extractos. En adición se observó en *C. koehleri*, a concentraciones entre 312,5 y 625 mg L⁻¹ de los extractos hexánicos de corteza y de hoja de *P. clavigera*, un incremento en el acicalamiento al irritar los mecanorreceptores y quimiorreceptores corporales (Tran et al., 2004). En los himenópteros parasitoides *D. rapae* y *A. matricariae* bajo la acción del insecticida sintético deltametrina se han encontrado efectos significativos sobre la supervivencia de los adultos (Desneux et al., 2006).

El extracto clorofórmico de la corteza de *P. clavigera* no produjo ningún efecto de mortalidad de las larvas de primer estadio de *C. externa*, tanto en los bioensayos por incorporación a la dieta como en los de contacto residual. Posiblemente, las bajas concentraciones entre 6,25 y 100 mg L⁻¹ de extracto empleadas en comparación con las concentraciones entre 312,5 y 5000 mg L⁻¹ de extracto usadas sobre *C. koehleri*, explicarían la ausencia de efectos observada. En *C. externa* se ha encontrado que la azadiractina y la rotenona produjeron efectos significativos de mortalidad larvaria por contacto en comparación con el control. Sin embargo, no se observaron efectos significativos en la mortalidad cuando se evaluó la azadiractina y la rotenona en bioensayos por incorporación en la dieta (Iannacone & Lamas, 2002). Sin embargo, tampoco

se puede excluir que el rol metabólico del extracto clorofórmico de la corteza de *P. clavigera* entre *C. koehleri* y *C. externa* pueda ser diferente (Medina et al., 2003).

En los ensayos se evaluó la actividad de extractos crudos de *P. clavigera* que contienen numerosos compuestos, algunos de los cuales pueden ser comunes en los extractos hexánicos, hidroalcohólicos y clorofórmicos (Tabla 3). Finalmente, los resultados muestran que a las concentraciones (mg L⁻¹) evaluadas los extractos hexánicos y clorofórmicos tuvieron efectos no selectivos sobre *D. magna* y *C. koehleri*, por lo que estas formulaciones no deberían ser empleadas cuando estas especies se encuentren presente en los ambientes dulceacuícolas y en el campo agrícola, respectivamente. Los extractos hidroalcohólicos mostraron buena selectividad hacia los organismos no destinatarios, por lo que pudieran ser considerados prioritarios en programas MIP. Sin embargo, más investigación se necesita para evaluar los efectos colaterales contra diferentes estados de desarrollo de *D. magna*, *C. koehleri* y *C. externa*. En adición, los experimentos de laboratorio deben ser verificados bajo condiciones de campo.

Agradecimiento — A la Universidad Ricardo Palma (URP) por el financiamiento de la presente investigación durante el 2005. A la Mg. Diana Pérez, del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP) por el apoyo con los extractos botánicos de *P. clavigera*. Este trabajo fue presentado en el IX Congreso Brasileiro de Ecotoxicología – SETAC Brasil, 3-6 de julio del 2006, São Paulo, Brasil.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMADIOLA, A. C., 2000, Controlling rice blast *in vitro* and *in vivo* with extracts of *Azadiracta indica*. *Crop Protection*, 19: 452-460.
- ARRUDA, W., CAVASIN, O. G. M. & GARCIA DA SILVA, I., 2003, Toxicidade do extrato etanólico de *Magonia pubescens* sobre larvas de *Aedes aegypti*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 36: 17-25.
- CANGIANO, T., DELLAGRECA, M., FIORENTINO, A., ISIDORI, M., MONACO, P. & ZARRELLI, A., 2002, Effect of *ent*-Labdane diterpenes from Potamogetonaceae on *Selenastrum capricornutum* and other aquatic organisms. *J. Chemical Ecol.*, 28: 1091-1102.
- CARVALHO, G. A., CARVALHO, C. F., SOUZA, B. & ULHOA, J. L. R., 2002, Selectividade de insecticidas a *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae). *Neotropical Entomol.*, 31: 615-621.
- CASTIGLIONI, E., VENDRAMIN, J. D. & TAMAI, M. A., 2002, Evaluación del efecto tóxico de extractos acuosos y derivados de meliáceas sobre *Tetranychus urticae* (Koch) (Acari, Tetranychidae). *Agrociencia*, 6: 75-82.
- CASTILLO, G., 2004, *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. IMTA, México, 189p.
- CIPOLLINI, M. L., 2000, Secondary metabolites of vertebrate-dispersed fruits: evidence for adaptative functions. *Rev. Chil. hist. Nat.*, 73: 421-440.
- DA FONSECA, C. A., LEAL, J., COSTA, S. S. & LEITAO, A. C., 1994, Genotoxic and mutagenic effects of guarana (*Paullinia cupana*) in prokaryotic organisms. *Mutat. Res.*, 321: 165-173.

- DE OLIVEIRA, J., DJAIR, J., RIBEIRO, J. & BARBOSA, J., 2003, Bioatividade de diversos pós de origem vegetal em relação a *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera Curculionidae). *Ciência e Agrotecnia*, 27: 1231-1236.
- DESNEUX, N., RAMIREZ-ROMERO, R. & KAISER, L., 2006, Multistep bioassay to predict recolonización potential of emerging parasitoid after a pesticide treatment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 25: 2675-2682.
- GODOY, M. S., CARVALHO, G. A., MORAES, J. C., COSME, L. V., GOUSSAIN, M. M., CARVALHO, C. F. & MORAIS, A. A., 2004, Seletividade de seis inseticidas utilizados em citros a pupas e adultos de *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae). *Neotropical Entomol.*, 33: 359-364.
- HANSEN, L. J. & JOHNSON, M. L., 1999, Conservation and toxicology: integrating the disciplines. *Conserv. Biol.*, 13: 1225-1227.
- HASSAN, S. A., 1992, Guidelines for testing the effects of pesticides on beneficial organisms: description of test methods. IOBC/WPRS. *Bulletin*, 1992/15/3.
- IANNACONE, J. & ALVARIÑO, L., 2002, Evaluación del riesgo ambiental del insecticida cartap en bioensayos con tres invertebrados. *Agric. Téc.* (Chile), 62: 366-374.
- IANNACONE, J., ALVARIÑO, L. & MANSILLA, J., 2002, Actividad insecticida de cuatro extractos botánicos sobre larvas de los mosquitos *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) y *Chironomus calligraphus* (Diptera: Chironomidae). *Wiñay Yachay* (Perú), 6: 56-71.
- IANNACONE, J. & LAMAS, G., 2002, Efectos de dos extractos botánicos y un insecticida convencional sobre el depredador *Chrysoperla externa*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, 65: 92-101.
- IANNACONE, J. & LAMAS, G., 2003a, Efectos toxicológicos de extractos de molle (*Schinus molle*) y lantana (*Lantana camara*) sobre *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae), *Trichogramma pintoi* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) y *Copidosoma koehleri* (Hymenoptera: Encyrtidae) en el Perú. *Agri. Téc.* (Chile), 63: 347-360.
- IANNACONE, J. & LAMAS, G., 2003b, Plantas biocidas usadas en el control de la polilla de la papa, *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Rev. Per. Ent.*, 43: 79-87.
- IANNACONE, J. & REYES, M., 2001, Efecto en las poblaciones de *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) y *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae) por los insecticidas botánicos Rotenona y Neem en el cultivo de Tomate en el Perú. *Rev. Col. Entomol.*, 27: 147-152.
- KALLQUIST, T., GRUNG, M. & TOLLEFSEN, K. E., 2006, Chronic toxicity of 2,4,2', 4'-Tetrabromodiphenil ether on the marine alga *Skeletonema costatum* and the crustacean *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 25: 1657-1662.
- KLÜTTGEN, B., DÜLMER, U., ENGELS, M. & RATTE, H. T., 1994, ADaM, an artificial freshwater for culture of zooplankton. *Water Research*, 28: 743-746.
- MACEDO, M. E., CONSOLI, R. A., GRANDE, T. S., DOS ANJOS, A. M., DE OLIVEIRA, A. B., MENDES, N. M., QUEIROZ, R. O. & ZANI, C. L., 1997, Screening of Asteraceae (Compositae) plant extracts for larvicidal activity against *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 92: 565-570.
- MEDINA, P., SMAGGHE, G., BUDIA, F., TIRRY, I. & VIÑUELA, E., 2003, Toxicity and absorption of azadirachtin, diflubenzuron, pyrifoxifen, and tebufenozide after topical application in predatory larvae of *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Environ. Entomol.*, 32: 196-203.
- MELENDEZ, P. A. & CARRILES, V. A., 2002, Molluscicidal activity of plants from Puerto Rico. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 96: 209-218.
- MORROW, D., CORRIGAN, D. & WALDREN, S., 2001, Development of a bioassay for phytochemicals using *Daphnia pulex*. *Planta Med.*, 67: 843-846.
- MYERSCOUGH, M., 1998, Herbal remedies. How much do you know? *Aust. Fam. Physician.*, 27: 1037-1040.
- NANO, G. M., BINELLO, A., BIANCO, M. A., UGAZIO, G. & BURDINO, S., 2002, *In vitro* tests to evaluate potential biological activity in natural substances. *Fitoterapia*, 73: 140-146.
- PÉREZ, D. & IANNACONE, J., 2004, Efecto insecticida de Sacha yoco (*Paullinia clavifera* var. *bullata* Simpson) (Sapindaceae) y oreja de tigre (*Tradescantia zebrina* Hort ex Bosse) (Commelinaceae) en el control de *Anopheles benarrochi* Gabaldon, Cova García y López, 1941, principal vector de malaria en Ucayali, Perú. *Ecol. Apl.*, 3: 64-72.
- PÉREZ, D. & IANNACONE, J., 2006, Efectividad de extractos botánicos de 10 plantas sobre la mortalidad y repelencia de larvas de *Rhynchophorus palmarum* L., insecto plaga del pijuayo *Bactris gasipaes* Kunth en la Amazonía del Perú. *Agric. Tec.* (Chile), 66: 21-30.
- PLOTKIN, M., 1988, The outlook for new agricultural and industrial products from the tropics: Natural pesticides. pp. 111-112. In: E. O. Wilson (ed.), *Biodiversity*. National Academy Press, Washington, D.C.
- RAMAN, K. V., PALACIOS, M. & MUJICA, N., 1993, *Control biológico de la polilla de la papa Phthorimaea operculella por el parasitoide Copidosoma koehleri*. Boletín de Capacitación CIP 3:28p. Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú.
- SANTA MARIA, A., LOPEZ, A., DIAZ, M. M., MUNOZ-MINGARRO, D. & POZUELO, J. M., 1998, Evaluation of the toxicity of guarana with *in vitro* bioassays. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 39: 164-167.
- SCHULTES, R. E., 1994, Amazonian ethnobotany and the search for new drugs. *Ciba Found Symp.*, 185: 106-112; discussion 112-115.
- SCHULTES, R. E. & RAFFAUF, R. F., 1990, *The healing forest: medicinal and toxic plant of the Northwest Amazonia* (Historical, Ethno- & Economic Botany, Vol. 2). Portland, Oregon, USA. 484 p.
- SCHUMUCK, R., 1997, Effects of Euparen® Mon honey bees and selected beneficial arthropods-information about the use of the pesticide during blossom and in IPM cultures. *Pflanz.-Nachr. Bayer*, 50: 233-246.
- TRAN, D. H., TAKAGI, M. & TAKASU, K., 2004, Effects of selective insecticides on host searching and oviposition behavior of *Neochrysocharis formosa* (Westwood) (Hymenoptera: Eulophidae), a larval parasitoid of American serpentine leafminer. *Appl. Entomol. Zool.*, 39: 435-441.
- TRUITI, M. C., FERREIRA, I. C., ZAMUNER, M. L., NAKAMURA, C. V., SARRAGIOTTO, M. H. & SOUZA, M. C., 2005, Antiprotozoal and molluscicidal activities of five Brazilian plants. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 38: 1873-1878.
- WERNERSSON, A. S., 2004, Aquatic ecotoxicity due to oil pollution in the Ecuadorian Amazon. *Aquat. Ecosyst. Health Managem.*, 7: 127-136.
- ZAMBLE, A., CARPENTIER, M., KANDOUSSI, A., SAHPAZ, S., PETRAULT, O., OUK, T., HENNUYER, N., FRUCHART, J. C., STAELS, B., BORDET, R., DURIEZ, P., BAILLEUL, F. & MARTIN-NIZARD, F., 2006, *Paullinia pinnata* extracts rich in polyphenols promote vascular relaxation via endothelium-dependent mechanisms. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 47: 599-608.



SETAC - Brazil

Comparação de Testes Ecotoxicológicos com *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) e *Daphnia magna* (Straus, 1820) Utilizando Remazol Brilliant Blue R e Água de Arroio Urbano

R. LANZER,* M. MÜLLER, M. DUMCKE & K. RASERA

Laboratório de Toxicologia, Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul,
C.P. 1352, CEP 95020-972, Caxias do Sul, RS, Brasil

(Received August 16, 2006; Accepted October 5, 2006)

RESUMO

O estudo visa comparar os efeitos do corante Remazol Brilliant Blue R e da água de arroio receptor de despejos mistos no desenvolvimento embrionário de *Biomphalaria tenagophila* e na reprodução de *Daphnia magna*. Posturas de *B. tenagophila* e jovens de *D. magna* foram expostos ao corante nas concentrações de 10 e 25 mg L⁻¹ e em água do arroio no estado bruto e diluição de 50%. O corante não teve efeito na taxa de eclosão, desenvolvimento e mortalidade dos embriões ($p > 0,05$). Quanto à reprodução de *D. magna*, foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) no número de neonatos em relação ao controle em ambas as concentrações do corante. As águas do arroio, em ambos os estados, provocaram mortalidade dos embriões entre 10 e 12 dias de exposição. Em *D. magna* houve diferença significativa no número de neonatos e na mortalidade, em relação ao controle, somente na exposição à água bruta. Os resultados indicam maior sensibilidade dos embriões de *B. tenagophila* à mistura de despejos domésticos e industriais presente em arroios urbanos, demonstrando sua utilidade no biomonitoramento da toxicidade aquática.

Palavras-chave: arroio urbano, *Biomphalaria tenagophila*, corante, desenvolvimento embrionário, reprodução de *Daphnia magna*, toxicidade crônica.

ABSTRACT

Comparative toxicological assays with *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) and *Daphnia magna* (Straus, 1820) using Remazol Brilliant Blue R and water from urban stream

The aim of this study was to compare the effects of Remazol Brilliant Blue R (RBBR) and polluted urban streams on the *Biomphalaria tenagophila* embryonic development test, in comparison to the *Daphnia magna* reproduction test. Eggs of *B. tenagophila* and *D. magna* neonates have been exposed to RBBR (10 and 25 mg L⁻¹ coloring concentrations) and 50% diluted and not diluted stream water. The dye was ineffective in alter the hatching rate, development and embryo mortality ($p > 0.05$). The reproduction of *D. magna* showed significant difference ($p < 0.05$) compared to control in both coloring concentrations. The stream water caused embryo mortality between 10 and 12 days in both cases. The neonates number and the mortality of *D. magna* differed significantly from the control only in the exposed undiluted stream water. The results from this study indicated that *B. tenagophila* embryos were more susceptible to complex mixtures in freshwater than *D. magna*, proving its usefulness as biological indicator in aquatic toxicity biomonitoring.

Key words: *Biomphalaria tenagophila*, coloring, *Daphnia magna* reproduction, embryonic development, toxicity chronic, urban stream.

*Corresponding author: Rosane Lanzer, e-mail: rlanzer@ucs.br.

INTRODUÇÃO

A predição realista do impacto ambiental em níveis subletais de compostos tóxicos individuais e, mais relevante, de misturas de substâncias tóxicas é o maior desafio da pesquisa na toxicologia ambiental (Rittschof & McClellan-Green, 2005).

As análises químicas são imprescindíveis na identificação e na quantificação de compostos químicos específicos no ambiente, mas aqueles não cobertos pela técnica analítica são negligenciados (Fent, 2003). Ensaio biológico permitem verificar o efeito de todas as substâncias contidas na água que estão biologicamente disponíveis, assim como avaliar a resultante de seus efeitos sinérgicos e antagônicos (Marschner, 1999). A ação de poluentes nos ecossistemas naturais pode ser medida por seus efeitos no processo reprodutivo de espécies-chave do ecossistema (Tripathi & Singh, 2004). Assim, a avaliação dos parâmetros que comprometem a manutenção de populações naturais é de extrema relevância na pesquisa ecotoxicológica.

Vários milhões de compostos químicos coloridos têm sido sintetizados nos últimos cem anos, dos quais cerca de 10.000 são produzidos em escala mundial (Guarati & Zanoni, 2000). As indústrias têxteis geram grande quantidade de resíduos com baixos níveis de degradação, e cerca de 15% dos corantes utilizados no processo de tingimento são perdidos no efluente (Dellamatrice & Monteiro, 2006).

Pela importância à saúde humana, espécies do gênero *Biomphalaria* (Preston, 1910) são bastante investigadas, o que favorece seu uso como organismo-teste, tendo sido publicados, no ano de 2005, cerca de 12.300 estudos sobre o gênero. Ensaio toxicológicos empregando espécies de *Biomphalaria* têm evidenciado sua importância como bioindicador na identificação da toxicidade aquática (Nakano et al., 2003; Salice & Miller, 2003; Oliveira-Filho et al., 2005). Com o objetivo de avaliar a sensibilidade da resposta do desenvolvimento embrionário de *B. tenagophila* (Orbigny, 1835) à mistura de substâncias presentes em arroios urbanos e a uma única substância, foi feita a comparação com *Daphnia magna* (Straus, 1820), organismo amplamente utilizado em testes de toxicidade aquática. O estudo visa contribuir com a elaboração de ensaios com novas espécies para verificar toxicidade crônica.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e regime de manutenção

Exemplares de *D. magna* foram obtidos a partir da cultura no Laboratório de Toxicologia da Universidade de Caxias do Sul, conforme norma estabelecida (NBR 12713, 2004). Os organismos foram mantidos em sala climatizada (23°C) com fotoperíodo de 16:8 horas (claro:escuro), luminosidade em torno de 2.000 Lux, em béqueres de 2000 mL. Os crustáceos foram alimentados uma vez por dia com algas clorofíceas, principalmente *Scenedesmus subspicatus* (10⁷ cels/cm³). *B.*

tenagophila foi trazida de tanques de cultivo, com 200 L de água natural, mantidos em estufa. Em laboratório, os moluscos foram aclimatados em mesmo meio e condições de *D. magna*, sendo alimentados com alface orgânica (*ad libitum*), complementada com ração para peixe.

Tratamento experimental

Posturas de *B. tenagophila* com menos de 24 horas foram cuidadosamente retiradas das paredes de béqueres, sendo contado o número de ovos e examinados os embriões ao estereomicroscópio. As massas de ovos de *B. tenagophila* e neonatos de *D. magna* foram expostos ao corante Remazol Brilliant Blue R (RBBR) nas concentrações de 10 e 25 mg L⁻¹ e à água de arroio poluído por despejos domésticos e industriais no estado bruto e na diluição de 50% em meio de cultivo. Os controles foram mantidos no meio de cultivo. Foram utilizadas quatro réplicas por meio, sendo duas séries experimentais para cada ensaio. A água foi coletada no arroio Tega, na região urbana de Caxias do Sul, RS. A cada dois dias, o meio foi substituído e os embriões de *B. tenagophila* foram observados quanto ao estágio de desenvolvimento, mortalidade e número de ovos eclodidos em 14 dias, pois a eclosão ocorre entre 9 e 16 dias (Santini, 2004). A taxa de mortalidade tolerada no controle foi de até 20%. Neonatos de *D. magna*, com idade entre 6 e 24 horas, foram aleatoriamente selecionados, sendo expostos cinco indivíduos nas concentrações testadas, as quais eram trocadas a cada 48 horas. O número de neonatos foi observado a partir da primípara e a mortalidade dos adultos, a cada 48 horas durante 21 dias. O número mínimo de nascimentos, que ocorre a partir de sete dias de exposição, foi em média 20 indivíduos por prole (NBR 12713, 2004), mantido o mesmo fotoperíodo do cultivo, em temperatura ambiente.

Amostras testadas:

1. Corante Remazol Brilliant Blue R (RBBR)

O RBBR é um corante reativo do grupo antraquinona que apresenta como característica alta solubilidade em água e o estabelecimento de ligação covalente entre o corante e a fibra, cuja ligação confere maior estabilidade da cor do tecido tingido, sendo empregado na indústria na concentração de 50 mg L⁻¹ (Rasera, 2006) e utilizado nas concentrações de 10 e 25 mg L⁻¹.

2. Água de arroio

O arroio Tega (Caxias do Sul, RS), com extensão de aproximadamente 33 km, é usado como fonte de escoamento de esgotos domésticos e industriais. As análises físico-químicas e biológicas realizadas em 2003 e 2004 (Santini, 2004) e os estudos de Reis (2002) evidenciaram a baixa qualidade da água e a presença de metais pesados como cobre, alumínio, chumbo, cromo, zinco e prata em níveis elevados, desconhecendo-se as concentrações de compostos orgânicos nocivos.

Análise estatística

A não normalidade na distribuição dos dados foi determinada pelo teste Kolmogorov-Smirnov e a significância das diferenças estatísticas, pelo teste de Mann-Whitney ($\alpha = 0,05$), utilizando o programa SPSS versão 11.5.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sistemas aquáticos relacionados ao meio urbano reúnem substâncias tanto de despejos domésticos como de efluentes industriais, constituindo misturas complexas. Santini (2004) avaliou a toxicidade da água dos arroios Tega e Pinhal, na cidade industrial de Caxias do Sul, no desenvolvimento embrionário de *B. tenagophila*, verificando retardo no desenvolvimento, presença de malformações e alta mortalidade dos embriões. O efeito de uma única substância sobre os organismos difere entre espécies e níveis de organização biológica e tem sido alvo de muitos estudos (Radix *et al.*, 2000; Tsui & Chu, 2003; Oliveira-Filho *et al.*, 2005). Para avaliar a sensibilidade da resposta dos embriões de *B. tenagophila*, este ensaio foi comparado ao teste de reprodução de *D. magna*, que é amplamente empregado no monitoramento da toxicidade (Laitano & Matias, 2006).

Os embriões de *B. tenagophila*, quando expostos ao corante RBBR, apresentaram retardo no desenvolvimento embrionário, redução na taxa de eclosão dos ovos e maior mortalidade dos embriões relacionados ao aumento da concentração (Tabela 1). Entretanto, não se constata diferença significativa dos resultados em relação ao controle ($p > 0,05$). Em *D. magna*, o número de neonatos sofreu redução de cerca de 50% em 10 mg L⁻¹ e de 75% em 25 mg L⁻¹, diferindo significativamente em relação ao controle e entre as duas concentrações (Figura 1). A mortalidade apresentou diferença estatística somente em uma das séries experimentais ($p < 0,05$).

Tóxicos orgânicos degradáveis são convertidos em outros compostos via série complexa de produtos intermediários, os

quais freqüentemente escapam à análise, e a degradação não pode ser sempre interpretada como destoxificação (Admiraal *et al.*, 2000). Nas exposições à água do arroio Tega, os embriões de *B. tenagophila* apresentaram alta mortalidade, sendo que entre 85% e 91% deles não ultrapassaram o estágio de trocófora na água em estado bruto (Tabela 2). Na água diluída do arroio, até 56% atingiram o hipo-estádio, mas não houve eclosão dos ovos. As diferenças entre as exposições à água do arroio e o controle foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$), não havendo diferença entre a água em estado bruto e a diluída. Nos ensaios com *D. magna*, exposta à água do arroio Tega, observa-se diferença significativa em relação ao controle somente na água em estado bruto ($p < 0,05$) (Figura 2). A mortalidade foi significativa na segunda série de testes entre o controle e a exposição à água bruta e entre esta e a água diluída do arroio ($p < 0,05$).

O desenvolvimento embrionário de gastrópodes límnicos tem sido empregado com sucesso para detectar efeitos tóxicos de metais (Gomot, 1998) e compostos orgânicos (Tate *et al.*, 1997; Lanzer *et al.*, 1999). Oliveira-Filho *et al.* (2005), por outro lado, encontraram que caracóis recém-eclodidos de *B. tenagophila* foram mais suscetíveis ao endossulfano, nonilfenol e etanol do que os embriões e adultos. A divergência entre os autores deve estar no *end point* escolhido. Enquanto Oliveira-Filho *et al.* (2005) testam a toxicidade aguda (mortalidade) em exposições até 96 horas, Tate *et al.* (1997) e Lanzer *et al.* (1999) avaliam a toxicidade crônica (reprodução). O uso de dados da toxicidade crônica é essencial para a avaliação ecotoxicológica de substâncias químicas (Radix *et al.*, 2000).

O ensaio com o desenvolvimento embrionário de *B. tenagophila* mostrou-se mais sensível que o teste de reprodução de *D. magna* na determinação da toxicidade crônica de misturas presentes em arroios poluídos por despejos domésticos e industriais. O estudo enfatiza a necessidade de testes com espécies e níveis de organização biológica distintos na predição do risco ambiental.

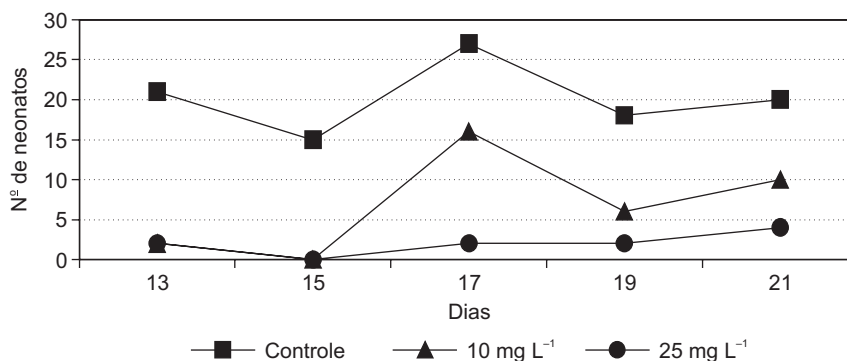


Figura 1 – Número médio de neonatos de *D. magna* exposta ao corante Remazol Brilliant Blue R (RBBR) nas concentrações de 10 e 25 mg L⁻¹ e controle.

Tabela 1 – Desenvolvimento embrionário de *B. tenagophila* exposta ao corante Remazol Brilliant Blue R (RBBR). A – Controle; B – 10 mg L⁻¹ do corante; C – 25 mg L⁻¹.

A						
Estágios/dias	Mórula	Trocófora	Véliger	Hipo-estágio	Eclosão	Mortalidade
0	100%	0%	0%	0%	0%	0%
2	0%	100%	0%	0%	0%	0%
4	0%	6%	94%	0%	0%	0%
6	0%	0%	3%	94%	0%	3%
8	0%	0%	0%	96%	0%	4%
10	0%	0%	0%	96%	0%	4%
12	0%	0%	0%	52%	44%	4%
14					94%	6%
B						
0	100%	0%	0%	0%	0%	0%
2	35%	65%	0%	0%	0%	0%
4	4%	56%	40%	0%	0%	0%
6	2%	9%	49%	40%	0%	0%
8	0%	9%	0%	88%	0%	3%
10	0%	0%	0%	88%	0%	12%
12	0%	0%	0%	85%	0%	15%
14				50%	35%	15%
C						
0	100%	0%	0%	0%	0%	0%
2	0%	99%	0%	0%	0%	1%
4	0%	7%	90%	0%	0%	3%
6	0%	7%	0%	90%	0%	3%
8	0%	0%	0%	90%	0%	10%
10	0%	0%	0%	90%	0%	10%
12	0%	0%	0%	82%	7%	11%
14				60%	27%	13%

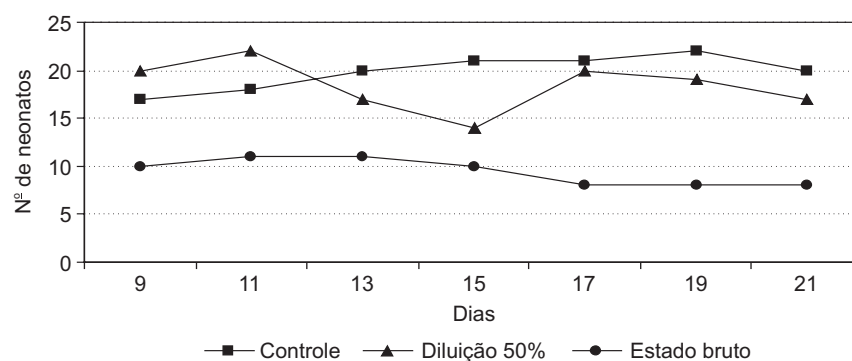


Figura 2 – Número médio de neonatos de *D. magna* exposta à água do arroio Tega, Caxias do Sul, RS, em estado bruto, diluída 50% e controle.

Tabela 2 – Desenvolvimento embrionário de *B. tenagophila* exposta à água do arroio Tega, Caxias do Sul, RS.
A – Controle; B – estado bruto; C – diluída 50%.

A						
Estágios/Dias	Mórula	Trocófora	Véliger	Hipo-estágio	Eclosão	Mortalidade
0	100%	0%	0%	0%	0%	0%
2	98%	0%	0%	0%	0%	2%
4	0%	96%	0%	0%	0%	4%
6	0%	0%	95%	0%	0%	5%
8	0%	0%	0%	95%	0%	5%
10	0%	0%	0%	87%	4%	9%
12	0%	0%	0%	44%	47%	9%
14					88%	12%
B						
0	100%	0%	0%	0%	0%	0%
2	97%	0%	0%	0%	0%	3%
4	13%	82%	0%	0%	0%	5%
6	0%	95%	0%	0%	0%	5%
8	0%	95%	0%	0%	0%	5%
10	0%	93%	0%	0%	0%	7%
12	0%	91%	0%	0%	0%	9%
14					0%	100%
C						
0	100%	0%	0%	0%	0%	0%
2	52%	47%	0%	0%	0%	1%
4	7%	58%	34%	0%	0%	1%
6	0%	32%	53%	14%	0%	1%
8	0%	32%	11%	56%	0%	1%
10	0%	32%	11%	56%	0%	1%
12	0%	32%	11%	56%	0%	1%
14					0%	100%

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADMIRAAL, W., BARRANGUET, C., VAN BEUSEKOM, S. A. M., BLEEKER, E. A. J., VAN DEN ENDE, F. P., VAN DER GEEST, H. G., GROENENDIJK, D., IVORRA, N., KRAAK, M. H. S. & STULJFZAND, S. C., 2000, Linking ecological and ecotoxicological techniques to support river rehabilitation. *Chemosphere*, 41: 289-295.

DELLAMATRICE, P. M. & MONTEIRO, R. T. R., 2006, Toxicidade de resíduos têxteis tratados por microorganismos. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, 1: 63-66.

FENT, K., 2003, Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicology Letters*, 140: 353-365.

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.

GUARATINI, C. C. I. & ZANONI, M. V. B., 2000, Corantes têxteis. *Química Nova*, 23: 71-78.

LAITANO, K. S. & MATIAS, W. G., 2006, Testes de toxicidade com *Daphnia magna*: uma ferramenta para avaliação de um reator experimental UASB. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, 1(1): 43-47.

LANZER, R., PFISTER, G., SCHRAMM, K-W. & KETTRUP, A., 1999, Evaluation of the toxicity of nonylphenol in the embryonic development of *Lymnaea stagnalis* (Linne). *Proceedings of SECOTOX 99, Fifth European Conference on Ecotoxicology and Environmental Safety*, Munich, Germany, GSF-Bericht 02/99, PF1, 4p.

MARSCHNER, A., 1999, Biologische Bodensanierung und ihre Erfolgskontrolle durch Biomonitoring. In: J. Oehlmann & B. Markert, *Ökotoxikologie, Landsberg. Ecomed.*, pp. 568-576.

NAKANO, E., WATANABE, L. C., OHLWILER, F. P., PEREIRA, C. A. B. & KAWANO, T., 2003, Establishment of the dominant lethal test in the freshwater mollusk *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *Mutation Research*, 536: 145-154.

NBR 12713, 2004, ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas.

- OLIVEIRA-FILHO, E. C., GERALDINO, B. R., GRISOLIA, C. K. & PAUMGARTTEN, F. J. R., 2005, Acute toxicity of endosulfan, nonylphenol ethoxylate, and ethanol to different life stages of the freshwater snail *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 75: 1185-1190.
- RADIX, P., LÉONARD, M., PAPANTONIOU, C., ROMAN, G., SAOUTER, E., GALLOTTI-SCHMITT, S., THIÉBAUD, H. & VASSEUR, P., 2000, Comparison of four chronic toxicity tests using algae, bacteria, and invertebrates assessed with sixteen chemicals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 47: 186-194.
- RASERA, K., 2006, *Desenvolvimento de membranas com atividade de lacases por imobilização do extrato enzimático de Pleurotus sajor caju*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, 90p.
- REIS, A. C. M., 2002, *Índice de qualidade do arroio Tega*. Monografia, Departamento de Engenharia Química, Universidade de Caxias do Sul.
- RITTSCHOF, D. & McCLELLAN-GREEN, P., 2005, Molluscs as multidisciplinary models in environment toxicology. *Marine Pollution Bulletin*, 50: 369-373.
- SALICE, C. J. & MILLER, T. J., 2003, Population-level responses to long-term cadmium exposure in two strains of a freshwater gastropod *Biomphalaria glabrata*: result from a life-table response experiment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22: 678-688.
- SANTINI, L. G., 2004, *Fertilidade e desenvolvimento embrionário de gastrópodes aquáticos como indicadores da toxicidade de arroios urbanos*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, 97p.
- 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.
- TRIPATHI, P. K. & SINGH, A., 2004, Toxic effects of cypermethrin and alphasmethrin on reproduction and oxidative metabolism of the freshwater snail, *Lymnaea acuminata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 58: 227-235.
- TSUI, M. T. K. & CHU, L. M., 2003, Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*, 52: 1189-1197.



SETAC - Brazil

Efecto de Malatión y de Maca (*Lepidium meyenii*) sobre la Espermatogenesis del Ratón (*Mus musculus*)

E. BUSTOS-OBREGÓN,^{1*} T. DIEDERICHS,² F. COSTA DEL RÍO² & L. SARABIA¹

¹Laboratorio de Biología de la Reproducción, Facultad de Medicina, Universidad de Chile,
Av. Independencia, 1027, Santiago de Chile

²Universidad Iberoamericana de Ciencias y Tecnología (UNICIT), Dieciocho 1680, Santiago de Chile

(Received August 21, 2006; Accepted November 24, 2006)

RESUMEN

El Malatión induce alteraciones testiculares ligadas a la disminución de fertilidad en distintas especies. Se utilizó el extracto de una planta (Maca) para analizar si ejerce un efecto antagónico a malatión, para lo cual se utilizaron 52 ratones de 12 semanas de edad, distribuidos en 4 grupos (Control, Maca, Malatión, Maca + Malatión) a los cuales se le administró Malatión o cloruro de sodio 0,9% vía intraperitoneal y/o Maca vía oral mediante sonda esofágica, con sacrificios a los días 1, 7, 14 y 21, en los que se determinó la frecuencia de los estados del ciclo del epitelio seminífero en cortes histológicos teñidos con Ácido Peryódico Schiff – Hematoxilina para la evaluación del acrosoma espermático. Los datos se analizaron con los test de ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis y análisis multivariable de Dunn. Al día 1 post tratamiento se observó con Maca y Malatión + Maca que aumenta el estadio XII y disminuye con Malatión. Por otra parte, al día 7 se observó aumento significativo del estadio VII en el grupo tratado con Malatión. Al día 14 se produjo aumento de los estadios VIII en el grupo tratado con Malatión, lo que fue evitado en el grupo tratado con Malatión + Maca, lo mismo ocurre al día 21 para el estadio IX. Los resultados sugieren que Malatión altera la frecuencia de estadios del ciclo en tanto que maca protege al túbulo seminífero de este daño.

Palabras claves: spermatogenesis, Maca, Malatión, túbulos seminíferos, epitelio seminífero.

ABSTRACT

Effect of Malathion and Maca (*Lepidium meyenii*) on spermatogenesis of mouse

Malathion induces testicular alterations related to decrease of fertility in different species. The extract of a plant (Maca) was utilized to analyze if it has an antagonistic effect to malathion. For this trial, for which 52 mice of 12 weeks of age were utilized, distributed in 4 groups (Control, Maca, Malathion, Maca + Malathion) and injected intraperitoneally with Malathion or NaCl 0.9% and/or Maca (given orally by means of an esophagic tube) mice were sacrificed at days 1, 7, 14 and 21. The frequency of the stages of the seminiferous epithelium was determined in histological sections stained with Peryodic Acid Schiff – Hematoxylin for the evaluation of the spermatic acrosomas. The data were analyzed with the non parametric test of ANOVA of Kruskal-Wallis, and multivariable analysis of Dunn. Al day 1 post treatment it was observed that the stage XII is more frequent with Maca and Malathion + Maca but diminishes with Malathion by day 7. A significative increase of the stage VII is found in the group treated with Malathion. Al day 14 an increase of the stage VIII is seen in the group treated with Malathion, which is not the case for group treated with Malathion + Maca, the same situations is found by day 21 in the stage IX. These results suggest that Malathion alters the frequency of stages of the cycle while Maca protects the tubules from this damage.

Key words: spermatogenesis, Maca, Malathion, seminiferous tubule, seminiferous epithelium.

*Corresponding author: Eduardo Bustos-Obregón, e-mail: ebustos@med.uchile.cl.

INTRODUCCIÓN

Hoy en día gracias a un conocimiento más acabado sobre plaguicidas organofosforados, se han creado nuevas estrategias de aplicación para estos productos agroquímicos. En 1950, se describe el Malatión compuesto organofosforado, ampliamente utilizado en la agroindustria, en cultivos de frutas y hortalizas, siendo hoy uno de los que producen mayor número de intoxicaciones agudas a nivel mundial (Hu *et al.*, 1989).

En Chile, existen antecedentes de importación de plaguicidas en el 2001, en el cual se importaron 17.942 toneladas, lo que llevó a un incremento de los casos de intoxicación, malformaciones e infertilidad principalmente en la población rural del país (MINSAL, 2002), por lo cual es importante evaluar su toxicidad y cómo los residuos de éstos contaminan el medio ambiente natural. Malathion por su alta liposolubilidad se acumula en tejidos grasos donde pueden ser liberados en forma de metabolitos activos (formas oxón). La intensidad y duración de los efectos farmacológicos dependen de su vía de administración, liposolubilidad y tiempo de degradación metabólica. Rodríguez & Bustos-Obregón (2000) demostraron que los organofosforados afectan la proliferación del epitelio seminífero disminuyendo la síntesis de ADN espermático. Atef *et al.* (1995) describen un efecto negativo sobre la masa testicular y motilidad espermática, induciendo aumentos en la mortalidad y en el número de anomalías morfológicas que presentan los espermatozoides.

Malatión se absorbe vía intestinal, respiratoria y dérmica, y el 90% de los metabolitos es excretado por vía renal, siendo el hígado el órgano reservorio por excelencia; su DL_{50} es variable según la vía de ingreso; Van Den Heuvel *et al.* (1990) reportan en ratones las DL_{50} por vía oral y dérmica de 1375 $mg\ kg^{-1}$ y 4400 $mg\ kg^{-1}$, respectivamente.

Maca (*Lepidium meyenii*) es una planta hipocotífla que se cultiva en los Andes Peruanos a una altura entre 3700 y 4500 m.s.n.m. (King, 1987), a la cual se le atribuyen acciones terapéuticas y nutricionales. Gonzáles *et al.* (2001) evaluaron su efecto en ratas sometidas a hipoxia hiperbárica, en las cuales incrementaron el recuento final de espermatozoides en los grupos tratados con Maca.

La espermatogénesis es un proceso complejo de división y diferenciación celular que conduce a la formación de espermatozoides, ésta comienza cuando los gonocitos se multiplican para producir diversas generaciones de espermatogonias y dan origen a espermatocitos primarios, los cuales entran en meiosis y originan finalmente células haploides, las espermátidas. Luego de un proceso de citodiferenciación, darán origen a los espermatozoides que, liberados fisiológicamente del epitelio germinal en el momento de la espermiación, discurren por la vía seminal, donde experimentan cambios morfológicos y funcionales conocidos como maduración (Bustos-Obregón, 1999). Los estadios del ciclo de la espermatogénesis lo constituyen grupos de células en similares estados de desarrollo y que van evolucionando sincrónicamente, agrupadas en asociaciones más o menos fijas.

Hay 12 estadios en el ratón y 14 en la rata. Cada estadio ocupa pequeños segmentos a lo largo del túbulo seminífero y la serie completa de los estadios del ciclo del epitelio seminífero constituye un ciclo, que en el ratón equivale en tiempo a 8,45 días y para espermatogénesis completa es de 33 días.

La hipótesis para este estudio postula que Malatión, administrado en dosis subletales, daña el epitelio seminífero disminuyendo la espermatogénesis y, por otra parte, Maca (*Lepidium meyenii*), por sus cualidades estimulantes, disminuye el efecto adverso del Malatión.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron 52 ratones machos (*Mus musculus*), cepa CF1, adultos con 12 semanas de edad y con peso que varió entre 30 y 32 gr., provenientes del bioterio del Laboratorio de Biología de la Reproducción de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Preparación del extracto acuoso de Maca

Por medio de la pulverización de las raíces secas hervidas en agua destilada por 30 minutos y posteriormente filtrada, se llega a una concentración de 333 $mg\ mL^{-1}$ de extracto de Maca seco en solución acuosa, se deja enfriar a temperatura ambiente para después ser almacenada en frascos y refrigerada a 4°C hasta su uso.

Los animales fueron distribuidos al azar en 4 grupos. Grupo 1 sólo se le administró Malatión 1/36 DL_{50} equivalentes a 80 $mg\ kg^{-1}$ de peso de ratón, vía intraperitoneal ($DL_{50} = 2880\ mg\ kg^{-1}$) solo una vez al día 0. Grupo 2 se trató solo con extracto de Maca en suspensión acuosa administrada diariamente por sonda esofágica en dosis de 666,6 $mg\ kg^{-1}$ de peso corporal. Grupo 3 recibió Malatión (solo una vez, vía intraperitoneal) y Maca diariamente en sus respectivas dosis y finalmente el cuarto grupo se usó como control, inyectando sólo suero fisiológico por vía intraperitoneal (solo una vez, día 0), para más tarde ser sacrificados (previa sedación con éter) a los días 1, 7, 14 y 21, respectivamente.

Evaluación histológica

Se fijaron los testículos en Bouin acuoso, e incluyeron en parafina. Posteriormente se realizaron cortes transversales ecuatoriales del testículo con un espesor de 5 μm , y teñidos con la técnica de ácido peryódico – Schiff y Hematoxilina, para luego ser observados al microscopio óptico con aumento de 1000. Se analizaron 200 túbulos por ratón, clasificándolos por estadios según la agrupación de células en el túbulo seminífero y determinando el grado de desarrollo del acrosoma.

Análisis estadístico

Se utilizó el test de ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de la comparación múltiple de Dunn, considerando el nivel $p < 0,05$ como significativo. Los resultados fueron expresados como promedios.

RESULTADOS

Día 1

Se observó una disminución de la frecuencia del estadio I en el grupo tratado con Maca al compararlo con el grupo tratado con Malatión + Maca también se observa una disminución del porcentaje en el estadio XII en los animales tratados con Malatión al compararlo tanto con el grupo control como al compararlo con el grupo Maca + Malatión (Figura 1).

Día 7

Siete días después del tratamiento se observa aumento significativo en la frecuencia del estadio VII en el grupo tratado con Malatión con respecto al control. Por otra parte, el estadio XII en el grupo tratado con Maca muestra disminución

significativa con respecto al control. Sin embargo, esta disminución es evitada en el grupo tratado con Malatión + Maca (Figura 2).

Día 14

Se observa aumento de la frecuencia de los estadios II y III en el grupo tratado con Malatión al compararlos con el grupo tratado con Maca + Malatión. Por otra parte, el estadio VIII aumenta significativamente su frecuencia en el grupo tratado con Malathion al compararlo tanto con el grupo control como con el grupo tratado con Malatión + Maca, en este último grupo se observa una inhibición del aumento de la frecuencia de este estadio encontrado en el grupo tratado solo con Malatión, lo que sugiere un efecto protector de Maca sobre la Integridad del epitelio seminífero (Figura 3).

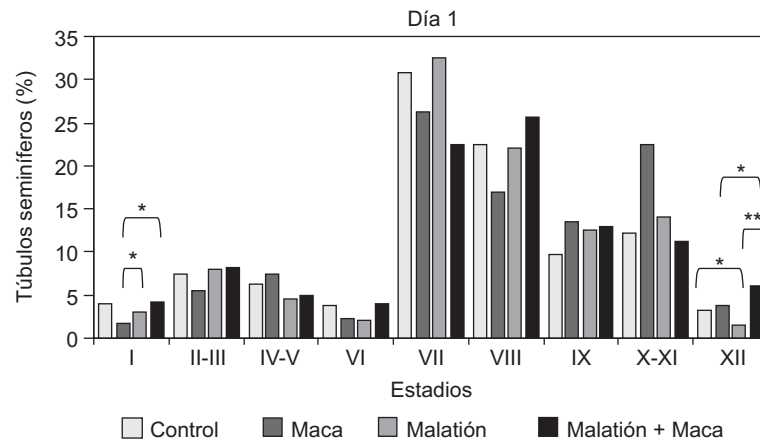


Figura 1 – Porcentaje de túbulos seminíferos de ratón cuantificados en microscopio óptico, día 1. Se observan diferencias al comparar los siguientes estadios. Estadios I Maca v/s Malatión y Maca v/s Maca + Malatión. Estadio XII Malatión v/s Control, Malatión v/s Malatión + Maca, Maca v/s Malatión + Maca. * p < 0,05; ** p < 0,01.

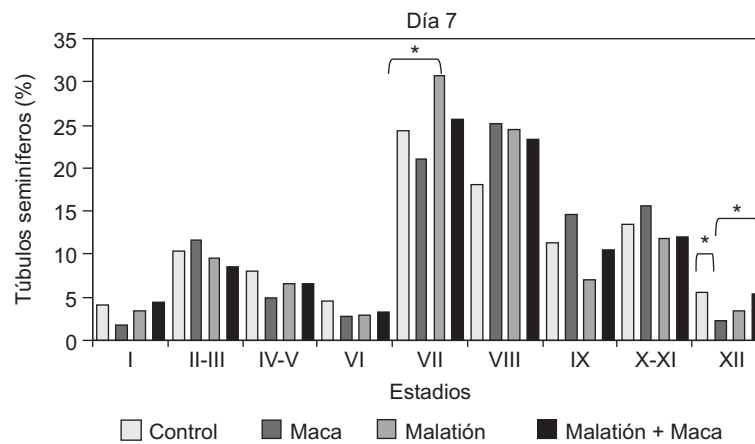


Figura 2 – Porcentaje de túbulos seminíferos de ratón cuantificados en microscopio óptico, día 7. Se observan diferencias al comparar los siguientes estadios. Estadio VII Malatión v/s control. Estadio XII Maca v/s control y Maca v/s Malatión + Maca. * p < 0,05.

Día 21

Se observa aumento de la frecuencia de los estadios II y III en el grupo tratado con Maca con respecto al grupo control como con el grupo Malatión + Maca, mostrando un efecto protector de Maca sobre este estadio, el grupo tratado con Malatión presenta aumento significativo con respecto al grupo Malatión + Maca, mientras que en el estadio VII se observa disminución de la frecuencia en el grupo tratado con Malatión

con respecto al control lo que no se observa en el grupo tratado con Malatión + Maca, sugiriendo un posible efecto protector de Maca sobre este estadio. El estadio IX muestra aumento en el grupo tratado con Malatión, lo que es evitado si se combina Malatión con Maca, y los estadios X y XI presentan aumento de la frecuencia en el grupo tratado con Maca en comparación al control, sugiriendo un efecto estimulador de Maca sobre este estadio (Figura 4).

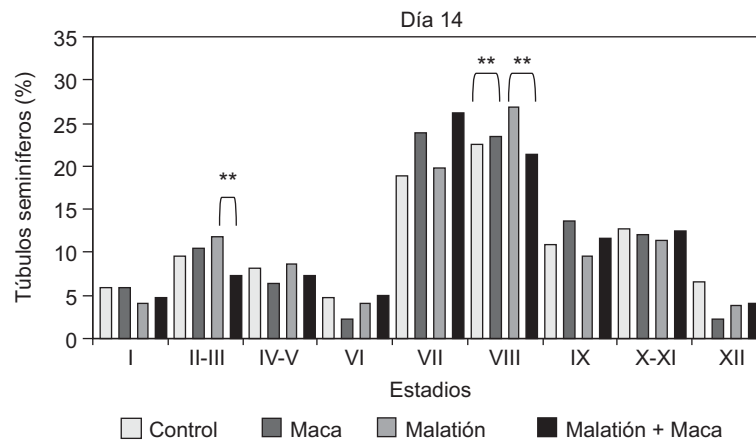


Figura 3 – Porcentaje de túbulos seminíferos de ratón cuantificados al microscopio óptico, día 14. Se observan diferencias al comparar los siguientes estadios. Estadios II y III, Malatión v/s Maca + Malatión. Estadio VIII, Malatión v/s Control y Malatión v/s o Malatión + Maca. ** p < 0,01.

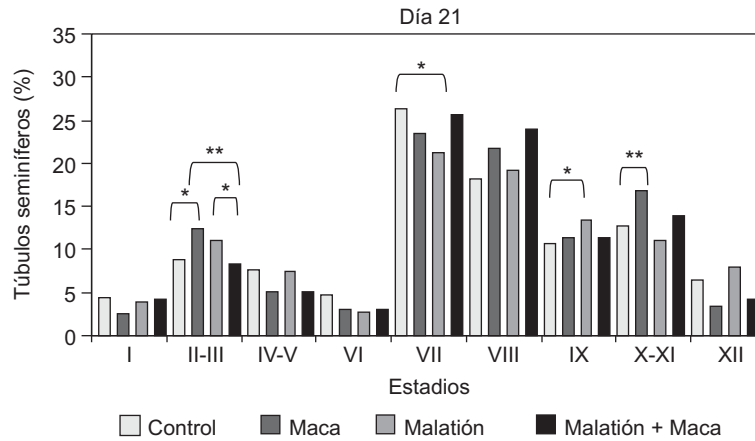


Figura 4 – Porcentaje de túbulos seminíferos de ratón cuantificados al microscopio óptico, día 21. Se observan diferencias al comparar los siguientes estadios. Estadios II y III Maca v/s Control y Maca v/s Malatión + Maca y el grupo tratado con Malatión v/s Malatión + Maca. Estadio VII Malatión v/s Control. Estadio IX Malatión v/s Control. Estadios X y XI Maca v/s control, presentan diferencias significativas. * p < 0,05.; ** p < 0,01.

DISCUSIÓN

Los compuestos organofosforados pueden tener efectos gonadotóxicos, induciendo una serie de alteraciones en la calidad del semen de algunos animales y del hombre, generándose de esta forma una acción deletérea sobre la espermatogénesis (Bustos-Obregón & Valenzuela, 1998). Motivados por estos antecedentes y el uso masivo de estos compuestos se planificó y realizó el presente trabajo experimental en ratones asociando un componente (Maca) que disminuiría tal efecto. Otros estudios indican que Maca (*Lepidium meyenii*) tendría un efecto protector sobre el daño gonadal provocado por diversos agentes físicos, como quedó demostrado en la investigación en ratones sometidos a hipoxia de altura, donde se evaluó la frecuencia relativa de los estados del ciclo del epitelio seminífero por la técnica de transiluminación (Bustos-Obregón *et al.*, 2005) y que se corroboran en nuestro estudio en donde Maca evitó la disminución del estadio XII producido por Malatión al día siguiente del tratamiento. La frecuencia relativa del estadio VIII fue aumentada de manera dosis dependiente en ratas tratadas con Maca considerando que la exposición a la altura redujo la espermiación (estadio VIII) en el grupo de animales que no fue tratado con Maca. En conclusión, el tratamiento de ratones con Maca previno la interrupción de la espermatogénesis inducida por la hipoxia. Otro estudio en relación con agentes físicos fue realizado en ratones sometidos a hipoxia hipobárica simulada en 4100 MSNM, confirmándose que la hipoxia ejerce efecto inhibitorio sobre las poblaciones celulares en división, en la espermatogénesis (Bustos-Obregón *et al.*, 2005).

Hay agentes químicos que se utilizaron en investigaciones de gran interés, como factores productores de daño gonadal, debido a uso masivo para distintas áreas, como ejemplo de esto tenemos los pesticidas organofosforados, que son elaborados artificialmente y aplicados para controlar las plagas de insectos. Sus características principales son su alta toxicidad, su baja estabilidad química y su nula acumulación en los tejidos, característica ésta que lo posiciona en ventaja con respecto a los organoclorados de baja degradabilidad y gran bioacumulación. Malatión es usado extensamente en todas partes del mundo, a pesar de que no se han estudiado todos sus efectos reproductivos. Bustos-Obregón & González-Hormazabal (2003) evaluaron el recuento epididimario de espermatozoides, teratozoospermia y nivel plasmático de testosterona, concluyendo que Malatión interfiere con la función testicular del ratón provocando una disminución del recuento espermático epididimario y en los niveles de testosterona y alteraciones estructurales en la morfología de las células germinales. Bustos-Obregón *et al.* (2005) utilizaron la técnica de transiluminación que consiste en observar de manera longitudinal una serie de túbulos seminíferos frescos montados "in toto", permitiendo de esta forma determinar las frecuencias relativas de los estadios

del ciclo del epitelio seminífero. Los resultados de ambos trabajos indican que algunos estadios se ven más alterados, lo que está en directa relación con aquellos que representan eventos importantes en el transcurso del ciclo espermatogénico; como lo es el estadio VIII donde se produce la espermiación, esto también ocurrió en el grupo tratado con Malatión. Sin embargo, Maca fue capaz de evitar el aumento de frecuencia en el estadio VIII a los 14 días después del tratamiento con el pesticida, lo que nos sugiere que se produce una espermiación normal.

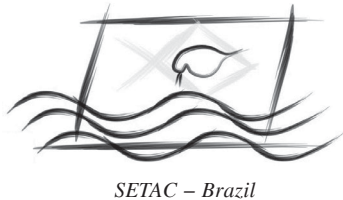
También fue evaluado tejido testicular de ratones de 7 días de edad, tratados con el organofosforado Paratión, demostrando la disminución del peso corporal y testicular y un daño temprano de las células germinales de efecto reversible donde la recuperación se presenta a intervalos largos post-inyección (Sobarzo, 2000).

En estudios posteriores fue evaluado el efecto de Malatión en ratones adultos donde se determinaron alteraciones en la frecuencia de los estadios del ciclo del epitelio seminífero provocando daño a nivel de las células germinales, más específicamente en las espermatogonias en renovación, desencadenando efectos posteriores en el desarrollo normal de la espermatogénesis donde se observó que algunos estadios fueron más vulnerables a la acción del pesticida (Bustos-Obregón *et al.*, 2005). En conclusión, se evidenció un efecto protector de Maca sobre estadios claves de la espermatogénesis en los grupos tratados con Malatión y un efecto estimulador al día 21 sobre los estadios II-III y X y XI. Ahora nos queda por aclarar el mecanismo molecular de tales efectos sobre el epitelio seminífero.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATEF, M., YOUSSEF, S., RAMADAN, A., NAWITO, M., EL-SAYED, M. & ABDEL-RAHMAN, H., 1995, Influence of Phoxim on testicular and seminal vesicle organs, testosterone and cholinesterase level and its tissue residues in male rats. *Dtsch. Tierärztl Wochenschr.*, 102: 1-5.
- BUSTOS-OBREGÓN, E., 1998, Andrología. 1. ed. Editorial Universitaria, Santiago de Chile, 21p.
- BUSTOS-OBREGÓN, E., GONZÁLEZ, J. & ESPINOZA, O., 2005, Melatonin as protective agent for the cytotoxic effects of diazinon in the spermatogenesis in the earthworm *Eisenia foetida*. *Ital. J. Anat. Embryol.*, 110(2): 159-165.
- BUSTOS-OBREGÓN, E., YUCRA, S. & GONZALES, G., 2005, *Lepidium meyenii* (Maca) reduces spermatogenic damage induced by a single dose of malathion in mice. *Asian J. Androl.*, 7(1): 71-76.
- BUSTOS-OBREGÓN, E. & GONZÁLEZ-HORMAZÁBAL, P., 2003, Mice testicular damage elicited by Malathion. *Int. J. Morphol.*, 21(2): 155-159.
- BUSTOS-OBREGÓN, E., VALENZUELA, M. & ROJAS, M., 1998, Agropesticides and testicular damage. Chapter 20. In: *Male reproduction. A multidisciplinary overview*. Edited by Martínez- García and Regadera. School of Medicine, Autonoma University, Madrid, Spain. Churchill Communications Europe España.

- GONZÁLES, G., GASCO, M., CORDOVA, A., CHUNGKIN, A., RUBIO, J. & VILLEGAS, L., 2001, Effect of *Lepidium meyenii* (Maca) roots on spermatogenesis of male rats. *Asian J. Androl.*, 3: 231-233.
- HU, H., COOK-DEEGAN, R. & SHUKRIL, A., 1989, The use of chemical weapons: conducting an investigation using survey epidemiology. *Am. J. Anat.*, 262: 640-643.
- KING, S., 1987, Four endemic andean tuber crops: Promising Food Resources for Agricultural Diversification. *Moun. Res. Develop.*, 7(1): 43-52.
- MINISTERIO DE SALUD DE CHILE (MINSAL), 2002, Departamento de Epidemiología. *Situación epidemiológica de las intoxicaciones por plaguicidas*. <http://epi.minsal.cl/epi/html/vigilan/tevep/intox.1998.pdf>.
- RODRÍGUEZ, H. & BUSTOS-OBREGÓN, E., 2000, An *in vitro* model to evaluate the effect of an organophosphoric agropesticide on cell proliferation in mouse seminiferous tubules. *Andrologia.*, 32: 1-5.
- SOBARZO, C. & BUSTOS-OBREGÓN, E., 2000, Sperm quality in mice acutely treated with Parathion. *Asian J. Androl.*, 2(2): 147-150.
- VAN DEN HEUVEL, M., CLARCK, D., FIELDER, R., KOUNDAKJIAN, P., OLIVER, G., PELLING, D., TOMLINSON, N. & WALTER, A., 1990, The international validation of a fixed dose procedure as an alternative to the classical LD50 test. *Food Chem. Toxicol.*, 28: 469-482.



SETAC - Brazil

Kidney Histology of Mice After Seven Days Oral Intake of Cyanobacterial Extract

E. G. CARVALHO,^{1*} R. B. SOTERO-SANTOS,¹ C. B. R. MARTINEZ,³ E. C. FREITAS,¹
N. FENERICH-VERANI,² M. J. DELLAMANO-OLIVEIRA¹ & O. ROCHA¹

¹Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva; ²Departamento de Hidrobiologia,
Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil

³Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Fisiológicas,
Campus Universitário Perobal, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil

(Received August 16, 2006; Accepted December 13, 2006)

ABSTRACT

At the end of the dry season, during October 2004, a dense cyanobacteria bloom was observed in Monjolinho Reservoir (São Carlos city, São Paulo State, Brazil), and a great amount of scum accumulated on the water surface. Samples were collected in order to identify phytoplankton species and to determine its toxicity. *Anabaena circinalis* and *Anabaena spiroides* were the dominant species in this bloom. Initially, mouse bioassays (LD₅₀-24 h) and analysis by ELISA were performed, to detect toxic compounds in crude extracts of the natural samples. After toxicity was confirmed, an oral chronic toxicity test was carried out using three doses of cyanotoxins, in male *Swiss albino* mice, for 7 days. To prepare the extract, cyanobacterial cells were broken by repeated freeze and thaw cycles. Mice received the following doses of crude cyanobacterial extract diluted in drinking test solutions: 0.5 mg L⁻¹; 1.0 mg L⁻¹ and 2.0 mg L⁻¹. Mortality, clinical signs, body weight and weight gain were recorded during the study. In addition, histological slides were prepared to detect toxic injuries to the kidney. Toxin analysis by ELISA revealed 1.77 to 6.12 µg L⁻¹ total microcystins in the mouse drinking water. This study indicated that administration of low doses of cyanotoxins in mouse drinking test solutions did not result in histological injury in the kidney of animals exposed to cyanotoxins, as observed by optical microscopy.

Key words: cyanobacterial blooms, *Anabaena circinalis*, *Anabaena spiroides*, chronic tests, oral toxicity, kidney histology.

RESUMO

Histologia renal de camundongos após sete dias de ingestão oral de extrato de cianobactéria

No final da estação seca, durante o mês de outubro de 2004, ocorreu densa floração de cianobactérias na comunidade fitoplanctônica do reservatório do Monjolinho (São Carlos, SP, Brasil), com grande quantidade de biomassa algal se acumulando na superfície da coluna d'água. Amostras de água foram coletadas para determinação da densidade e abundância relativa das espécies e para determinação da toxicidade. *Anabaena circinalis* e *Anabaena spiroides* foram as espécies dominantes na floração. Inicialmente foram realizados bioensaios com camundongos (LD₅₀-24 h), sendo feita a quantificação de toxinas pelo método ELISA para detectar a concentração total de microcistinas. Após confirmação da toxicidade foram realizados testes crônicos em camundongos da linhagem *Swiss albino*, testando-se três concentrações de toxinas, em experimento com duração de 7 dias. Para a preparação do extrato, as células das cianobactérias foram submetidas a um ciclo de repetidos congelamentos e descongelamentos. Os camundongos receberam as seguintes doses de extrato bruto diluído em água mineral: 0,5 mg L⁻¹; 1,0 mg L⁻¹ e 2,0 mg L⁻¹. A mortalidade, sinais clínicos, peso corporal e ganho de peso foram registrados. Em adição, cortes histológicos foram realizados para análises do rim. A análise de toxinas pelo método ELISA indicou concentrações entre 1,77 e 6,12 µg L⁻¹ de microcistina total na água ingerida pelos camundongos. Este estudo indica que a administração de baixas concentrações de cianotoxinas via ingestão oral não resultou em toxicidade nem em injúria histológica no rim dos animais expostos às cianotoxinas.

Palavras-chave: florações de cianobactérias, *Anabaena circinalis*, *Anabaena spiroides*, testes crônicos, toxicidade oral, histologia renal.

*Corresponding author: Elisa Garcia Carvalho, e-mail: elisa.garciacarvalho@gmail.com.

INTRODUCTION

Toxic cyanobacteria found in eutrophic water bodies used for public supply are dangerous because they produce lethal toxins that affect wild and domestic animals, sometimes even to humans (Carmichael *et al.*, 1985; Carmichael, 1994; Dawson, 1998; Nasri *et al.*, 2004). It is now common knowledge that species belonging to certain genera of cyanobacteria, such as *Anabaena*, *Microcystis*, *Nostoc* and *Oscillatoria*, produce hepatotoxic peptides, named microcystins, and neurotoxic alkaloids. Chronic exposure to microcystins (MC) contaminating drinking water can induce human liver cancer (Nishiwaki-Matsushima *et al.*, 1992). In Caruaru, Brazil, patients suffered liver failure and death after exposure to microcystins at a Hemodialysis Center, because the water was contaminated (Jochimsen *et al.*, 1998). Chronic treatment of rats with intraperitoneal injections of sublethal doses of microcystins MC-LR and MC-YR revealed collapsed glomeruli with thickened basement membranes and dilated tubuli (Milutinovic *et al.*, 2003). In a preliminary study, the crude extract from a recent cyanobacterial bloom in SE Brazil was seen to cause histological alterations in the liver of *Swiss albino* mice (24 h-LD₅₀ = 297.30 mg kg⁻¹) submitted to acute toxicity test (unpublished data). An oral chronic toxicity test was performed using three doses of cyanotoxins in male mice for 7 days, in drinking water: 0.5 mg L⁻¹; 1.0 mg L⁻¹ and 2.0 mg L⁻¹. No mortality and none histological injury in liver of animals exposed to cyanotoxins were observed. The present study was thus carried out to discovery whether the same concentrations of the same natural cyanobacterial extract could affect the mouse kidney histology.

MATERIALS AND METHODS

Description of the study area

The site of this study is a small and shallow artificial reservoir (Figure 1) located at São Carlos city, São Paulo State, Brazil, formed by the damming of the Monjolinho River (21° 59' 8.4" S and 47° 52' 45" W).

Phytoplankton sampling

Samples used in this study were taken on October 25th, 2004, near the dam. For the quantitative and qualitative studies of the phytoplankton community, samples were collected in Van Dorn bottles and with a 20 µm mesh phytoplankton net, respectively, transferred to flasks of known volume and preserved, respectively, in Lugol's iodine and 4% formaldehyde solution, maintained in a cool and dark place until the time of analysis. The phytoplankton was counted by the inverted microscope technique of Utermöhl (1958). Filaments of *Anabaena* were counted and converted to cell numbers using the mean cell number per filament in the sample (68 cells per filament of *Anabaena circinalis* and 101 for *A. spiroides*).

Preparation of crude cyanobacterial extract

Lyophilized bloom material (collected on October 25th, 2004) was suspended in drinking water, frozen at -20°C and thawed at room temperature. This freeze and thaw cycle was repeated 4 times. After the last cycle, the thawed material was ultrasonicated 3 times for 1 min. Finally, debris were removed by centrifuging at 2800 × g for 5 min.

Animals

Twelve male *Swiss albino* mice weighing from 20 to 30 g at the beginning of the experiment were used in the study. The mice were housed in standard plastic cages with sawdust cover on the floor. They were maintained on a 12 h light-dark cycle, at room temperature, with free access to pellets chow and tap water. The animals were obtained from Federal University of São Carlos.

Oral toxicity test

Oral toxicity tests were performed during a week. Experimental test solutions at the concentrations of 0.5, 1.0 and 2.0 mg mL⁻¹ of cyanobacterial extract were supplied to the mice whereas the control group received only drinking water. During the 7-days exposure, the test solutions were renewed 3 times per week in order to reduce toxins degradation in the test solutions supplied. All groups were allowed to drink "ad libitum". At the beginning of the experiment toxin concentrations were measured in experimental test solutions. The drinking bottles were covered with aluminum foil to avoid the degradation of toxins by light. Animals were weighted at the beginning and at the end of the experiment and weight gain determined. Mice were fed daily with standard pellet chow and at the end of the experiment they were sacrificed. Kidneys were removed and fixed in Bouin's solution for histological analysis.

Microcystin analysis

Total microcystin concentrations in test solutions were performed by ELISA immunoassay (Enzyme-linked immuno assay) with a Microcystin Plate Kit (Beacon Analytical Systems Inc.). Spectrophotometric analysis was carried out at 450 nm. The results were expressed as µg L⁻¹ total microcystin. The analytical procedure used was that described by Chu *et al.* (1990).

Histological analysis

After overnight fixing, kidney samples were dehydrated through a graded ethanol series, paraffin wax-embedded and cut in sections (7 µm) and mounted on slides. After deparaffinization in xylene, sections were rehydrated through a graded ethanol series, stained with haematoxylin and eosin (HE) and dehydrated through a graded again and cleared in xylene and mounted with Canada balsam for histological assessment under the light microscopy.

Statistical analysis

In order to identify the significant differences between body weights of the mice, the Kruskal-Wallis (KW) non-parametric test (at level of significance, $p = 0.05$) was employed.

RESULTS

The results of the phytoplankton analyses showed that community of Monjolinho reservoir was dominated by *Anabaena circinalis* and *Anabaena spiroides* (Cyanophyceae). This group represented more than 60% of the total algae present (Figure 2). Cyanobacterial cell density in the reservoir in the

sampling day was 0.35×10^6 for *A. circinalis* and 0.32×10^6 for *A. spiroides*, respectively. Other species belonging to the following taxonomic classes also occurred: Chlorophyceae, Bacillariophyceae, Xanthophyceae and Conjugatophyceae, although at low numbers.

After the oral intake of cyanobacterial extract the results evidenced that no mortality occurred during 7-d exposure to water with toxins. The results from histological analyses were shown in the Figure 3: a-h. No changes in the kidney histology were observed by light microscopy. The results of final body weight and weight gain of the mice were shown in the Table 1. The treatments did not differ among them and the control (Table 1).

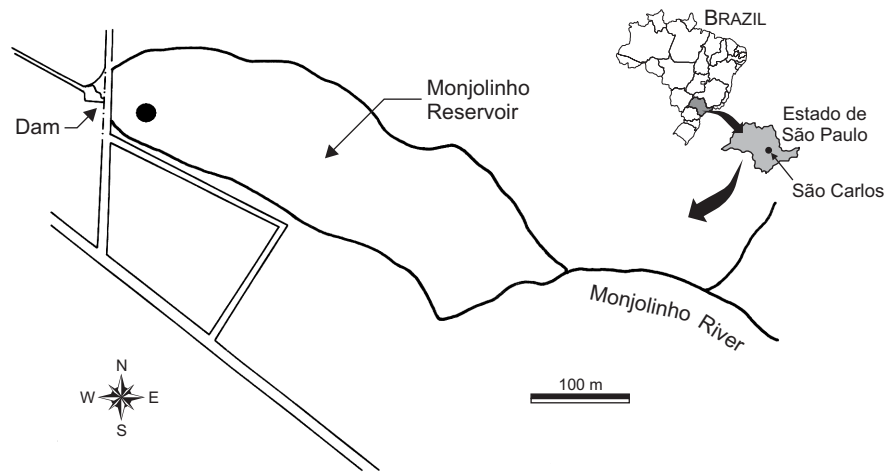


Figure 1 – Geographical location of studied reservoir in São Carlos city (São Paulo State, Brazil). The dot shows the location of the sampling site. Scale: 1:100,000.

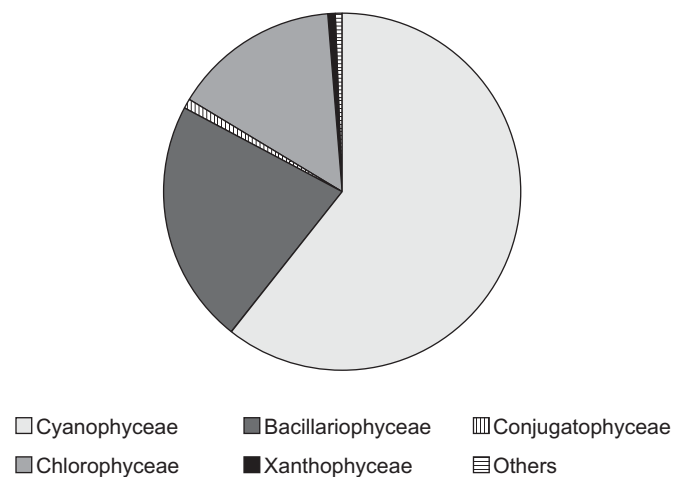


Figure 2 – Relative abundance of dominant groups in the phytoplankton community of Monjolinho Reservoir, on October 25th, 2004.

The measured concentrations of microcystin from the test solutions are also shown in Table 1. Data obtained here showed clearly that as the extract concentration increased, the microcystin concentrations equally increased.

DISCUSSION

In the present experiment we aimed to explore some of the cellular mechanisms that could be responsible for the kidney injury induced by chronic treatment with cyanobacterial extract containing microcystins. Some studies have reported that chronic and acute cyanotoxins exposure can cause kidney damage (Nobre et al., 1999, 2003; Milutinovic et al., 2002; Milutinovic et al., 2003; Moreno et al., 2005). In contrast, our results showed that oral ingestion of MCs in the form of extract (ranging from 0.5, 1.0 and 2.0 mg mL⁻¹) of a lyophilized from *Anabaena* bloom during 7 days, apparently did not result in histological alterations of kidney, as observed by light microscopy.

The amount of microcystin present in the test solutions varied between 1.77 and 6.12 µg L⁻¹. The maximum concentration of MCs allowed in drinking water for human consumption is 1.0 µg L⁻¹ (WHO, 1998) consequently the concentration of total MC contained in the highest concentration tested here was up to 6 times the allowed value for human consumption. Moreover, the dominant species in this bloom were *Anabaena circinalis* and *A. spiroides*. It is known that these species from *Anabaena* genus also produce neurotoxins (Beltran & Neilan, 2000). Therefore, some histological effect in the kidney could be expected.

We can think of two possible explanations, hypothetically: although microcystin concentrations present in the solutions test were high, the period of exposure was short and not enough to cause histological effects. Another fact is that in the present work the microcystin concentration measured represented all variants present in the sample whereas in those studies purified microcystin of a toxic strain was used, possibly with higher toxicity than that in the extract we used.

Table 1 – Extract concentration in drinking test solutions, microcystin concentration, initial and final body weight and weight gain.

Extract concentration in drinking water	Microcystin concentration (µg L ⁻¹)	Animal	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Weight gain (g)
0.0 mg mL ⁻¹ (Control group)	–	1	31.3	35.8	4.5
		2	30.1	36.2	6.1
		3	36.9	42.7	5.8
		Mean	32.8 ± 2.1	38.2 ± 2.2	5.5 ± 0.5
0.5 mg mL ⁻¹	1.77	1	36.3	43.4	7.1
		2	32.6	36.5	3.9
		3	34.0	39.6	5.6
		Mean	34.3 ± 1.1	39.8 ± 2.0	5.5 ± 0.9
1.0 mg mL ⁻¹	2.32	1	33.7	37.4	3.7
		2	32.9	34.8	1.9
		3	29.7	38.1	8.4
		Mean	32.1 ± 1.2	36.8 ± 1.0	4.7 ± 1.9
2.0 mg mL ⁻¹	6.12	1	28.5	37.2	8.7
		2	29.4	36.4	7.0
		3	30.0	31.6	1.6
		Mean	29.3 ± 0.4	35.1 ± 1.7	5.8 ± 2.1
KW			3.0	0.49	
P			0.39	0.92	

KW = Kruskal-Wallis test; p = probability (significance level p < 0.05).

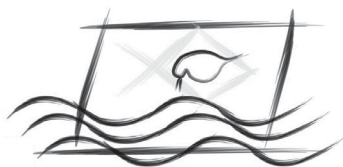
It is important also to observe that at the end of the tests all mice from the treatments with toxins had body weights and weight gain similar to control. Additionally no mortality and no other reactions or changes in behavior such as hunched posture or reduced motor activity were observed until the end of the experiment.

Fawell *et al.* (1999) testing the adverse effect of purified microcystin on mouse liver have found that microcystin-LR is 30-100 times less toxic via oral ingestion than via intraperitoneal injection. Therefore, in a next step it will be relevant to characterize the dominant type of microcystin present in Monjolinho Reservoir cyanobacterial blooms in order to better interpreting the results here obtained.

Acknowledgements — We are grateful to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processos 03/00352-2, 01/13213-5 and 02/08341-7) for financial support and fellowships during the course of this work.

REFERENCES

- BELTRAN, E. C. & NEILAN, B. A., 2000, Geographical segregation of the neurotoxin-producing cyanobacterium *Anabaena circinalis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(10): 4468-4474.
- CARMICHAEL, W. W., JONES, C. L. A., MAHMOOD, N. A. & THEISS, W. C., 1985, Algal toxins and water based diseases. *CRC Crit. Rev. Environ. Contam.*, 15: 275-313.
- CARMICHAEL, W. W., 1994, The toxins of cyanobacteria. *Sci. Am.*, 270: 78-86.
- CHU, F. S., HUANG, X. & WEI, R. D., 1990, Enzyme-linked immunosorbent assay for microcystins in the blue-green algal blooms. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, 73: 451-456.
- DAWSON, R. M., 1998, The toxicology of microcystins – review article. *Toxicon*, 36: 953-962.
- JOCHIMSEN, E. M., CARMICHAEL, W. W., AN, J., CARDO, D. M., COOKSON, S. T., AHOLMES, C. E. M., ANTUNES, M. B., DE MELO, D. A., LYRA, T. M., SPINELLI, V. T., AZEVEDO, S. M. F. O. & JARVIS, W. R., 1998, Kidney failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *N. Engl. J. Med.*, 338: 873-878.
- FAWELL, J. K., MITCHELL, R. E., EVERETT, D. J. & HILL, R. E., 1999, The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: I Microcystin – LR. *Hum. Exp. Toxicol.*, 18: 162-167.
- MILUTINOVIC, A., ZIVIN, M., SEDMAK, B., HORVAT-ZNIDARSIC, I. & SUPUT, D., 2002, Renal injuries induced by chronic intoxication with microcystins. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 7(1): 139-141.
- MILUTINOVIC, A., ZIVIN, M., ZORC-PLESKOVIC, R., SEDMAK, B. & SUPUT, D., 2003, Nephrotoxic effects of chronic administration of microcystin – LR and – YR. *Toxicon*, 42: 281-288.
- MORENO, I., PICHARDO, S., JOS, A., GÓMES-AMORES, L., MATE, A., VAZQUEZ, C. M. & CAMEÁN, A. M., 2005, Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to microcystin – LR administered intraperitoneally. *Toxicon*, 45: 395-402.
- NASRI, A-B., BOUAÏCHA, N. & FASTNER, J., 2004, First report of a Microcystin-containing bloom of the Cyanobacteria *Microcystis* spp. in lake Ouberia, Eastern, Algeria. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 46: 197-202.
- NISHIWAKI-MATSUSHIMA, R., OHTA, T., NISHIWAKI, S., SUGANUMA, M., KOHYAMA, K., ISHIKAWA, T., CARMICHAEL, W. W. & FUJIKI, H. J., 1992, Kidney tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *Cancer Res. Clin. Oncol.*, 118: 420-424.
- NOBRE, A. C. L., JORGE, M. C. M., MENEZES, D. B., FONTELES, M. C. & MONTEIRO, H. S. A., 1999, Effects of microcystin – LR in isolated perfused rat kidney. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 32: 985-988.
- NOBRE, A. C. L., MARTINS, A. M. C., HAVT, A., BENEVIDES, C., LIMA, A. A. M., FONTELES, M. C. & MONTEIRO, H. S. A., 2003, Renal effects of supernatant from rat peritoneal macrophage activated by microcystin – LR: role protein mediators. *Toxicon*, 41: 377-381.
- WHO, 1998, *Guidelines for drinking-water quality*. 2nd ed. Addendum to volume 2. Health criteria and other supporting information. World Health Organization, Geneva.
- UTERMÖHL, H., 1958, Zur Vervollkommnung der quantitativen phytoplankton: methodic. *Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie Mitteilungen*, 9: 1-38.



SETAC - Brazil

O Ensaio Cometa na Avaliação da Genotoxicidade Induzida por Poluentes Atmosféricos Utilizando como Biomonitor o Molusco *Cantareus aspersus* (Müller, 1774)

J. DA SILVA,^{1*} N. SIMEONI,¹ A. A. GROFF,¹ M. IANISTCKI,¹ V. BENVENÚ¹ & N. T. SCHRÖDER²

¹Laboratório de Genética Toxicológica, PPGTA, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS

²Laboratório de Poluição Ambiental, PPGEAM, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS

(Received August 16, 2006; Accepted December 18, 2006)

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi verificar a viabilidade do uso do molusco terrestre *Cantareus aspersus* (Müller, 1774) como biomonitor e a metodologia do Ensaio Cometa como biomarcadora de dano genético, por meio da exposição dos organismos a poluentes atmosféricos da área estudada. Os moluscos foram expostos às condições atmosféricas na estação de climatologia do Campus da Ulbra, Canoas (RS), por 7, 15 e 30 dias em duas estações: inverno de 2004 e verão de 2005. O grupo-controle não foi exposto, permanecendo no laboratório sob condições controladas. Células de pulmão e hemolinfa foram analisadas por meio do Ensaio Cometa, um teste rápido e sensível na quantificação de lesões e detecção de efeitos de reparo no DNA. Foram analisadas 100 células/indivíduo/tecido e classificadas visualmente em cinco classes: sem danos – classe 0; até danos máximos – classe 4. Os resultados mostraram que as células pulmonares são mais sensíveis que as células da hemolinfa. Quanto maior o tempo de exposição, mais danos ao DNA eram causados. Em relação às estações do ano, verificaram-se níveis de danos maiores que os controles de forma significativa, porém sem grandes diferenças entre as estações. O organismo e o método utilizado mostraram-se baratos, efetivos e sensíveis no estudo envolvendo biomonitoramento de organismos expostos aos diversos poluentes atmosféricos.

Palavras-chave: biomonitoramento, Ensaio Cometa, *Cantareus aspersus*, poluição atmosférica.

ABSTRACT

Evaluation of genotoxicity induced by atmospheric pollution using the land mollusk *Cantareus aspersus* (Müller, 1774) as biomonitor and the Comet Assay as biomarker

The objective of this work was to investigate the viability of using the land mollusk *Cantareus aspersus* (Müller, 1774) as biomonitor and the Comet Assay as biomarker, exposing organisms to atmospheric pollutants. Organisms were exposed to air at the Ulbra University campus climatic control station (Canoas, RS) for 7, 15 and 30 days, in the winter/2004 and in the summer/2005. Our control group, not exposed, was kept in the laboratory, under controlled conditions. Lung cells and hemolymph cells were evaluated through Comet Assay, which shows sensitive results in a short time in quantifying lesions and detecting DNA repair effects. 100 cells/individual/tissue were analyzed and visually classified into five classes (0 – no effect to 4 – maximum damage). Results show that pulmonary cells are more sensitive than hemolymph cells. Longer exposition time produced more DNA damage. Considering climatic seasons, no significant differences were detected between them. Both organisms and method showed to be cheap, effective and sensitive in our study, for biomonitoring atmospheric pollution.

Key words: biomonitoring, Comet Assay, *Cantareus aspersus*, atmospheric pollution.

*Corresponding author: Juliana da Silva, e-mail: juliana.silva@ulbra.br.

INTRODUÇÃO

A emissão de gases tóxicos e de material particulado na atmosfera tem crescido em quase todas as grandes aglomerações urbanas e industriais do mundo, afetando não só a qualidade local do ar, mas produzindo efeitos que se manifestam a grandes distâncias e a longo prazo. Os ventos podem transportar os poluentes para longe, submetendo novas áreas a chuvas ácidas que causam danos à vegetação e contaminam o solo.

Veículos e indústrias são dois dos maiores fornecedores de agentes da poluição. Chaminés despejam, sem parar, toneladas de enxofre, óxido de nitrogênio, ácido sulfúrico, dióxido de enxofre, ácido fluorídrico, hexacloro de benzeno, sulfeto de carbono, cloro, fenóis e outras substâncias nocivas (Freire, 2000).

A exposição às emissões provenientes dos motores dos veículos tem sido considerada preocupante pelos seus efeitos na saúde humana em longo prazo. Nas cidades, os automóveis são responsáveis por considerável parcela da poluição do ar (cerca de 80%), já que os gases produzidos pelos motores, via explosão, contêm diversos poluentes sabidamente genotóxicos, como: óxidos de nitrogênio (NO e NO₂) (Victorin, 1994) e monóxido de carbono, derivados oxigenados dos hidrocarbonetos, como aldeídos e peróxidos, partículas residuais da combustão, além de chumbo, até a pouco adicionado como antidetonante à gasolina. Todos esses compostos isolados ou associados a outros elementos são tóxicos ou de efeito danoso aos organismos, de forma não totalmente esclarecida. Traços de outras substâncias perigosas, como cádmio e níquel, também são encontrados. O vento e as chuvas provocam a precipitação desses elementos, contaminando as águas e o solo e colocando em risco a vida humana e o meio ambiente por terem efeito cumulativo. A EPA (Environmental Protection Agency – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos) atribui a essas substâncias tóxicas emitidas pelos carros a metade dos casos de câncer causados por substâncias presentes no ar. Alguns estudos experimentais e evidências epidemiológicas indicam que a gasolina e o óleo diesel têm efeito mutagênico e/ou carcinogênico em animais e no homem (Crebelli et al., 1995).

As emissões do tráfego são as principais fontes da poluição do ar das regiões urbanas (Mage et al., 1996). A cidade de Canoas, além de possuir tráfego intenso, tanto nas rodovias que a cortam como nas principais avenidas, também recebe as emissões de indústrias localizadas em sua região metropolitana. Apesar disso, a poluição em sua atmosfera ainda não foi devidamente caracterizada e não há controles sistemáticos da poluição existente. Por isso é necessário que se ponha em prática projetos de monitoramento da qualidade do ar e dos efeitos que os poluentes têm sobre os seres vivos expostos, incluindo testes de genotoxicidade e monitoramento de populações humanas para conhecimento e prevenção de doenças públicas e ocupacionais que afetam grande parte da sociedade atual. Para este estudo escolheu-se *Cantareus aspersus* como organismo biomonitor por ser bastante resistente,

possuir aclimação fácil e ainda não ter sido descrito o Ensaio Cometa para moluscos terrestres em avaliação ecotoxicológica.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de estudo

Tendo em vista os objetivos traçados, o local utilizado para exposição dos organismos à poluição atmosférica foi a estação de climatologia do campus Universidade Luterana do Brasil – Ulbra, Canoas, RS.

Dados ambientais

Os dados ambientais quanto à temperatura e à umidade relativa do ar tanto no inverno (2004) como no verão (2005) foram obtidos na Ulbra, na estação de climatologia. Já os índices de qualidade do ar (IQA_r) foram obtidos no site FEPAM-RS (Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luis Roessler; disponível em: www.fepam.rs.gov.br). O IQA_r tem por objetivo entender a qualidade do ar local em relação a diversos poluentes atmosféricos amostrados nas estações de monitoramento. O IQA_r proposto pela FEPAM é obtido por meio de uma função linear segmentada, na qual os pontos de inflexão representam os Padrões Nacionais de Qualidade do Ar e os critérios para episódios agudos da poluição do ar estabelecidos conforme a Resolução CONAMA nº 03 de 28/06/1990, para seis poluentes atmosféricos: partículas totais em suspensão, partículas inaláveis, dióxido de enxofre, dióxido de nitrogênio, ozônio e monóxido de carbono.

Organismos e exposição

O organismo utilizado foi o *C. aspersus*, molusco terrestre de idade adulta. Duas semanas foram utilizadas para aclimação e possível detoxificação dos animais. Alface orgânica (sem agrotóxico) e água foram oferecidas *ad libitum*. Os animais foram mantidos em gaiolas de propileno.

Inicialmente realizou-se teste com exposição à UV, para adaptação da metodologia. Assim, foram utilizadas duas amostras celulares (hemolinfa e pulmão) e exposição *in vitro* à radiação UVC 4.5 J/m². Foram coletadas amostras da hemolinfa dos indivíduos (n = 4), as quais, já em lâmina (6 lâminas/indivíduo, preparadas conforme próximo item), foram submetidas a diferentes tratamentos: (a) sem exposição à UV; (b) 4 segundos de exposição à UV; (c) 10 s de exposição à UV. Para coleta da hemolinfa, foi utilizada seringa de 3 ml para aspiração, a qual foi introduzida através da concha do molusco; e o pulmão foi obtido após dissecação.

Após padronização, foram formados 3 grupos de 7 moluscos por tempo de exposição no local de estudo, na estação de climatologia da Ulbra: (a) exposição às condições atmosféricas de 7 dias; (b) exposição de 15 dias; (c) exposição de 30 dias (para cada estação do ano). Além desses grupos, foram utilizados grupos-controle, sem exposição e mantidos em laboratório, de forma pareada (um grupo-controle para cada

grupo de exposição). Um total de 41 indivíduos foi utilizado como controle, em condições de temperatura (21-24°C) e luz (fotoperíodo de 12 h com luz branca) controladas em laboratório. Os organismos (n = 21) do grupo de inverno foram submetidos à exposição ambiental, no período de 22 de junho a 22 de julho de 2004, e do grupo de verão (n = 21), no período de 28 de fevereiro a 29 de março de 2005.

Avaliações de genotoxicidade e/ou mutagenicidade

O Ensaio Cometa foi realizado conforme descrito por Silva *et al.* (2000a e b) e Hartmann *et al.* (2003), com algumas modificações. As células de hemolinfa foram utilizadas diretamente, e as de pulmão, após dissociação em meio de cultura celular RPMI 1640 (Gibco). Aproximadamente 10 µL de cada amostra (células de hemolinfa e pulmão) foram embebidas em 95 µL de agarose Low Melting Point (0,75%). Essa mistura foi colocada em lâmina de vidro com cobertura de 300 µL de agarose normal a 1%. Depois da solidificação em geladeira, as lâminas foram colocadas em tampão de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10,0-10,5, com adição na hora do uso de 1% de Triton X – 100 e 10% de DMSO) por no mínimo 1 hora até duas semanas. As lâminas foram então incubadas em tampão alcalino (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH 12,6) por 20 minutos. A corrida eletroforética foi realizada por mais 15 minutos, a 25 volts e 300 Amps, e a alcalinidade foi neutralizada com 0,4 M Tris (pH 7,5). Finalmente, o DNA foi corado com uma solução com prata (5% carbonato de sódio, mais uma solução de 0,1% nitrato de amônia, 0,1% de nitrato de prata, 0,25% de ácido tungstosilicico e 0,15% de formaldeído).

Quanto à observação ao microscópio, foram analisadas 100 células por indivíduo e por tecido (50 de cada lâmina duplicada). As células também foram classificadas, visualmente, em cinco classes, de acordo com o tamanho da cauda: sem danos – classe 0; até danos máximos – classe 4. Assim, o Índice de Danos de cada grupo estudado variou de zero (100X0; 100 células observadas completamente sem danos) a 400 (100X4; 100 células observadas com dano máximo).

Para certificar-se das condições corretas e da eficiência da eletroforese, conforme recomendação de Hartmann *et al.* (2003), foram usados controles negativo e positivo do teste. Para o controle positivo utilizou-se exposição à UV. As lâminas obtidas dos diferentes tecidos e indivíduos foram submetidas a diferentes tratamentos: (a) sem exposição à UV; (b) 4 s de exposição à UV. Os resultados só foram considerados se os controles negativos e positivos apresentassem resultados diferentes significativamente.

Avaliação estatística foi realizada por meio do teste t-Student, sendo considerado $p < 0,05$ como nível de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o monitoramento da poluição atmosférica na estação de climatologia no campus Ulbra, Canoas, RS, por meio do Ensaio Cometa, utilizou-se como biomonitor o molusco *C. aspersus*. Todos os animais utilizados eram adultos, pesando entre 10,8 g e 17,9 g. Inicialmente foram realizados experimentos prévios com o molusco, buscando a padronização do teste. Após exposição à radiação UV, observou-se que para as células de hemolinfa não se obtiveram células viáveis para a análise de 10 s. Já 4 s apresentou aumento significativo ($p < 0,05$) de danos nas células (Figura 1). Essa diferença não foi observada para os pulmões talvez em razão de o nível basal de danos (controle negativo) ter sido maior em pulmões (Figura 2). Diferenças entre índices de danos nos níveis basais em diferentes tecidos já foram observadas por outros autores (Sasaki *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2000b). O molusco *C. aspersus* apresentou-se como um bom organismo bioindicador para estudos em laboratório, como também o Ensaio Cometa para biomarcador. Com esse teste laboratorial também é possível verificar que a exposição à radiação UV mostrou-se como um bom controle positivo, sem a necessidade do uso de químicos tóxicos e mutagênicos. Resultado similar, quanto ao uso de UV como controle positivo, foi observado recentemente para mexilhão-dourado (Villela *et al.*, 2006).

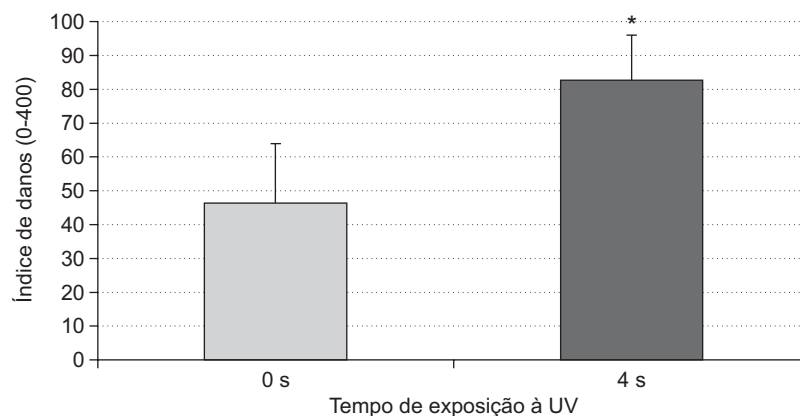


Figura 1 – Índice de danos em células de hemolinfa do *Cantareus aspersus* submetidas a diferentes tempos de exposição à UV. * $p < 0,05$ – teste t-Student.

Após a padronização do teste, os organismos foram submetidos à exposição ambiental (ar atmosférico da área de estudo). Os resultados referentes ao índice e frequência de danos das amostras de hemolinfa e pulmão, relacionados ao tempo de exposição e à estação do ano, além do grupo-controle, são demonstrados na Tabela 1 e nas Figuras 3 a 6. Para todas as eletroforeses realizadas, os controles negativos e positivos apresentaram diferenças significativas (t-Student, $p < 0,05$), demonstrando eficiência do teste e, assim, resultados válidos (dados não demonstrados).

Células pulmonares mostraram-se mais sensíveis ao monitoramento, pelo fato de apresentarem maior índice de danos que as células da hemolinfa. Quanto ao tempo de exposição, observou-se que, quanto maior o tempo de exposição, mais danos ao DNA apareciam. Em relação às estações do ano (inverno e verão), verificaram-se níveis de danos maiores que os controles de forma significativa, porém sem grandes

diferenças entre as estações. Pode-se observar que o pulmão, tecido-alvo, apresentou pequeno aumento de lesões durante o inverno. Mas com essa diferença de sensibilidade para os diferentes tempos de exposição, demonstrou-se o possível uso desse organismo como um potencial biomonitor através do Ensaio Cometa. Segundo Cotelle & Féraud (1999), é cada vez mais indicado o uso de Ensaio Cometa em espécies expostas *in natura*, determinando assim organismos-sentinela. A eficiência do gastrópoda *C. aspersus* (anteriormente *Helix aspersa*) no monitoramento ambiental já foi descrito anteriormente, mas em relação à dosagem de metais (Yasoshima & Takano, 2001) e atividade do citocromo P450 em resposta à exposição a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Ismert, 2002). O último trabalho também sugere o *C. aspersus* como biomonitor por este apresentar metabolismo tão complexo quanto os mamíferos, demonstrando diferenças entre tecidos e efeito dose-resposta para naftaleno.

Tabela 1 – Parâmetros biológicos e ambientais nas exposições de *Cantareus aspersus* no inverno e verão.

Tecido/estação	n	Índice de danos (ID)	Frequência de danos (%)	Umidade relativa U.R. (%)	Temperatura média (°C) (mín.-máx.)
Hemolinfa/inverno					
Controle	10	70,1 ± 48,1	29,2 ± 16,4	–	–
7 dias (22/6-28/6)	2	67,0 ± 11,3	34,0 ± 1,4	86,4%	17,5° (14,9-25)
15 dias (22/6-6/7)	4	82,7 ± 30,4	40,3 ± 22,7	85,0 %	17,8° (7-31)
30 dias (22/6-22/7)	4	236,4 ± 44,2***	74,4 ± 10,4***	86,4%	15,6° (3-31)
Hemolinfa/verão					
Controle	12	98,3 ± 49,4	49,7 ± 19,6	–	–
7 dias (28/2-6/3)	3	159,5 ± 42,8 *	80,0 ± 7,2***	80,0%	20,0° (12-30)
15 dias (28/2-14/3)	4	172,2 ± 29,5**	67,3 ± 6,2*	81,8%	29,3° (11-36)
30 dias (28/2-29/3)	4	202,0 ± 16,3***	78,5 ± 10,7**	82,3%	23,0° (13-28)
Pulmão/inverno					
Controle	8	180,0 ± 59,0	59,9 ± 14,5	–	–
7 dias (22/6-28/6)	1	81,0 ± 0,0	42,0 ± 0,0	86,4%	17,5° (14,9-25)
15 dias (22/6-6/7)	4	323,7 ± 14,9***	89,2 ± 8,5***	85,2%	17,8° (7-31)
30 dias (22/6-22/7)	4	324,5 ± 28,3***	87,5 ± 7,1***	86,4%	15,6° (3-31)
Pulmão/verão					
Controle	11	113,5 ± 29,0	52,8 ± 11,1	–	–
7 dias (28/2-6/3)	4	140,7 ± 25,1	61,2 ± 19,0	80,0%	20,0° (12-30)
15 dias (28/2-14/3)	4	200,7 ± 24,6***	85,3 ± 6,9***	81,8%	29,3° (11-36)
30 dias (28/2-29/3)	4	197,2 ± 25,2***	78,0 ± 6,5***	82,3%	23,0° (13-28)

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ – teste t-Student.

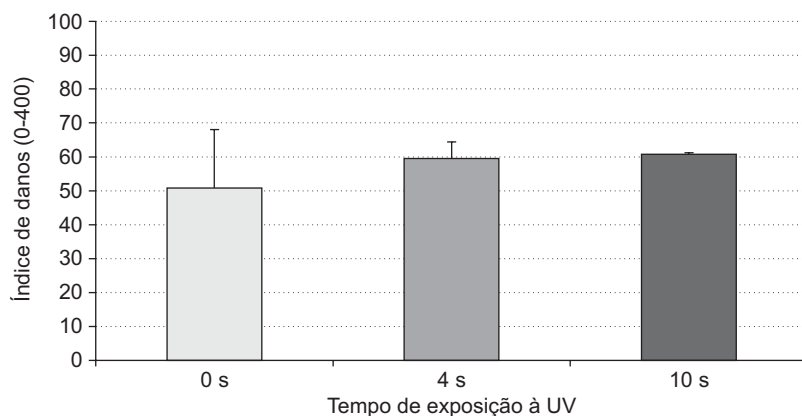


Figura 2 – Índice de danos nas células de pulmão de *Cantareus aspersus* submetidas a diferentes tempos de exposição à UV.

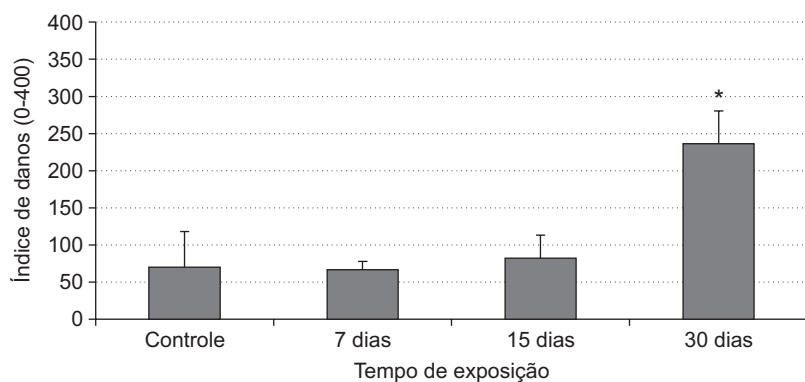


Figura 3 – Índice de danos em células de hemolinfa em *Cantareus aspersus*, estação inverno. * $p < 0,001$ – teste t-Student.

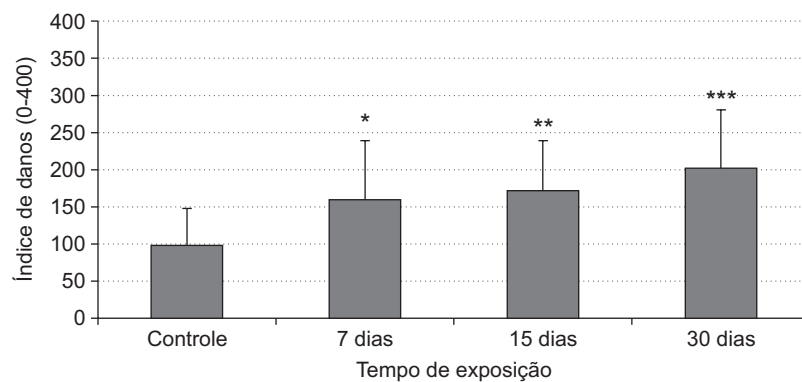


Figura 4 – Índice de danos em células de hemolinfa em *Cantareus aspersus*, estação verão.
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ – teste t-Student.

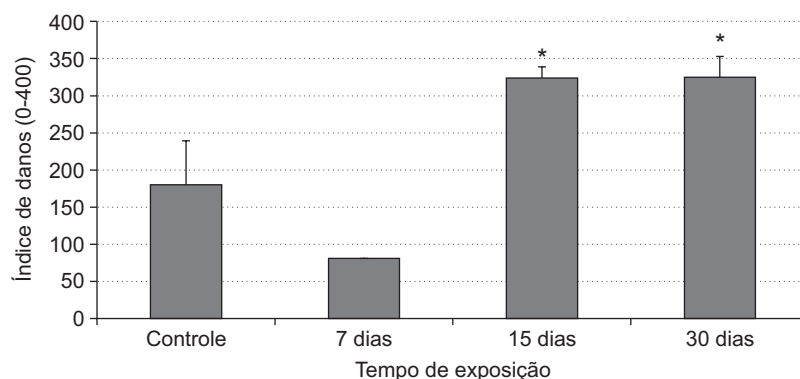


Figura 5 – Índice de danos em células de pulmão em *Cantareus aspersus*, estação inverno. * $p < 0,001$ – teste t-Student.

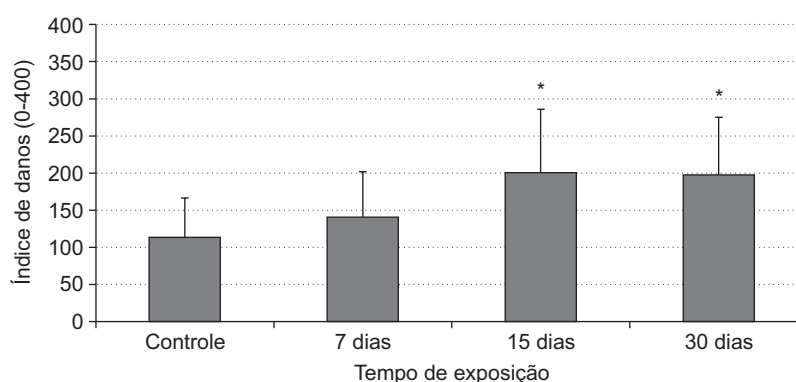


Figura 6 – Índice de danos em células de pulmão em *Cantareus aspersus*, estação verão. * $p < 0,001$ – teste t-Student.



As células de hemolinfa, durante o inverno, apresentaram aumento significativo do índice e frequência de danos para o grupo de animais expostos durante 30 dias ($p < 0,001$) (Tabela 1 e Figura 3). Já para amostras de verão, verificou-se aumento significativo de danos para 7 dias ($p < 0,05$), 15 dias ($p < 0,05$) e 30 dias ($p < 0,001$) (Tabela 1 e Figura 4), e para frequência de danos 7 dias ($p < 0,001$), 15 dias ($p < 0,05$) e 30 dias ($p < 0,01$) (Tabela 1). Em relação às células de pulmão, do grupo de inverno e verão (Figuras 5 e 6 e Tabela 1), o aumento é significativo para 15 dias e 30 dias ($p < 0,001$), tanto para o índice de danos como para a frequência de danos.

Observa-se de forma geral que células pulmonares, tecido-alvo para poluição atmosférica, parecem ser mais sensíveis que a hemolinfa ao monitoramento, embora sem diferença significativa. Quanto às estações, não se observa relação entre temperaturas mais baixas, umidade relativa maior e danos no DNA. Embora não tenha sido observada significância na análise de regressão linear ($Y = 21,26 - 0,0032 X$) e de coeficiente de correlação ($r = -0,06$) para temperaturas mais baixas e índice de danos. Resultados similares foram obtidos por Heuser *et al.* (2002), em que não foi observado aumento de danos significativos para inverno, que também

citam diferentes autores que estudaram poluição por exaustão de automóveis sem verificar associação com temperaturas baixas. Geralmente essa associação se dá devido ao fenômeno da “inversão térmica”, que acaba concentrando os poluentes na região mais próxima da superfície (Duchiade, 1992). Já quanto ao tecido-alvo, Silva *et al.* (2000b), estudando roedores, observaram que os pulmões são bons indicadores para poluição atmosférica.

Quando comparados os resultados com o IQAr (Tabela 2) para cada período de exposição dos indivíduos de *C. aspersus*, embora os índices de partículas inaláveis (PM10) tenham sido um pouco maiores durante o inverno, os níveis foram considerados sempre regulares. De forma interessante esses dados corroboram nossos dados biológicos, uma vez que não houve diferença significativa entre as estações climáticas estudadas. Associações com o IQAr poderiam ser interessantes, visto que este pode ser associado aos efeitos da poluição do ar sobre a saúde humana. Nos Estados Unidos, por intermédio da EPA, o IQAr (EPA-454/R-99-010/1999) é aplicado na divulgação diária da qualidade do ar, indicando níveis de poluição, associando-os com os efeitos sobre a saúde e com os cuidados que devem ser adotados.

Tabela 2 – Boletim Mensal da Qualidade do Ar – Rede Manual (durante inverno e verão).

Qualidade do ar	Inverno	Verão
IQAr médio:	65	50
Pior ocorrência:	14/6/2004	5/3/2005
Poluente detectado:	Partículas Inaláveis (PI 10 µm)	Partículas Inaláveis (PI 10 µm)
Cor:	 Regular	 Regular
	50-100 IQAr	50-100 IQAr

Fonte: Adaptado de FEPAM (2005).

CONCLUSÕES

Este estudo avaliou a sensibilidade do molusco *C. aspersus* para ser utilizado como organismo biomonitor (bioindicador) da poluição atmosférica, como também padronizou o Ensaio Cometa como biomarcador. O molusco *C. aspersus* apresentou-se como um bom organismo bioindicador para estudos em laboratório, como também o Ensaio Cometa para biomarcador. A exposição à radiação UV mostrou-se um bom controle positivo, sem a necessidade do uso de químicos tóxicos e mutagênicos.

A espécie e o método utilizados em conjunto mostraram-se sensíveis, baratos e efetivos para o uso no biomonitoramento da genotoxicidade ocasionada por poluição atmosférica, permitindo avaliações de saúde ambiental de forma continuada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- COTELLE, S. & FÉRARD, J. F., 1999, Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 34: 246-255.
- CREBELL, R., CONTI, L., CROCHI, B., CARERE, A., BERTOLDI, C. & GIACOMO, N. D., 1995, The effect of fuel composition on the mutagenicity of diesel engine exhaust. *Mutation Research*, 346: 167-172.
- DUCHIADE, M. P., 1992, Air pollution and respiratory diseases: a review. *Caderno de Saúde Pública*, 8: 311-330.
- FREIRE, R., 2000, Controle da poluição atmosférica. *Revista Adusp*, 20: 56-62.
- HARTMANN, A., AGURELL, E., BEEVERS, C., BRENDLER-SCHWAAB, S., BURLINSON, B., CLAY, P., COLLINS, A., SMITH, A., SPEIT, G., THYBAUD, V. & TICE, R. R., 2003, Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, 18: 45-51.
- HEUSER, V. D., SILVA, J., MORISKE, H., DIAS, J., YONEAMA, M. & FREITAS, T., 2002, Genotoxicity biomonitoring in regions exposed to vehicle emissions using the comet assay and the micronucleus test in native rodent *Ctenomys minutus*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 40: 227-235.
- ISMERT, M., OSTER, T. & BAGREL, D., 2002, Effects of atmospheric exposure to naphthalene on xenobiotic-metabolising enzymes in the snail *Helix aspersa*. *Chemosphere*, 46: 273-80.
- MAGE, D., OZOLINS, G., PETERSON, P., WEBSTER, A., ORTHOFER, R., VANDEWEERD, V. & GWYNNE, M., 1996, Urban air pollution in megacities of the world. *Atmospheric Environment*, 30: 681-686.
- SASAKI, Y. F., NISHIDATE, E., IZUMIYAMA, F., MATSUSAKA, N. & TSUDA, S., 1997, Simple detection of chemical mutagens by alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay in multiple organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow). *Mutation Research*, 391: 215-231.
- SILVA, J., FREITAS, T. R. O., MARINHO, J. R., SPEIT, G. & ERDTMANN, B., 2000a, Alkaline single-cell gel electrophoresis (Comet) assay for environmental *in vivo* biomonitoring with native rodents. *Genetics and Molecular Biology*, 23: 241-245.
- SILVA, J., FREITAS, T. R. O., HEUSER, V., MARINHO, J. R., BITTENCOURT, F., CERSKI, C. T., KLIEMANN, L. M. & ERDTMANN, B., 2000b, Effects of chronic exposure to coal in wild rodents (*Ctenomys torquatus*) evaluated by multiple methods and tissues. *Mutation Research*, 470: 39-51.
- VICTORIN, K., 1994, Review of the genotoxicity of nitrogen oxides. *Mutation Research*, 317: 43-55.
- VILLELA, I. V., OLIVEIRA, I. M., SILVA, J. & HENRIQUES, J. A. P., 2006, DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Linnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. *Mutation Research*, 697: 78-86.
- YASOSHIMA, M. & TAKANO, B., 2001, *Bradybaena similaris* shell as a biomonitor of copper, cadmium, and zinc. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology*, 66: 239-248.



SETAC - Brazil

J. Braz. Soc. Ecotoxicol., v. 2, n. 1, 2007, 53-60

JBSE

Biochemical Biomarkers in Individual Larvae of *Chironomus xanthus* (Rempel, 1939) (Diptera, Chironomidae)

L. B. PRINTES,^{1*} E. L. G. ESPÍNDOLA¹ & M. N. FERNANDES²

¹Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento,
Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada, Universidade de São Paulo,
Av. Trabalhador São-carlense, 400, Centro, C.P. 292, CEP 13560-900, São Carlos, SP, Brasil

²Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Ciências Fisiológicas, Via Washington Luís km 235, C.P. 676,
CEP 13565-905, São Carlos, SP, Brasil, e-mail: printes_liane@yahoo.com.br

(Received July 6, 2006; Accepted December 7, 2006)

ABSTRACT

Biochemical biomarkers have shown to be useful toxicity tools in environmental assessment programmes. However, few studies involving freshwater invertebrate species have been performed and even fewer on tropical species. The aim of this paper was to evaluate cholinesterase (ChE) and glutathione-S-transferase (GST) activities in larvae of *Chironomus xanthus* (Chironomidae, Diptera) exposed to the organophosphate parathion (ethyl) and the metals copper and cadmium. Considering ChE, significant reduction in activity was observed following *C. xanthus* exposure to parathion and cadmium (48 and 96 h, respectively). Inhibition of ChE activity (IC₅₀) related to parathion seemed to be a more consistent and sensitive effect criteria than the LC₅₀. For GST, there was significant reduction in activity following parathion exposure (48 h). Copper did not elicit any change in ChE or GST activities in *C. xanthus*. The findings of this paper show the two biomarkers as promising tools for assessing exposure to contaminants in tropical regions.

Key words: *Chironomus xanthus*, glutathione-S-transferase, cholinesterase, pesticides, metals.

RESUMO

Biomarcadores bioquímicos em larvas individuais de *Chironomus xanthus* (Rempel, 1939) (Diptera, Chironomidae)

Diversos biomarcadores bioquímicos têm demonstrado importante papel como ferramentas de toxicidade em programas de avaliação ambiental. Entretanto, poucos estudos envolvem espécies de invertebrados de água doce; menor ainda é o número de trabalhos que incluem análises de espécies tropicais. O objetivo deste artigo foi avaliar as atividades de colinesterase (ChE) e glutatona-S-transferase (GST) em larvas de *Chironomus xanthus* (Chironomidae, Diptera) expostas ao organofosfato paration (etil) e aos metais cobre e cádmio. Em relação a ChE, foi observada redução significativa na atividade dessa enzima em *C. xanthus* expostos ao paration e ao cádmio (48 e 96 h, respectivamente). Além disso, a inibição de ChE (CI₅₀) relacionada ao paration foi mais consistente e sensível que a CL₅₀. Foi também encontrada redução significativa da atividade de GST em *C. xanthus* após exposição ao paration (48 h). A exposição ao cobre não resultou em alteração nas atividades de colinesterase e glutatona-S-transferase. Os resultados obtidos demonstram o potencial dos dois biomarcadores como ferramentas de avaliação da exposição a poluentes em regiões tropicais.

Palavras-chave: *Chironomus xanthus*, glutatona-S-transferase, colinesterase, pesticidas, metais.

*Corresponding author: Liane Biehl Printes, e-mail: printes_liane@yahoo.com.br.

INTRODUCTION

A biomarker can be defined as a biological response to an environmental chemical at the individual level or below demonstrating a departure from the normal status (Walker *et al.*, 2001). Among the biological responses that have been commonly evaluated as biomarkers are the biochemical responses, which include measurements of activities of various enzymes (Huggett *et al.*, 1992).

Cholinesterases (ChEs) are important enzymes of the nervous system, and are readily inhibited by organophosphate and carbamate pesticides (Habig & Di Giulio, 1991). There are also evidences for the effect of metals on ChE activity (Diamantino *et al.*, 2003). They are of two types: (1) acetylcholinesterases (AChE) which are highly specific to acetylcholine and hydrolyze acetylcholine at the synaptic cleft; and (2) pseudocholinesterases (PChE), which are relatively non-specific esterases and hydrolyze a number of cholinesteres (e.g. butyrylcholine) in addition to acetylcholine itself. The physiological role of PChE is not yet well understood (Walker *et al.*, 2001). The two types are usually measured together in biochemical assays (Habig & Di Giulio, 1991).

Glutathione-S-transferases (GSTs) are involved in the phase II of the biotransformation of organic contaminants in living organisms. They catalyse the conjugation of a variety of electrophilic compounds with the tripeptide glutathione. They are also involved in the transport of xenobiotics through the cytoplasm to sites of phase I metabolism. In addition, they are capable of forming covalent bonds with electrophilic compounds produced by phase I enzymes, preventing binding of the activated species to DNA and other cellular macromolecules (Stegeman *et al.*, 1992). GST biomarkers may be sensitive indicators of exposure to organic contaminants and metals (McLoughlin *et al.*, 2000).

Although biomarker measurements are equally feasible in invertebrate samples, its employment within this group has been considered disproportionately small (Sturm & Hansen, 1999; Fulton & Key, 2001). However, considering aquatic insects, including midges, significant advances have been made in recent years (Callaghan *et al.*, 2001; Moreira-Santos *et al.*, 2005). And both ChE and GST activities have been successfully measured in the correlated species *C. riparius* (Sturm & Hansen, 1999; Fisher *et al.*, 2000; Callaghan *et al.*, 2001). In relation to tropical species, not many studies have been performed. Moreira-Santos *et al.* (2005) found that the measurement of AChE activity in *C. xanthus* heads might be useful tool for ecosystem quality assessment in tropical regions.

Chironomidae are predominant species in the benthic communities in most freshwater ecosystems (Sixtrino & Sixtrino, 1982). Among the tropical species *C. xanthus* (synonym of *Chironomus sancticaroli* (Sixtrino & Sixtrino, *op. cit.*), are well spread in the Neotropical Region. Larvae of *C. xanthus* have been successfully employed as test organisms in sediment toxicity tests in Brazil (Fonseca, 1997; Dornfeld, 2006).

The aim of this paper was to evaluate cholinesterase (ChE) and glutathione-S-transferase (GST) activities in IV instar larvae of *Chironomus xanthus* (Chironomidae, Diptera) exposed to the organophosphate parathion (ethyl) and the metals copper and cadmium. There was also the intention of comparing effects in terms of enzyme activity and lethality (LC50) to verify possible relationships between the two endpoints. This work intends to contribute towards the establishment of a basis for the use of these biomarkers as toxicological tools in environmental assessment programmes.

MATERIAL AND METHODS

Test organism

Test organisms were cultured in the Laboratory of Ecotoxicology, School of Engineering of São Carlos, University of São Paulo. Cultures were kept under static conditions at $20 \pm 2^\circ\text{C}$ and 12:12 h light: dark regime. *C. xanthus* were maintained in reconstituted soft water prepared according to American Society for Testing and Materials (ASTM, 1980) and natural, acid-washed and organic matter-free, sediment. They were fed every other day with distilled water suspensions of Tetramin® fish food (0.04 mg mL^{-1}). Culturing procedures followed those proposed by Fonseca & Rocha (2004).

Chemicals

The pesticide tested was parathion (ethyl) (99%, PST-761, Ultra Scientific). As for metals copper sulphate (100%, 4844, Mallinckodt) and cadmium chloride (99.3%, 1212-04, J.T. Baker) were used.

Parathion stock solutions were made fresh on the day of the experiment in pure acetone and the test solutions were obtained by adding 1.0 μL of each stock solution per mL of ASTM water to give the required concentrations in the test vessels. The sole addition of 1 μL of acetone per mL of ASTM did not cause any reduction in survival following 48 h of exposure and did not affect AChE and GST activities (see results section). The ranges of concentrations tested were: 1, 2, 5, 10, 20, 50 and 100 μg parathion/L.

Metal stock solutions were prepared in ASTM water and dilutions were made directly in the test vessel. The concentrations used were: 0.10, 0.20, 0.40, 0.80 and 1.60 mg Cu/L and 0.25, 0.50, 0.75, 1.50 and 3.0 mg Cd/L.

Toxicity tests

The method for determining acute effects of toxicants on *C. xanthus* were derived from Fonseca (1997). Six IV instar larvae were placed in 200 mL acid-washed beakers filled with test solutions or culture water for controls. For the pesticide exposures, 1 $\mu\text{L}/\text{m}$ of pure acetone was added to an extra set of controls. Three replicates were set up for each treatment. No previous information on the toxicity of parathion to *C. xanthus* was available, so a series of tests was performed for calculating the LC50 (48 h). On the other hand, for Cu and

Cd the LC50 (96 h) had been previously determined (Dornfeld, 2006). Hence, one test with copper sulphate and two tests with cadmium chloride were then performed in 96 h to verify possible effects on ChE and GST activities. All animals were exposed under the same conditions described for culturing. Mortality was recorded at the end of the exposure periods. In all metal exposures, animals were fed (0.04 mg mL^{-1}) on the first day. Considering parathion, half of the toxicity tests were performed with the addition of food on the first day and the other half without it (as indicated). Food can have a substantial influence on the outcome of toxicity tests. It has been shown, for instance, that food can interact with contaminants during toxicity tests (Pery *et al.*, 2002). Thus, the effect of feeding on the LC50 of parathion to *C. xanthus* was also evaluated.

Surviving animals from the parathion tests 4 to 10 and from all tests performed with metals were snap-frozen individually in 1.5 mL micro-centrifuge tubes dropped into liquid nitrogen. Considering ChE activity, organisms from tests 4 to 8 were assayed whereas for GST activity only organisms from tests 8 and 10 were analysed. ChE and GST activities were measured in three replicates per treatment (one from each test replicate). The larvae were stored for up to 3 months at -80°C for ChE and GST analyses.

Biochemical assays

Cholinesterase activity was determined according to Ellman *et al.* (1961), adapted for use in microplates with *C. riparius* by Fisher *et al.* (2000). The homogenates were obtained from a single larva. Whole animals were homogenized in 1.5 mL eppendorf tubes with ice-cold 0.02 M sodium phosphate buffer (PB), pH 8.0, with 1% Triton X-100 (Sigma). The homogenization was manual, using a microcentrifuge tube pestle (50 cycles, 10 s). The initial homogenate was made up to 350 μL mixed and centrifuged at $14,000 \times g$ and $2-4^{\circ}\text{C}$ for 4 min. Supernatants (315 μL) were transferred to a clean pre-cooled tube, mixed using a whirlimixer and assayed immediately. Additions to the microplate were made in the following order: 100 μL of 8 mM 5,5'-dithio bis-2-nitrobenzoate (D-8130, Sigma Chemical) in PB supplemented with 0.75 mg mL^{-1} sodium hydrogen carbonate; 50 μL of assay blank (PB containing 0.1% triton-x-100) or supernatant; and 50 μL of 16 mM acetylthiocholine iodide (ATCI) in PB (A-5751 Sigma). Absorbances (405 nm) were read using a microtiter plate reader at 30°C , after 5 min incubation, over 10 min with intermittent shaking. A Dynex MRX microtiter plate reader (Intercientífica, São José dos Campos, SP) was used.

Glutathione S-transferase assay was based on the method described by Habig *et al.* (1974), modified for use in microplates with *C. riparius* (Callaghan *et al.*, 2001). The homogenates were obtained as described for ChE assay. However, ice-cold 0.02 M sodium phosphate buffer (PB), pH 6.5 was used instead.

The microplate was loaded on ice with three replicates of 50 μL of assay blank (PB containing 0.1% Triton X-100 and 0.1% phenylmethylsulfonyl fluoride) or supernatant. Subsequently, the microplate was incubated for 5 min at 30°C in the plate reader. Meanwhile the substrate mixture was prepared by adding 7 mL of 20 mM reduced glutathione (Sigma G-4251) in 0.1 M potassium dihydrogen phosphate (Sigma P5379), 1 mM ethylene-diamine tetracetic acid (Sigma ED4SS) to 12.5 mL of 0.02 M PB, pH 6.5. Following 5 min incubation of the solution at 30°C , 1.4 mL of 40 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (Sigma C-6369) in 95% ethanol was added. Thus, 150 μL of the substrate mixture was added to the microplate, and the activity rate was measured as change in OD/min at 340 nm over 10 min with intermittent shaking.

The activities of both GST and ChE were expressed as activity per unit of protein ($\mu\text{M/L/min/g}$ protein). Protein concentration in homogenate supernatants was determined by using a modification of the bicinchoninic acid (BCA) protein assay (Pierce, Rockford, IL, USA) (Smith *et al.*, 1985). The protein standard curve was prepared with a series of bovine serum albumin (BSA) standards diluted in ChE blank buffer (BB).

Statistics

Median lethal concentrations (LC50) were calculated using the Spearman-Kärber method with 95% confidence limits (Hamilton *et al.*, 1977). Inhibition median concentrations for ChE activity (IC50) were estimated by non-linear regression analysis applying the exponential model. The approximated confidence intervals were obtained by the delta method (Sen & Singer, 1993). Comparative analyses were performed using 2 sample t-test or one-way ANOVA in Minitab (Minitab for Windows, version 13.1).

RESULTS

Acute toxicity

LC50 (48 h) values obtained from the toxicity tests with *C. xanthus* exposed to parathion are depicted in Table 1; there was no difference between the tests performed with the addition of food and without it (t-test, $p = 0.497$). Therefore, all data were treated together. Results obtained with copper sulphate and cadmium chloride (LC50; 96 h) are given in Table 2.

A total of nine tests performed with parathion were considered valid (i.e. less than 10% mortality in the controls). The mean value for LC50 (48 h) was $15.03 \mu\text{g L}^{-1}$ with a coefficient of variation (CV) of 48%. Considering the tests performed with metals, the mean LC50 (96 h) for copper sulphate was 0.34 mg L^{-1} of Cu; whereas the LC50 (96 h) value obtained for the test carried out with cadmium chloride was 0.52 mg L^{-1} of Cd.

Table 1 – Acute toxicity of parathion (ethyl) to IV instar larvae of *C. xanthus* and effect on cholinesterase (ChE) activity. *Lethal median concentration (LC50; 48 h) (lower and upper 95% confidence limits); **inhibition median concentration (IC50; 48 h) (lower and upper 95% confidence limits); test number in bold = tests performed without food; n.c. = not calculable; – ChE assays not performed.

Insecticide	Test n.	LC50; 48 h ($\mu\text{g L}^{-1}$)*	IC50 48 h ($\mu\text{g L}^{-1}$)**	IC50/LC50
Parathion	2	n.c.	–	–
Parathion	3	15.49 (10.49-22.88)	–	–
Parathion	4	n.c.	n.c.	n.c.
Parathion	5	6.93 (5.68-8.46)	n.c.	n.c.
Parathion	6	9.44 (3.56-25.03)	0.95 (0.74-1.16)	0.10
Parathion	7	17.78 (12.98-24.36)	0.64 (0.31-0.98)	0.04
Parathion	8	7.89 (6.03-10.32)	0.89 (0.52-1.26)	0.11
Parathion	9	25.60 (19.47-33.67)	–	–
Parathion	10	22.06 (15.88-30.64)	–	–
Average \pm SD		15.03 \pm 6.73	0,83 \pm 0.13	

Table 2 – Acute toxicity of copper and cadmium to IV instar larvae of *C. xanthus*. *Lethal median concentration (LC50; 96 h) (lower and upper 95% confidence limits).

Metal	Test n.	LC50; 96 h (mg L^{-1})*
Cu	1	0.35 (0.13-0.95)
Cu	2	0.33 (0.26-0.41)
Average for Cu \pm SD	1 and 2	0.34 \pm 0.014
Cd	unique	0.52 (0.42-0.64)

Cholinesterase activity

The sensitivity of the ChE assay when IV instar larvae of *C. xanthus* were exposed to different concentrations of the organophosphate parathion is demonstrated in Figure 1. Significant decrease in ChE activity levels were seen in all assays performed: $F_{3,4} = 31.70$, $p = 0.03$; $F_{2,8} = 57.48$, $p = 0.000$; $F_{5,6} = 7.59$; $p = 0.014$; $F_{5,6} = 73.09$; $p = 0.000$ and $F_{4,10} = 13.94$; $p = 0.000$, for toxicity tests 4 to 8, respectively.

The IC50 values estimated for ChE activity are presented in Table 1. The mean value for IC50 (48 h) was $0.83 \mu\text{g L}^{-1}$ with a CV of 16.24%.

There was a tendency for a reduction in ChE activity in *C. xanthus* exposed to the higher concentrations of copper sulphate however the differences were not statistically

significant ($F_{3,5} = 3.03$; $p = 0.132$ and $F_{3,8} = 3.52$; $p = 0.069$ for tests 1 and 2, respectively). Cadmium chloride has effectively reduced ChE activity in *C. xanthus* ($F_{2,6} = 13.84$; $p = 0.006$) (Figure 2).

Glutathione-S-transferase activity

GST activities of IV instar larvae of *C. xanthus* exposed to different concentrations of parathion are presented in Figure 3. Significant reductions in GST activities were obtained in animals from the higher test concentrations ($F_{4,10} = 2.91$; $p = 0.078$ and $F_{6,14} = 23.50$; $p = 0.000$, for tests 1 and 2, respectively).

The GST assay was not sensitive to copper sulphate ($F_{2,6} = 1.43$; $p = 0.310$) or cadmium chloride ($F_{2,6} = 2.33$; $p = 0.179$).

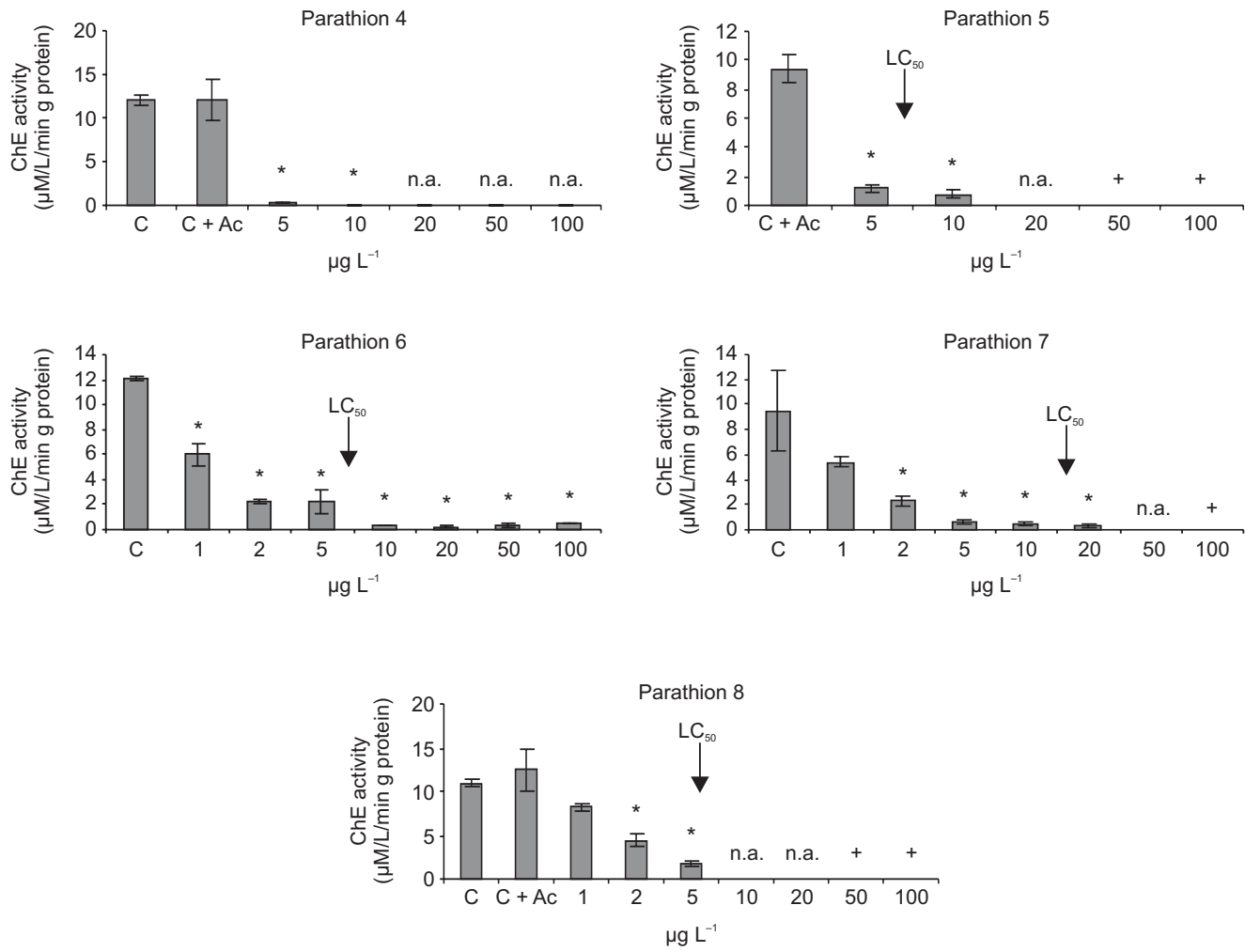


Figure 1 – Cholinesterase activity in IV instar larvae of *C. xanthus* following 48 h exposure to different concentrations of parathion (tests 4 to 8) (average ± SEM). C: water control group; C + Ac = acetone control; *: significant differences (p < 0.05); n.a.: not analysed; +: no survivals.

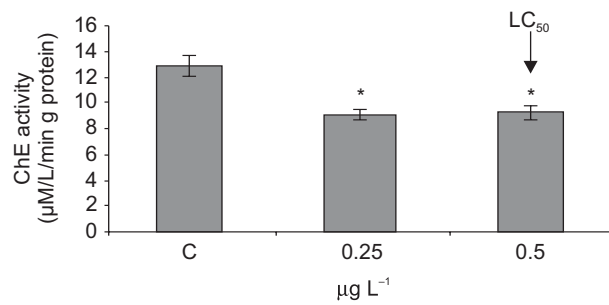


Figure 2 – Cholinesterase activity in IV instar larvae of *C. xanthus* following 96 h exposure to different concentrations of cadmium chloride (average ± SEM). C: water control group; *: significant difference (p < 0.05).

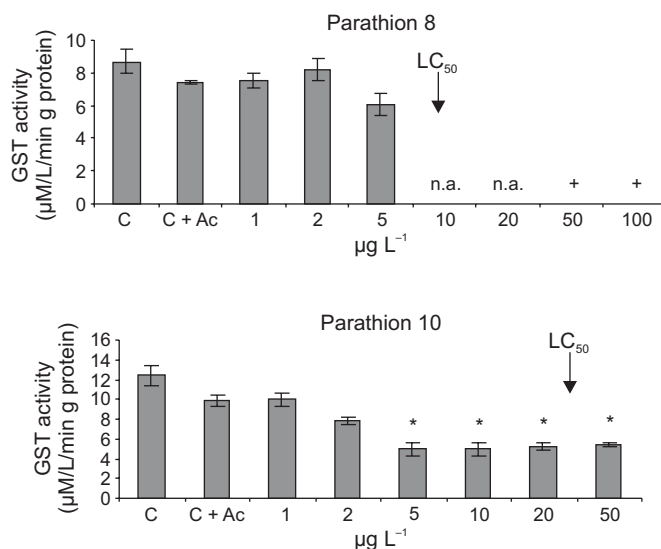


Figure 3 – Glutathione-S-transferase activity in IV instar larvae of *C. xanthus* following 48 h exposure to different concentrations of parathion (average \pm SEM). C + Ac = acetone control; * significant difference ($p < 0.05$); n.a. not analyzed; + no survivors.

DISCUSSION

Biochemical biomarkers can give measures of exposure, and sometimes also of toxic effects (Walker *et al.*, 2001). They are very sensitive responses and should, in theory, anticipate more ecologically relevant effects at higher levels of biological organization (Van Gestel & Van Brummelen, 1996). The findings of this study have demonstrated the sensitivity of both ChE and GST activity in IV instar larvae of *C. xanthus*. For ChE activity, a clear dose-response relationship was observed in all tests performed with parathion. This effect was even more evident when organisms were exposed to very low concentrations (between 1 and 5 $\mu\text{g L}^{-1}$) (Figure 1). A significant effect of cadmium on *C. xanthus* ChE activity was also verified, although the dose-response relationship was not so clear. Considering GST, a significant reduction in activity was demonstrated in larvae that had been exposed to parathion. Hence, the findings of this work point to the usefulness of these two biomarkers as indicators of exposure.

The baseline reaction rates obtained with the methods used for measuring ChE and GST activities in untreated IV instar larvae of *C. xanthus* are in agreement with the optimum rates obtained for IV instar *C. riparius* assayed under very similar conditions (i.e. buffer pH, substrate concentration and reaction time) (Fisher & Callaghan, 1999; Fisher *et al.*, 2000). Fisher & Callaghan (1999) define the range of kinetic readings between 60-80 mOD/min for the ChE assay; whereas for the GST assay this range is between 20-30 mOD/min. The same values were obtained with *C. xanthus* in both assays (results not shown). Moreover, the ChE activity in terms of protein

in untreated IV instar larvae of *C. xanthus* is the same found for *C. riparius* (around 15 $\mu\text{M/L/min/g protein}$) (Fisher *et al.*, 2000). These evidences, together with the consistent results that were obtained with *C. xanthus* exposed to a specific ChE inhibitor in the present study, support the suitability of the methodologies employed.

Results in terms of ChE activity in larvae of *C. xanthus* exposed to parathion seem to be more consistent than the data obtained for LC₅₀ (48 h) (Table 1 and Figure 1). A much lower coefficient of variation (CV) was obtained in terms of IC₅₀ (48 h) in contrast with the CV derived from the average LC₅₀ (48 h). These findings support the idea that the IC₅₀ could be a better index to evaluate parathion toxicity to *C. xanthus* than the LC₅₀. Difficulty in determining death of the organisms or genetic variability among the different batches of *C. xanthus* evaluated might have contributed to this high variability in the LC₅₀ (48 h). Both factors have previously been pointed as likely causes for intraspecific variability in LC₅₀ values (Baird *et al.*, 1989; Barata *et al.*, 2000). Considering the correlated species *C. riparius*, concentrations up to 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ have been considered highly toxic (Detra & Collins, 1991). Sturm & Hansen (1999) found a median effect concentration (EC₅₀; 24 h) of 7.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ of parathion (ethyl) for *C. riparius*.

For the sensitivity of the responses following parathion exposure it appears that ChE and GST reduction in activities came earlier than the effect in terms of mortality (Figures 1 and 3). Considering ChE activity, the ratios IC₅₀/LC₅₀ (Table 1) were below 0.10. Sturm & Hansen (1999) have also demonstrated that the effect in terms of ChE inhibition in *C. riparius* exposed to parathion anticipates EC₅₀ (24 h). The calculated IC₅₀/EC₅₀ was 0.40. Inhibition of postmitochondrial

and cytosolic GSTs was a more sensitive parameter than growth and reproduction in the freshwater mollusc *Lymnea palustris* treated with atrazine (Baturó & Lagadic, 1996).

In relation to the metals, the LC50 (96 h) values obtained for copper are also in agreement with what has been previously obtained for *C. xanthus* (0.30 mg L⁻¹). However for cadmium, our values are a bit lower than previous findings (0.70 mg L⁻¹) (Dornfeld, 2006). Metals have sometimes been associated with a direct effect on ChE activity. Among those related with ChE inhibition in invertebrates are cadmium, mercury, chrome, copper and zinc (Lagadic *et al.*, 1994; Guilhermino *et al.*, 1998; Diamantino *et al.*, 2003). Metals can interfere with the enzyme molecular structure by forming covalent bonds; making the enzyme unavailable for the substrate (Walker *et al.*, 2001). Our findings have shown that differently from what was demonstrated with parathion, inhibition of ChE activity due to cadmium exposure does not appear to be a more sensitive parameter than LC50 (96 h) (Figure 2). However, more studies should be performed for a better understanding of the relationship between these two parameters.

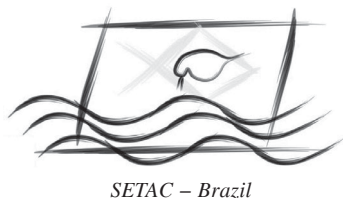
The findings of this work have shown the value of measuring ChE and GST activity in *C. xanthus*. The ChE biomarker was highly sensitive to parathion and cadmium; whereas the GST biomarker was sensitive to parathion. Inhibition of ChE activity related to parathion seemed to be a more consistent and sensitive effect criteria than LC50. Additional studies must be performed to evaluate relationships between inhibition of both ChE and GST activities and effects on life history and population parameters. Also, field studies involving the two biomarkers are needed to understand their relationship with more ecologically relevant responses. Nevertheless, ChE and GST activities in IV instar larvae of *C. xanthus* appear as promising ecotoxicological tools for assessing exposure to contaminants in tropical regions.

Acknowledgements — This work was supported by FAPESP. The authors wish to thank Professor Dulcinei Garcia, Physics Department, Federal University of São Carlos and Professor Mário de Castro, Mathematics and Computer Science Institute, School of Engineering of São Carlos, University of São Paulo.

REFERENCES

- ASTM – AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS, 1980, *Standard practice for conducting acute toxicity test with fishes, microinvertebrates and amphibians*. Philadelphia, PA, USA, Report E-790-80.
- BAIRD, D. J., BARBER, I., BRADLEY, M., CALOW, P. & SOARES, A. M. V. M., 1989, The *Daphnia* bioassay: a critique. *Hydrobiologia*, 188/189: 403-406.
- BARATA, C., BAIRD, D. J., AMAT, F. & SOARES, A. M. V. M., 2000, Comparing population response to contaminants between laboratory and field: an approach using *Daphnia magna* ephippial egg banks. *Funct. Ecology*, 14: 513-523.
- BATURÓ, W. & LAGADIC, L., 1996, Benzo[a]pyrene hydroxylase and glutathione S-transferase activities as biomarkers in *Limnea palustris* (mollusca, gastropoda) exposed to atrazine and hexachlorobenzene in freshwater mesocosms. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15: 771-781.
- CALLAGHAN, A., HIRTTHE, G., FISHER, T. & CRANE, M., 2001, Effect of short-term exposure to chlorpyrifos on developmental parameters and biochemical biomarkers in *Chironomus riparius* Meigen. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 50: 19-24.
- DETRA, R. L. & COLLINS, W. J., 1991, The relationship of parathion concentration, exposure time, cholinesterase inhibition and symptoms of toxicity in midge larvae (Chironomidae: Diptera). *Environ. Toxicol. Chem.*, 10: 1089-1095.
- DIAMANTINO, T. C., ALMEIDA, E., SOARES, A. M. V. M. & GUILHERMINO, L., 2003, Characterization of cholinesterases from *Daphnia magna* Straus and its inhibition by zinc. *B. Environ. Contam. Tox.*, 71: 219-225.
- DORNFELD, C. B., 2006, *Utilização de Chironomus sp. (Diptera, Chironomidae) para avaliação da qualidade de sedimentos e contaminação por metais*. PhD Thesis, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 211p.
- ELLMAN, G. L., COURTNEY, K. D., ANDRES JR., V. A. & FEATHERSTONE, R. M., 1961, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7: 88-95.
- FISHER, T. C. & CALLAGHAN, A., 1999, *Standard operating procedures of enzyme activity assays and protein assay for use with III and IV instar larvae of C. riparius*. Ecotoxicology Research Group, University of Reading.
- FISHER, T. C., CRANE, M. & CALLAGHAN, A., 2000, An optimized microtitreplate assay to detect acetylcholinesterase activity in individual *Chironomus riparius* meigen. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19: 1749-1752.
- FONSECA, A. L., 1997, *Avaliação da qualidade da água do rio Piracicaba/SP através de testes de toxicidade com invertebrados*. PhD Thesis, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 211p.
- FONSECA, A. L. & ROCHA, O., 2004, Laboratory cultures of the native species of *Chironomus xanthus*, Rempel, 1939 (Diptera, Chironomidae). *Acta Limnol. Bras.*, 16: 153-161.
- FULTON, M. H. & KEY, P. B., 2001, Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20: 37-45.
- GUILHERMINO, L., BARROS, P., SILVA, M. C. & SOARES, A. M. V. M., 1998, Should the use of inhibition of cholinesterases as a specific biomarker for organophosphate and carbamate pesticides be questioned? *Biomarkers*, 3: 157-163.
- HABIG, W. H., PABST, M. J. & JAKOBY, W. B., 1974, Glutathione-S-transferases: the first step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 249: 7130-7139.
- HABIG, C. & DI GIULIO, R. T., 1991, Biochemical characteristics of cholinesterases in aquatic organisms. In: P. Mineau (ed.). *Cholinesterase-inhibiting Insecticides – Their Impact on Wildlife and the Environment*. Elsevier, London, UK.
- HAMILTON, M. A., RUSSO, R. C. & THURTON, R. V., 1977, Trimed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.*, 11: 714-719.
- HUGGETT, R. J., KIMERLE, R. A., MEHRLE JR., P. M. & BERGMAN, H. L. (eds.), 1992, *Biomarkers. Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA.

- LAGADIC, L., CAQUET, T. & RAMADE, F., 1994, The role of biomarkers in environmental risk assessment (5). Invertebrate populations and communities. *Ecotoxicology*, 3: 193-208.
- MCLOUGHLIN, N., YIN, D., MALTBY, L., WOOD, R. M. & YU, H., 2000, Evaluation of sensitivity and specificity of two crustacean biochemical biomarkers. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19: 2085-2092.
- MOREIRA-SANTOS, M., FONSECA, A. L., MOREIRA, M. S., *et al.*, 2005, Short-term sublethal (sediment and aquatic roots of floating macrophytes) assays with a tropical chironomid based on postexposure feeding and biomarkers. *Environ. Toxicol. Chem.*, 24: 2234-2242.
- SMITH, P. K., KROHN, R. I., HERMANSON, G. T., MALLIA, A. K., GARTNER, F. H., PROVENZANO, M. D., FUJIMOTO, E. K., GOEKE, N. M., OLSON, B. J. & KLENK, D. C., 1985, Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, 150: 76-85.
- STEGEMAN, J. J., BROUWER, M., DI GIULIO, R. T., FÖRLIN, L., FOWLER, B. A., SANDERS, B. M. & VAN VELD, P. A., 1992, Enzyme and protein synthesis as indicators of contaminant exposure and effect. In: R. J. Huggett, R. A. Kimerle, P. M. Mehrle Jr. and H. L. Bergman (eds.). *Biomarkers. Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA.
- SEN, P. K. & SINGER, J. M., 1993, *Large sample methods in statistics: an introduction with applications*. Chapman & Hall, New York.
- STRIXINO, S. T. & STRIXINO, G., 1982, Ciclo de vida de *Chironomus sancticarloi* Strixino & Strixino (Diptera, Chironomidae). *Rev. Bras. Ent.*, 26: 183-189.
- STURM, A. & HANSEN, P. D., 1999, Altered cholinesterase and monooxygenase levels in *Daphnia magna* and *Chironomus riparius* exposed to environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 42: 9-15.
- VAN GESTEL, C. A. M. & VAN BRUMMELEN, T. C., 1996, Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology*, 5: 217-225.
- WALKER, C. H., HOPKIN, S. P., SIBLY, R. M. & PEAKALL, D. B., 2001, *Principles of ecotoxicology*. 2. ed. Taylor & Francis, London, UK, 309p.



SETAC - Brazil

Mussel Reference Material Preparation Proposal as a Quality Assurance Tool for Brazilian Seashore Biomonitoring

E. G. MOREIRA,* M. B. A. VASCONCELLOS, V. A. MAIHARA, M. G. M. CATHARINO & M. SAIKI

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP,
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, CEP 05346-000, Butantã, São Paulo, SP, Brasil

(Received July 6, 2006; Accepted November 29, 2006)

ABSTRACT

Analytical measurement results may affect economical, political and environmental protection decisions. Therefore, there is a growing demand for quality assurance of such results. The use of certified reference materials, CRMs, is a simple and efficient way to validate analytical methods and to keep them under control. However, CRMs are expensive and usually obtained abroad, which makes their use prohibitive for a large number of Brazilian chemical laboratories. This paper presents a proposal for the preparation of a mussel reference material using the *Perna perna* species. This material will be used in biomonitoring studies of the Brazilian Seashore. The various aspects of the preparation such as sampling, processing, physical and chemical characterization are presented. Preliminary results for the concentration of elements such as As, Br, Co, Cr, Fe, K, Na, Se and Zn determined by INAA and Cd and Hg determined by AAS, are also presented.

Key words: reference material, mussel, *Perna perna*, INAA, AAS, metals.

RESUMO

Proposta de preparo de um material de referência de mexilhão como ferramenta de controle de qualidade para a biomonitoração do litoral brasileiro

Resultados de medições analíticas podem afetar decisões econômicas, políticas e de preservação ambiental. Assim, há crescente demanda para a garantia da qualidade de tais resultados. A utilização de materiais de referência certificados, MRCs, é uma maneira simples e eficiente de validar métodos analíticos e monitorá-los de forma a garantir que estejam sob controle. No entanto, MRCs são materiais de alto valor agregado, em geral obtidos no exterior, o que torna seu uso rotineiro proibitivo para grande parte dos laboratórios nacionais. Neste trabalho é apresentada proposta de preparo de material de referência de mexilhão da espécie *Perna perna* para ser utilizado em estudos de biomonitoração de elementos tóxicos realizados em pontos do litoral brasileiro. Os diversos aspectos do preparo, como amostragem, processamento, caracterização física e química do material, serão abordados. Além disso, são apresentados resultados preliminares para a concentração de elementos como As, Br, Co, Cr, Fe, K, Na, Se e Zn, determinados por INAA, e Cd e Hg, determinados por AAS.

Palavras-chave: material de referência, mexilhão, *Perna perna*, INAA, metais.

INTRODUCTION

Reference materials in the quality assurance of analytical measurements

Analytical measurement results may affect economical, political and environmental protection decisions regarding pollutant limits implementation in environment monitoring and in remediation planning (Zschunke, 2000). Therefore, there

has been a growing demand for quality assurance of such results, i.e., that obtained results are accurate through analytical techniques and that they are accompanied by their respective associated uncertainties in order to warrant the confiability for result comparison between different locations and different times. A straightforward and efficient method to achieve this goal is the comparison of the result obtained for a real sample with the value assigned to a known material, the reference

*Corresponding author: Edson Gonçalves Moreira, e-mail: emoreira@ipen.br.

material, RM, which has sufficiently homogeneous and well-established property values. RMs are also used in the validation of analytical methods, inter-laboratory studies and proficiency tests (Kramer *et al.*, 2001). When the property values of the RM are certified by a procedure that establishes the traceability of the values to an exact value of the unit of the International System of Units, SI, in which the property values are expressed, followed by an uncertainty for an established confidence level, the RM is called certified reference material, CRM. In the case of CRM for chemical composition, the property value is the element or compound concentration in the material (ISO, 1997).

Despite its importance in analytical result quality assurance, the use of CRMs is far from being widely disseminated. The complexity in the preparation and characterization of CRMs make their final price high, which may make their use economically unviable. Besides, there may be import constraints and restrictions for such materials. Last but not least, it is not always possible to obtain a CRM with a similar matrix to the sample under investigation and/or with element levels at the same range of concentration.

Use of mussels as biomonitors

Mussels are sedentary organisms that feed by seawater filtration and are in close contact with seawater. As a consequence, they may bioaccumulate several pollutants in their tissues. Although it may be detrimental to aquaculture, this fact has been extensively used in water quality monitoring.

Generally speaking, the objective of environmental monitoring is not only to determine the natural concentration of chemical constituents but also the concentration above which chemicals become pollutants in the environment. Many human activities such as mining, fossil fuel burning, industrial processing, agriculture, domestic sewage discharges and nuclear activities contribute to the pollution of the marine environment. Many contaminants pose drastic effects due to their bioavailability and toxicity to biological processes and persistence in the environment (Kayasth & Swain, 2004; Kramer *et al.*, 2001).

National and international environmental monitoring programs have been launched worldwide to assess the quality of aquatic environments. Even though it can be done using seawater, the use of marine organisms permits pollution evaluation over longer periods of time including concentration peaks and biological absorption effects. In this kind of study, marine organisms act as "biological samplers".

Mussels, oysters and other benthic organisms are used in marine and fresh water biomonitoring in more than seventy

countries (Kramer *et al.*, 2001). It is of fundamental importance that biomonitoring data are produced with sufficient accuracy if results obtained in different laboratories over long periods of time are to be compared. For the assessment of pollutants and their byproducts in the environment, it is important not only to use accurate techniques but also pay careful attention to every step of the analytical process from meaningful sampling and appropriate sample preparation and storage to the use of quality assurance and quality control protocols for analytical procedures. The availability of CRMs with similar properties as those of the real environmental samples is of utmost importance for the quality assurance and quality control of the analytical methods used in biomonitoring.

Various studies have been done in Brazil using marine organisms as indicators of anthropic toxic compound contamination of the environment (Callil, 1998; Medeiros *et al.*, 1998).¹ Nowadays, there is a biomonitoring study under development at IPEN in collaboration with the Oceanographic Institute of the São Paulo University. This study, subject of a Ph. D. program, aims the biomonitoring at some regions of São Paulo State Seashore for the contamination of toxic elements such as arsenic, cadmium, lead and mercury, using the *Perna perna* mussel.

Mussel reference material preparation proposal

From the previous observations, the relevance of the preparation of a mussel CRM, to help in the biomonitoring of seawater pollution, is evident. The development of skills for the preparation and certification of a mussel RM, i.e., a biological matrix reference material to be used in environmental studies, is an important step in Brazilian metrological evolution. In this paper, the preparation of a *Perna perna* mussel RM is proposed. The material will be used in toxic element biomonitoring studies of the Brazilian Seashore.

MATERIAL AND METHODS

In this work, the steps for the production of a mussel reference material are shown in Figure 1. The various steps were defined from the expertise of our laboratory in handling and sampling of biological materials, from the evaluation of detailed international mussel CRMs production reports, and they attend to international guidelines for the preparation, characterization and certification of CRMs (ISO, 1992, 1997, 2000a, 2000b, 2000c, 2006).

1. CALLIL, C. T., 1998, Utilização de moluscos como indicadores de mercúrio: proposta de biomonitoração. In: Encontro Brasileiro de Ecotoxicologia, 5., 05-08 out., Itajaí, SC. *Anais...* Itajaí. CD-ROM.

MEDEIROS, I. D., ALMEIDA, E. A., VENTURA, E. C., MÜLLER, I. C., MEZZARI, M. P. & BAINY, A. C. D., 1998, Biomonitoramento da contaminação aquática na Bafa Norte da Ilha de Santa Catarina utilizando mexilhões *Perna perna* como organismos sentinela. In: Encontro Brasileiro de Ecotoxicologia, 5., 05-08 out., Itajaí, SC. *Anais...* Itajaí. CD-ROM.

Mussels were obtained from a single population, from a single producer, from Cocanha Beach in Caraguatatuba City, São Paulo State North Shore, where mussels are cultivated by the longline system. Using cultivated mussels poses the advantage of using animals with the same size (age), at the same place and the same time of origin (same pollution burden history), which enhances the homogeneity of the product. Furthermore, sampling is easy and usually at a reasonably low cost.

Tissue masses shown in Figure 1 are approximate and were obtained from preliminary tests. An 80% mass loss in the freeze drying process and in the disposal of individuals with size outside the range of the mean size of the population used was considered. A 20% dry material loss was also foreseen due to storage, drying, vessel transfers and inappropriate particle size fractions disposal after cryomilling in a ball mill.

After the bulk preparation, the candidate RM will be homogenized in an appropriate “Y shape” mixer and bottled in glass bottles with about 20 g of RM each. The moisture content

of the material will be tested in a moisture content determination balance and, if necessary, the RM will be subjected to the freeze-drying process until the moisture content level be lower than 3-4% (w/w). The bottles will be gamma ray irradiated at the ^{60}Co irradiation facility at IPEN in order to enhance its stability. The homogeneity will be evaluated with respect to the within-bottle homogeneity and between-bottles homogeneity by means of a two-way analysis of variance test, ANOVA (ISO, 2006). The stability of the material will be checked at different temperatures using a previously established experimental design to define the most favorable transport and storage conditions (ISO, 2006). The content of the elements of interest in the candidate RM will be determined by national and international laboratories in an interlaboratorial program by means of various validated analytical methodologies. Element content certification will be accomplished by applying statistical treatments to the results reported by the interlaboratory program participants in order to assign the certified values and their associated uncertainties.

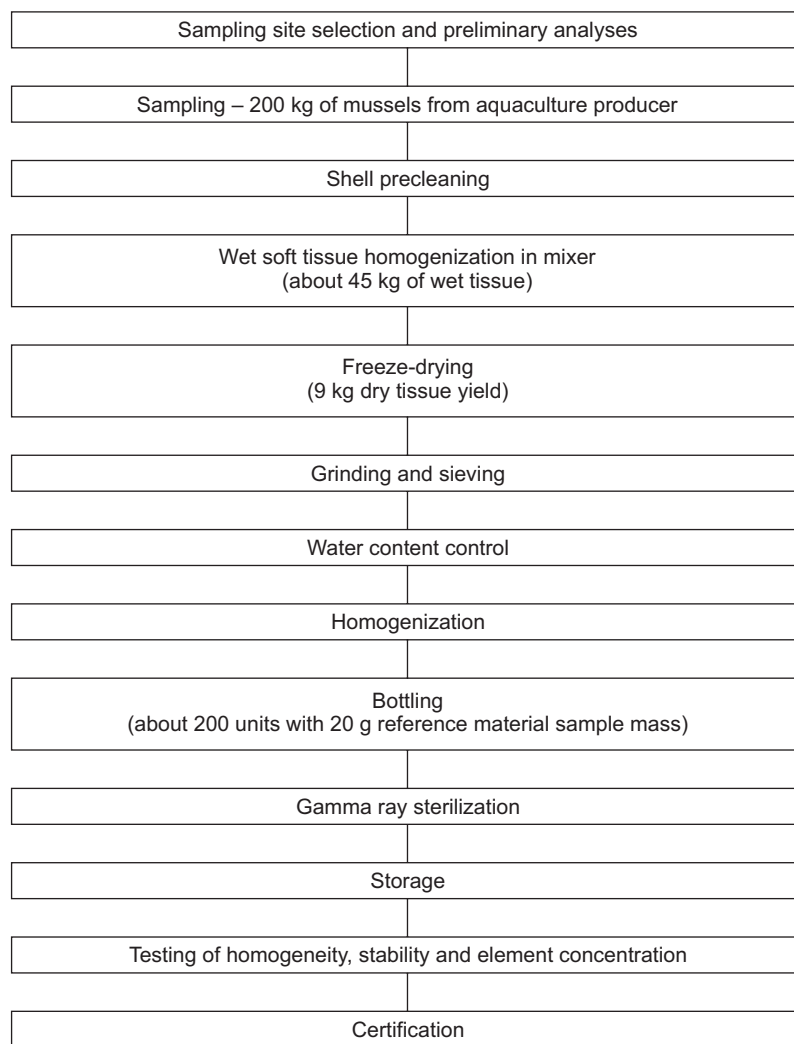


Figure 1 – Preparation steps for the mussel reference material.

Table 1 – Element concentration determined in this study by INAA, CV-AAS (Hg) and ETAAS (Cd) for a test sample of the mussel candidate CRM and certified values for mussel CRMs.^a

Element	Candidate CRM	IRMM CE 278	NIST SRM 2976
As, mg kg ⁻¹	15.8 ± 0.5	6.07 ± 0.13	13.3 ± 1.8
Br, mg kg ⁻¹	338 ± 5	NC	(329 ± 15)
Cd, mg kg ⁻¹	0.654 ± 0.013	0.348 ± 0.007	0.82 ± 0.16
Co, mg kg ⁻¹	0.86 ± 0.01	NC	(0.61 ± 0.02)
Cr, mg kg ⁻¹	0.90 ± 0.06	0.78 ± 0.06	NC
Fe, mg kg ⁻¹	373 ± 6	NC	171.0 ± 4.9
Hg, mg kg ⁻¹	0.188 ± 0.020	0.196 ± 0.009	0.0610 ± 0.0036
K, %	1.3 ± 0.2	NC	(0.76 ± 0.03)
Na, %	2.79 ± 0.01	NC	(3.5 ± 0.1)
Se, mg kg ⁻¹	3.6 ± 0.2	1.84 ± 0.10	1.80 ± 0.15
Zn, mg kg ⁻¹	103 ± 1	83.1 ± 1.7	137 ± 13

NC – not certified; concentrations in parentheses are informative values (not certified); ^auncertainties are: the standard deviation for three determinations (candidate CRM); 95% confidence intervals (IRMM CE 278); expanded uncertainties (NIST SRM 2976).

RESULTS

At the time being, the material is in the freeze-drying step. Mean water content is about 84%. Preliminary element concentration results in test samples of the mussel candidate reference material are shown in Table 1. As, Br, Co, Cr, Fe, K, Na, Se and Zn were analyzed by Instrumental Neutron Activation Analysis, INAA; Hg by Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry, CVAAS and Cd by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry, ETAAS. For comparison purposes, the certified values for two CRMs are also presented: IRMM CE 278 “mussel tissue” and NIST SRM 2976 “mussel tissue (trace elements and methylmercury)” (IRMM, 2004; NIST, 1998).

Most element concentration values in the candidate RM are at the same order of magnitude of the certified values for IRMM CE 278, which was produced from the tissue of the *Mytillus edulis* mussel collected in the Dutch Wadden Sea and for NIST SRM 2976, which was produced from the tissue of the *Mytillus galloprovincialis* mussel obtained from French commercial producers close to Marseille. Important exceptions are As and Hg. As is present in higher amounts in the candidate RM than in IRMM CE 278. In contrast, Hg is present in the same order of magnitude in IRMM CE 278 but in considerably lower levels in NIST SRM 2976. Such differences are observable in matrix reference materials and reflect differences in water quality, species used in the CRM preparation and the degree of development of the used animals.

DISCUSSION

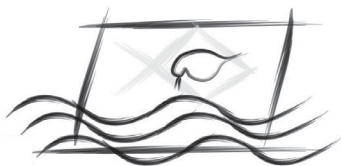
The preliminary results presented in this paper show the viability of the production of a Brazilian mussel certified reference material, which is contribution to Brazilian Metrology as it may be used in the quality assurance of analytical results and hence, they improve the confidence in the data used in biomonitoring as well as in ecotoxicological studies concerned with toxic element determination. It is also important to stress that the certification of the candidate reference material will be possible with the collaboration of other laboratories, as concentration values are usually assessed as the consensus mean among result values obtained in interlaboratory trials.

Acknowledgements — We are indebted to the Brazilian government agencies FAPESP and CNPq for financial support in the preparation of this work.

REFERENCES

- IRMM, INSTITUTE FOR REFERENCE MATERIALS AND MEASUREMENT, 2004, *The certification of the mass fraction of As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Pb, Se and Zn in mussel tissue (Mytilus edulis) – Certified Reference Material ERM-CE278*. European Commission, Geel, Belgium, 20p.
- ISO, INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 1992, *Terms and definitions related to reference materials (ISO Guide 30)*. 2 ed. Genève, Switzerland, 9p.
- ISO, INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 1997, *Calibration in analytical chemistry and use of certified reference materials (ISO Guide 32)*. 1 ed. Genève, Switzerland, 9p.

- ISO, INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2000a, *Reference materials – Contents of certificates and labels (ISO Guide 31)*. 2 ed. Genève, Switzerland, 8p.
- ISO, INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2000b, *Use of certified reference materials (ISO Guide 33)*, 2 ed. Genève, Switzerland, 23p.
- ISO, INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2000c, *General requirements for the competence of reference materials producers (ISO Guide 34)*. 2 ed. Genève, Switzerland, 22p.
- ISO, INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2006, *Reference materials – General and statistical principles for certification (ISO Guide 35)*. 3. ed. Genève, Switzerland, 64p.
- KAYASTH, S. & SWAIN, K. R., 2004, Role of analytical chemistry in environmental monitoring. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 262: 35-42.
- KRAMER, J. M., KRAMER, G. N. & MUNTAU, H., 2001, *Practical manual for the production of laboratory reference materials*, Mermayde, Bergen, Netherlands, 116p.
- NIST, NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS & TECHNOLOGY, 1998, *Standard Reference Material 2976 Certificate of Analysis – Mussel tissue (trace elements and methylmercury)*. Gaithersburg, USA, 8p.
- ZSCHUNKE, A. (ed.), 2000, *Reference materials in analytical chemistry – a guide for selection and use*. Springer, Berlin, Germany, 224p.



SETAC - Brazil

J. Braz. Soc. Ecotoxicol., v. 2, n. 1, 2007, 67-72

JBSE

Mercúrio no Plâncton de um Lago Natural Amazônico, Lago Puruzinho (Brasil)

E. L. NASCIMENTO,^{1*} J. P. O. GOMES,^{1,2} R. ALMEIDA,¹ W. R. BASTOS,¹ J. V. E. BERNARDI¹ & R. K. MIYAI³

¹Laboratório de Biogeoquímica Ambiental, Núcleo de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de Rondônia,
Rodovia BR-364, km 9,5, Sentido Acre, CEP 78900-500, Porto Velho, RO, Brasil

²Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA,
Avenida Jorge Teixeira, 3559, Porto Velho, RO, Brasil

³Centrais Elétricas do Norte do Brasil S/A, Rua Major Amarantes, 513, Arigolândia, Porto Velho, RO, Brasil

(Received August 16, 2006; Accepted December 13, 2006)

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo avaliar as concentrações de mercúrio total (Hg) em amostras de plâncton do lago Puruzinho, localizado à margem esquerda do rio Madeira, a 20 km da cidade de Humaitá (Amazonas, Brasil). Foram realizadas três amostragens em um ponto central do lago (S07°22'19,2"; W063°02'32,2"), que correspondem aos períodos chuvoso (fevereiro de 2004 e maio de 2005) e seco (outubro de 2004). As amostras de plâncton foram coletadas com o uso de duas redes de náilon, sendo que uma alíquota do concentrado de plâncton de cada rede utilizada foi fixada para posterior identificação e contagem dos organismos e outra foi liofilizada para a análise de Hg. A determinação de Hg foi realizada por espectrofotometria de absorção atômica por geração de vapor frio (FIMS-400). A maior concentração de Hg no plâncton foi observada na coleta de fevereiro de 2004 (337 µg kg⁻¹), período chuvoso. Os níveis encontrados no plâncton do lago Puruzinho são comparáveis aos encontrados em estudos de regiões consideradas impactadas por Hg. Com a inundação da vegetação marginal (igapó) durante os períodos de chuva, pode ter ocorrido no lago a entrada de mercúrio associado às partículas de solo por meio do processo de lixiviação, bem como a ressuspensão do mercúrio adsorvido no sedimento de fundo, disponibilizando este metal para a comunidade planctônica.

Palavras-chave: mercúrio, zooplâncton, fitoplâncton, lago Puruzinho, Amazônia.

ABSTRACT

Mercury in the plankton of an Amazon natural lake, Puruzinho Lake (Brazil)

This study has the objective of evaluating the total mercury concentrations (Hg) in plankton samples of Puruzinho Lake, which is located on the left margin of the Madeira River, 20 km downstream of the Humaitá city (Amazon state, Brazil). Three samples were taken at a central part of the lake (S07°22'19.2"; W063°02'32.2") during rainy (February 2004 and May 2005) and dry (October 2004) seasons. Plankton samples were collected using two nets of nylon. An aliquot of each plankton filtrate was preserved for posterior plankton identification, and another lyophilized for Hg analysis. The total mercury was determined by atomic absorption spectrophotometry and cold vapor generation (FIMS-400). The highest concentration of mercury in the plankton was observed in February of 2004 (337 µg kg⁻¹), the rainy period. Levels in the plankton were comparable to those from regions considered contaminated by Hg. Inputs of mercury are likely to happen due to run off after soil flooding during the rainy season, which also turn this metal available to the planktonic community.

Key words: mercury, zooplankton, fitoplankton, Puruzinho Lake, Amazon.

*Corresponding author: Elisabete Lourdes do Nascimento, e-mail: betalabmerc@yahoo.com.br.

INTRODUÇÃO

A contaminação por mercúrio (Hg) na região amazônica é associada ao uso deste metal em garimpos de ouro. Entretanto, alguns estudos sugerem que parte do mercúrio encontrado na região amazônica seria de origem natural (Fadini & Jardim, 2001; Wasserman *et al.*, 2003; Roulet & Lucotte, 1995).

O mercúrio entra na cadeia alimentar principalmente pela transformação do íon Hg^{2+} em metilmercúrio (MeHg ou CH_3Hg^+) por um processo de metilação, em que o Hg^{2+} recebe um grupamento metila, sendo a forma mais comum do mercúrio encontrada na biota, principalmente em organismos topo de cadeia alimentar. Cada forma química do Hg apresenta uma toxicidade, sendo o metilmercúrio considerado o composto de mercúrio mais tóxico, por ser substância neurotóxica e teratogênica, capaz de causar danos irreversíveis. Esse composto pode ser absorvido por uma gama de organismos aquáticos, sendo capaz de bioacumular e biomagnificar ao longo dos níveis tróficos devido ao fato de ligar-se fortemente às proteínas, o que facilita sua passagem através dos tecidos, além de baixa eliminação quando comparado às formas inorgânicas de mercúrio (Seewt & Zelikoff, 2001). Fatores ambientais (pH, o carbono orgânico dissolvido (COD) e a temperatura), ecológicos (produtividade e posição trófica) e fisiológicos (graus de assimilação de mercúrio) podem influenciar essa bioacumulação do Hg (Watras *et al.*, 1998).

A transferência energética dentro da cadeia alimentar aquática consiste em importante via de entrada e acumulação de Hg nos peixes, que pode começar ainda em seus estágios larvais. Entretanto, essa hipótese é incerta, devido às lacunas existentes em relação ao comportamento do Hg em ambientes aquáticos. Esta incerteza deve-se em parte à carência de informações quanto ao comportamento do Hg nos pequenos organismos, que são fontes de alimento para os peixes jovens, a exemplo do zooplâncton (Watras & Bloom, 1992). Determinar as concentrações de Hg e seus compostos em organismos de pequeno tamanho é um desafio em razão das baixas concentrações de Hg presente em águas naturais (Watras & Bloom, 1992).

O fitoplâncton pode incorporar mercúrio por processos passivos, enquanto o zooplâncton pode incorporar mercúrio por processos passivos e ativos por meio da ingestão de alimento contaminado (fitoplâncton, material particulado em suspensão). Nos organismos zooplânctônicos, o Hg incorporado da fase dissolvida tende a acumular-se principalmente no exoesqueleto (Fishe & Hook, 2002). Algumas pesquisas revelaram que a composição da carapaça do zooplâncton (cálcio ou polissacarídeo) é fundamental na bioacumulação de substâncias tóxicas (Hembray & Masson, 2003).

Os teores de Hg presentes nos organismos planctônicos podem causar efeitos negativos para os mesmos, como a redução nas taxas de reprodução. Isso foi observado em cladóceros

de água doce e copépodos marinhos que, após exposição ao Hg inorgânico via alimentação (fitoplâncton), apresentaram decréscimo de 50% a 75% na produção de ovos que, aparentemente, está relacionado ao acúmulo de Hg nos ovários (Fishe & Hook, 2002).

Os aportes de Hg para a região amazônica são oriundos de aportes naturais, atmosféricos e, principalmente, atividades antrópicas associadas ao garimpo do ouro (Hanon *et al.*, 1995). Os dados referentes às quantidades de Hg que foram lançadas em rios, solos e atmosfera no ambiente amazônico nas décadas de 1970 e 1980 diferem entre os autores, mas todos sugerem cargas da ordem de 1.000 a 4.000 toneladas (Lacerda & Solomons, 1992).

Desta forma, por meio da determinação das concentrações de Hg no plâncton do lago Puruzinho, o presente trabalho tem por objetivo contribuir com os escassos estudos do comportamento do mercúrio nos organismos pertencentes à base da cadeia alimentar aquática (fitoplâncton e zooplâncton) na região amazônica.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O lago Puruzinho está localizado à margem esquerda do rio Madeira, a 20 km da cidade de Humaitá, no Estado do Amazonas (Figura 1). Foram realizadas três amostragens em um ponto central do lago (S07°22'19,2" e W063°02'32,2"), nos meses de fevereiro (período chuvoso) e outubro (período seco) de 2004 e maio (período chuvoso) de 2005.

Plâncton

Para a coleta de plâncton foram realizados arrastes na superfície da água com o barco em movimento (4,5 km/h) utilizando duas redes de náilon, uma com abertura de poro de 68 μ m, apropriada para coleta de zooplâncton, e outra com 20 μ m de abertura de poro, apropriada para coleta de fitoplâncton. O plâncton de ambas as redes foi acondicionado em frascos de polietileno até a obtenção de 4 L de concentrado de plâncton para cada rede utilizada.

Identificação das amostras de fitoplâncton e zooplâncton

Em campo, uma alíquota de cada filtrado de plâncton foi removida para posterior identificação do plâncton. O fitoplâncton foi fixado com solução *Transeaux* e o zooplâncton, com formol 8%. Para a identificação e contagem das amostras de fitoplâncton e zooplâncton foi utilizado o método proposto por Lund *et al.* (1958), com precisão de $\pm 20\%$ ($p < 0,05$). A identificação e a contagem das amostras foram realizadas em microscópio óptico (Leika, Alemanha), pela observação de caracteres morfológicos e com bibliografia específica para cada grupo (Edmondson, 1959; Bicudo & Bicudo, 1970).

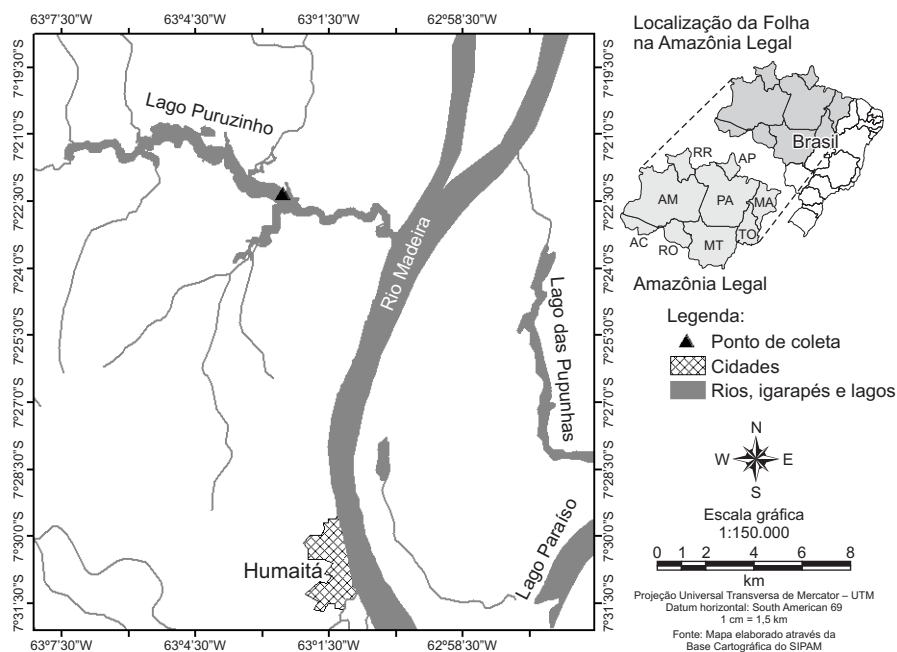


Figura 1 – Localização da área de estudo.

Determinação de mercúrio no plâncton

Para a determinação de mercúrio, as amostras de plâncton total (zooplâncton + fitoplâncton) foram liofilizadas e sofreram processo de digestão ácida em banho-maria, conforme metodologia de Bastos *et al.* (1998). As amostras foram pesadas em tubos de ensaio (50 mg), e a digestão ocorreu em presença de 2 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), 3,0 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4 P.A) e 3,0 mL de ácido nítrico (HNO_3 P.A) a 60°C por cerca de 8-10 horas. Em seguida, foram adicionados 5,0 mL de $KMnO_4$ 5% e, após o período de 12 h e resfriamento das amostras, 1 mL de cloridrato de hidroxilamina 12%. As determinações de Hg total foram realizadas pela técnica de espectrofotometria de absorção atômica por geração de vapor frio (FIMS-400, Perkin-Elmer, Alemanha).

Parâmetros físico-químicos da água

Os parâmetros físico-químicos da água analisados foram: oxigênio dissolvido, temperatura, pH e condutividade. As concentrações de oxigênio dissolvido foram determinadas pelo método titulométrico de Winkler, descrito em Golterman *et al.*, 1978. Os dados de temperatura foram obtidos *in loco* com o uso de um termistor (HORIBA, modelo U10, Japão). O pH e a condutividade foram medidos em laboratório com o uso de um pHmetro de bancada e um condutivímetro de banca (Digitimed, Brasil), respectivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros físico-químicos indicaram maior concentração de oxigênio nas coletas de outubro ($5,7 \text{ mg L}^{-1}$; $31,9^\circ\text{C}$) e fevereiro de 2004 ($5,9 \text{ mg L}^{-1}$; $27,5^\circ\text{C}$) e menor em maio de 2005 ($3,0 \text{ mg L}^{-1}$; $28,5^\circ\text{C}$). O valor encontrado em fevereiro de 2004 pode ser considerado alto, uma vez que no período de cheia grande parte da vegetação marginal do lago está submersa. Já em outubro de 2004, com a menor movimentação das águas, é gerado ambiente menos turbulento, propiciando assim o desenvolvimento do fitoplâncton. Em maio de 2005, o baixo valor de oxigênio dissolvido registrado provavelmente está relacionado com a decomposição da vegetação submersa. As águas estiveram mais quentes no período de seca (outubro 2004 – $31,9^\circ\text{C}$), com menores temperaturas no período chuvoso (fevereiro de 2004 – $27,5^\circ\text{C}$; maio de 2005 – $28,5^\circ\text{C}$), enquanto o pH da água foi ácido nos três períodos amostrados ($5,4$ – fevereiro de 2004; $5,6$ – outubro de 2004; $5,2$ – maio de 2005). Como o lago Puruzinho possui grande carga de matéria orgânica em decomposição, principalmente no período de cheia, pode-se classificá-lo com um lago de água preta (Sioli & Klinge, 1964), caracterizado por baixos valores de pH. A condutividade foi maior na coleta de outubro de 2004 ($15,2 \mu\text{S cm}^{-1}$) e menor nas coletas de fevereiro de 2004 ($8,3 \mu\text{S cm}^{-1}$) e maio de 2005 ($9,2 \mu\text{S cm}^{-1}$). No período de seca, o lago Puruzinho passa a

receber influência da água branca do rio Madeira, e este, rico em sólidos em suspensão (Gomes *et al.*, 2006), tende a elevar os valores de condutividade do lago Puruzinho. Apesar de o presente estudo ter avaliado Hg total, é possível observar pelos parâmetros físicos e químicos da água que o lago Puruzinho apresenta características favoráveis à metilação do Hg (Lacerda & Solomons, 1992), como baixos valores de pH e oxigênio dissolvido e elevadas temperaturas.

A concentração mais elevada de mercúrio no plâncton foi registrada na coleta de fevereiro de 2004 (337 $\mu\text{g kg}^{-1}$), seguida pelas coletas de maio de 2005 (136 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e outubro de 2004 (34 $\mu\text{g kg}^{-1}$). É provável que essa diminuição nas concentrações de mercúrio no plâncton esteja em parte relacionada à composição da comunidade, uma vez que a amostra de fevereiro era dominada por zooplâncton (~90% da amostra), enquanto nas coletas de maio de 2005 e outubro de 2004 houve redução na dominância do zooplâncton, predominando fitoplâncton (~85% e ~95%, respectivamente). A variabilidade na composição de grupo de organismos pertencentes ao fito e zooplâncton também pode ter influenciado os níveis de Hg observados. Foi possível observar alternância na dominância entre os três principais grupos de organismos pertencentes ao zooplâncton (Figura 2). Correlação inversa pode ser observada entre a concentração de Hg e a dominância de cladóceros, apesar da maior dominância dos cladóceros ter ocorrido em outubro de 2004, quando o fitoplâncton era mais abundante que o zooplâncton.

Alguns estudos indicam que há relação entre a concentração de mercúrio e a composição (tamanho) do plâncton. Kainz *et al.* (2005) avaliaram as concentrações de mercúrio total e metilmercúrio e suas possíveis correlações com os ácidos graxos em 4 diferentes frações do zooplâncton (10-64 μm , 100-200 μm , 200-500 μm e maior que 500 μm), verificando que as concentrações de mercúrio total aumentaram progressivamente nos organismos de maior tamanho. Entretanto, não foi encontrada nenhuma correlação

entre os níveis de metilmercúrio e lipídios. Por outro lado, em um estudo em lagos de planície inundada da região do rio Negro e rio Tapajós (Amazônia), Pacheco-Peleja (2002) verificou que os maiores valores de mercúrio (452 e 264 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente) foram registrados em organismos planctônicos menores que 40 μm .

A importância do estudo do fito e do zooplâncton em relação às concentrações de mercúrio está na verificação de possível alteração em seu metabolismo, devido à presença deste metal e sua posição trófica, pois o zooplâncton incorpora mercúrio principalmente pela alimentação com fitoplâncton, transferindo este elemento para os níveis subsequentes (larvas de peixe, insetos, peixes planctívoros e outros).

Os níveis encontrados no plâncton do lago Puruzinho são comparáveis aos encontrados em estudos da região amazônica (lagos do rio Negro e rio Tapajós) e do Canadá (reservatório de Quebec), considerados impactados por Hg (Tabela 1), sendo mais elevados que níveis obtidos no plâncton de áreas pouco impactadas (reservatório de ribeirão das Lajes, RJ).

Apesar de a exploração de ouro na bacia do rio Madeira ter registrado seu auge nas décadas de 1980 e 1990, ela ainda pode ser considerada importante fonte de Hg para o ambiente aquático. Portanto, o transporte atmosférico e a drenagem hídrica de Hg das áreas de garimpagem da região do rio Madeira podem representar a principal fonte de Hg para a região em estudo. Além disso, a presença de partículas orgânicas e inorgânicas de origem alóctone ou autóctone observadas nas amostras analisadas pode ter influenciado as concentrações de Hg encontradas no plâncton do lago Puruzinho, principalmente no período chuvoso (fevereiro de 2004 e maio de 2005). Com a inundação da vegetação marginal (igapó) durante os períodos de chuva, pode ter ocorrido a entrada de mercúrio associado às partículas de solo pelo processo de lixiviação, bem como a ressuspensão do mercúrio adsorvido ao sedimento de fundo, disponibilizando esse metal para a comunidade planctônica.

Tabela 1 – Concentração de mercúrio ($\mu\text{gHg kg}^{-1}$) no plâncton de diferentes regiões.

Localidades	Min-Max	Trabalhos
Lago rio Negro (AM/Brasil)	242-452	Pacheco-Peleja, 2002
Lago rio Tapajós (AM/Brasil)	150-264	Pacheco-Peleja, 2002
Reservatório de ribeirão das Lajes (RJ/Brasil)	30-100	Palermo, 2002
Reservatório de Quebec (Quebec/Canadá)	70-538	Tremblay <i>et al.</i> , 1998
Reservatório da U.H.E. Samuel (RO/Brasil)	4-309	Nascimento, 2006
Lago Puruzinho (AM/Brasil)	34-337	Presente trabalho

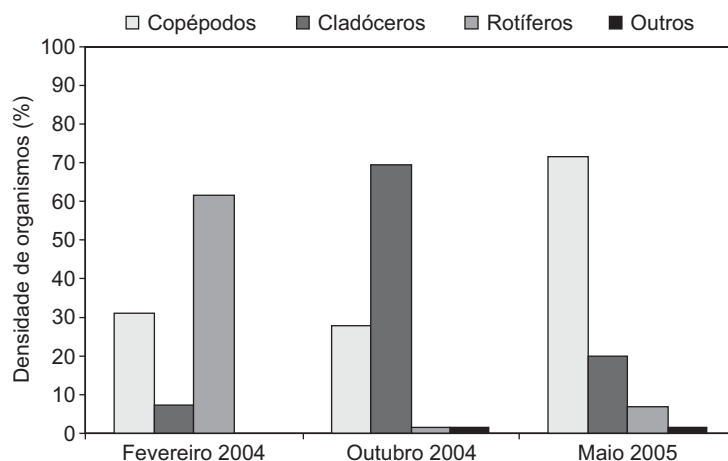


Figura 2 – Composição dos organismos zooplânctônicos estudados nos meses de coleta: fevereiro e outubro de 2004 e maio de 2005.

CONCLUSÕES

Os níveis encontrados no plâncton do lago Puruzinho indicam contaminação significativa por mercúrio total, sendo necessário estudo da especiação química desse metal na comunidade planctônica, uma vez que esse lago possui características físicas e químicas favoráveis à metilação do mercúrio.

Agradecimentos — À Comunidade do Lago Puruzinho. Ao CNPq, MCT-CNPq-CT-Amazônia Proc. Nº 553269-2005-4 e CNPq-PPG-7-Fase II Proc. Nº 556934-2005-9, pelo apoio financeiro. Equipes dos laboratórios de Biogeoquímica Ambiental (UNIR) e Radioisótopos Eduardo Penna Franca (UFRJ).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASTOS, W. R., MALM, O., PFEIFFER, W. & CLEARY, D., 1998, Establishment and analytical quality control of laboratories for Hg determination in biological and geological samples in the Amazon, Brazil. Technical Review. *An. Acad. Bras. Cienc.*, 8: 255-260.
- BICUDO, C. E. M. & BICUDO, R. M. T., 1970, *Algas de águas continentais brasileiras: chave ilustrada para identificação de gêneros*. Fundação Brasileira para o Desenvolvimento do Ensino de Ciências (FBDE), São Paulo, 228p.
- EDMONDSON, W. T., 1959, *Fresh-water biology*. Washington, 1248p.
- FADINI, P. S. & JARDIM, W. F., 2001, Is the Negro River Basin (Amazon) impacted by naturally occurring mercury? *Sci. Total Environ.*, 275: 71-82.
- FISHE, N. S. & HOOK, S. E., 2002, Toxicology tests with aquatic animals need to consider the trophic transfer of metals. *Toxicology*, 181: 531-536.
- GOLTERMAN, H. L., CLYMO, R. S. & OHNSTAD, M. A. M., 1978, *Methods for physical and chemical analysis of freshwaters*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 213p.
- GOMES, J. P. O., NASCIMENTO, E. L., ALMEIDA, R., BASTOS, W. R., BERNARDI, J. V. E. & BARROS, P. R. H. B., 2006, Distribuição espacial das concentrações de mercúrio em sólidos em suspensão no Alto Rio Madeira – Rondônia. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, 1: 35-39.
- HANCON, S., ARTAXO, P., GERAB, F., YAMASOE, M. A., CAMPOS, R. C., CONTI, L. F. & LACERDA, L. D., 1995, Atmospheric mercury and trace elements in the region of Alta Floresta in the Amazon Basin. *Water Air Soil Poll.*, 80: 273-283.
- HEMBRAY, A. & MASSON, S., 2003, Effects of intensive fishing on the structure of zooplankton communities and mercury levels. *Sci. Total Environ.*, 304: 377-390.
- KAINZ, M., TELMER, K. & MAZUNDER, A., 2005, Bioaccumulation patterns of methyl mercury and essential fatty acids in lacustrine planktonic food webs and fish. *Sci. Total Environ.*, 368: 271-282.
- LACERDA, L. D. & SOLOMONS, W., 1992, *Mercúrio na Amazônia: uma bomba-relógio química?* Série Tecnologia Ambiental. Rio de Janeiro, CETEM/CNPq, 78p.
- LUND, J. W. G., KIPLING, C. & LE-KREN, D., 1958, The inverted microscope method of estimating algal numbers and statistical basis of estimation by counting. *Hydrobiology*, 58: 143-170.
- NASCIMENTO, R. L., 2006, *Concentração de mercúrio no plâncton e fatores ecológicos no reservatório da U.H.E.-Samuel-Amazônia Ocidental (Rondônia/Brasil)*. Dissertação de Mestrado, Fundação Universidade Federal de Rondônia-UNIR, Porto Velho-RO, Brasil, 122p.
- PACHECO-PELEJA, J. R., 2002, *Os fatores que influem no nível de mercúrio (Hg) na água e no plâncton de lagos associados aos rios Tapajós e Negro*. Dissertação de Mestrado, INPA/FUA, Manaus-AM, Brasil, 75p.
- PALERMO, E. F. A., 2002, *Avaliação dos níveis naturais de mercúrio e metilmercúrio no reservatório de Ribeirão das Lajes, RJ*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro-RJ, Brasil, 46p.
- ROULET, M. & LUCOTTE, M., 1995, Geochemistry of mercury in pristine and flooded ferralitic soils of a tropical rain forest in French Guiana, South America. *Water, Air, Soil Pollut.*, 80: 1079-1088.
- SEEWIT, L. & ZELIKOFF, J., 2001, Toxicology and immunotoxicology of mercury: a comparative review in fish and humans. *J. Toxicol. Environ. Health*, 4: 161-205.

- SIOLI, H. & KLINGE, H., 1964, Solos, tipos de vegetação e água na Amazônia. *Boletim geográfico: informações, notícias, bibliografia e legislação*, 179: 147-153.
- TREMBLAY, A., LUCOTTE, M. & SCHETAGNE, A., 1998, Total mercury and methylmercury accumulation in zooplankton of hydroelectric reservoirs in northern Québec (Canada). *Sci. Total Environ.*, 213: 307-315.
- WASSERMAN, J. C., HACON, S. & WASSERMAN, M. A., 2003, Biogeochemistry of mercury in the Amazonian. *Ambio*, 32: 336-342.
- WATRAS, C. J. & BLOOM, N. S., 1992, Mercury and methylmercury in individual zooplankton: implications for bioaccumulations. *Limnol. Oceanogr.*, 6: 1313-1318.
- WATRAS, C. J., BACK, R. C., HALVORSEN, S., HUDSON, R. J. M., MORRISON, K. A. & WENTE, S. P., 1998, Bioaccumulation of mercury in pelagic freshwater food webs. *Sci. Total Environ.*, 219: 183-208.



SETAC - Brazil

Preliminary Appraisal of Imposex in Areas Under the Influence of Southern Brazilian Harbors

I. B. DE CASTRO,^{1,2} C. E. BEMVENUTI² & G. FILLMANN^{2*}

¹Laboratório de Zoobentos, Instituto de Ciências do Mar, LABOMAR/UFC, Av. da Abolição, 3207, Bairro Meireles, CEP 60165-081, Fortaleza, CE, Brasil

²Fundação Universidade Federal do Rio Grande, C.P. 474, CEP 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil

(Received November 1, 2006; Accepted January 10, 2007)

ABSTRACT

Imposex in gastropod mollusks is an efficient and low-cost biomarker for pollution by organotin compounds. Such substances are typically found in areas with an intense flux of vessels, such as marinas and harbors. This study preliminarily evaluated the occurrence of imposex in *Stramonita haemastoma* (Linnaeus, 1758) populations along the areas under the influence of the main harbors from southern Brazil (Paranaguá, PR; São Francisco do Sul, SC; Itajaí, SC; and Rio Grande, RS). Although no chemical analyses were performed so far to confirm the presence of organotins, the occurrence of imposex strongly suggests a contamination by these compounds in the studied areas and it is likely that the closest from the harbors (as the main sources) the more contaminated the environment. However, due to the limitations of *S. haemastoma*, it is important to assess the response of alternative species adapted to mesohaline environments and non-consolidated substrates, in order to make up for the lack of indicator species for some areas such as Patos Lagoon and Itajaí-Açu estuaries.

Key words: imposex, *Stramonita haemastoma*, organotin, estuary, southern Brazil.

RESUMO

Avaliação preliminar de imposex em área sob a influência de portos do sul do Brasil

O imposex em moluscos gastrópodes é um eficiente biomarcador de baixo custo para contaminação por compostos orgânicos de estanho. Esses compostos são tipicamente encontrados em áreas com intenso fluxo de embarcações, como marinas e terminais portuários. O presente estudo verificou preliminarmente a ocorrência de imposex em populações de *Stramonita haemastoma* (Linnaeus, 1758) ao longo das áreas sob a influência dos principais terminais portuários do sul do Brasil (Paranaguá, PR, São Francisco do Sul, SC, Itajaí, SC, e Rio Grande, RS). Apesar de não confirmados quimicamente, a ocorrência de imposex em todas as áreas estudadas sugere contaminação por compostos orgânicos de estanho, sendo possivelmente tanto maior quanto mais próxima dos portos (ou das fontes). Porém, em razão das limitações de *S. haemastoma*, é importante avaliar essa resposta em espécies alternativas que suportem ambientes mesohalinos e com substratos não consolidados, possibilitando assim avaliação mais completa de ambientes como os estuários da Lagoa dos Patos e Itajaí-Açu.

Palavras-chave: imposex, *Stramonita haemastoma*, organoestanho, estuário, sul do Brasil.

*Corresponding author: Gilberto Fillmann, e-mail: gilberto@pesquisador.cnpq.br.

INTRODUCTION

Imposex is the appearance of male sexual features (penis and vas deferens) in neogastropod females exposed to organotin compounds (tributyltin and triphenyltin) (Gibbs & Bryan, 1987). This is a highly specific biomarker, which indicates physiological changes associated with the reproductive organs in gastropods exposed to organotin compounds (Matthiessen & Gibbs, 1998). Such compounds are found mainly in antifouling paints used for the coating of ships and aquaculture structures (Horiguchi *et al.*, 1994). Therefore, it has been widely used worldwide to monitor the contamination of aquatic environments (Morcillo & Porte, 1998; Axiak *et al.*, 2003; Minchin, 2003), being reported in 132 species of gastropod mollusks (Castro *et al.*, *in press*).

Some cases of imposex were reported in Latin America, specifically in Chile using *Nucella crassilabrum*, *Chorus giganteus*, *Xantochorus cassidiformes* (Gooding *et al.*, 1999) and *Acanthina monodon* (Osorio & Huaquin, 2003), and in Argentina using *Bucinanops monilifer*, *Adelomelon brasiliana* (Penchaszadeh *et al.*, 2001) and *Olivancillaria auricularia* (Cledon *et al.*, 2006) as bioindicators. Imposex was also found at Northeast and Southeast coast of Brazil during monitoring

studies using the muricid *Stramonita haemastoma* at Ceará (Castro *et al.*, 2000), Paraíba, Pernambuco (Castro, 2005) and Rio de Janeiro (Fernandez *et al.*, 2002; Fernandez *et al.*, 2005), and *Stramonita rustica* at Rio Grande do Norte (Castro *et al.*, 2004), Alagoas (Camillo *et al.*, 2004) and Sergipe (Castro *et al.*, 2005). Caetano & Absalão (2003) also found imposex in the olivid *Olivancillaria vesica* at coastal areas of Rio de Janeiro. All of these studies showed a clear relationship with distance from harbors.

Considering the lack of previous studies, this work aims to preliminarily verify the occurrence of imposex in areas under the influence of the most important harbors of Southern Brazil (e.g. Paranaguá-PR, São Francisco do Sul-SC, Itajaí-SC and Rio Grande-RS) using *Stramonita haemastoma* as a bioindicator.

MATERIALS AND METHODS

Four harbors in the southern region of Brazil were chosen based on their cargo load and annual flow of vessels. Up to five sampling stations were chosen for the region under the influence of each harbor based on the distance from potential sources of contamination, availability of *Stramonita haemastoma* (Linnaeus, 1758) and local dynamics (Table 1).

Table 1 – Position (latitude and longitude) of the sampling stations and their distance from the main harbor.

Harbor	Station	Description	Latitude	Longitude	Distance from harbor (km)	N. ships/year*
Paranaguá (Paranaguá Bay)	E1	Galheta Island	26°55'11"	48°38'28"	23.93	2252
	E2	Mel Island	25°34'24"	48°19'01"	23.53	
	E3	Marina	25°32'41"	48°22'31"	17.00	
	E4	Guará Island	25°28'45"	48°31'36"	2.87	
	E5	Gererê Island	25°29'02"	48°34'31"	4.22	
São Francisco do Sul (Babitonga Bay)	E1	Paulas Beach	26°13'39"	48°36'59"	2.28	395
	E2	Ingleseas Beach	26°13'45"	48°37'39"	1.32	
	E3	Northeastern Harbor	26°13'53"	48°38'6,7"	0.66	
	E4	Tourist Harbor	26°14'30"	48°38'24"	0.45	
	E5	Flores Island	28°15'54"	48°42'31"	6.19	
Itajaí (Itajaí-Açu estuary)	E1	Brava Beach	26°55'43"	48°37'39"	5.37	902
	E2	Cabeçudas Beach	26°55'17"	48°38'12"	3.52	
	E3	Outside of South Jetty	26°54'56"	48°28'23"	2.99	
	E4	Outside of North Jetty	26°54'37"	48°34'30"	2.57	
Rio Grande (Patos Lagoon estuary)	E1	Ship Wreck – 16 km South of E2	32°17'29"	52°15'34"	19.32	1652
	E2	Outside base of West Jetty	32°09'39"	52°05'49"	1.42	
	E3	Outside end of West Jetty	32°11'00"	52°05'00"	5.24	
	E4	Outside end of East Jetty	32°08'50"	52°04'40"	5.62	
	E5	Outside base of East Jetty	32°10'56"	52°04'30"	2.48	

*Source: Ministério dos Transportes, 2006.

Up to 30 adult specimens (20-30 mm) of *S. haemastoma* were sampled (either manually or by free diving) in each station during January 2006. The organisms were stored in plastic bags, labeled and taken to the laboratory where they were narcotized with a 3.5% MgCl solution for a period of 2 hours. Shells were then measured with a caliper (0.05 mm) from the spiral tip to the end of the siphon channel. Thus, shells were removed for the analysis of the soft tissues. Gender identification was based on the presence of a seminal receptacle (only in females) and the prostate gland (only in males).

The imposex levels were quantified using the following indexes: % of imposex in females, Relative Penis Length Index (RPLI) and the Vas Deferens Development Stage Index (VDSI). The RPLI was calculated by mean penis length in females/mean penis length in males) \times 100 (Gibbs & Bryan, 1987), while the VDSI comprised the six-stage scale proposed by Gibbs & Bryan (1994) for *Nucella lapillus* and modified by Fernandez *et al.* (2005) for organisms of *Stramonita* genus.

RESULTS

Paranaguá Bay (PR). Most of the stations sampled at Paranaguá Bay showed an imposex occurrence higher than 85%, with the highest levels found in stations E4 (located in front of the Paranaguá harbor) and E3 (located nearby a big marina where many small boats were moored). Station E1

showed the lowest levels, since it was located in the outer part of the bay and far away from possible sources (Figure 1).

Babitonga Bay (SC). The levels found in the inner part of the Bay showed an imposex gradient decreasing with increasing distance from the São Francisco do Sul harbor. Stations E4 (south from the harbor) and E3, E2 and E1 (north from it) showed imposex in 100% of the sampled organisms with an RPLI as high as 65.0. On the other hand, the organisms from station E5 did not show any sign of imposex, due to probably its upstream location (Figure 2).

Itajaí-Açu estuary and adjacent coastal area (SC). Two out of four sampled stations under the influence of the Itajaí Harbor showed imposex. Stations E3 and E4, both at the jetties of the harbor entrance, showed imposex in 100% of the sampled organisms with an RPLI of 3.8 and 1.8, respectively (Figure 3). Stations E2 and E1 did not show any sign of imposex, possibly because of their location at the adjacent coast and far away from the harbor.

Patos Lagoon estuary and adjacent coastal area (RS). Imposed animals were found in every sampling station, with the highest indexes found at the west jetty protecting the west side of the access to the Rio Grande harbor (e.g. E2 and E3) (Figure 4). Even located far away from the harbor and southwards along the coast, station E1 showed imposex in 18% of the sampled organisms (Figure 4).

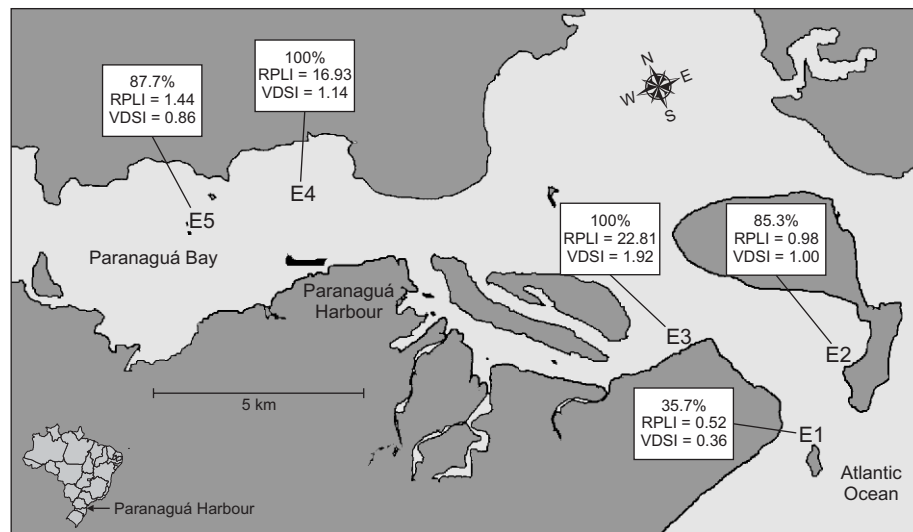


Figure 1 – Imposex frequency (%), RPLI and VDSI for each station sampled at Paranaguá Bay (PR).

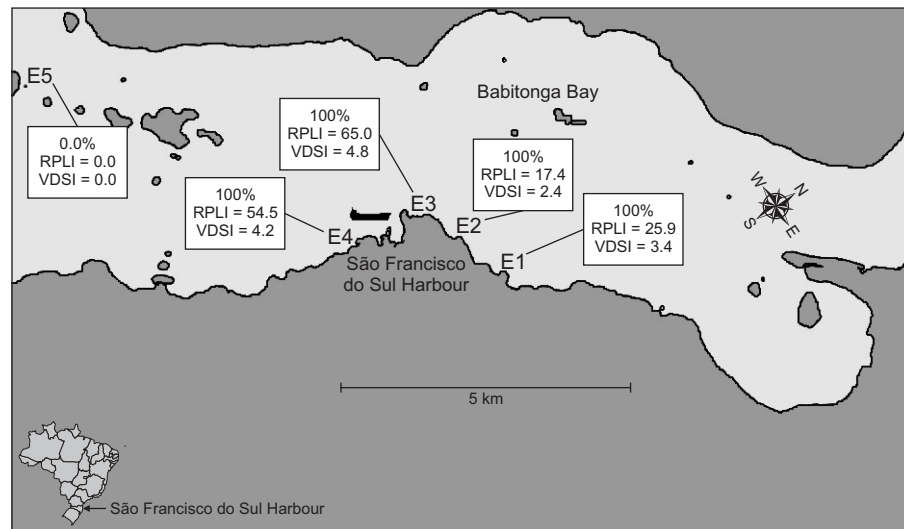


Figure 2 – Imposex frequency (%), RPLI and VDSI for each station sampled at Babitonga Bay (SC).

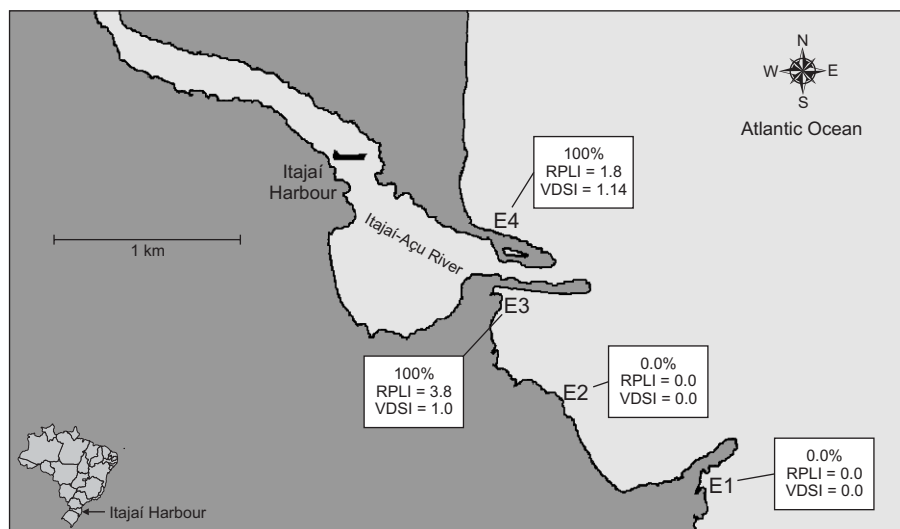


Figure 3 – Imposex frequency (%), RPLI and VDSI for each station sampled nearby the Itajaí harbor and adjacent coastal area.

DISCUSSION

Stramonita haemastoma was chosen for this study because 38 out of 132 species reported as presenting imposex were from the Thaididae family, and 18 belonged to the genus *Stramonita* (Castro *et al.*, *in press*). This fact makes this family and this genus as well, most commonly taxon used as a

bioindicator of contamination by organotin compounds all over the world. Furthermore, *Stramonita haemastoma* presents a wide geographical distribution, being found in consolidated substrates in the intertidal zone practically all along the Brazilian coastline (Matthews, 1968). Additionally, no evidences of natural occurrence of imposex in muricid mollusks (such as *Stramonita haemastoma*) were found so far.

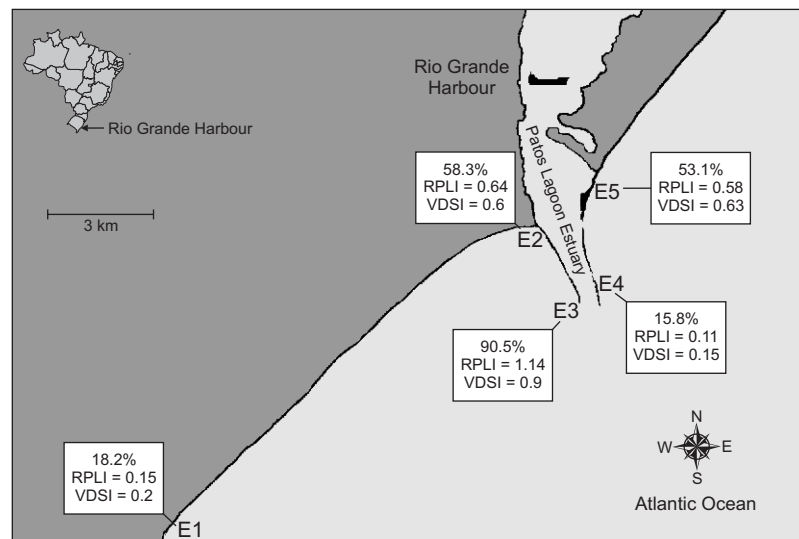


Figure 4 – Imposex frequency (%), RPLI and VDSi for each station sampled nearby the Rio Grande harbor and adjacent coastal area.

Sixteen out of nineteen stations sampled at harbors of southern Brazil showed imposex in *S. haemastoma*. Even showing one of the lowest vessel movements (mean of 352 vessels/year; Table 1), the highest indexes of imposex were found in Babitonga Bay, on station under the influence of São Francisco do Sul harbor. That is probably due to a reduced water exchange rate, which increases the time of exposure to the contaminants. An imposex gradient was observed as a function of distance from the harbor. Similar patterns are often seen in monitoring surveys at open sea (Castro *et al.*, 2000).

Conversely, the Patos Lagoon estuary showed the lowest imposex indexes, even under the influence of one of the biggest Brazilian harbors (Ministério dos Transportes, 2006). Although the local dynamics and dilution capacity of each region were not taken in consideration, the Patos Lagoon estuary has probably one of the highest water exchange rates (Garcia, 1997) among the studied systems. The difficulty to find *S. haemastoma* individuals in areas under the direct influence of Rio Grande harbor has also some influence since the system has a highest capacity to dilute any substance released into its waters. *S. haemastoma* was found only at the outer faces of the jetties, since the inner ones and the estuary itself very often presents very low salinity, which are not tolerated by this mollusk.

The highest imposex indexes of Paranaguá Bay were found at the station closer to the harbor (station E4) and to a marina (station E3), where an intense flow of recreational boats was observed. However, based on its highest movement of vessels (a mean of 2252 vessels/year; Table 1) and intense

flux of recreational boats, Paranaguá Bay should have shown higher imposex levels, which could also be explained by a high capacity to dilute the contaminants. Although most studies on organotin contamination deal mainly with big harbors, it is important to consider the pollution caused by the marinas, where only small and medium-sized boats are found. Studies carried out in marinas of Phuket Island (Thailand) showed imposex levels as high as those found in big harbors around the globe (Bech, 2002).

The Itajaí harbor has a mean annual flow of 902 vessels, mostly constituted by recreational and fishing boats (Ministério dos Transportes, 2006). The results showed the influence of coastal currents on stations located southwards from the entrance of the estuary. Stations E1 and E2 shown no imposex, while stations located at the jetties (E3 and E4) showed the highest indexes of imposex due probably to the permeability of the jetty to the waters coming from the inner estuary. A similar pattern also occurs at the Natal harbor (Northern Brazil) (Castro *et al.*, 2004). However, more detailed studies are needed to confirm this hypothesis.

The results indicated a pattern in the distribution of imposex, once indexes decreased with the distance from some of the monitored harbors (or possible sources). Similar results were observed in studies carried out in the Mediterranean with *Hexaplex trunculus* (Axiak *et al.*, 1995), in the Sanriku region in Japan with *Thais clavigera* (Horiguchi *et al.*, 1998), in Crock Harbour, Ireland, with *Nucella lapillus* and *Littorina littorea* (Minchin *et al.*, 1996), in Phuket Island, Thailand, with *Chicoreus capucinus* and *Thais distinguenda* (Bech, 2002),

in Killybegs, Ireland, with *Nucella lapillus* and *Littorina littorea* (Minchin *et al.*, 1997), as well as in many harbors in the Brazilian northeast (Castro *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2005).

The use of OTCs is a matter of controversy in the international scientific community. In 1996, the United Nations Marine Environment Protection Committee (MEPC) suggested a gradual elimination of TBT-based paints during the following 10 years. This proposal was exhaustively discussed by several countries, and its prohibition was postponed to 2008 (ten Hallers-Tjabbes *et al.*, 2003). Some countries (such as Japan, New Zealand and France) have already banned the use of these compounds in their territories. Other countries such as Canada, USA, South Africa, Australia and most of the European Union countries have limited the use of OTCs to vessels longer than 25 meters (Champ, 2000). In a general way, these prohibitions were motivated by the proved toxicity of OTCs to the biota (ten Hallers-Tjabbes, 1997).

On January 1st, 2005 came into effect a new Brazilian resolution for water quality standards (CONAMA 357, 2005). For the first time levels were established for tributyltin (TBT), with maximum allowed concentrations of 0.01 and 0.37 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Class 1 and 2 salty waters, respectively. Although this regulation represents an improvement, ecotoxicological studies using native species are needed in order to establish more realistic limits, once impacts on marine populations have been reported for exposure to concentrations as low as 0.001 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Alzieu, 2000), which are much lower than those set by the above-mentioned regulation.

The results obtained in the present study indicate that every single Southern Brazilian harbor is probably already contaminated by OTCs and possibly the closest from the harbors (as the main sources) the more contaminated the environment. Although no chemical analyses were performed so far to confirm the presence of organotins, the occurrence of imposex strongly suggests a contamination by these compounds in the studied areas (Matthiessen & Gibbs, 1998). Thus, this screening data will help focusing more detailed future studies, where the unconditional confirmation of contamination will be achieved with the chemical analyses.

In some areas, such as Patos Lagoon estuary and Itajaí-Açu River, imposex indexes were not as high as expected, due probably to the lack of *Stramonita haemastoma* populations in the low salinity regions close to those harbors. Other limitation is that *S. haemastoma* survives only on consolidated substrates such as jetties, rocky shores and harbor columns. Therefore, it is important to assess the response of alternative species, adapted to mesohaline environments and non-consolidated substrates, in order to make up for the lack of indicator species for those areas. In addition, the hydrodynamics must be considered to the better understanding of OTCs distribution along the environment.

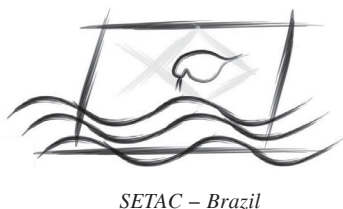
Finally, in view of the fact that the continuous worldwide banishment of the organotin-based antifouling paints is likely to reduce their environmental relevance, the present study represents very important baseline information that can be used in the future to evaluate the effectiveness of the total ban.

Acknowledgements — The authors would like to thank the Center of Marine Studies of the Federal University of Paraná (CEM/UFPR), and especially the members of the Benthos Laboratory: Cynthia Simone Gomes dos Santos, Igor Pessoa and André Senna Garafoni. G. Fillmann was sponsored by CNPQ (PQ 303218/2003-7).

REFERENCES

- ALZIEU, C., 2000, Environmental impact of TBT: the French experience. *Sci Total Environ.*, 258: 99-102.
- AXIAK, V., VELLA, A. J., MICALLEF, D., CHIRCOP, P. & MINTOFF, B., 1995, Imposex in *Hexaplex trunculus* (Gastropoda: Muricidae): first results from biomonitoring of tributyltin contamination in the Mediterranean. *Mar. Biol.*, 121: 685-691.
- AXIAK, V., MICALLEF, D., MUSCA, T. J., VELLA, A. J. & MINTOFF, B., 2003, Imposex as a biomonitoring tool for marine pollution by tributyltin: some further observations. *Environ. Int.*, 28: 743-749.
- BECH, M., 2002, Imposex and tributyltin contamination as a consequence of the establishment of a marina, and increasing yachting activities at Phuket Island, Thailand. *Environ. Pollut.*, 117: 421-429.
- CAETANO, C. H. S. & ABSALÃO, R. S., 2003, Imposex in *Olivancillaria vesica vesica* (Gmelin) (Gastropoda, Olividae) from a Southeastern Brazilian sandy beach. *Rev. Bras. Zool.*, 19: 215-218.
- CAMILLO, E., QUADROS, J., CASTRO, I. B. & FERNANDEZ, M. A. S., 2004, Imposex in *Thais rustica* (Mollusca: Neogastropoda) (Lamarck, 1822) as an indicator of organotin compounds pollution at Maceio coast (Northeastern Brazil). *Braz. J. Ocean.*, 52: 101-105.
- CASTRO, I. B., 2005, *Estudo do imposex em muricídeos do gênero Stramonita (Mollusca: Gastropoda) no Nordeste do Brasil*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 187 p.
- CASTRO, I. B., MATTHEWS-CASCON, H. & FERNANDEZ, M. A. S., 2000, Imposex em *Thais haemastoma* (Linnaeus, 1767) (Mollusca: Gastropoda) uma indicação da contaminação por organoestânicos na costa do município de Fortaleza. *Arq. Ciên. Mar.*, 33: 51-56.
- CASTRO, I. B., MEIRELLES, C. A. O., MATTHEWS-CASCON, H. & FERNANDEZ, M. A. S., 2004, *Thais (Stramonita) rustica* (Lamarck, 1822) (Mollusca: Gastropoda: Thaididae), a potential bioindicator of contamination by organotin in Northeast Brazil. *Braz. J. Ocean.*, 52: 135-139.
- CASTRO, I. B., CAVALCANTE-BRAGA, A. R. & ROCHA-BARREIRA, C. A., 2005, Altos índices de imposex em *Stramonita rustica* (Mollusca: Gastropoda) em áreas portuárias dos estados de Alagoas e Sergipe, Brasil. *Trop. Ocean.*, 33: 121-128.
- CASTRO, I. B., MEIRELLES, C. A. O., PINHEIRO, J. C. L., MATTHEWS-CASCON, H. & ROCHA-BARREIRA, C. A., 2005, The increasing incidence of imposex in *Stramonita haemastoma* (Mollusca: Gastropoda: Muricidae) after the establishment of the Pecem Harbor, Ceará state, Northeast Brazil. *Thalassas*, 21: 71-75.
- CASTRO, I. B., RODRIGUES, L. & ROCHA-BARREIRA, C. A., 2007, Compostos orgânicos de estanho: efeitos sobre a fauna marinha – uma revisão. *Arq. Cien. Mar.*, in press.

- CHAMP, M. A., 2000, A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related costs and benefits. *Sci. Total Environ.*, 258: 21-71.
- CLEDON, M., THEOBALD, N., GERWINSKY, W. & PENCHASZADEH, P. E., 2006, Imposex and organotin compounds in marine gastropods and sediments from the Mar del Plata coast, Argentina. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 86: 1-5.
- CONAMA 357, 2005, National Council of Environment (CONAMA). Resolution Nº 357, March 17th, 2005. Ministry of Environment (MMA). Government of Brazil, 23 p.
- FERNANDEZ, M. A. S., LIMAVERDE, A. C., CASTRO, I. B., WAGENER, A. L. R. & ALMEIDA, A. C. O., 2002, Occurrence of imposex in *Thais haemastoma*: possible evidence of environmental contamination derived from organotin compounds in Rio de Janeiro and Fortaleza, Brazil. *Rep. Public Health*, 18: 463-476.
- FERNANDEZ, M. A. S., WAGENER, A. L. R., LIMAVERDE, A. C., SCOFIELD, A. L., PINHEIRO, F. M. & RODRIGUES, E., 2005, Imposex and surface sediment speciation: A combined approach to evaluate organotin contamination in Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Mar. Environ. Res.*, 59: 435-452.
- GARCIA, C. A. E., 1997, Hydrographic characteristics, pp. 18-20. In: U. Seeliger, C. Odebrecht & J. Castello (eds.), *Subtropical convergence marine ecosystem: the coast and the sea in the warm temperate southwestern Atlantic*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- GIBBS, P. E. & BRYAN, G. M., 1987, TBT paints and demise of the dogwhelk *Nucella lapillus* (Gastropoda). *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 68: 1482-1487.
- GIBBS, P. E. & BRYAN, G. M., 1994, Biomonitoring of tributyltin (TBT) pollution using the imposex response of neogastropod mollusks. In: J. M. Kramer Kees (ed.), *Biomonitoring of coastal waters and estuaries*. Boca Ratón, EUA, CRC Press Inc., p. 2005-226.
- GOODING, M., GALLARDO, C. & LEBALANC, G., 1999, Imposex in three marine gastropod species in Chile and potential impact on muriciculture. *Mar. Poll. Bull.*, 38: 1227-1231.
- HORIGUCHI, T., SHIRAISHI, H., SHIRAISHI, H. & MORITA, M., 1994, Imposex and organotin compounds in *Thais clavigera* and *T. bronni* in Japan. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, 74: 651-669.
- HORIGUCHI, T., HYEON-SEO, C., SHIRAISHI, H., SHIBATA, Y., SOMA, M., MORITA, M. & SHIMIZU, M., 1998, Field studies on imposex and organotin accumulation in the rock shell, *Thais clavigera*, from the Seto Inland Sea and the Sanriku region, Japan. *Sci. Total Environ.*, 214: 65-70.
- MATTHEWS, H. R., 1968, Notas sobre o gênero *Thais* (Roding, 1798) no Nordeste brasileiro. *Arq. Est. Biol. Mar.*, 8: 37-41.
- MATTHIESSEN, P. & GIBBS, P. E., 1998, Critical appraisal of the evidence for tributyltin – mediated endocrine disruption in mollusks. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17: 37-43.
- MINCHIN, D., STROBEN, E., OEHLMANN, J., BAUER, B., DUGGAN, C. B. & KEATINGE, M., 1996, Biological indicators used to map organotin contamination in Cork Harbour, Ireland. *Mar. Pollut. Bull.*, 32: 188-195.
- MINCHIN, D., BAUER, B., OEHLMANN, J., SCHULTE-OEHLMANN, U. & DUGGAN, C. B., 1997, Biological indicators used to map organotin contamination from a fishing port, Killybegs, Ireland. *Mar. Pollut. Bull.*, 34: 235-243.
- MINCHIN, D., 2003, Monitoring of tributyltin contamination in six marine inlets using biological indicators. *Mar. Environ. Health.*, 6: 1-15.
- MINISTÉRIO DOS TRANSPORTES. Available in: <http://www.transportes.gov.br/>. Accessed in: October 6th 2006.
- MORCILLO, Y. & PORTE, C., 1998, Monitoring of organotin compounds and their effects in marine mollusks. *TRAC*, 17: 109-116.
- OSORIO, C. & HUAQUIN, L. G., 2003, Alteración de la sexualidad de *Acanthina monodon* (Pallas, 1774) (Gastropoda: Muricidae) en el litoral de Chile central, inducida por compuestos organoestañosos. *Cienc. Tecnol. Mar.*, 26: 97-107.
- PENCHASZADEH, P. E., AVERBUJ, A. & CLEDÓN, M., 2001, Imposex in gastropods from Argentina (southwestern Atlantic) *Nucella lapillus* and the common whelk *Buccinum undatum* as indicators of TBT contamination. *Mar. Pollut. Bull.*, 42: 790-791.
- TEN HALLERS-TJABBES, C. C., 1997, Tributyltin and policies for antifouling. *Environ. Technol.*, 18: 1265-1268.
- TEN HALLERS-TJABBES, C. C., WAGNER, J., HATTUM, B. V., KEMP, J. F., TEM HALLERS, E., REITSEMA, T. J. & BOON, J. P., 2003, Imposex and organotin concentrations in *Buccinum undatum* and *Neptunea antiqua* from the North Sea: relationship to shipping density and hydrological conditions. *Mar. Environ. Res.*, 55: 203-233.



SETAC - Brazil

Imposex in Two Muricid Species (Mollusca: Gastropoda) from the Northeastern Brazilian Coast

I. B. CASTRO,^{1,2,*} A. F. ALVES DE LIMA,² A. R. C. BRAGA¹ & C. A. ROCHA-BARREIRA¹

¹Division of Biotic Oceanography, Institute of Marine Sciences, LABOMAR/UFC,
Av. da Abolição, 3207, Bairro Meireles, CEP 60165-081, Fortaleza, CE, Brasil

²Fundação Universidade Federal do Rio Grande, C.P. 474, CEP 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil

(Received October 7, 2006; Accepted January 17, 2007)

ABSTRACT

Imposex is the occurrence of male sexual features in female prosobranch mollusks exposed to organotin compounds. Since imposex has measurable characteristics, it has been used as a bioindication tool for the presence of this kind of pollutants. Thus, this work aimed to monitor organotin pollution over areas under the influence of ten main harbors of Northeastern Brazilian coast. Imposex intensity was measured using the indexes VDSI, RPSI, RPLI and the percentage of imposexed females. At least one sampling site in each studied harbor showed imposex, suggesting a widespread contamination by organotin compounds. However, the observed imposex levels are lower than those obtained by other monitoring works in highly industrialized regions of Europe and Asia, confirming that organotin contamination levels are higher in the most industrialized regions of the world. Approximately 39% of all sampling sites (32 sites) did not show imposexed females, suggesting that this feature does not occur naturally in *Stramonita haemastoma* and *Stramonita rustica*.

Key words: Gastropoda, harbor, imposex, muricidae, organotin compounds, *Stramonita haemastoma*, *Stramonita rustica*.

RESUMO

Imposex em duas espécies de muricídeos (Mollusca: Gastropoda) da costa do Nordeste do Brasil

O imposex é a ocorrência de caracteres sexuais masculinos em fêmeas de moluscos prosobrânquios expostos a compostos orgânicos de estanho (COEs). Como o imposex apresenta características mensuráveis, o mesmo tem sido usado como bioindicador de baixo custo para esse tipo de poluição. O presente trabalho monitorou a contaminação por compostos organoestânicos nas áreas sob a influência dos 10 principais terminais portuários do Nordeste do Brasil. A intensidade de imposex foi medida utilizando-se os índices VDSI, RPSI e RPLI e a porcentagem de fêmeas com imposex. Pelo menos uma estação em cada um dos terminais portuários estudados apresentou imposex, sugerindo ampla contaminação por COEs. Entretanto, os índices observados revelaram-se baixos quando comparados aos obtidos em outros monitoramentos realizados em regiões muito industrializadas da Europa e da Ásia. Isso reforça dados já mencionados na literatura que sugerem que a contaminação por compostos orgânicos de estanho é mais severa em regiões mais industrializadas do mundo. Das 82 estações analisadas durante o presente estudo, 32 mostraram-se completamente livres de quaisquer indícios de imposex, o que sugere que o imposex não se manifesta naturalmente nas espécies *Stramonita haemastoma* e *Stramonita rustica*.

Palavras-chave: Gastropoda, porto, imposex, muricidae, compostos organoestânicos, *Stramonita haemastoma*, *Stramonita rustica*.

*Corresponding author: Ítalo Braga Castro, e-mail: italo_braga@yahoo.com.br.

INTRODUCTION

Imposex in gastropod mollusks has been widely used to monitor contamination by organotin compounds all over the world (Morcillo & Porte, 1998; Axiak *et al.*, 2002; Minchin, 2003). The reliability of this bioindicator lays on the fact that imposex is caused by a specific hormonal alteration, occurring only in gastropods exposed to organotin compounds (Matthiessen & Gibbs, 1998). Although imposex has already been observed in Latin America (Gooding *et al.*, 1999; Penchaszadeh *et al.*, 2001), no comprehensive monitoring studies have been so far conducted in this region.

In Brazil, imposex was observed in the muricids *Stramonita haemastoma* (Lanneus, 1767) (Castro *et al.*, 2000; Fernandez *et al.*, 2002; Fernandez *et al.*, 2005; Castro *et al.*, 2007), *Stramonita rustica* (Lamarck, 1822) (Camillo *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2004), and in the olivid *Olivancillaria vesica* (Gmelin, 1791) (Caetano & Absalão, 2003).

There are more than 130 different mollusk species known that have shown imposex and 38 of them belonging to the Muricidae family (Castro *et al.*, *in press*). Muricidae is probably the most widely mollusk taxon used as a bioindicator for the contamination by organotin compounds all over the world.

Thus, this study aimed to verify the occurrence of imposex in muricid gastropod populations from the 10 main harbors of Northeastern Brazilian coast.

MATERIALS AND METHODS

Study area and sampling

The 10 studied harbors of the Northeastern Brazilian coast were: Pecém and Mucuripe (State of Ceará); Natal (State of Rio Grande do Norte); Cabedelo (State of Paraíba); Recife and Suape (State of Pernambuco); Jaraguá (State of Alagoas); Aracaju (State of Sergipe) and Salvador and Aratu (State of Bahia).

A total of 82 sites were sampled throughout the area under the influence of each of the 10 monitored harbors (Table 1). The sampling points were chosen considering the distance from the harbor, availability of muricid gastropods and direction of the predominant local currents. Thirty adult muricids of either *Stramonita haemastoma* (Harbors of Pecém, Mucuripe and Cabedelo) or *Stramonita rustica* (Harbor of Natal, Recife, Jaraguá, Aracaju, Salvador and Aratu) (approximately 30 mm long) were sampled from each site (whenever possible) between February and November 2004.

Laboratory proceedings

The animals were sedated with a 3.5% MgCl₂ solution for 2 hours. Their shells were then measured from the tip of the spiral to the siphon channel using vernier calliper. The shell

of each individual was then removed in order to examine the soft tissues. Sexual identification was performed based on the presence of a seminal receptacle in the females, and a prostate gland in males.

The imposex levels in each site were quantified using the following indexes: % of imposex in females; Relative Penis Length Index (RPLI), calculated by the equation (mean penis length in females/mean penis length in males) × 100 (Gibbs & Bryan, 1987); Relative Penis Size Index (RPSI), calculated by the equation (mean penis length in females)³/(mean penis length in males)³ × 100 (Gibbs & Bryan, 1987); and Vas Deferens Sequence Index (VDSI). VDSI was based on the six-stage scale proposed by Gibbs & Bryan (1987) for the species *Nucella lapillus* and adapted by Fernandez *et al.* (2005) for *Stramonita haemastoma*. Such option was chosen because of the difficult visualization of the vas deferens in the muricids of the *Stramonita* genus.

RESULTS AND DISCUSSION

The highest imposex indexes at Pecém harbor (State of Ceará) were found at the harbor jetty (S2), decreasing with the distance from the harbor up to São Pedro beach (S5), which showed no evidences of imposex (Figure 1). The observed gradient of imposex indexes in the Pecém harbor area followed the east-west direction of the predominant coastal currents (Maia, 1998). However, some evidences of imposex were again observed further away at São Pedro ou Paracuru beach (S6) and Point of Paracuru (S7), probably due to the traffic of vessels towards the pier of Petrobras (oil exploration company), which is located at this beach.

The values obtained at the Pecém harbor (State of Ceará) were not as high as other areas monitored with *S. haemastoma*, which can be explained by the short existence of this harbor (operations started in 2002) and relatively low traffic (< 500 ships between 2002 and 2004) (CEP, 2004). A similar situation was observed in a marina in Thailand where the initial levels of imposex were low but increased with time (Bech, 2002).

At the Mucuripe harbor (State of Ceará), the highest levels were found at Mansa Beach (S9 – RPLI = 76.0), decreasing with distance the harbor. Sites located eastwards showed much lower evidences of imposex due to probably the predominant coastal currents. Previously, Castro *et al.* (2000) showed that the western limit of imposex was at Dois Coqueiros beach (S3). However, the present study found imposex further away at Pacheco beach (S1), indicating an expansion of the area contaminated by organotin compounds, which might be related to an increase in the Ceará River flow just before the sampling dates, because of a very intense rainy season, and a shipyard located at the river mouth, where repairs of small ships are performed.

Table 1 – Description of the sampling sites and specie used for monitoring (number of organisms).

Harbor	Site	Description	Latitude	Longitude	Specie used(n)
Pecém (Ceará State)	S1	Cauípe Beach	3°34'38"	38°47'10"	<i>S. haemastoma</i> (30)
	S2	Jetty of Harbor	3°32'40"	38°48'34"	<i>S. haemastoma</i> (30)
	S3	Pecém Beach	3°32'48"	38°49'50"	<i>S. haemastoma</i> (30)
	S4	Taíba Beach	3°31'69"	38°52'37"	<i>S. haemastoma</i> (30)
	S5	São Pedro Beach	3°24'34"	38°58'31"	<i>S. haemastoma</i> (30)
	S6	Paracuru Beach	3°23'60"	38°00'49"	<i>S. haemastoma</i> (30)
	S7	Point of Paracuru	3°24'13"	39°01'25"	<i>S. haemastoma</i> (30)
Mucuripe (Ceará State)	S1	Pacheco Beach	3°41'09"	38°37'45"	<i>S. haemastoma</i> (30)
	S2	Iparana Beach	3°41'13"	38°37'03"	<i>S. haemastoma</i> (30)
	S3	Dois Coqueiros Beach	3°41'21"	38°36'45"	<i>S. haemastoma</i> (30)
	S4	Barra Beach	3°41'54"	38°35'15"	<i>S. haemastoma</i> (30)
	S5	Formosa Beach	3°42'53"	38°32'40"	<i>S. haemastoma</i> (30)
	S6	Poço da Draga Beach	3°43'06"	38°31'02"	<i>S. haemastoma</i> (30)
	S7	Ideal Beach	3°35'56"	38°30'07"	<i>S. haemastoma</i> (30)
	S8	Meireles Beach	3°28'29"	38°28'30"	<i>S. haemastoma</i> (28)
	S9	Mansa Beach	3°42'12"	38°28'34"	<i>S. haemastoma</i> (30)
	S10	Titã Beach	3°42'28"	38°28'02"	<i>S. haemastoma</i> (30)
	S11	Caça e Pesca Beach	3°45'54"	38°26'18"	<i>S. haemastoma</i> (30)
	S12	Sabiaguaba Beach	3°46'27"	38°25'54"	<i>S. haemastoma</i> (30)
Natal (Rio Grande do Norte State)	S1	Barreira D'Água Beach	5°47'70"	35°10'92"	<i>S. rustica</i> (30)
	S2	Ponta do Morcego Beach	5°47'13"	35°11'38"	<i>S. rustica</i> (23)
	S3	Meio Beach	5°46'49"	35°11'44"	<i>S. rustica</i> (30)
	S4	Forte Beach	5°45'46"	35°11'68"	<i>S. rustica</i> (30)
	S5	Potengi River estuary (int)	5°46'01"	35°12'18"	<i>S. rustica</i> (30)
	S6	Potengi River estuary (ext)	5°46'01"	35°12'19"	<i>S. rustica</i> (18)
	S7	Harbor – ferryboat	5°46'00"	35°28'22"	<i>S. rustica</i> (30)
	S8	Jetty of Redinha	5°45'14"	35°12'08"	<i>S. rustica</i> (30)
	S9	Santa Rita Beach	5°42'15"	35°11'53"	<i>S. rustica</i> (30)
Cabedelo (Paraíba State)	S1	Harbor	6°58'40"	34°50'00"	<i>S. haemastoma</i> (30)
	S2	Jetty of Paraíba	6°57'45"	34°50'35"	<i>S. haemastoma</i> (30)
	S3	Ponta do Mato Beach	6°57'59"	34°49'47"	<i>S. haemastoma</i> (30)
	S4	Formosa Beach	6°58'43"	34°49'40"	<i>S. haemastoma</i> (30)
	S5	Areia Dourada Beach	6°57'40"	34°49'31"	<i>S. haemastoma</i> (30)
	S6	Camboinha Beach	6°58'56"	34°49'12"	<i>S. haemastoma</i> (30)
	S7	Intermares Beach	6°59'31"	34°48'55"	<i>S. haemastoma</i> (30)
	S8	Costinha Beach	6°57'40"	34°49'31"	<i>S. haemastoma</i> (30)
	S9	Lucena Beach	6°57'40"	34°49'01"	<i>S. haemastoma</i> (19)

Table 1 – (Continuação).

Harbor	Site	Description	Latitude	Longitude	Specie used(n)
Recife (Pernambuco State)	S1	Boa Viagem Beach	8°07'12"	34°03'22"	<i>S. rustica</i> (30)
	S2	Boa Viagem Beach	8°06'25"	34°53'04"	<i>S. rustica</i> (30)
	S3	Pina Beach	8°05'37"	34°2'52"	<i>S. rustica</i> (30)
	S4	Brasília Teimosa Beach	8°04'46"	34°52'34"	<i>S. rustica</i> (30)
	S5	Jetty of Harbor	8°03'49"	34°51'03"	<i>S. rustica</i> (30)
	S6	Milagres Beach	8°03'01"	34°51'12"	<i>S. rustica</i> (30)
	S7	Bairro Novo Beach	8°02'42"	34°51'23"	<i>S. rustica</i> (30)
Suape (Pernambuco State)	S1	Portode Galinhas Beach	8°23'43"	34°55'57"	<i>S. rustica</i> (30)
	S2	Muro Alto Beach	8°22'06"	34°56'37"	<i>S. rustica</i> (30)
	S3	Suape Beach	8°21'54"	34°56'49"	<i>S. rustica</i> (30)
	S4	Point of Stº Agostinho	8°21'20"	34°56'60"	<i>S. rustica</i> (30)
	S5	Guaibú Beach	8°20'14"	34°57'02"	<i>S. rustica</i> (30)
	S6	Inlet of Coral	8°19'33"	34°56'59"	<i>S. rustica</i> (30)
	S7	Pedra do Xaréu Beach	8°18'59"	34°56'54"	<i>S. rustica</i> (30)
Jaraguá (Alagoas State)	S1	Sereia Beach	9°34'00"	35°38'45"	<i>S. rustica</i> (30)
	S2	Cruz das Almas Beach	9°37'31"	35°41'37"	<i>S. rustica</i> (30)
	S3	Yacht Club	9°39'53"	35°41'46"	<i>S. rustica</i> (30)
	S4	Eastern Jetty Harbor	9°40'41"	35°43'11"	<i>S. rustica</i> (30)
	S5	Western Jetty Harbor	9°40'25"	35°43'27"	<i>S. rustica</i> (30)
	S6	Emissary	9°40'32"	35°45'10"	<i>S. rustica</i> (30)
	S7	Terminal	9°41'10 "	35°45'51"	<i>S. rustica</i> (30)
	S8	Sacoda Pedra Beach	9°44'53"	35°49'22"	<i>S. rustica</i> (30)
	S9	Francês Beach	9°46'00"	35°50'14"	<i>S. rustica</i> (30)
	S10	São Miguel Beach	9°50'42"	35°54'23"	<i>S. rustica</i> (30)
Aracaju (Sergipe river estuary – Sergipe State)	S1	Aracaju Terminal	10°54'37"	37°02'52"	<i>S. rustica</i> (30)
	S2	Barra dos Coqueiros Beach	10°54'27"	37°02'22"	<i>S. rustica</i> (30)
	S3	Yacht Club	10°55'27"	37°02'36"	<i>S. rustica</i> (30)
	S4	Atalaia Nova Terminal	10°56'25"	37°02'06"	<i>S. rustica</i> (30)
	S5	Jetty of Atalaia Nova	10°56'59"	37°01'57"	<i>S. rustica</i> (30)
	S6	Jetty of Coroa do Meio	10°57'12"	37°01'22"	<i>S. rustica</i> (30)
	S7	Jetty of Praia do Farol	10°58'26"	37°01'03"	<i>S. rustica</i> (25)
Salvador e Aratu (Todos os Santos Bay – Bahia State)	S1	Bom Despacho Beach	13°01'35"	38°40'59"	<i>S. rustica</i> (30)
	S2	Mar Grande Beach	13°01'67"	38°41'24"	<i>S. rustica</i> (30)
	S3	Barra Grande Beach	13°02'25"	38°40'33"	<i>S. rustica</i> (30)
	S4	Acapulco Beach	13°03'27"	38°42'14"	<i>S. rustica</i> (13)
	S5	Aratuba Beach	13°05'22"	38°44'30"	<i>S. rustica</i> (30)
	S6	Rio Vermelho Beach	13°00'53"	38°29'19"	<i>S. rustica</i> (30)
	S7	Ondina Beach	13°00'40"	38°30'32"	<i>S. rustica</i> (30)
	S8	Farol da Barra Beach	13°00'40"	38°31'54"	<i>S. rustica</i> (30)
	S9	Yatch Clube	12°59'54"	38°31'47"	<i>S. rustica</i> (30)
	S10	Harbor Authority	12°58'30"	38°30'60"	<i>S. rustica</i> (30)
	S11	Canta Galo Beach	12°56'16"	38°30'25"	<i>S. rustica</i> (30)
	S12	Ribeira Beach	12°55'21"	38°30'06"	<i>S. rustica</i> (30)
	S13	Maré Island	12°47'54"	38°31'34"	<i>S. rustica</i> (30)
	S14	Aratu Bay	12°48'36"	38°30'01"	<i>S. rustica</i> (30)

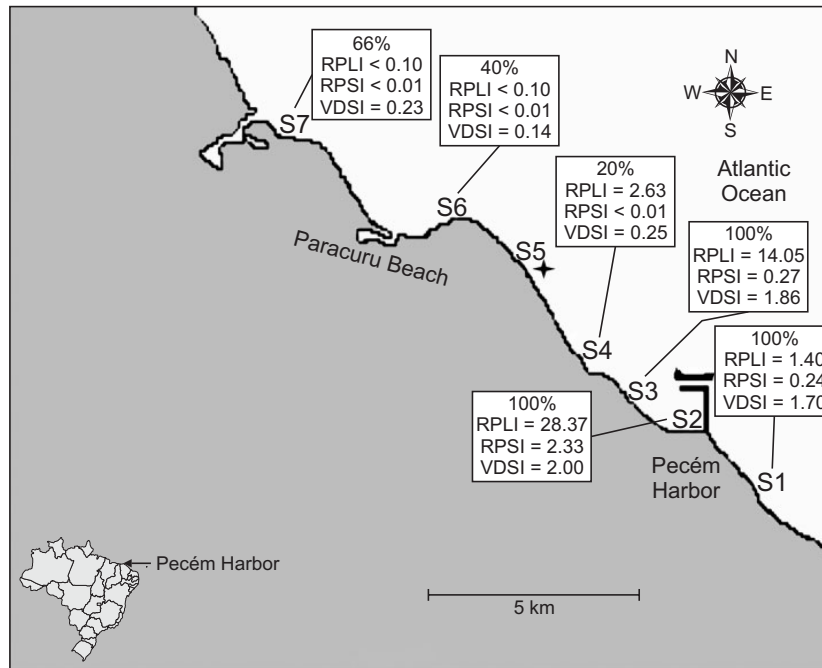


Figure 1 – Imposex frequency (%), RPLI, RPSI and VDSI for each site sampled nearby the Pecém harbor and adjacent coastal area in Ceará State. (⊕) Imposex not observed.

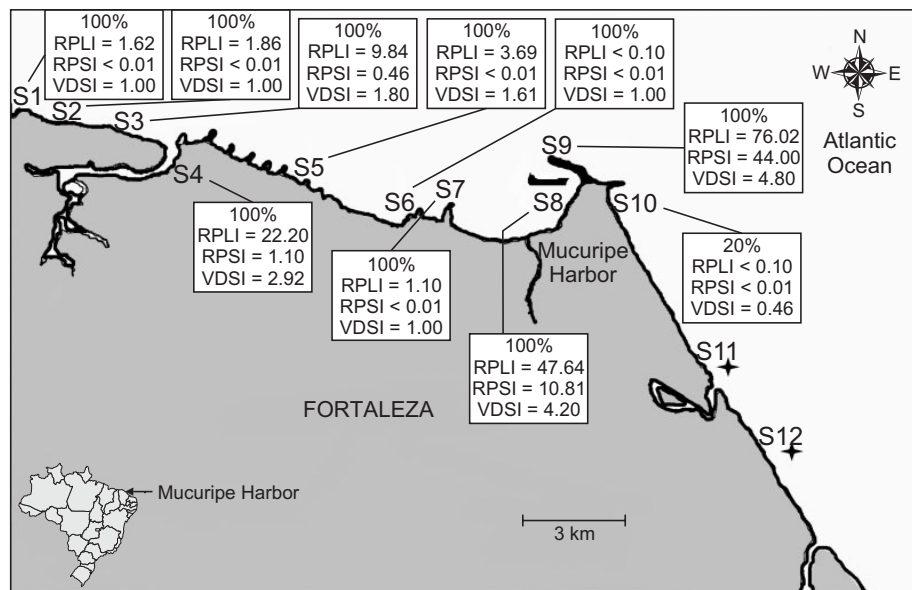


Figure 2 – Imposex frequency (%), RPLI, RPSI and VDSI for each site sampled nearby the Mucuripe harbor and adjacent coastal area in Ceará State. (⊕) Imposex not observed.

The highest levels of imposex at Natal harbor (State of Rio Grande do Norte) were found at the Harbor (S7 – RPLI = 32.3) and Potengi River mouth (S5 and S8), decreased with distance from the possible sources. Three sites showed no evidence of imposex (Figure 3). In a previous study, Castro *et al.* (2004) showed high levels of imposex up to Praia do Forte (S4). Although the present work indicated a slight decrease in imposex levels, the imposex-stricken area was still wide (up to Meio beach (S3)). The currents dominating the coast of Natal flow in the south to north direction (Castro *et al.*, 2003), which may explain the low imposex values obtained in the outer face of the harbor jetty (S6).

The observed imposex indexes at Cabedelo harbor (State of Paraíba) were moderate compared to other harbors in the northeast of Brazil. The highest indexes were found nearby the

harbor at both banks of the Paraíba do Norte River (S1 – RPLI = 22.1 and S8 = RPLI = 13.4). Indexes decreased with distance from the harbor, showing no evidence of imposex at Formosa beach (S4), Areia Dourada (S5), Intermars beach (S6) and Lucena beach (S9) (Figure 4). This can be attributable to the comparatively low traffic of the Cabedelo harbor (MTB, 2004).

Four out of seven sites nearby the Harbor of Recife (State of Pernambuco) showed no imposex, while the highest levels were found in the outer face of the harbor jetty (site S5), decreasing with the distance from the harbor (Figure 5). Since the Harbor of Suape construction, Recife has been reducing the number of ship operations (MTB, 2004). In addition, the study sites were located outside the harbor jetty, an area with strong hydrodynamics. These may help to explain the low imposex levels registered in the region.

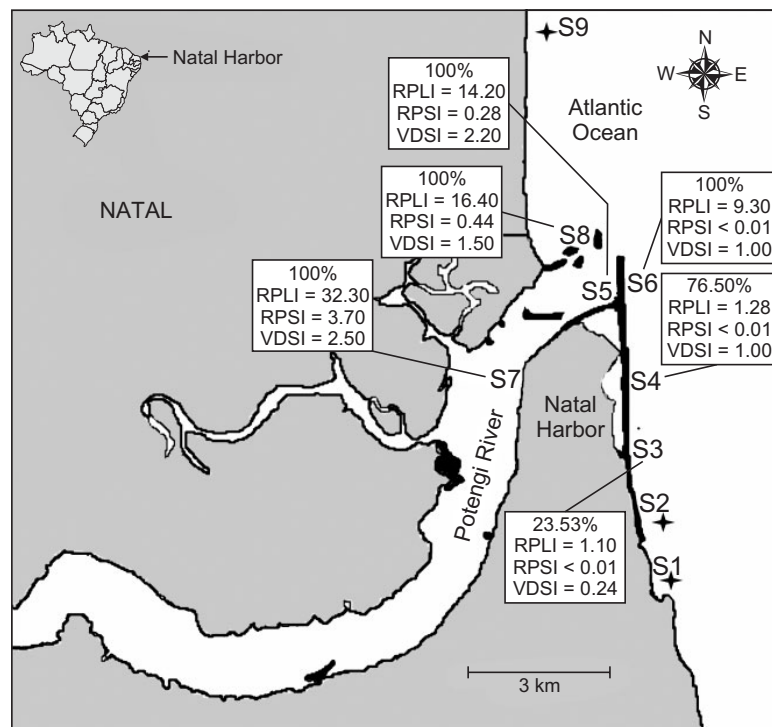


Figure 3 – Imposex frequency (%), RPLI, RPSI and VDSI for each site sampled nearby the Natal harbor and adjacent coastal area in Rio Grande do Norte State. (↕) Imposex not observed.

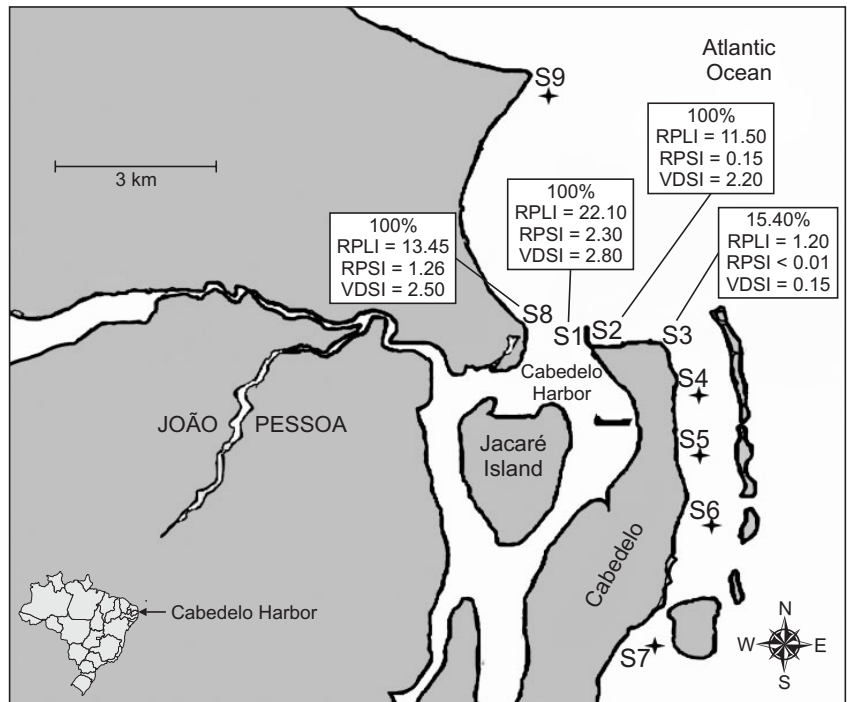


Figure 4 – Imposex frequency (%), RPLI, RPSI and VDSI for each site sampled nearby the Cabedelo harbor and adjacent coastal area in Paraíba State. (✦) Imposex not observed.

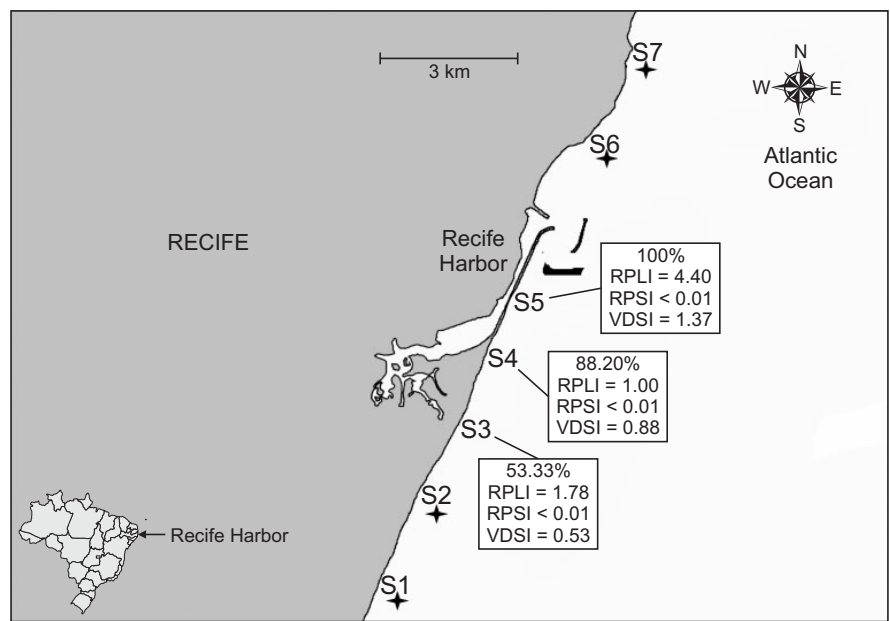


Figure 5 – Imposex frequency (%), RPLI, RPSI and VDSI for each site sampled nearby the Recife harbor and adjacent coastal area in Pernambuco State. (✦) Imposex not observed.

A very low level of imposex was found in just one of the seven monitored sites of Suape harbor (State of Pernambuco) (Figure 6). The low imposex levels found around the Suape harbor are probably caused by several factors, such as the recent beginning of its operations (MTB, 2004), the local hydrodynamics and its “off-shore” location, which allows a better dilution of the pollutants released by the vessels.

At the Jaraguá harbor (State of Alagoas), the highest imposex indexes were found in the southwestern side of the harbor, at the Western Jetty Harbor (S5 – RPLI = 36.1 and VDSI of up to IV). Levels gradually decreased towards the southwest, while sites towards the northeast showed no imposex at all (Figure 7). Site S5 showed the highest imposex levels among all monitored harbors from the northeastern Brazilian coast using *S. rustica*. These values were higher than those recorded by Camillo *et al.* (2004) for the site S5 (RPLI = 33.1). More detailed studies have to be performed to find out if these increasing levels are related to an increase in the number of vessels at the harbor.

In Aracaju (State of Sergipe) the monitoring was performed at the Sergipe river estuary, which has an intense traffic of small

vessels. The highest levels of imposex were found at the Terminal of Barra dos Coqueiros beach (S2 – RPLI = 50.27 and VSDI up to III), decreasing with distance. No imposex was found in the Coroa do Meio beach (S6) and Farol beach (S7) (Figure 8). Such high imposex levels at site S2 suggest that, despite the region does not have an intense traffic of vessels, the organotin compounds released into the waters by small ships may accumulate in the sediments, due to the degree of protection of this area, thus having a longer residence time in the local waters.

Five out of fourteen monitored sites in the Todos os Santos Bay (including Salvador and Aratu harbors – State of Bahia) showed no evidences of imposex. The highest levels were found at the Salvador harbor (S10 – RPLI = 14.8 and VDSI = 1.5) (Figure 9). Despite some areas around the Todos os Santos Bay are between the most urbanized and industrialized of the Brazilian Northeast and with intense traffic of vessels, the imposex levels were lower than those found by this study in other locations. However, the width of the channel communicating the bay with the Atlantic ocean, as well as its significant depth, may contribute to the dilution of pollutants within the bay, decreasing their impact to biota.

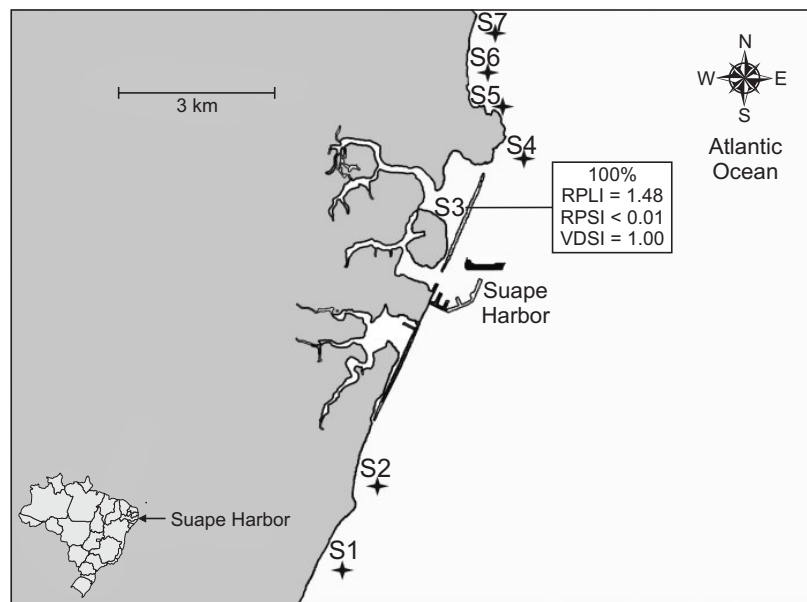


Figure 6 – Imposex frequency (%), RPLI, RPSI and VDSI for each site sampled nearby the Suape harbor and adjacent coastal area in Pernambuco State. (+) Imposex not observed.

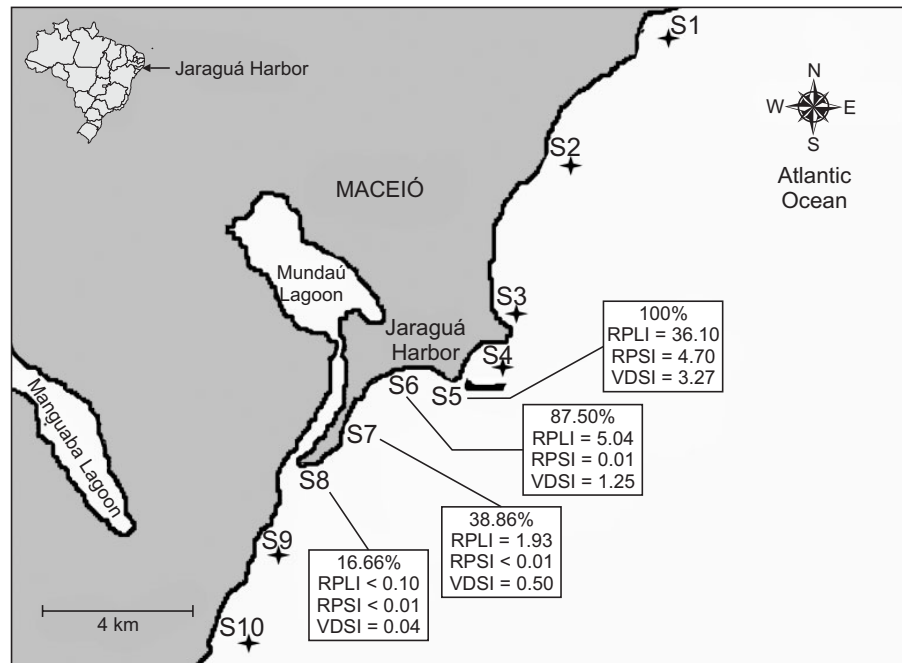


Figure 7 – Imposex frequency (%), RPLI, RPSI and VDSI for each site sampled nearby the Jaraguá harbor and adjacent coastal area in Alagoas State. (★) Imposex not observed.

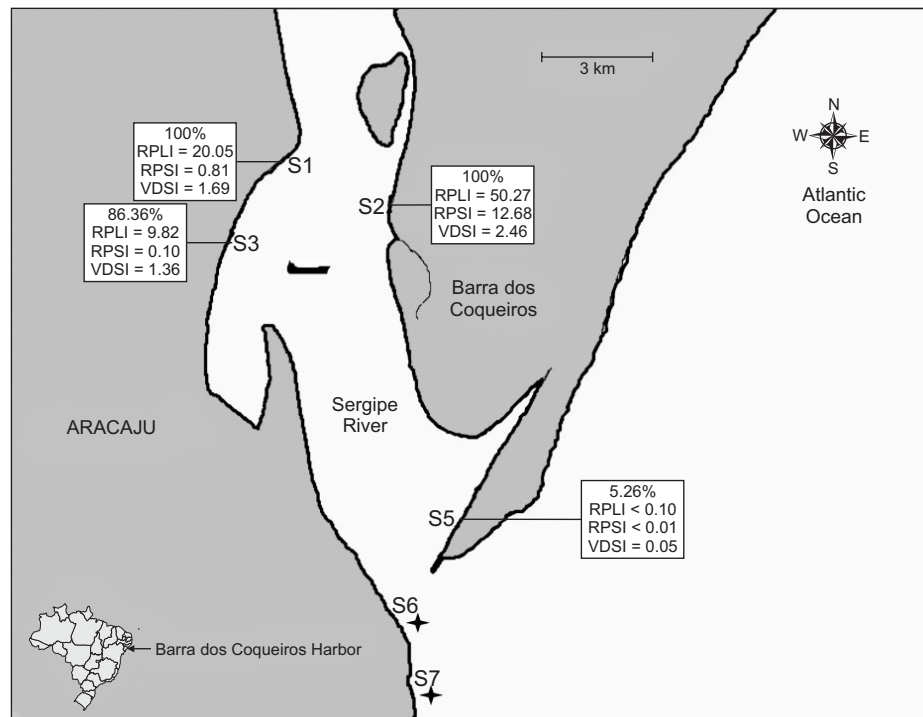


Figure 8 – Imposex frequency (%), RPLI, RPSI and VDSI for site sampled at Sergipe river estuary area in Sergipe State. (★) Imposex not observed.

This study showed the occurrence of imposex in all monitored areas. A gradient was found in most areas, i.e. decreasing imposex indexes as the sites were more distant from the harbors. In addition, other parameters such as water depth, local hydrodynamics and availability of monitoring species must be taken into account (ten Hallers-Tjabbes et al., 2003). Similar results were observed in studies performed in the Mediterranean, using *Hexaplex trunculus* (Linnaeus, 1758) (Axiak et al., 1995), in Crok Harbor, Ireland, using *Nucella lapillus* (Linnaeus, 1758) and *Littorina littorea* (Linnaeus, 1758) (Minchin et al., 1996), in Phuket Island, Thailand, using *Chicoreus capucinus* (Lamarck, 1822) and *Thais distinguenda* (Roding, 1798) (Bech, 2002), in Fishing Port, Kyllibegs, Ireland, using *Nucella lapillus* and *Littorina littorea* (Minchin & Minchin, 1997), and at many other locations.

In most harbors where *S. rustica* was used as bioindicator, the imposex indexes were lower, confirming that *S. rustica* is less sensitive to organotin contamination than *S. haemastoma* (Castro et al., unpublished results).

Imposex is an hormone regulation failure, which can be triggered by a very low concentrations (ng L⁻¹) of organotin

compounds in most prosobranchiate mollusks (Mensink et al., 1997; Morcillo & Porte, 1998). Thus, very industrialized coastal area which receive a large number of vessels are expected to show higher imposex indexes as a result of higher contamination by organotin compounds. A study done in Japan with *Thais clavigera* (Dunker, 1860) and *T. bronni* (Dunker, 1860) showed all sites with 100% imposex and most of the RPSI values higher than 40 (Horiguchi et al., 1997). The imposex indexes observed in the studied sites were lower than those found in bigger harbors from Brazil, such as Guanabara Bay, RJ (Fernandez et al., 2005), and around the world. However, it is important to carry out chemical analysis to get the real extension of organotin contamination in those areas where imposex was observed.

Studies performed with the species *Hexaplex trunculus* (Axiak et al., 2002) and *Nucella lapillus* (Davies et al., 1997) reported the occurrence of natural imposex levels in populations not exposed to organotin compounds. However, it is suggested that this feature does not occur naturally in *Stramonita haemastoma* and *Stramonita rustica*, since 32 out of 82 sampled sites showed no signs of imposex, especially those far away from possible organotin sources.

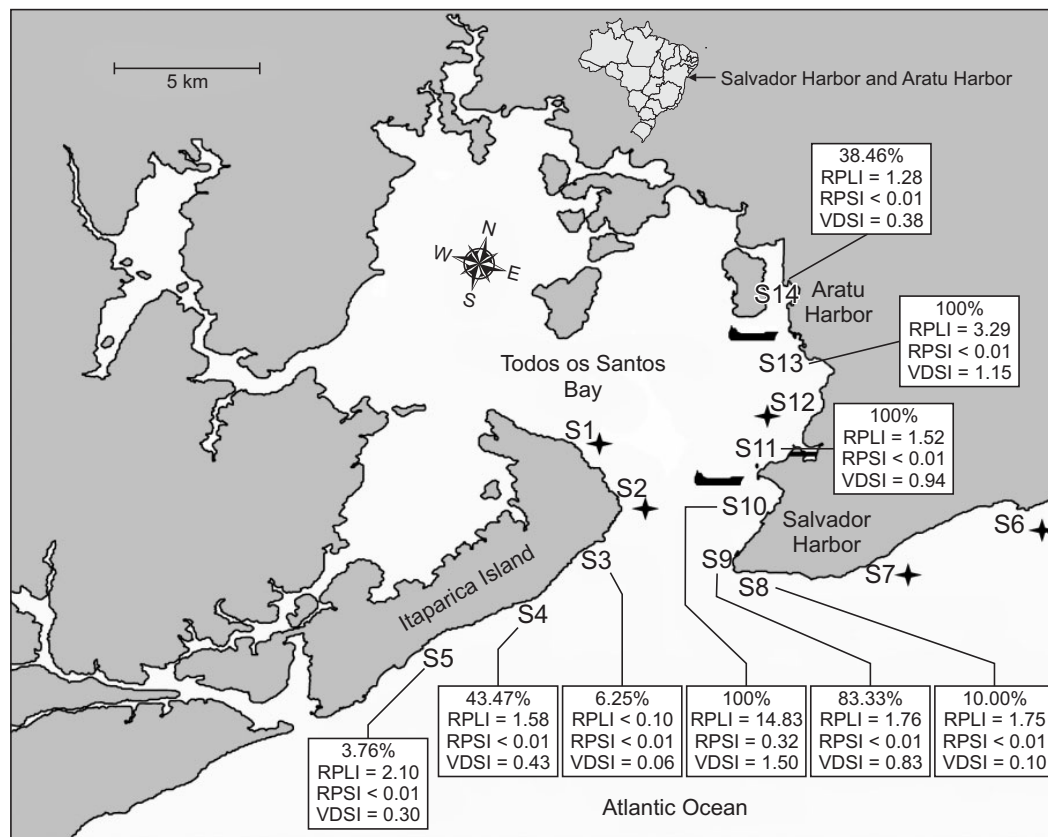


Figure 9 – Imposex frequency (%), RPLI and VDSI for site sampled at Todos os Santos Bay in Bahia State. (†) Imposex not observed.

CONCLUSIONS

The occurrence of imposex in all ten monitored harbors of Northeastern Brazilian coast suggests that studied areas have different degrees of organotin contamination. Thus, chemical analysis are necessary to evaluate the real extension of contamination.

S. rustica showed to be less sensitive to organotin contamination than *S. haemastoma*, but imposex does not seem to occur naturally in these species, since a significant part of the individuals sampled in areas far away from possible organotin source show no evidences of it.

Acknowledgements — The authors thank Dr. Marcos Fernandez for the contributions all along the development of this study.

REFERENCES

- AXIAK, V., VELLA, A. J., MICALLEF, D., CHIRCOP, P. & MINTOFF, B., 1995, Imposex in *Hexaplex trunculus* (Gastropoda: Muricidae): first results from biomonitoring of tributyltin contamination in the Mediterranean. *Mar. Biol.*, 121: 685-691.
- AXIAK, V., MICALLEF, D., MUSCAT, J., VELLA, A. J. & MINTOFF, B., 2002, Imposex as a biomonitoring tool for marine pollution by tributyltin: some further observations. *Environ. Int.*, 976: 1-7.
- BECH, M., 2002, Imposex and tributyltin contamination as a consequence of the establishment of a marina, and increasing yachting activities at Phuket Island, Thailand. *Environ. Pollut.*, 117: 421-429.
- CAETANO, C. H. S. & ABSALÃO, R. S., 2003, Imposex in *Olivancillaria vesica vesica* (Gmelin) (Gastropoda, Olividae) from a Southeastern Brazilian sandy beach. *Sci. Total Environ.*, 19: 215-218.
- CAMILLO, E., QUADROS, J., CASTRO, I. B. & FERNANDEZ, M. A. S., 2004, Imposex in *Thais rustica* (Mollusca: Neogastropoda) (Lamarck, 1822) as an indicator of organotin compounds pollution at Maceió coast (Northeastern Brazil). *Braz. J. Ocean.*, 52: 101-105.
- CASTRO A. F., AMARO, V. E. & VITAL, H., 2003, Desenvolvimento de um banco de dados geográficos em um ambiente SIG e sua aplicação na elaboração de mapas de sensibilidade ambiental ao derramamento de óleo em áreas costeiras do estado do Rio Grande do Norte. *Anais XI SBSR*, Belo Horizonte, Brasil, INPE, p. 1533-1540.
- CASTRO, I. B., MATTHEWS-CASCON, H. & FERNANDEZ, M. A. S., 2000, Imposex em *Thais haemastoma* (Linnaeus, 1767) (Mollusca: Gastropoda) uma indicação da contaminação por organoestânicos na costa do município de Fortaleza. *Arq. Ciên. Mar.*, 33: 51-56.
- CASTRO, I. B., MEIRELLES, C. A. O., MATTHEWS-CASCON, H. & FERNANDEZ, M. A. S., 2004, *Thais (Stramonita) rustica* (Lamarck, 1822) (mollusca: Gastropoda: Thaididae), a potential bioindicator of contamination by organotin Northeast Brazil. *Braz. J. Ocean.*, 52: 135-139.
- CASTRO, I. B., BEMVENUTI, C. E. & FILLMANN, G., 2007, Preliminary appraisal of imposex in areas under the influence of Southern Brazilian harbors. *J. Braz. Soc. Ecotox.*, 2: 73-79.
- CASTRO, I. B., RODRIGUES, L. & ROCHA-BARREIRA, C. A., 2007, Compostos orgânicos de estanho: efeitos sobre a fauna marinha – uma revisão. *Arq. Cien. Mar*, in press.
- CEP, 2004, Ceará harbors, relatories on pecém harbor movements, <http://www.cearaportos.com.br/>, accessed in April, 2004. (in Portuguese).
- DAVIES, I. M., HARDING, M. J. C., BAILEY, S. K., SHANKS, A. M. & LANGE, R., 1997, Sublethal effects of tributyltin oxide on the dogwhelk *Nucella lapillus*. *Mar. Ecol. Progress Series*, 158: 191-204.
- FERNANDEZ, M. A. S., LIMAVERDE, A. C., CASTRO, I. B., WAGENER A. L. R. & ALMEIDA, A. C. O., 2002, Occurrence of imposex in *Thais haemastoma*: possible evidence of environmental contamination derived from organotin compounds in Rio de Janeiro and Fortaleza, Brazil. *Rep. Pub. Health*, 18: 463-476.
- FERNANDEZ, M. A. S., WAGENER A. L. R., LIMAVERDE, A. C., SCOFIELD, A. L., PINHEIRO, F. M. & RODRIGUES, E., 2005, Imposex and surface sediment speciation: a combined approach to evaluate organotin contamination in Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Mar. Environ. Res.*, 59: 435-452.
- GIBBS, P. E. & BRYAN, G. M., 1987, TBT paints and demise of the dogwhelk *Nucella lapillus* (Gastropoda). *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, 68: 1482-1487.
- GOODING, M., GALLARDO, C. & LEBLANC, G., 1999, Imposex in three marine Gastropod species in Chile and potential impact on Muriciculture. *Mar. Pollut. Bull.*, 38: 1227-1231.
- HORIGUCHI, T., SHIRAIISHI, H., SHIMIZU, M. & MORITA, M., 1997, Imposex in sea snails caused by organotin (tributyltin and triphenyltin) pollution in Japan: a survey. *Appl. Organometallic Chem.*, 11: 451-455.
- MAIA, L. P., 1998, *Procesos costeros y balance sedimentario a lo largo de Fortaleza (NE-Brasil): Implicaciones para una gestión adecuada de la zona litoral*. Tese de Doutorado, Programa de Doutorado em Ciências do Mar, Universidad de Barcelona, Barcelona, 269 p.
- MATTHIESSEN, P. & GIBBS, P. E., 1998, Critical appraisal of the evidence for tributyltin – mediated endocrine disruption in Mollusks. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17: 37-43.
- MENSINK, B. P., BOON, J. P., TEM HALLERS-TJABBES, C. C., HATTUM, B. V. & KOEMAN, J. H., 1997, Bioaccumulation of organotin compounds and imposex occurrence in a marine food chain (Eastern Scheldt, the Netherlands). *Environ. Techn.*, 18: 1235-1244.
- MINCHIN, A. & MINCHIN, D., 1997, Dispersal of TBT from a fishing port determined using the dogwhelk *Nucella lapillus* as an indicator. *Environ. Techn.*, 38: 1225-1234.
- MINCHIN, D., STROBEN, E., OEHLMANN, J., BAUER, B., DUGGAN, C. B. & KEATINGE, M., 1996, Biological indicators used to map organotin contamination in Cork Harbour, Ireland. *Mar. Pollut. Bull.*, 32: 188-195.
- MINCHIN, D., 2003, Monitoring of tributyltin contamination in six marine inlets using biological indicators. *Mar. Environ. Health Ser.*, 6: 1-15.
- MTB, 2004, Ministério dos Transportes do Brasil, Relatories on Brazilian Harbors movement, <http://www.transportes.gov.br/>, accessed in: April of 2004. (in Portuguese)
- MORCILLO, Y. & PORTE, C., 1998, Monitoring of organotin compounds and their in marine molluscs. *TRAC.*, 17: 109-116.
- PENCHASZADEH, P. E., AVERBUJ, A. & CLEDÓN, M., 2001, Imposex in gastropods from Argentina (southwestern Atlantic) *Nucella lapillus* and the common whelk *Buccinum undatum* as indicators of TBT contamination. *Mar. Pollut. Bull.*, 42: 790-791.
- TEM HALLERS-TJABBES, C. C., WAGENER, J., HATTUM, B. V., KEMP, J. F., TEM HALLERS, E., REITSEMA, T. J. & BOON, J. P., 2003, Imposex and organotin concentrations in *Buccinum undatum* and *Neptunea antiqua* from the North Sea: relationship to shipping density and hydrological conditions. *Mar. Environ. Res.*, 55: 203-233.

LIST OF REFEREES – JBSE/2006

The editors would like to thank all referees listed below, which their voluntary and anonymous work during 2006, contributed to the success of the journal. We wish you a happy 2007, full of achievements.

Alexandre Arenzon – UFRGS/RS/BRAZIL
Alexandre Matthiensen – FURG/RS/BRAZIL
Aloysio da S. Ferrão-Filho – FIOCRUZ/RJ/BRAZIL
Ana M. G. Figueiredo – IPEN-CNEN/SP/BRAZIL
Bernardo Halfeld-Vieira – EMBRAPA/RR/BRAZIL
Bryn Phillips – University of California/USA
Charrid Resgalla Jr – UNIVALI/SC/BRAZIL
Clarice T. de Lemos – FEPAM/RS/BRAZIL
Cristina L. S. Sisino – FIOCRUZ/RJ/BRAZIL
Denis M. de S. Abessa – UNESP/SP/BRAZIL
Eduardo B. Platte – CENPES/PETROBRÁS/RJ/BRAZIL
Eduardo Bertolotti – CETESB/SP/BRAZIL
Eduardo M. da Silva – UFBA/BA/BRAZIL
Elba C. Teixeira – FEPAM/RS/BRAZIL
Eleine F. A. Lima – CENPES/PETROBRÁS/RJ/BRAZIL
Eliana F. G. de C. Dores – UFMG/MG/BRAZIL
Evaldo L. G. Espíndola – USP/SP/BRAZIL
Fábio Kummrow – UNIFAL/MG/BRAZIL
Franci M. F. Varoli – UPM/RJ/BRAZIL
Gilberto Fillmann – FURG/RS/BRAZIL
Gisele A. Ambuzeiro – CETESB/SP/BRAZIL
Glen B. Thursby – USEPA/USA
Grasiela L. L. Pinho – FURG/RS/BRAZIL
Gustavo Somoza – INTECH/ARGENTINA
Harllen S. A. Silva – IB/SP/BRAZIL
Hector Rodriguez – University of Chile/CHILE
Helena do A. Kehrig – UFRJ/RJ/BRAZIL
Isaac R. dos Santos – Florida State University/USA
Isabel M. N. da S. Moreira – PUC/RJ/BRAZIL
João P. M. Torres – UFRJ/RJ/BRAZIL
João S. Yunes – FURG/RS/BRAZIL

LISTA DE REVISORES – JBSE/2006

A JBSE agradece a todos os revisores relacionados abaixo que, com seu trabalho voluntário e anônimo ao longo de 2006, contribuíram para o sucesso da revista. Desejamos a todos um Feliz 2007, pleno de realizações.

José M. Monserrat – FURG/RS/BRAZIL
Júlio C. Rocha – UNESP/SP/BRAZIL
Kléber C. M. Filho – FURG/RS/BRAZIL
Laura A. G. Monserrat – FURG/RS/BRAZIL
Laura G. Huaquin – University of Chile/CHILE
Liane B. Printes – USP/SP/BRAZIL
Lilian L. Amado – FURG/RS/BRAZIL
Marcos A. dos S. Fernandez – UERJ/RJ/BRAZIL
Maria B. C. Bohrer-Morel – IPEN-CNEN/SP/BRAZIL
Maria E. T. Nunes – USP/SP/BRAZIL
Maria L. Ribeiro – UNESP/SP/BRAZIL
Maria T. R. Rodriguez – UFRGS/RS/BRAZIL
Michael Bech – University of Southern Denmark /DENMARK
Miguel M. Santos – CIIMAR/PORTUGUAL
Mônica Wallner-Kersanach – FURG/RS/BRAZIL
Naithirithi T. Chellappa – UFRN/RN/BRAZIL
Nicolai Mirlean – FURG/RS/BRAZIL
Olaf Malm – UFRJ/RJ/BRAZIL
Pedro A. Zagatto – BIOAGRI AMBIENTAL/SP/BRAZIL
Raúl Sanchez – CEBIOR/CHILE
Regina S. Sáfadi – TECAM/SP/BRAZIL
Renato J. R. Molicca – UFRPE/PE/BRAZIL
Renato Zanella – UFES/RS/BRAZIL
Satie Taniguchi – USP/SP/BRAZIL
Silvia R. B. de Medeiros – UFRN/RN/BRAZIL
Sueli I. Borrely – IPEN-CNEN/SP/BRAZIL
Vera M. F. Vargas – FEPAM/RS/BRAZIL
Volney de M. Câmara – UFRJ/RJ/BRAZIL
Wilson de F. Jardim – UNICAMP/SP/BRAZIL

INSTRUCTIONS TO CONTRIBUTORS

JOURNAL OF THE BRAZILIAN SOCIETY OF ECOTOXICOLOGY

Aims and Scope

The *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology* (JBSE), published by SETAC Brazil, is a scientific journal committed to serve its readers as a forum for discussion of several aspects related to the advancement of Ecotoxicology. The JBSE publishes original research papers in English (preferably), Portuguese or Spanish every three months, covering all fields of environmental chemistry, environmental toxicology and risk assessment.

Editorial Policy

The Journal, which issues four numbers a year (March, June, September, and December), publishes manuscripts preferably in English (with an optional additional abstract in Portuguese or Spanish). Alternatively, manuscripts in Portuguese or Spanish (with a mandatory additional abstract and key words in English) may be accepted. Original manuscripts should be sent to the Editor-in-Chief or any of the Editors. Those submitted and authored by more than one author should present the agreement of the co-authors.

Papers should comply with the instructions listed below. (Otherwise they will be sent back to the authors for reformulation.) After being checked for presentation and style, they will then be evaluated by the advisors, i.e., specialists analyzing for originality, scientific quality, and relevance. Approved papers are sent to outside referees. The Editors decide for acceptance or rejection on the basis of the referees' assessment.

Submission and review of manuscripts

Submission of manuscripts

Manuscript should be submitted electronically (pdf or MS Word files) at <http://www.rimaeditora.com.br/jbse.asp>. Full instructions on how to use the electronic submission will be available at the above site or can be requested by e-mail from the JBSE Editorial Office (JBSEcotox@gmail.com.br). During the submission process, authors are asked to select an appropriate section of JBSE and to provide names and address (including e-mail) of at least five researchers of recognized competence who may be considered as reviewers.

Revision of manuscripts: Revised manuscripts must be submitted within one month of the authors' receipt of the referees' reports. Otherwise they will be considered as new submissions.

Proofs: The corresponding author will receive proof by e-mail. Proofs must be carefully checked immediately and returned to the JBSE. Corrections to the proofs should be restricted to printer's errors only. Substantial alterations may be charged to the author. The JBSE will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections will not be possible, so please ensure your first sending is complete.

Reprints: Electronic reprints (pdf files) will be sent to the corresponding author.

Page charges: JBSE has no page charges for members of SETAC Brazil. A publication charge of US\$ 10.00 per printed page for the first six pages, US\$ 30.00 per page thereafter, will be charged on manuscripts published by non-members (TEMPORARY EXEMPT).

Preparation of manuscripts

Manuscripts: research papers, short communications, new project and review articles are accepted for publication. Manuscripts must be original (except reviews). New project articles are expected to propose innovative and novel ideas and/or methodologies, offering new paradigms and research lines in the field of Ecotoxicology.

Sections: Manuscripts should be divided into the following sections: Title page, abstract, *título*, *resumo*, introduction, material and methods, results, discussion, acknowledgements, references, captions to figures, tables.

Formats: All sections of the manuscript must be typed using MS Word (or compatible), letter Times New Roman 12, double-spaced on A4 paper with 2.5 cm margins. To aid reviewers, number the lines of the text (go to

files, page setup, layout, lines numbering). Pages should be numbered consecutively (at bottom right-hand corner) and footnotes must be avoided. Mark the position of each figure and table in the margin. The full Latin names of all species used in this study must be supplied.

Length: Authors should keep the length of research papers below 10 journal pages (approximately 3.2 double-spaced typewritten pages equal one page of printed type) and limit the number of references (maximum of 40), figures and tables. New project articles should not exceed 4 journal pages.

Title pages: The title should be short, concise and informative. Consult a recent issue of JBSE for author format. The author's name should be followed by his/her department, institution, city, and country. Indicate the author to whom correspondence and proofs should be addressed and supply full postal address, phone and fax numbers and e-mail address.

Abstract: The second page of the manuscript must contain only the abstract and the key words. The abstract should be a single paragraph not exceeding 200 words. Non-standard abbreviations and reference citations should be avoided. A title, abstract and key word in a different language are mandatory (i.e. additional title, abstract and key word in Portuguese or Spanish if the manuscript is in English).

Key words: Up to six key words, which may or may not appear in the title, should be listed in alphabetic order after the abstract.

Tables: Each table, including headings and legend (at the top), should be on a separate page. Number tables consecutively using Arabic numerals. Do not duplicate information in the text or data presented in graphic forms. Very long tables are discouraged and very short ones should be combined, when possible. Insert rules at the head, below column headings and foot of each table.

Illustrations: Photographs, charts and diagrams (limited to 6) are to be referred to as "Figures" and should be ordered consecutively. Figures should not duplicate information found in tables. Include titles and explanatory legends for all illustrations on a separate sheet placed before the figures. Label multipart figures with consecutive letters of the alphabet. Line drawings should be intensely black on white. Halftones do not reproduce well and must be submitted as photographs with good contrast and sharp focus throughout. Authors must assume the costs of printing color photographs or prints on glossy stock. Avoid small dotted lines, shading, and stippling, which do not reproduce well. Be certain that symbols and lettering will be legible after reduction.

References: All publications cited in the text should be presented in alphabetic order in a list following the manuscript. In the text refer to the author's name and year of publication (i.e. Reis (1998) or (Reis, 1998)). For two authors, use the ampersand (&); for more than two authors the name of the first author should be followed by "et al.". References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references (on a separate sheet) should be arranged alphabetically on authors' names, and chronologically per author. Names of all authors must be included. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 2000a, 2000b, etc. Unpublished work will not be listed in this section unless it is "in press". Abbreviations should follow the "World List of Scientific Periodicals" published by Butterworths, London.

References must follow the relevant examples below.

AXELSSON, M., FARY, G. T. & FARRELL, A. P., 1993, Coronary blood flow in vivo in the coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Am. J. Physiol.*, 264: 963-971.

MROSOVSKY, N. & YNTEMA, C. L., 1981, Temperature dependence of sexual differentiation in sea turtles: implications for conservation. *In*: K. A. Bjorndal (ed.), *Biology and conservation of sea turtles*. Smithsonian, Inst. Press in Coop. World, Wildlife Fund. Inc., Washington, D.C.

REIS, J., 1998, Microbiologia, pp. 3-31. *In*: M. G. Ferri & Shozo Motoyama (orgs.), *História das ciências no Brasil*. EDUSP e EPU, São Paulo, 2^o vol., 468p.

RIZZINI, C. T., 1979, *Tratado de fitogeografia do Brasil. Aspectos sociológicos e florísticos*. HUCITEC, São Paulo, 2^o vol., 374p.