

COMPORTAMENTO DE *BIOMPHALARIA GLABRATA* (SAY, 1818) COMO CRITÉRIO DE TOXICIDADE EM ENSAIOS BIOLÓGICOS COM MOLUSCICIDAS

OTÁVIO S. PIERI
PEDRO JURBERG

Visando à aplicação sistemática de parâmetros comportamentais como indicadores da ação tóxica de moluscicidas empregados no combate aos hospedeiros intermediários do Schistosoma mansoni, um procedimento para avaliação quantitativa do efeito de dose sobre o comportamento de Biomphalaria glabrata foi desenvolvido, com base no paradigma recomendado pela O.M.S. para ensaios biológicos e envolvendo registro comportamental por cinematografia com lapso de tempo: caramujos com $5 \frac{7}{8} \pm 1/8$ giros eram submetidos a diferentes concentrações subletais de sulfato de cobre durante 24 horas e em seguida transferidos para recuperação em água destilada desionizada; a partir da análise dos registros foram computados (a) a frequência total de subidas à superfície por indivíduo, (b) a frequência total de saídas da água por indivíduo e (c) a proporção média de indivíduos no terço superior do recipiente de teste. O método Litchfield-Wilcoxon foi empregado para determinação de índices de referência (denominados "concentrações de efeito comportamental de 50%" ou CEC_{50}) em relação a cada parâmetro, e os valores obtidos – (a) 0,010, (b) 0,006 e (c) 0,029 ppm de cobre – não só evidenciaram a exequibilidade da aplicação sistemática de critérios comportamentais de toxicidade, como se revelaram capazes de detectar o efeito tóxico do produto em concentrações muito inferiores às obtidas nas determinações convencionais de letalidade. Os dados também mostraram alterações na atividade dos caramujos em decorrência do ciclo de iluminação dia-noite. Embora o esclarecimento dos aspectos etológicos envolvidos no problema do controle químico do vetor dependa da análise das relações entre o indivíduo e seu ambiente natural, estudos de laboratório com mensurações acuradas de parâmetros relacionados a comportamentos de proteção podem fornecer subsídios relevantes a respeito.

A escolha de compostos químicos para uso como moluscicidas no controle da schistosomose depende de critérios múltiplos, em que são levados em conta fatores como toxicidade, estabilidade, facilidade de aplicação e preço (Paulini, 1965). No que diz res-

Este trabalho, conduzido com auxílio do CNPq a Otávio S. Pieri (Proc. 30.0070/79), é uma adaptação de parte da tese de mestrado apresentada por um dos autores (O.S.P.) à PUC/RJ e foi realizado no Laboratório de Comportamento Animal do Instituto Oswaldo Cruz – Caixa Postal 926 – 20000 – Rio de Janeiro – Brasil, e no Laboratório de Comportamento Animal do Instituto de Psicologia e Comunicação Social da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Recebido para publicação em 30 de outubro de 1980 e aceito em 8 de janeiro de 1981.

peito à caracterização da atividade tóxica dos produtos, padronizou-se uma técnica para a realização de ensaios biológicos em laboratório (World Health Organization, 1965), de modo a permitir a comparação dos resultados obtidos por diferentes pesquisadores, nas várias partes do mundo e com as diversas espécies de moluscos.

O procedimento padrão consiste em determinar o nível de toxicidade de um novo produto (ou de um já conhecido, mas em novas condições) submetendo-se grupos de caramujos a diferentes concentrações do composto e verificando-se as respectivas taxas de mortalidade. Os animais são colocados em recipientes contendo as soluções de teste, ali permanecendo por 24 horas (período de exposição); ao final, são levados e transferidos para recipientes com água pura, onde permanecem por 24 horas ou mais (período de recuperação). Os caramujos são então examinados, registrando-se o número de mortos em cada concentração. O índice de toxicidade do moluscicida é calculado estatisticamente com base nessas determinações de mortalidade, sendo expresso em termos de uma concentração letal (LC) de referência: em geral aquela correspondente à taxa de 50% (LC₅₀) ou 90% (LC₉₀) de mortes.

Recentemente, outros critérios para avaliar a toxicidade de um composto, além da letalidade, têm sido desenvolvidos, visando à obtenção de medidas mais abrangentes e rigorosas. Cheng & Sullivan (1973b) compararam o efeito de dois compostos de cobre em *B. glabrata*, utilizando dados respirométricos ao lado das determinações de mortalidade. Esses mesmos autores (Cheng & Sullivan, 1973a), analisando a influência do sulfato de cobre sobre a taxa de batimentos cardíacos de *B. glabrata*, verificaram ser essa uma medida muito sensível às diferentes concentrações daquele moluscicida, e sugeriram sua utilização em ensaios biológicos. Malek & Cheng (1974) propuseram o emprego sistemático das determinações respirométricas e de batimentos cardíacos para testar a ação dos moluscidas numa base mais rápida e quantitativa. O método, sugerido como uma complementação dos testes de letalidade para *Biomphalaria* spp., consistia numa combinação dos procedimentos empregados por Cheng & Sullivan (1973a, b) e observações concomitantes no comportamento dos caramujos.

Até o presente, há apenas referências qualitativas aos aspectos comportamentais em ensaios com moluscidas. Nolan, Bond & Mann (1953), triando uma série de compostos, relataram as seguintes reações de *B. glabrata* durante e imediatamente depois da exposição: retração do corpo na concha, extensão do corpo além da margem palial da concha, saída da água e imobilidade; não foram feitas, entretanto, considerações sobre a ocorrência desses padrões em função da toxicidade dos produtos, sendo esta determinada em termos de mortalidade. Harry & Aldrich (1963), por sua vez, descreveram em *B. glabrata* um conjunto de reações agônicas ("distress syndrome") a íons metálicos, identificando várias categorias comportamentais, como a permanência do animal no fundo do aquário com a massa cefalopodal distendida, incapaz de fixar-se com o pé no substrato e ir à superfície para respirar. A ocorrência dessa síndrome variava de acordo com a natureza do íon e com a concentração a que os indivíduos eram submetidos, permitindo determinar a maior ou menor toxicidade dos íons: aqueles em que se observavam reações agônicas e menores concentrações eram classificados como mais tóxicos. Cheng & Sullivan (1973a) identificaram diferenças comportamentais em *B. glabrata* de acordo com a concentração de sulfato de cobre: retração na concha ou, às vezes, liberação de bolhas de gás provenientes da cavidade palial, produção de muco na região pedal (acima de 1,0 ppm de cobre) e reações agônicas (a 0,01 ppm de cobre).

Embora nos estudos acima referidos não se tenham caracterizado quantitativamente os padrões comportamentais identificados, as evidências obtidas sugerem claramente a possibilidade de se determinar a toxicidade dos produtos testados em termos de diferenças mensuráveis no comportamento. Tanto Harry & Aldrich (1963) quanto Cheng & Sullivan (1973a) consideravam apenas a presença ou ausência de um dado conjunto de reações como indicador de ação tóxica e, talvez por isso, os critérios comportamentais

não tenham alcançado o grau de precisão desejado. No presente trabalho procurou-se determinar parâmetros quantitativos capazes de detectar diferenças de comportamento entre níveis de concentrações relativamente próximas, de modo a fornecer índices de toxicidade fidedignos.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

Foram utilizados caramujos da espécie *B. glabrata* provenientes do Laboratório de Xistossomose do Instituto Oswaldo Cruz. Seis meses antes do início dos testes, cápsulas ovíferas de um único adulto foram transferidas para um tanque de amianto (dimensões internas: 62cm x 62cm x 25cm) contendo água previamente mantida no escuro por um mês. Na mesma ocasião foram colocados alguns ramos de *Elodea canadense* e exemplares de *Poecilia reticulata* ("guppy"). A criação era alimentada com alface fervida e, mensalmente, adicionavam-se cerca de 10 g de carbonato de cálcio (precipitado leve) à água. O tanque de criação era mantido no interior do laboratório, em local sob incidência da luz solar, mas ao abrigo de variações extremas de temperatura. Semanalmente, o nível da água era completado com água destilada.

Para os ensaios eram selecionados indivíduos melânicos com diâmetro da concha medindo entre 15 e 20 mm. Após a realização dos testes, procedeu-se à determinação precisa das dimensões de 28 exemplares, aleatoriamente escolhidos entre os caramujos utilizados: o diâmetro da concha foi de $17,6 \pm 0,86$ mm (média e desvio-padrão) e o número de giros, $5,9 \pm 0,29$ (média e desvio-padrão).

2. Material

Os testes eram realizados no interior de uma câmara construída para oferecer iluminação com ciclo dia-noite e temperatura controlada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), além de permitir a incorporação de uma unidade de registro comportamental por cinematografia com lapso de tempo (30 segundos de intervalo quadro-a-quadro). Uma descrição detalhada dessa aparelhagem foi apresentada por Pieri, Jurberg & Raymundo (1980).

A Fig. 1 mostra esquematicamente o recipiente de teste em visão frontal, tal como registrada pela filmadora. Medindo 18cm x 30cm x 2,5cm, esse recipiente possuía uma divisória vertical no meio separando dois compartimentos com capacidade superior a 500 ml cada (cd e ce, na Fig. 1). As peças componentes tinham 0,2cm de espessura, e foram colocadas com borracha e silicone transparente marca Dow Corning. Na face de trás era afixado externamente um cartão plastificado com quadrículas de 3 x 3cm (q, na Fig. 1), de modo a permitir a determinação da posição dos indivíduos no espaço vertical.

As soluções para os testes foram preparadas com sulfato de cobre penta-hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) P.A. (procedência J.T. Baker Chemical Co.) em água destilada desionizada (ADD). Esta era obtida por repetidas passagens de água destilada em desionizador marca Permution modelo 1800 até se alcançar uma condutividade inferior a 1,0 micromho/cm. Inicialmente, foram dissolvidos 16mg do produto em quatro litros de ADD, obtendo-se assim uma solução de 1 ppm de cobre. Em seguida, por diluições sucessivas à quarta parte, foram obtidas as soluções de 0,25 ppm, 0,062 ppm, 0,016 ppm, 0,004 ppm e 0,001 ppm de cobre. Um sétimo nível de tratamento, o de controle, foi constituído apenas por ADD. A escolha do sulfato de cobre como meio tóxico para os ensaios deveu-se não só à sua longa utilização no controle da xistossomose (Duncan, 1974) como também ao seu emprego como moluscicida de referência nos testes com novos produtos (Bruaux & Gillet, 1961). Além disso, é em relação a esse composto que se registra na literatura maior número de observações comportamentais, tanto em estudos de laboratório como de campo.

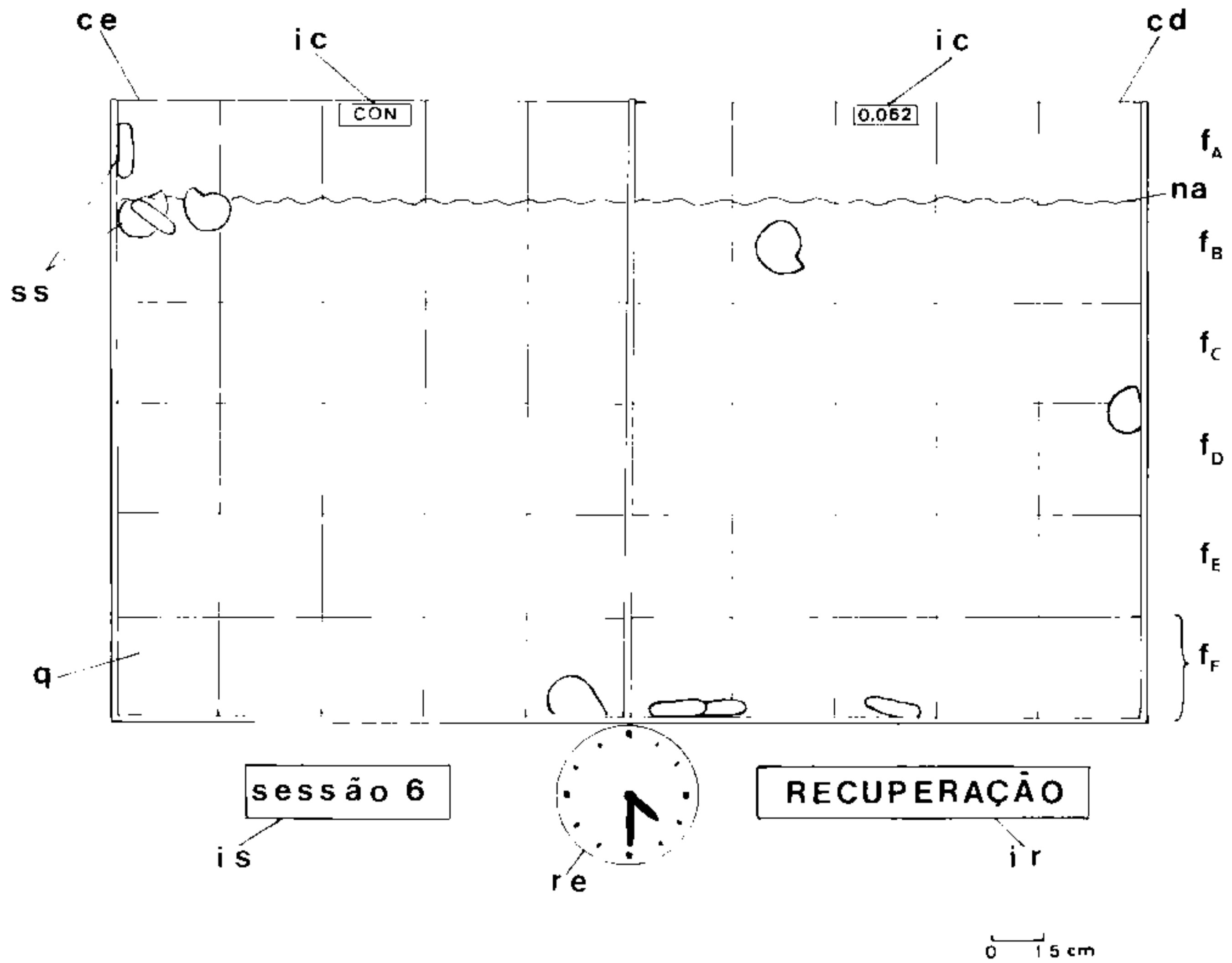


Fig. 1 - Representação esquemática do recipiente de teste para a determinação de índices comportamentais de toxicidade de moluscidas com *Biomphalaria glabrata*: visão frontal, tal como registrado cinematograficamente.

cd, compartimento direito; ce, compartimento esquerdo; f_A , faixa horizontal de 3 cm acima do nível da água; f_B , idem de 0 a 3 cm de profundidade; f_C , idem, de 3 a 6 cm de profundidade; f_D , idem, de 6 a 9 cm de profundidade; f_E , idem, de 9 a 12 cm de profundidade; f_F , idem, de 12 a 15 cm de profundidade; ic, indicador de concentração; ir, indicador de período de recuperação; is, indicação do número da sessão; na, nível da água; q, quadrícula; re, relógio; ss, sujeitos.

3. Procedimentos

O procedimento obedeceu basicamente ao paradigma recomendado pela O.M.S. para realização de ensaios biológicos com moluscidas (World Health Organization, 1965). As modificações introduzidas visaram tão-somente a permitir o registro comportamental por cinematografia, exceção feita ao fato de que, no presente trabalho, nenhuma cobertura foi colocada sobre os recipientes de teste. Os ensaios consistiam em submeter grupos de cinco indivíduos a 500 ml das diferentes soluções, durante 24 horas (período de exposição), ao final das quais eram enxaguados e transferidos para igual volume de ADD onde permaneciam um mínimo de 24 horas (período de recuperação). Em cada nível de tratamento foi testado um total de 20 caramujos, havendo quatro réplicas para uma mesma concentração. Como o recipiente de teste permitia o registro simultâneo de dois grupos, foram realizadas 14 sessões com os grupos distribuídos de acordo com um arranjo especialmente elaborado: em primeiro lugar, levou-se em conta a localização dos compartimentos, planejando-se duas réplicas de cada nível de tratamento no lado direito e duas

no lado esquerdo; também foi levado em consideração a diferença de tempo entre as primeiras sessões e as últimas, arranjando-se os grupos de forma que cada nível de tratamento fosse testado tanto nas iniciais quanto nas finais (Tabela I).

TABELA I

Arranjo dos grupos testados nos compartimentos esquerdo e direito do recipiente de teste, nas 14 sucessivas sessões experimentais, para o estabelecimento de índices comportamentais de toxicidade de moluscicidas com *Biomphalaria glabrata*.

Compartimentos	Sessões Números													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Esquerdo	0,004	1,00	0,062	0,001	0,25	CON	0,016	0,062	1,00	0,001	0,004	0,25	0,016	CON
Direito	0,25	0,016	CON	1,00	0,001	0,062	0,004	CON	0,25	0,016	1,00	0,004	0,062	0,001

OBS.: Os grupos estão identificados pela concentração de cobre (ppm) a que foram submetidos no período de exposição, com exceção do grupo de controle, identificado por CON.

Um dia antes de cada sessão, eram retirados 15 caramujos e 1.500 ml de água do tanque de criação e colocados em um recipiente no interior da câmara para aclimação, com alimento (alface fervida) *ad libitum*. Também as soluções a serem testadas e a água de recuperação eram deixadas de véspera na câmara. As sessões começavam sempre às 12h de modo que os grupos sofriam um regime de luz-escuro-luz, durante 6,12 e 6 horas, respectivamente. Tal esquema foi escolhido por propiciar uma forma de controle balanceado da seqüência dia-noite: com início das sessões ao meio-dia, o efeito da precedência da fase diurna sobre a noturna seria minimizado. Pouco antes do início da sessão, o recipiente de teste era lavado em detergente marca Extran e enxaguado repetidas vezes com ADD. De acordo com o esquema preestabelecido no quadro 1, os compartimentos do aquário eram encheidos com as respectivas soluções até a altura de 15cm, isto é, a 3cm da borda, e coincidindo com a penúltima linha horizontal do cartão quadriculado atrás do aquário (na, na Fig. 1); essa altura correspondia a 500 ml de solução. Uma pequena etiqueta com indicação da concentração testada era colada na face frontal de cada compartimento, acima do nível da água (ic, na Fig. 1); ao lado do relógio, era colocada uma tira de papel com indicação do número da sessão (is, na Fig. 1). Cinco dos caramujos aclimatados eram, então, aleatoriamente colocados em cada compartimento (100 ml por indivíduo), dando-se início imediato à filmagem; os cinco restantes permaneciam no recipiente de aclimação ao longo de toda a sessão, sendo que nem a estes nem aos testados era fornecido alimento. Ao final das 24 horas de exposição, os grupos passavam por três enxaguaduras sucessivas em recipientes com 500 ml de ADD, numa operação que durava cerca de 3 minutos; o aquário, por sua vez, era lavado da mesma maneira que antes da sessão, enchendo-se, depois, ambos os compartimentos com ADD até a altura determinada; em seguida, os caramujos eram recolocados nos respectivos compartimentos sendo uma segunda tira de papel afixada ao lado do relógio, indicando tratar-se do período de recuperação (ir, na Fig. 1). Caso ao termo das 24 horas seguintes algum dos indivíduos ainda não tivesse alcançado a superfície, a sessão prosseguia até que tal se verificasse, ou que se constatasse sua morte.

Os seguintes parâmetros comportamentais foram escolhidos para mensuração e análise, com base nos registros cinematográficos:

a. frequência de subidas à superfície: esse parâmetro se referia aos deslocamentos em que a massa cefalopodal dos indivíduos imersos atingisse o nível da água e era medido computando-se, no conjunto das quatro réplicas de cada nível de tratamento, o total de ocorrências verificadas durante as 48 horas de teste (24h de exposição e 24h de recuperação);

b. frequência de saídas da água: esse parâmetro dizia respeito aos deslocamentos que resultassem na total emersão dos caramujos e era medido da mesma forma que o parâmetro anterior, computando-se, no conjunto das quatro réplicas de cada nível de tratamento, o total de ocorrências nas 48 horas de teste;

c. distribuição no espaço vertical: esse parâmetro fazia referência à localização dos indivíduos em relação ao nível da água, computando-se, no conjunto das quatro réplicas de cada nível de tratamento, a média do número de caramujos registrados no terço superior do recipiente de teste (faixas f_A , f_B e f_C da Fig. 1) ao final de cada 30 minutos das 48 horas de teste (24h de exposição e 24h de recuperação).

Para verificar se os parâmetros escolhidos traduziram efetivamente um efeito de dose, a linearidade da relação efeito/log dose foi testada estatisticamente através do método do coeficiente de determinação (Daniel, 1974). As determinações comportamentais de toxicidade foram levadas a efeito para cada parâmetro, segundo um procedimento análogo ao descrito por Malek & Cheng (1974) para o cálculo dos valores de LC_{50} pelo método gráfico Litchfield-Wilcoxon: na abscissa do papel de probabilidade lognormal eram locadas as concentrações de moluscicida; na ordenada, eram dispostas as medidas obtidas do parâmetro, expressas como percentagens em relação aos valores do grupo de controle; com os pontos assim marcados, uma linha era traçada por interpolação gráfica, representando as medidas percentuais esperadas do parâmetro, dentro da amplitude das concentrações testadas; em seguida, verificava-se a adequação da reta pelo teste qui-quadrado; em caso afirmativo, o ponto da abscissa correspondente a 50 na escala de percentagens era tomado como o valor de referência para caracterizar o efeito comportamental do produto considerado, em relação ao parâmetro em questão. Esses valores, calculados um para cada parâmetro, foram aqui denominados "concentrações de efeito comportamental de 50%" (representadas pela abreviatura CEC_{50}) e constituíram os índices comportamentais da ação tóxica do produto testado.

RESULTADOS

Na Tabela II, a coluna C apresenta as medidas obtidas em cada parâmetro comportamental nos diferentes níveis de concentração do moluscicida sulfato de cobre. A adequação dessas medidas para a determinação dos índices de toxicidade do produto em relação aos respectivos parâmetros foi comprovada pela rejeição da hipótese de não haver efeito de dose: verificou-se uma relação linear entre os logaritmos dos níveis de concentração e (a) totais de subidas à superfície, por indivíduos ($F(1,4) = 21,96$; $P < 0,05$), (b) os totais acumulados de saídas da água, por indivíduos ($F(1,4) = 22,40$; $P < 0,05$) e (c) as proporções médias de indivíduos no terço superior do recipiente de teste ($F(1,4) = 97,85$; $P < 0,05$). Com base na determinação gráfica das percentagens obtidas e esperadas para cada parâmetro comportamental (Fig. 2; Tabela 2, colunas D e E), e uma vez confirmada a adequação das respectivas retas de regressão (Tabela II, coluna F), obteve-se a concentração de efeito comportamental de 50% (CEC_{50}) para os três parâmetros considerados (Fig. 2; Tabela II, coluna G).

A Tabela III mostra a distribuição proporcional média de indivíduos a cada 6 horas de exposição e recuperação nas sucessivas faixas de recipiente de teste sob diferentes concentrações de sulfato de cobre. Comparando-se estatisticamente (teste qui-quadrado) os valores obtidos ao nível de 5% de significância, verificou-se que, no grupo de controle, a proporção de indivíduos no terço superior do recipiente (faixas A e B) era significativamente maior do que nos terços médios (faixas C e D) e inferior (faixas E e F), em todos os intervalos de 6 horas, tanto no período de exposição quanto no de recuperação; o mesmo verificou-se a 0,001 ppm, com exceção das primeiras 6 horas de exposição, em que não houve diferença significativa entre os terços superior e inferior. Na concentração de 0,004 ppm, constatou-se uma proporção significativamente maior de indivíduos no terço inferior do recipiente, na média das primeiras 6 horas; no entanto, em todos os outros intervalos, as proporções médias no terço superior é que se mostraram significativamente maiores. A 0,016 ppm as proporções obtidas no terço inferior do recipiente de teste foram significativamente maiores em todos os intervalos de 6 horas do período de exposição; na recuperação, por sua vez, constatou-se o oposto, com as proporções no terço superior

TABELA II

Passos na determinação dos índices de toxicidade do moluscicida sulfato de cobre em relação a três parâmetros comportamentais de *Biomphalaria glabrata*, segundo o método Litchfield-Wilcoxon (adaptado de Malek & Cheng, 1974). CEC₅₀, concentração de efeito comportamental de 50%; m, número de concentrações locadas; n, número de caramujos por concentração; P, probabilidade; v, graus de liberdade (m - 2); X², qui-quadrado

A Parâmetros	B Concentrações de Cobre	C Medidas do Parâmetro	D % Obtida	E % Esperada	F Adequação da Reta	G CEC ₅₀ (ppm)
a. Frequência de subidas à superfí- cie	controle	25,3	—	—	n = 20 m = 6 x ² = 4,40 v = 4 p > 0,05	0,10
	0,001	26,0	97,4	92		
	0,004	17,5	69,2	72		
	0,016	5,4	21,3	40		
	0,062	2,6	10,3	14		
	0,25	1,4	5,5	3		
	1,00	0,0	0,09	0,3		
b. Frequência de saídas da água	controle	12,3	—	—	n = 20 m = 5 x ² = 2,54 v = 3 p > 0,05	0,006
	0,001	10,6	86,2	92		
	0,004	7,3	48,0	62		
	0,016	2,4	19,5	22		
	0,062	0,6	4,9	3		
	0,25	0,0	0,03	0,1		
	1,00	0,0	—	—		
c. Distribuição no espaço vertical	controle	84,8	—	—	n = 20 m = 6 x ² = 4,40 v = 4 p > 0,05	0,029
	0,001	76,9	90,7	95,5		
	0,004	76,7	90,4	84		
	0,016	44,4	52,4	62		
	0,062	31,7	37,4	32		
	0,25	20,5	24,2	13		
	1,00	0,0	1,2	3,5		

OBS.: Foram tomados como medidas dos parâmetros (coluna C):

- total acumulado de subidas à superfície, por indivíduo, ao final de 48 horas de teste (24h de exposição e 24h de recuperação)
- total acumulado de saídas da água, por indivíduo, ao final de 48 horas de teste (24 h de exposição e 24 h de recuperação)
- proporção (%) de indivíduos no terço superior do recipiente de teste: média das mensurações a cada 30 minutos de exposição e recuperação.

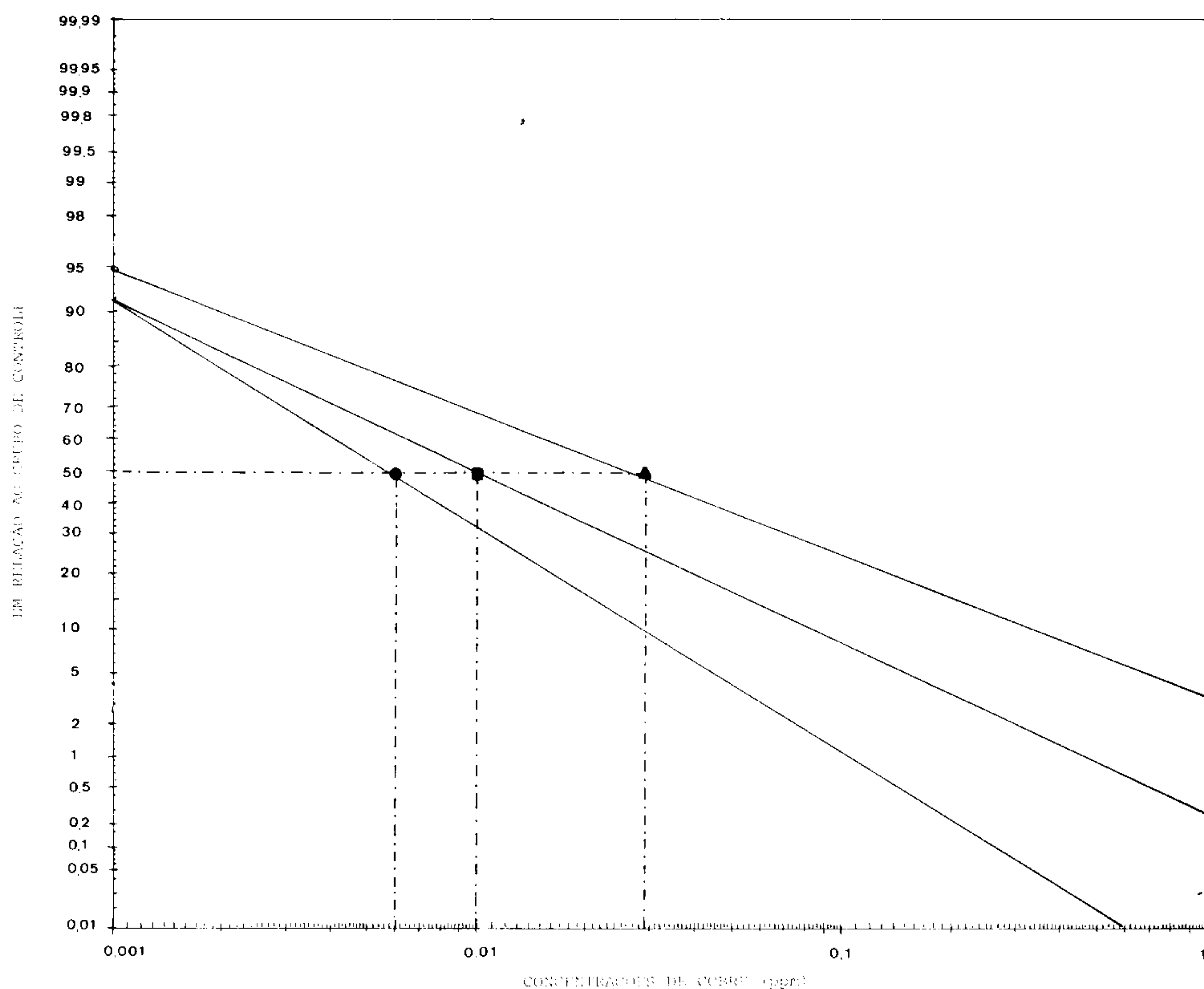


Fig. 2 – Gráfico de determinação dos índices de toxicidade do moluscicida sulfato de cobre em relação a três parâmetros comportamentais de *Biomphalaria glabrata*, segundo o método Litchfield-Wilcoxon (adptado de Malek & Cheng, 1974). Abscissa: escala logarítmica; ordenada: escala correspondente às frequências acumuladas da distribuição normal.

As retas de traço contínuo representam as linhas de regressão para as medidas de cada parâmetro; as retas de ponto e traço interrompido determinam, na abscissa, as concentrações de efeito comportamental de 50% (CEC_{50}) respectivas. ■, ponto da linha de regressão correspondente à CEC_{50} relativa ao parâmetro frequência de subidas à superfície; ●, ponto da linha de regressão correspondente à CEC_{50} relativa ao parâmetro frequência de saídas da água; ▲, ponto da linha de regressão correspondente à CEC_{50} relativa ao parâmetro distribuição no espaço vertical.

sendo significativamente maiores. A 0,062 ppm, 100% dos indivíduos permaneceram no fundo do aquário durante todo o período de exposição; a partir do segundo intervalo de seis horas de recuperação, isto é, entre 30 e 36 horas decorridas do início do ensaio, a proporção média no terço superior passou a ser significativamente maior. A 0,25 ppm, os indivíduos também não saíram do fundo no período de exposição; no entanto, somente nas 6 horas finais de recuperação é que se verificou uma proporção significativamente maior de indivíduos no terço superior do aquário.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos mostram, em primeiro lugar, que os procedimentos empregados para a determinação de parâmetros comportamentais de toxicidade em bases quantitativas e acuradas são plenamente executáveis. O próprio paradigma recomendado pela O.M.S. para caracterização da ação tóxica dos moluscicidas pôde ser obedecido em suas

TABELA III

Distribuição espacial dos indivíduos nas diferentes concentrações de cobre como CuSO_4 : média das proporções (%) registradas de 30 em 30 minutos, a cada 6 horas dos períodos de exposição e recuperação, em faixas horizontais de 3 cm de altura. A, faixa horizontal de 3 cm acima do nível da água; B, idem, de 0 a 3 cm de profundidade; C, idem, de 3 a 6 cm; D, idem, de 6 a 9 cm; E, idem, de 9 a 12 cm; F, idem, de 12 a 15 cm.¹ As barras hachuradas indicam as fases noturnas.

Tempo (h) decorrido	Faixas	Controle	Concentrações de Cobre (ppm)						
			0,001	0,004	0,016	0,062	0,25	1,00	
Período de Exposição	0 - 6	A	10,4	4,3	3,3	0,0	0,0	0,0	0,0
		B	50,0	46,9	28,7	0,0	0,0	0,0	0,0
		C	2,7	4,0	1,7	0,0	0,0	0,0	0,0
		D	6,0	3,3	3,3	0,0	0,0	0,0	0,0
		E	3,8	5,3	7,1	0,0	0,0	0,0	0,0
		F	27,1	36,8	55,8	100,0	100,0	100,0	100,0
	6 - 12	A	16,2	8,3	14,2	0,0	0,0	0,0	0,0
		B	76,9	73,0	67,0	4,2	0,0	0,0	0,0
		C	0,0	3,3	1,2	0,8	0,0	0,0	0,0
		D	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0
		E	0,2	1,7	2,1	0,0	0,0	0,0	0,0
		F	6,7	13,6	15,1	95,0	100,0	100,0	100,0
	12 - 18	A	15,0	14,2	26,1	0,4	0,0	0,0	0,0
		B	83,0	79,2	68,4	10,8	0,0	0,0	0,0
		C	0,0	0,8	1,7	0,0	0,0	0,0	0,0
		D	0,3	0,8	0,5	0,4	0,0	0,0	0,0
		E	0,3	0,8	0,0	1,2	0,0	0,0	0,0
		F	1,4	4,2	3,2	87,2	100,0	100,0	100,0
18 - 24	A	13,5	10,0	12,2	0,4	0,0	0,0	0,0	
	B	60,4	52,6	51,4	2,0	0,0	0,0	0,0	
	C	3,6	0,8	2,8	0,8	0,0	0,0	0,0	
	D	2,8	2,5	2,8	0,0	0,0	0,0	0,0	
	E	1,1	0,8	5,0	3,3	0,0	0,0	0,0	
	F	18,6	33,3	25,8	93,5	100,0	100,0	100,0	
24 - 30	A	12,5	11,7	8,3	5,4	2,5	0,8	0,0	
	B	67,5	52,8	64,3	59,6	7,5	5,0	0,0	
	C	2,5	7,2	6,7	3,3	2,5	0,0	0,0	
	D	3,3	5,6	2,5	3,3	2,0	1,3	0,0	
	E	2,5	4,4	5,0	2,9	0,8	0,4	0,0	
	F	11,7	18,3	13,3	25,5	84,5	92,5	100,0	
30 - 36	A	25,0	34,0	20,8	22,0	3,3	12,2	0,0	
	B	74,2	61,0	77,9	76,7	57,8	36,7	0,0	
	C	0,0	1,3	0,4	0,0	1,1	2,8	0,0	
	D	0,0	2,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	E	0,4	0,7	0,4	0,0	0,0	2,2	0,0	
	F	0,4	0,7	0,4	1,3	37,8	46,1	100,0	
36 - 42	A	27,9	30,9	36,2	20,4	15,0	8,7	0,0	
	B	70,8	65,8	60,0	70,0	78,9	40,8	0,0	
	C	0,4	1,7	0,0	1,3	0,5	2,4	0,0	
	D	0,0	0,7	0,8	0,8	0,5	4,1	0,0	
	E	0,0	0,0	0,8	0,8	1,1	0,0	0,0	
	F	0,8	1,0	2,0	6,7	3,9	44,0	100,0	
42 - 48	A	15,8	15,3	18,7	11,7	5,5	0,0	0,0	
	B	59,6	55,7	56,7	72,0	83,3	60,4	0,0	
	C	2,5	2,7	1,7	5,4	3,9	0,4	0,0	
	D	1,7	0,3	4,2	1,7	2,2	1,7	0,0	
	E	1,7	2,3	2,1	1,3	1,7	0,0	0,0	
	F	18,8	23,7	17,1	7,9	3,5	37,5	100,0	
Total	A	17,0	16,1	17,4	7,5	3,3	2,7	0,0	
	B	67,8	60,8	59,3	36,9	28,4	17,8	0,0	
	C	1,5	2,7	2,0	1,5	1,3	0,7	0,0	
	D	1,8	1,9	1,8	0,8	0,5	0,9	0,0	
	E	1,3	2,0	2,8	1,2	0,4	0,3	0,0	
	F	10,6	16,5	16,7	52,1	66,1	77,6	100,0	

¹ Ver Fig. 1

linhas gerais, e as modificações introduzidas para efeito de registro cinematográfico resultaram satisfatórias; o uso de um recipiente de teste com formato especial, por sua vez, permitiu o levantamento de categorias comportamentais normalmente inobserváveis nos recipientes convencionais; além disso, a não colocação de tela na superfície da água, permitindo a saída dos caramujos, revelou aspectos importantes desse comportamento, sem prejuízo para as determinações de toxicidade. Um outro aspecto metodológico, qual seja, a impossibilidade de se testar todos os grupos ao mesmo tempo, foi resolvido satisfatoriamente com o arranjo das sessões de acordo com a Tabela I: comparando-se, para um mesmo parâmetro os dados obtidos entre réplicas realizadas em sessões distantes em mais de 20 dias uma da outra (ou seja, entre as sessões de 1 a 3 e as de 12 a 14) com os obtidos entre as réplicas realizadas em sessões com menos de uma semana de diferença, o teste qui-quadrado não revelou nenhuma discrepância significativa; isso significa que, pelo menos em relação às categorias consideradas, um intervalo de vários dias entre as sessões não interferiu nos resultados.

Em linhas gerais, os métodos aqui empregados podem ter aplicação igualmente na análise das relações de tempo-concentração (TxC), de grande importância para o planejamento de ensaios biológicos de campo (Ritchie, 1973), bastando para isso acrescentar a programação das sessões grupos submetidos a intervalos diferentes de exposição como, por exemplo, 1, 2 e 6 horas (Gillet & Bruaux, 1961). Nesse caso, um cuidado especial deveria ser tomado no que se refere à interferência do ciclo dia-noite; se, por um lado, o efeito dessa variável poderia ser desprezado quando se tratasse de medidas de mortalidade, o mesmo não poderia ser feito em relação às de comportamento. Portanto, tornar-se-ia necessária a formação de dois subgrupos para cada tempo de exposição, um com regime de iluminação inverso do outro, computando-se os dados em conjunto.

Em segundo lugar, os resultados permitiram evidenciar uma relação típica dos efeitos das substâncias ativas sobre o organismo, qual seja a relação efeito/log dose (Lison, 1976); de fato, tanto as medidas de frequência de subida à superfície e saída da água como as de distribuição espacial dos indivíduos mostraram-se inversamente proporcionais aos logaritmos das concentrações do moluscicida, pelo menos na faixa de 0,001 a 1,00 ppm de cobre. Além disso, a linearidade dessas relações permitiu a determinação de índices de toxicidade análogos aos obtidos com base no critério de letalidade: em geral as concentrações de um moluscicida e as respectivas medidas de mortalidade, quando localizadas em papel de probabilidade lognormal, tendem a produzir uma linha reta, a partir da qual podem ser obtidos os valores de referência LC_{50} e LC_{90} (Uemura, 1973); da mesma forma, também em relação aos parâmetros comportamentais aqui considerados a concentração do moluscicida testado obedeceu à distribuição lognormal, permitindo, com base na reta resultante, a obtenção de valores de referência cada qual correspondendo à concentração de efeito comportamental de 50% (CEC_{50}) para um dado parâmetro.

Em terceiro lugar, constatou-se pelos resultados que os índices comportamentais de toxicidade assim obtidos atingiram valores extremamente baixos, em comparação com os verificados com base no critério de totalidade. Hopf & Muller (1962), empregando basicamente o mesmo procedimento recomendado pela O.M.S. acima referido, e utilizando exemplares adultos de *B. glabrata* (diâmetro da concha de 10 a 12 mm), obteve, como índice de toxicidade do sulfato de cobre $LC_{50} = 2$ ppm; as medidas comportamentais aqui empregadas, por outro lado, permitiram detectar efeitos tóxicos desse produto a níveis na ordem de 10^{-2} ppm (para os parâmetros frequência de subida à superfície e distribuição dos indivíduos no espaço vertical) ou mesmo de 10^{-3} ppm (para o parâmetro frequência de saídas da água).

Embora os objetivos do presente trabalho tenham dito respeito essencialmente à obtenção de índices fidedignos de toxicidade com base em critérios comportamentais, algumas evidências sobre o aspecto causal e funcional da questão não podem deixar de ser mencionadas. Antes de mais nada, parece não haver dúvidas de que, pelo menos na faixa de 0,001 a 1,00 ppm de cobre, o efeito comportamental do sulfato de cobre é significativo

tanto sobre as respostas de subida à superfície e de saída da água quanto sobre a distribuição vertical dos caramujos. Com referência à subida à superfície, todos os indivíduos sobreviveram aos níveis de 0,001 a 0,25 ppm de cobre e chegaram à tona pelo menos uma vez até o final do ensaio; só a 1,00 ppm é que nenhum indivíduo chegou à superfície, verificando-se 100% de mortes. Embora esse comportamento possa ter importante valor de sobrevivência para os caramujos vetores, pois nos gastrópodos pulmonados as trocas respiratórias se processam geralmente no meio atmosférico (Guiretti & Guiretti-Magaldi, 1975), parece improvável que apenas o efeito da substância sobre a coordenação motora dos indivíduos, impedindo a fixação da sola pedal no substrato e, conseqüentemente, a subida à superfície, tenha causado a morte dos caramujos a 1,00 ppm; na verdade, houve indícios de sangramento em alguns indivíduos ainda no período de exposição e, via de regra, ao final do ensaio, a água já mostrava sinais de apodrecimento. De fato, as evidências a respeito (Sullivan & Cheng, 1976) apontam, como causa da morte por sulfato de cobre, disfunções na osmorregulação ou na respiração devidas à ação dos íons de cobre sobre o epitélio do organismo.

Quanto à saída da água, os resultados indicam que, pelo menos nas condições observadas, sua ocorrência não depende da presença de agentes tóxicos no meio líquido: a frequência de respostas no nível de controle apresentou valores surpreendentemente altos, sendo registradas 246 saídas pelos 20 sujeitos, ou seja, uma proporção de 12,3 respostas por indivíduos, no total das 48 horas de ensaio. Além disso, as evidências aqui obtidas não permitem atribuir qualquer efeito causal de "repelência" por parte do moluscicida usado: não só se verificaram menores frequências de saída sob crescentes concentrações como também, na maioria das vezes, os caramujos não iam além da borda do recipiente, retornando à água, no máximo algumas horas depois. (Segundo consta nos registros, apenas 3 dos 20 sujeitos abandonaram o recipiente durante os ensaios, sendo encontrados retraídos no soalho da câmara de observação; além disso, computando-se todas as saídas da água registradas nas diferentes concentrações, em 71,9% das vezes a permanência fora da água foi inferior a 15 minutos; apenas 1,8% das vezes o tempo fora da água foi superior a 3 horas). Embora, no âmbito do presente trabalho, não seja possível avaliar o papel desse comportamento na sobrevivência de *B. glabrata* aos moluscicidas, os dados obtidos são suficientes para caracterizar a necessidade de estudos mais detalhados, haja vista sua importância epidemiológica (Paraense, 1957).

A distribuição espacial dos indivíduos, por sua vez, foi o parâmetro que melhor pôde evidenciar a ação do sulfato de cobre sobre o comportamento dos caramujos nas condições testadas, não só por apresentar combinadamente os efeitos verificados nos demais parâmetros, como também por proporcionar uma avaliação estatisticamente fundamentada dessas alterações nos diferentes níveis de exposição e recuperação. Pela Tabela II fica patente, em primeiro lugar, que os indivíduos não submetidos ao agente tóxico (nível de controle) tenderam a ocupar mais as áreas superficiais da massa líquida do que o fundo ou as faixas intermediárias do recipiente de teste; note-se ainda que, durante todo o ensaio, a taxa de indivíduos observados fora da água nunca foi inferior a 10%; em segundo lugar, o fato de, nas primeiras 6 horas de exposição a 0,004 ppm, a maior parte dos sujeitos ter sido encontrada no fundo do aquário (ao contrário do obtido a 0,001 ppm, onde a distribuição dos indivíduos não se mostrou significativamente diferente em relação aos controles) sugere fortemente ser essa a menor concentração em que o comportamento se mostrou afetado pelo moluscicida; nos níveis de concentração subletais mais elevados, por sua vez, o que se observou tipicamente foi o retorno dos indivíduos à normalidade (tomando-se como referência os valores obtidos no nível de controle), depois de interrompida a ação do moluscicida ao final de 24 horas de contato. De um modo geral, essas evidências apontam para a mesma hipótese sugerida com base nos resultados revelados pelo parâmetro de subida à superfície, qual seja, a de que o efeito específico do sulfato de cobre sobre os mecanismos neuromotores do organismo não acarretaria, por si só, conseqüências capazes de determinar a morte dos indivíduos: se a concentração do produto for de tal ordem que não atinja irreversivelmente os processos osmorreguladores ou respiratórios, o animal acabará se recuperando. Nesse contexto, portanto, um composto, cujo efei-

to sobre o sistema nervoso promovesse alterações comportamentais permanentes mesmo quando administrado em doses insuficientes para atingir letalmente o organismo em outros sistemas vitais, poderia ter uma eficácia muito maior.

Um último aspecto a ser ainda destacado diz respeito às variações noturna e diurna da atividade dos caramujos nos diferentes níveis do moluscicida. Como não foi possível identificar individualmente os caramujos através dos registros cinematográficos, a análise das diferenças de comportamento intra-sujeitos ao longo dos períodos de claro e de escuro não pôde ser feita em bases estatísticas para as respostas de subida à superfície e saída da água. No entanto, os dados da Tabela II sugerem que, independentemente do efeito tóxico do moluscicida, a proporção dos indivíduos no terço superior do recipiente tende a ser maior quando as luzes da câmara estão apagadas: no grupo de controle, a média observada na proporção de caramujos acima do nível da água ou logo abaixo da superfície (faixas A e B) no total das fases de escuro foi superior a 97,2% ao passo que no dos períodos de claro alcançou apenas 72,4% ($t = 5,589$; $p < 0,05$). É óbvio que as condições em que se realizaram os ensaios não permitem nenhuma extrapolação para as condições naturais; entretanto, esses dados confirmam as observações de Pimentel & White (1959) realizadas em campo e em laboratório.

CONCLUSÕES

As determinações aqui efetuadas constituem evidência segura da possibilidade de utilização de critérios comportamentais para caracterizar a ação tóxica dos moluscicidas. Em primeiro lugar, o fato de os parâmetros considerados terem permitido a obtenção de índices fidedignos de toxicidade para o sulfato de cobre abre perspectivas para uma análise comparativa mais abrangente das propriedades dos moluscicidas em uso, bem como dos novos compostos. Assim, para decidir sobre a superioridade de um produto em relação a outro, além da letalidade e outros fatores, os efeitos comportamentais também poderiam ser sistematicamente levados em conta, avaliando-se um moluscicida inclusive por sua ação sobre comportamentos de proteção: com respeito a parâmetros como a frequência de subidas à superfície ou de saídas da água, por exemplo, quanto menor a CEC_{50} , maior seria eficácia do produto testado, sob esse aspecto. Em segundo lugar, a constatação de que o efeito do $CuSO_4$ sobre o comportamento de *B. glabrata* se fez sentir em doses relativamente muito mais baixas que as detectadas pelo critério de letalidade; demonstra a grande sensibilidade das determinações comportamentais: fazendo-se uso deste critério, a avaliação de toxicidade de um moluscicida poderia ser levada a termo mesmo numa faixa de concentrações subletais.

É claro que, no âmbito do presente trabalho, pouco se pode afirmar sobre os aspectos causais e funcionais do comportamento dos caramujos vetores da xistosomose em relação aos moluscicidas. Como para se empreender um estudo abrangente da questão nenhum enfoque que exclua a dinâmica das relações entre o indivíduo e seu ambiente natural pode proporcionar respostas adequadas (Thomas, 1973), quaisquer generalizações nesse sentido, fundamentadas estritamente nos procedimentos aqui empregados, têm valor limitado. Não obstante, graças à mensuração acurada e sistemática de parâmetros relacionados aos comportamentos de proteção, as evidências obtidas podem fornecer subsídios relevantes para a elucidação desses aspectos.

SUMMARY

The possibility of using reliable behavioural parameters in toxicity determinations of molluscicides was assessed through the development of a method based on W.H.O. standard procedures for bioassaying molluscicides and involving behavioural records by time-lapse cinematography. *B. glabrata* adults ($5 \frac{7}{8} \pm 1/8$ whorls) were subjected to different sublethal doses of copper sulfate during 24 hours and then trans-

ferred to deionized distilled water for recovery; from those records it was possible to compute: (a) frequency of climbs to surface, (b) frequency of crawlings out of water and (c) proportion of snails on the upper, middle and bottom thirds of the test containers. The Litchfield-Wilcoxon test was employed in determining a reference value (called "concentration of behavioural effect of 50%" or CBE₅₀) in relation to each parameter. The indices thus obtained – (a) 0.010, (b) 0.006 and (c) 0.029 ppm of copper – showed the feasibility of systematic uses of behavioural criteria of toxicity and also proved capable of detecting toxic effects of the product under concentrations much lower than those obtained from conventional lethality determinations. The data also showed an effect/log dose linear relationship for all the parameters considered and revealed changes in snail activity as a consequence of the daily light cycle. Although the clarification of the ethological aspects involved in the control of schistosome host snails depends on the analysis of the relationships between the snail and its natural habitat, laboratory studies, carried out with accurate measurements of the parameters related to protective modes of behaviour, can be of great value as well.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRUAUX, P. & GILLET, J., 1961. Comparaison de l'activité de divers molluscicides en laboratoire. *Bull. W.H.O.*, 25 (4-5) :519-523.
- CHENG, T.C. & SULLIVAN, J.T., 1973a. The effect of copper on the heart-rate of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata). *Comp. Gen. Pharmac.*, 4 :37-41.
- CHENG, T.C. & SULLIVAN, J.T., 1973b. A comparative study of the effects of two copper compounds on the respiration and survival of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata). *Comp. Gen. Pharmac.*, 4 :315-320.
- DANIEL, W.W., 1974. *Biostatistics: A foundation for analysis in the health sciences*. John Wiley & Sons, New York.
- DUNCAN, J., 1974. A review of the development and application of molluscicides in schistosomiasis control. In CHENG, T.C., ed. *Molluscicides in Schistosomiasis Control*. Academic Press, New York. p. 9-40.
- GUILLET, J. & BRUAUX, P., 1961. Essais en laboratoire des nouveaux molluscicides Bayer 73 et ICI 24223. *Bull. W.H.O.*, 25 (5) :509-517.
- GUIRETTI, F. & GUIRETTI-MAGALDI, A., 1975. Respiration. In FRETTER, V. & PEAKE, J. eds. *Pulmonates: Volume 1 – Functional Anatomy and Physiology*. Academic Press, New York p. 33-52.
- HARRY, H.W. & ALDRICH, D.V., 1963. The distress syndrome in *Taphius glabratus* (Say) as a reaction to toxic concentrations of inorganic ions. *Malacologia*, 1 (2) :283-289.
- HOPF, H.S. & MULLER, R.L., 1962. Laboratory breeding and testing of *Australorbis glabratus* for molluscicidal screening. *Bull. W.H.O.*, 27 (5) :783-789.
- LISON, L., 1976. *Estadística Aplicada a la Biología Experimental*. Editorial Universitaria, Buenos Aires.
- MALEK, E. & CHENG, T.C., 1974. *Medical and Economical Malacology*. Academic Press, New York.
- NOLAN, M.O.; BOND, H.W. & MANN, E.R., 1953. Results of laboratory screening tests of chemical compounds for molluscicidal activity. I. Phenols and related compounds. *Am. H. Trop. Med. Hyg.*, 2 (4) :716-752.
- PARAENSE, W.L., 1957. Apertural lamellae in *Australorbis glabratus*. *Proc. Malacol. Soc. London*, 32 (4) :157-179.

- PAULINI, E., 1965. Estado atual dos conhecimentos sobre moluscicidas. *Rev. Bras. Mal. D. Trop.*, 17 (4) :355-362.
- PIERI, O.S.; JURBERG, P. & RAYMUNDO, J.S., 1980. Estudos sobre o comportamento dos planorbídeos: I. Uma técnica de observação e registro comportamental por cinematografia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 75 (1-2) :57-63.
- PIMENTEL, D. & WHITE, P.C., 1959. Biological environment and habits of *Australorbis glabratus*. *Ecology*, 40 (4) :541-550.
- RITCHIE, L.S., 1973. Chemical control of snails. In ANSARI, N. ed. *Epidemiology and Control of Schistosomiasis (Bilharziasis)*. S. Karger, Basel, p. 458-532.
- SULLIVAN, J.T. & CHENG, T.C., 1976. Comparative mortality studies on *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata) exposed to copper internally and externally. *J. Invert. Pathol.*, 28 (2) :255-257.
- THOMAS, J.D., 1973. Schistosomiasis and the control of molluscan hosts of human schistosomes with particular reference to self-regulatory mechanisms. *Advances in Parasitology*, 11 :307-394.
- UEMURA, K., 1973. Statistical methods. In ANSARI, N. ed. *Epidemiology and Control of Schistosomiasis (Bilharziasis)*. S. Karger, Basel, p. 705-739.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1965. Molluscicide screening and evaluation *Bull. W.H.O.*, 33 (4) :567-581.