



**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE VILA VELHA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE
ECOSSISTEMAS**

Dissertação de Mestrado

**AÇÃO MOLUSCICIDA DO LÁTEX DE *Euphorbia milii* Des Moul. var.
splendens (Ursch & Leandri) EM *Achatina fulica* (Bowdich, 1822) E
SEU EFEITO EM BIOMARCADORES AMBIENTAIS**

RENAN DE NARDI DE CRIGNIS

**VILA VELHA
MARÇO DE 2011**



**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE VILA VELHA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE
ECOSSISTEMAS**

Dissertação de Mestrado

**AÇÃO MOLUSCÍCIDA DO LÁTEX DE *Euphorbia milii* Des Moul. var.
splendens (Ursch & Leandri) EM *Achatina fulica* (Bowdich, 1822) E
SEU EFEITO EM BIOMARCADORES AMBIENTAIS**

Dissertação apresentada ao Centro Universitário de Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas, para a obtenção do título de Mestre em Ecologia.

RENAN DE NARDI DE CRIGNIS

Orientadora:

Prof. Dra. Zilma Maria Almeida Cruz

**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE VILA VELHA (UVV)
VILA VELHA
MARÇO DE 2011**

Catalogação na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

C928a Crignis, Renan De Nardi de

Ação moluscicida do látex de *Euphorbia milii* EM *Achatina fulica* e seu efeito em biomarcadores ambientais / Renan De Nardi de Crignis. – 2011.

72 f.: il.

Orientador: Prof. Dra. Zilma Maria Almeida Cruz.

Dissertação (mestrado em Ecologia de Ecossistemas) - Centro Universitário Vila Velha, 2011.

Inclui bibliografias.

1. Caramujo gigante africano. 2. Toxicologia ambiental. 3. Ecossistema. I. Cruz, Zilma Maria Almeida. II. Centro Universitário Vila Velha. III. Título.

CDD 577.18

Dissertação de Mestrado

AÇÃO MOLUSCICIDA DO LÁTEX DE *Euphorbia milii* Des Moul. var. *splendens* (Ursch & Leandri) EM *Achatina fulica* (Bowdich, 1822) E SEU EFEITO EM BIOMARCADORES AMBIENTAIS

RENAN DE NARDI DE CRIGNIS

Aprovada em 30 de março de 2011,

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Vilma Reis Terra

Prof. Dr. Alessandro Coutinho Ramos – UVV

Prof. Dr. Maurício Carvalho de Vasconcellos– FIOCRUZ

Prof. Dra Zilma Maria Almeida Cruz – UVV

Dedico este trabalho a todos aqueles que compartilham de minha amizade, amor e respeito, em especial a minha mãe Elza Catarina De Nardi e a minha filha Barbara Soares De Crignis

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida plena.

Ao Centro Universitário de Vila Velha, pela oportunidade.

Aos meus familiares, pelo apoio, carinho e incentivo.

À minha orientadora Dra. Zilma Maria Almeida Cruz, pesquisadora do programa de Mestrado do Centro Universitário de Vila Velha, pela dedicação, desvelo e apoio incondicionais.

À Dra. Vilma Reis Terra, professora de Química do Instituto Federal do Espírito Santo por ter me acompanhado durante boa parte do percurso e pelo incentivo.

Ao Dr. Professor Maurício Carvalho de Vasconcellos, do LAPSA (Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental) – IOC(Instituto Oswaldo Cruz) – FIOCRUZ pela disposição e pelas mudanças de rumo providenciais nos momentos certos.

Aos professores do Mestrado em Ecologia de Ecossistemas pelo aprendizado e dedicação.

Ao professor Msc. Romildo Rocha Azevedo Junior da UVV, pela disposição e orientações ao longo do percurso

Aos meus colegas de turma do Mestrado em Ecologia de Ecossistemas pela convivência agradável e apoio.

À colaboradora aluna do curso de Biologia da UVV Janaina Biral dos Santos, pelas coletas intermináveis, junto com seu companheiro Walber Alves de Souza, apoio, contribuição científica e dedicação nos trabalhos laboratoriais desde os primeiros momentos do caminho

À colaboradora Gisele Pani, pela contribuição científica, apoio em inúmeros momentos, dedicação, amizade e disposição em investigar sempre um pouco mais.

Ao colaborador Antônio Jesus Doriguetto Cogo, pela contribuição científica, generosidade e dedicação ao longo das análises laboratoriais.

Ao colaborador Msc. Frederico Jacob Eutrópio, pelas análises estatísticas e apoio na revisão.

Aos funcionários do Centro Universitário de Vila Velha pelos préstimos e simpatia.

À minha afilhada Hellen De Nardi Medeiros, pelo apoio na formatação desta dissertação.

À minha namorada Anclea Cristina Lima Eler, pelo amor, carinho e compreensão.

Aos todos meus alunos, pela compreensão e torcida durante o caminho.

À todos meus amigos, por tudo.

O especialista é um homem que sabe cada vez mais sobre cada vez menos, e por fim acaba sabendo tudo sobre nada.

George Bernard Shaw

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Euphorbia milii</i> var. <i>splendens</i> , Ursch & Leandri (A) Cultivo em vaso na casa de vegetação. (B) Corte no ápice caulinar para drenagem de látex.	24
Figura 2	SEST-SENAT Alto Lage – Cariacica, ES - Local de coleta do látex de <i>Euphorbia milii</i> var. <i>splendens</i> , Ursch & Leandri – Lat.: 20°19'51.06"S e Long.: 40°22'30.06"O - Fonte: IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística e IEMA – Instituto Estadual do Meio Ambiente do Estado do Espírito Santo.	25
Figura 3	Local de Coleta dos caramujos <i>Achatina fulica</i> , Bowdich, 1822. Bairro Nova Itaparica, Vila Velha, E.S. – Fonte: IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística e IEMA - Instituto Estadual do Meio Ambiente do Estado do Espírito Santo.	26
Figura 4	Metodologia de Coleta e seleção dos espécimes (A) Local de coleta (terreno baldio com lixo e entulho) (B) Seleção dos caramujos para os bioensaios. (C) Pesagem dos caramujos.	26
Figura 5	Metodologia de confecção de terrários (A) Montagem do terrário dos caramujos para ambientalização. (B) Caramujos em ambientalização.	27
Figura 6	Bioteste - (A) Exposição dos caramujos <i>Achatina fulica</i> , Bowdich, 1822 às concentrações do látex de <i>Euphorbia milii</i> var. <i>splendens</i> , Ursch & Leandri (B) Terrário de testes com supressão de alimentação.	28
Figura 7	Metodologia de cultivo e colheita de <i>Tradescantia pallida</i> – (A) Mudanças para experimentação na casa de vegetação. (B) Inflorescência de <i>Tradescantia pallida</i> .	29
Figura 8	Bioensaio <i>Tradescantia</i> - (A) <i>Tradescantia pallida</i> em período de exposição (B) Talo central com tamanho ideal para análise.	30
Figura 9	Bioensaio – (A) Exposição de <i>Tradescantia pallida</i> ao látex de <i>Euphorbia milii</i> var. <i>splendens</i> , Ursch & Leandri. (B) Plantas em período de bioensaio.	31
Figura 10	Análise de genotoxicidade (A) Montagem da lâmina, com botão floral. (B) Tétrade de <i>Tradescantia pallida</i> com micronúcleo.	32
Figura 11	Bioensaio microalgas – (A) Preparação do meio de cultura para <i>Pseudokirchneriella subcaptata</i> . (B) Contagem do número de indivíduos em câmara de contagem hematocítômetro de Neubauer. (C) <i>Pseudokirchneriella subcaptata</i> .	33
Figura 12	Metodologia de bioensaio (A) Dissecção (B) Fígado e intestinos separados. (C) Pesagem do intestino.	33
Figura 13	Análise enzimática – (A) Homogeneização do órgão. (B) Centrifugação (C) Espectrofotômetro Ultrospec 2100 Pro (Amersham, Biosciences).	34
Figura 14	Análise enzimática de <i>Tradescantia pallida</i> (A) - Separação de amostras. (B) Fracionamento das amostras (C) Extração do conteúdo celular por esmagamento.	35
Figura 15	Determinação de atividade enzimática – (A) Substrato + reagente. (B) Adição de meio de reação. (C) Espectrofotometria.	37

- Figura 16** Mortalidade total e média de mortalidade de *Achatina fulica* expostas ao látex de *Euphorbia milii*. Os indivíduos foram expostos a concentrações de 3,75; 5,0; 6,25 e 7,50 g/L de látex em água tratada. Os valores representam o total de 30 indivíduos (n=30), para cada concentração. 38
- Figura 17** Atividade da Glutathione S-Transferase em fígado de *Achatina fulica*, expostas às concentrações de látex de *Euphorbia milii*. O controle foi desenvolvido na ausência do látex. A atividade enzimática foi expressa em U/mg de proteína. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade capaz de transformar 1µmol de substrato por minuto por mg de proteína. Letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os valores representam a média de seis indivíduos (n=6), com 03 determinações enzimáticas por indivíduo. 40
- Figura 18** Atividade da Catalase em fígado de *Achatina fulica*, expostas às concentrações de látex de *Euphorbia milii*. O controle foi desenvolvido na ausência do látex. A atividade enzimática foi expressa em U/mg de proteína. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade capaz de transformar 1µmol de substrato por minuto por mg de proteína. Letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os valores representam a média de seis indivíduos (n=6), com 03 determinações enzimáticas por indivíduo. 41
- Figura 19** Atividade da Fosfatase Alcalina em intestino de *Achatina fulica*, expostas às concentrações de látex de *Euphorbia milii*. O controle foi desenvolvido na ausência do látex. A atividade enzimática foi expressa em U/mg de proteína. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade capaz de transformar 1µmol de substrato por minuto por mg de proteína. Letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os valores representam a média de seis indivíduos (n=6), com 03 determinações enzimáticas por indivíduo. 42
- Figura 20** Atividade enzimática da Fosfatase Ácida em *Tradescantia pallida* exposta, por imersão do caule, à concentração 4,67 g/L, durante 8 e 30 horas, ao látex de *Euphorbia milii*. A atividade enzimática foi expressa em U/mg de proteína. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade capaz de transformar 1µmol de substrato por minuto por mg de proteína. Letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os valores representam a média de seis indivíduos (n=6), com 03 determinações enzimáticas por indivíduo. 43
- Figura 21** Atividade enzimática da Catalase em *Tradescantia pallida* exposta por imersão do caule, à concentração 4,67 g/L, durante 8 e 30 horas, ao látex de *Euphorbia milii*. A atividade enzimática foi expressa em U/mg de proteína. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade capaz de transformar 1µmol de substrato por minuto por mg de proteína. Letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os valores representam a média de seis indivíduos (n=6), com 03 determinações enzimáticas por indivíduo. 44
- Figura 22** Atividade enzimática da Fosfatase Ácida em *Tradescantia pallida* exposta por aspersão foliar, à concentração 4,67 g/L, durante 96 horas, ao látex de *Euphorbia milii*. A atividade enzimática foi expressa em U/mg de proteína. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade capaz de transformar 1µmol de substrato por minuto por mg de proteína. Letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os valores representam a média de seis indivíduos (n=6), com 03 determinações enzimáticas por indivíduo. 45

- Figura 23** Atividade enzimática da Catalase em *Tradescantia pallida* exposta por aspersão foliar, à concentração 4,67 g/L, durante 96 horas, ao látex de *Euphorbia milii*. A atividade enzimática foi expressa em U/mg de proteína. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade capaz de transformar 1µmol de substrato por minuto por mg de proteína. 46
- Figura 24** Células micronucleadas de *Tradescantia pallida*, após exposição à concentração 4,67g/L de látex de *Euphorbia milii*, durante 8 e 30 horas. Letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os valores representam a média de 20 indivíduos ($n=20$). 47
- Figura 25** Toxicidade crônica em *Pseudokirchneriella subcaptata*, expostas às concentrações de: 89 mg/L; 134 mg/L; 178 mg/L; 223 mg/L e 357 mg/L de látex de *Euphorbia milii*, segundo Environmental Canada EPS1/RM/25, (1992). Letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) 48

LISTA DE ABREVIATURAS

ACP – Fosfatase ácida

ALP – Fosfatase alcalina

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CAT - Catalase

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

GLU – Glutamato

GSH – Glutathiona reduzida

GST – Glutathiona S-Transferase

MCN – Micronúcleos

MMA – Ministério do Meio Ambiente

MMS – Ministério da Saúde

OMS – Organização Mundial de Saúde

pNPP – para-nitrofenilfosfato

TRAD – *Tradescantia*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO.....	xv
ABSTRACT	xvi
INTRODUÇÃO	19
1. JUSTIFICATIVA.....	21
2. OBJETIVOS.....	26
2.1. Gerais	26
2.2. Específicos	26
3.0. METODOLOGIA.....	27
3.1. Coleta do látex de <i>Euphorbia milii</i> , Bowdich, 1922	27
3.2. Bioensaios	27
3.2.1. Determinação da DL50 para <i>Achatina fulica</i>	27
3.2.2. Determinação da formação de micronúcleos em <i>Tradescantia pallida</i>	31
3.3. Exposição de microalgas da espécie <i>Pseudokirchneriella subcaptata</i> à DL ₅₀ do látex de <i>Euphorbia milii</i>	34
3.4. Extração das enzimas.....	35
3.4.1. Caramujos africanos (<i>Achatina fulica</i>)	35
3.4.2. <i>Tradescantia pallida</i>	37
3.5. Determinação da catalase (E.C.1.11.1.6)	38
3.6. Determinação da Glutathione S-Transferase (GST) – (EC 2.5.1.18).....	38
3.7. Fosfatase Alcalina - ALP (EC 3.1.3.1)	39
3.8. Fosfatase Ácida – ACP (E.C. 3.1.3.2).....	39
3.9. Determinação de proteínas totais	40

	14
3.10. Análise Estatística.....	40
4. RESULTADOS	41
4.1. Determinação da DL ₅₀	41
4.2. Atividade enzimática em <i>Achatina fulica</i>	40
4.2.1. Glutathione S-Transferase	40
4.2.2. Catalase	43
4.2.3. Fosfatase Alcalina	44
4.3. Atividade enzimática em <i>Tradescantia pallida</i> , imersa em solução DL ₅₀ ..	45
4.3.1. Fosfatase ácida	45
4.3.2. Catalase	46
4.4. Atividade enzimática em <i>Tradescantia pallida</i> (aspersão)	47
4.4.1. Fosfatase ácida	47
4.4.2. Catalase	48
4.5. Micronúcleos em <i>Tradescantia pallida</i>	49
4.6. Microalgas (<i>Pseudokirchneriella subcaptata</i>)	50
5. DISCUSSÃO	50
5.1. Biometria dos indivíduos.....	50
5.2 Determinação da DL ₅₀	53
5.3. Biomarcadores enzimáticos.....	54
5.3.1. <i>Achatina fulica</i>	54
5.3.2. Atividade enzimática em <i>Tradescantia pallida</i>	58
5.4 Micronúcleos em <i>Tradescantia pallida</i>	60
5.5. <i>Pseudokirchneriella subcaptata</i>	61
CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
REFERÊNCIAS.....	63

RESUMO

O uso de moluscicida é importante estratégia no controle de espécies invasoras como o caramujo gigante africano, *Achatina fulica*. Entre os moluscicidas testados, os extratos de plantas mostraram-se bem promissores, com destaque para o látex de *Euphorbia milii*, recomendado pela Organização Mundial da Saúde. O presente estudo tem como objetivos determinar a eficácia do látex de *Euphorbia milii* des Moul. var. *splendens* (Ursch & Leandri) como moluscicida para *Achatina fulica*, Bowdich, 1822; determinar a DL₅₀ do látex em *Achatina fulica*; avaliar o efeito do látex sobre o comportamento enzimático da Catalase, Fosfatase Ácida, Fosfatase Alcalina e Glutathione S-Transferase em *Achatina fulica* e *Tradescantia pallida*; avaliar os efeitos da DL₅₀ aplicados em *Tradescantia pallida* através da análise de micronúcleos como forma de verificar os efeitos na biota e sobre *Pseudokirchneriella subcaptata* como forma de qualiquantificar os efeitos de toxicidade no ambiente aquático. Concentrações inferiores a 3,75 g/L não resultaram em qualquer mortalidade enquanto que concentrações superiores a 7,50 g/L foram suficientes para causar 100% de mortalidade da população amostrada de *Achatina fulica*. A DL₅₀ encontrada foi de 4,67 g/L e a repetição do bioensaio com concentração 4,67g/L, demonstrou a confiabilidade dos dados segundo o teste do qui-quadrado $X^2 = 0,60$, gl=2 e $p = 0,74$ ($p \geq 0,05$). O efeito do látex sobre a atividade da GST hepática foi positiva para todos os tratamentos, já que a atividade específica foi elevada significativamente em todas as concentrações ($F=55,501$ e $p=0,0001$). Os resultados obtidos no bioensaio para a atividade da Catalase demonstraram diferença significativa entre o controle e os tratamentos com látex ($F=32,907$ e $p=0,0001$). A fosfatase alcalina extraída de intestino dos indivíduos expostos às concentrações do látex apresentou inibições significativas quando relacionadas ao controle ($H=24,659$ e $p=0,0001$). Os resultados da atividade da fosfatase ácida em *Tradescantia pallida*, demonstram diferença significativa ($F=23,726$ e $p=0,0001$) na redução da atividade enzimática. A atividade da catalase, nos espécimes expostos por metodologia de imersão do caule de *T. pallida*, à concentração da DL₅₀, com exposição de 8 horas, aumentou de forma significativa, quando comparando ao grupo controle. O tratamento dos espécimes de *T. pallida* com látex por aspersão foliar, não resultou em alterações significativas ($t=-0,622$ e $p=0,541$) na atividade da fosfatase ácida,

mesmo após 96 horas de tratamento. O tratamento dos espécimes de *T. pallida* com látex por aspersão foliar, não resultou em alterações significativas ($t=-0,979$ e $p=0,341$) na atividade da catalase, mesmo após 96 horas de tratamento. A exposição da *T. pallida*, ao látex em concentração DL_{50} , mostrou um aumento significativo ($p\leq 0,05$) de micronúcleos no tratamento de 8 horas. O efeito de concentrações de látex sobre o número de indivíduos de *Pseudokirchneriella subcaptata* apresentou uma tendência significativa ($p\leq 0,05$) a diminuir em relação ao aumento da concentração do látex. O látex de *Euphorbia milii* é eficaz no controle do caramujo gigante africano (*Achatina fulica*). Sua ação atinge o complexo metabólico celular causando efeito deletérico nos organismos expostos. Seu uso, no entanto, não pode ser realizado de forma indiscriminada, uma vez que na concentração letal para *Achatina fulica*, o látex provoca efeitos de toxicidade em organismos terrestres e aquáticos. Estudos *in situ* devem ser realizados de forma complementar com o presente estudo para suprirem a necessidade de informações, garantindo a segurança ambiental.

Palavras chaves: caramujo gigante africano, DL_{50} , análise enzimática, *Tradescantia pallida*, ecotoxicologia.

ABSTRACT

The use of molluscicide is an important strategy to control invasive species like the giant African snail, *Achatina fulica*. Among the tested molluscicides, plant extracts were shown to be promising as well, especially the latex of *Euphorbia milii*, recommended by the World Health Organization. This study aims to determine the effectiveness of the latex of *Euphorbia milii* des Moul. var. *splendens* (Ursch & Leandro) as a molluscicide for *Achatina fulica*, Bowdich, 1822; determine the LD₅₀ of latex in *Achatina fulica*; evaluate the effect of latex on behavior of the enzyme catalase, acid phosphatase, alkaline phosphatase and glutathione S-transferase in *Achatina fulica* and *Tradescantia pallida*; evaluate the effects of LD₅₀ applied to *Tradescantia pallida* by analysis of micronuclei as a way to verify the effects on biota and *Pseudokirchneriella subcaptata* as a way to qualify and quantify the effects of toxicity in the aquatic environment. Concentrations below 3.75 g / L did not result in any deaths while concentrations above 7.50 g/L were sufficient to cause 100% mortality of the sampled population of *Achatina fulica*. The LD₅₀ was found to be 4.67 g/L and repeat bioassay concentration 4.67 g/L, demonstrated the reliability of the data using the chi-square $X^2 = 0,60$, $df=2$ and $p= 0,74$ ($p \geq 0,05$). The effect of latex on the hepatic GST activity was positive for all treatments, since the specific activity was elevated significantly at all concentrations ($F=55,501$ e $p=0,0001$). The results obtained in the bioassay for the activity of catalase showed a significant difference between control and treatments with latex ($F=32,907$ and $p=0,0001$). Alkaline phosphatase extracted from the intestines of individuals exposed to concentrations of latex showed significant inhibitions as they relate to control ($H=24,659$ and $p=0,0001$). The results of acid phosphatase activity in *Tradescantia pallida*, showed significant difference ($F = 23.726$ and $p = 0.0001$) reduction in enzyme activity. Catalase activity in fish exposed by immersion method of stems of *T. pallida*, the concentration of LD₅₀, with exposure of 8 hours, increased significantly when compared to the control group. Treatment of specimens of *T. pallida* Latex foliar spray, did not result in significant changes ($t = - 0.622$, $p = 0.541$) in acid phosphatase activity, even after 96 hours of treatment. Treatment of specimens of *T. pallida* latex foliar spray, did not result in significant changes ($t = - 0.979$, $p = 0.341$) in catalase activity, even after 96 hours of treatment. Exposure of *T. pallida*, in Latex concentration LD₅₀, showed a significant increase ($p \leq 0.05$) micronuclei in the

treatment of 8 hours. The effect of concentrations of latex on the number of individuals of *Pseudokirchneriella subcaptata* presented a significant trend ($p \leq 0.05$) decrease compared to the increased concentration of latex. The latex of *Euphorbia milli* is effective to control the giant African snail (*Achatina fulica*). Their action affects the complex cellular metabolic causing deleterious effects in exposed organisms. Its use, however, can not be done indiscriminately, since the lethal concentration for *Achatina fulica*, latex causes toxic effects on aquatic and terrestrial organisms. *In situ* studies should be conducted in a complementary fashion with the present study to meet the need of information, ensuring environmental safety.

Keywords: Giant African snail, DL_{50} , enzymatic analysis, *Tradescantia pallida*, ecotoxicology.

INTRODUÇÃO

Os moluscos pulmonados, tanto aquáticos quanto terrestres, constituem um importante objeto de estudo no campo da parasitologia, por atuarem como hospedeiros intermediários de vermes que parasitam humanos e animais domésticos.

O Caramujo gigante africano (*Achatina fulica*) foi introduzido no Brasil pelo estado do Paraná em 1988, conforme Teles (2002), através de feira agropecuária e suas matrizes distribuídas para criadouros para ser usado na alimentação exótica como sucedâneo do escargot (Vasconcellos e Pile, 2001) que por meio de solturas propositais ou fugas se espalhou pelo território nacional colocando em estado de alerta pesquisadores da área de saúde e de meio ambiente. Sua dispersão é relatada como preocupante pelo rápido crescimento demográfico, graças a sua grande capacidade reprodutiva, recursos favoráveis e ausência de predadores no país, podendo transmitir doenças, predação de plantas ornamentais, macrófitas e culturas agrícolas (Venturini *et al.*, 2008).

Nos vários países em que se estabeleceu, *A. fulica* promoveu a devastação de plantações de banana, mamão, amendoim, café, cítricos e outras, bem como a destruição de grãos armazenados, de jardins e de hortas domésticas. Nos EUA e Austrália foi considerada praga agrícola, exigindo grandes esforços para o controle e erradicação nas áreas invadidas (Teles 1997).

Analisando estes fatos preocupantes, órgãos governamentais e ONGs tem elaborado um protocolo para diagnóstico e monitoramento das populações de *A. fulica*, com objetivo de nortear planos de combate e manejo de acordo com Fischer *et al.* (2006) e visa subsidiar e direcionar os planos de manejo.

Como certos moluscos são essenciais no ciclo de vida de diversos helmintos e alguns são pragas agrícolas, a necessidade de controle destes moluscos tem levado a pesquisa por agentes de moluscidas que atuem tanto nas espécies aquáticas quanto terrestres, pois ambas apresentam semelhanças anatomofisiológicas. Alternativas para o controle de espécies exóticas com potencial patogênico ou causadores de prejuízos agrícolas são fundamentais sob o ponto de vista epidemiológico, econômico e ecológico.

Para combate aos moluscos, num passado recente, eram utilizados, em larga escala, moluscidas inorgânicos, bastante eficientes, porém de alto custo,

efeito residual longo e elevado impacto ambiental. Assim sendo, atualmente têm-se procurado compostos químicos menos prejudiciais ao meio, como os organometálicos, ou mesmo o controle biológico dessas pragas a partir do efeito biocida de alguns extratos vegetais.

O uso de métodos de controle deve ser seguro, uma vez que podem expor outros seres vivos a riscos ambientais e a saúde humana, devem ser certificados por órgãos ambientais atendendo a quesitos de biosegurança, por isso, segundo Luchini (2004), devem ser alvo de estudos sob diversas metodologias, de modo a esgotar as possibilidades de imprevistos e riscos. Sob a ótica da biosegurança, a certificação do efeito deletérico de uma substância não qualifica o produto como utilizável, se este não atende normas de especificidade, resiliência e baixa toxidez a biota.

O presente trabalho analisa o efeito do látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopilii* N.E.B. syn. *Euphorbia milii* Des Moul. var. *splendens* (Ursch & Leandri), em caramujos gigantes africanos (*Achatina fulica*, Bowdich, 1822), os mecanismos de comprometimento metabólico através de testes de toxicidade enzimáticos nos organismos alvo, bem como o efeito potencial poluidor ambiental em organismos não alvo através de testes de análise enzimática e de genotoxicidade em *Tradescantia pallida* (Rose) D.R. var. *purpurea* Boom e no meio aquático dulcícola com testes de crescimento de algas da espécie *Pseudokirchneriella subcapitata*.

1. JUSTIFICATIVA

Uma das conseqüências críticas no movimento de integração da economia mundial, ocorrido durante o século XX, é a grande dispersão de organismos nocivos ou de espécies invasoras exóticas, entre os diversos países, através da intensificação do comércio agrícola, de animais, da modificação dos ecossistemas, bem como o fluxo de pessoas em função de atividades laborais ou turismo. (Moyle e Ellsworth, 2004).

O termo espécie invasora refere-se, portanto, a introdução de organismos vivos em regiões ainda não colonizadas, gerando grande impacto e ocasionando prejuízos incalculáveis nos âmbitos ambiental, econômico, sanitário e sociocultural. (Davis e Thompson, 2000).

Sob o ponto de vista da Biologia da Conservação, a introdução de espécies invasoras é a segunda maior causa de extinção de espécies no planeta (Pimentel *et al.*, 2001), Segundo o Ministério do Meio Ambiente (Brasil, 2010), espécies invasoras dominam os nichos ocupados pelas espécies nativas, por suas vantagens competitivas, favorecidas pela ausência de fatores limitantes e pela degradação dos ambientes naturais.

Embora a sociedade acredite que as introduções da maioria das espécies não nativas sejam benéficas, estas ações são coletivamente prejudiciais para toda a sociedade (Espinola e Ferreira, 2007).

Em âmbito mundial, os danos decorrentes das espécies invasoras superam 1,4 trilhões de dólares/ano, o que representa cerca de 5% da economia mundial (Brasil, 2010).

Existem no Brasil, muitos obstáculos a serem superados para que se possa construir uma política nacional efetiva de controle de espécies exóticas, já que é uma temática que afeta, simultaneamente, diferentes setores da sociedade, principalmente os da agricultura, saúde pública e meio ambiente (Oliveira e Machado, 2009).

Dentre os organismos invasores introduzidos recentemente no Brasil, destaca-se o caramujo gigante africano (*Achatina fulica*, Bowdich, 1822), que pelo potencial de proliferação, adaptação e ausência de predadores naturais, espalhou-se por todo território nacional, e, até o momento, registrado em 24 estados brasileiros (Brasil, 2005).

Ao caramujo africano foram atribuídos prejuízos como a destruição de lavouras, infestação em meio urbano, destruição de ecossistemas e agravos à saúde humana. Carvalho *et al.* (2003) descrevem evidências consideráveis de "riscos" à saúde pública relacionada ao potencial de transmissão da angiostrongilíase abdominal causada pelo *Angiostrongylus costaricensis* (Morera e Céspedes, 1971), bem como a Meningoencefalite eosinofílica causada pelo *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935). Por outro lado, Vasconcellos e Pile (2001) destacam a presença desses moluscos como hospedeiros importantes na instalação destas doenças na localidade em que são encontrados.

O uso de moluscidas no combate a caramujos potencialmente causadores de prejuízos ambientais (Teles e Fontes, 2002) e econômicos (Araújo, 1989) bem como os causadores de patologias (Chang, 2002), vem sendo realizado há quase um século, a partir de substâncias diversas de uso não específico, evoluindo naturalmente para compostos de maior especificidade.

Devido ao elevado custo econômico, tecnológico e o perigo no uso de quimiotóxicos, os moluscidas desenvolvidos a partir de substâncias de origem vegetal podem tornar-se viáveis sob o ponto de vista econômico e ecológico de controlar esses animais. (Vasconcellos *et al.*, 2003).

O uso do látex de *Euphorbia milii* var. *splendens*, (Ursch & Leandri), tem demonstrado efetivo valor quando usado no controle de caramujos aquáticos, hospedeiros intermediários de parasitas, como descrevem Vasconcellos e Amorim (2003) em testes com o caramujo *Lymnaea columella* (Say, 1817), hospedeiro intermediário da Fascíola hepática (*Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758) e no combate de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), o hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907) conforme Mello-Silva *et al.* (2006) e Oliveira-Filho e Paumgartten (2000).

No entanto, o uso de biocidas tem sido associado à contaminação indiscriminada de organismos, com conseqüências desastrosas para a biota. Os biotóxicos, mesmo que de origem natural, têm amplo espectro de ação sobre vários grupos de organismos, merecendo estudos complexos a fim de assegurar eficácia e segurança ambiental. Os pesticidas representam o único grupo de compostos, intencionalmente expostos ao meio ambiente, que possuem grande relevância em virtude de sua persistência, toxicidade e bioconcentração em plantas e animais, além do impacto na cadeia alimentar (Dams, 2006).

A fim de prever, evitar ou se minimizar os efeitos de toxidade ambiental, biomarcadores podem fazer parte de programas de monitoramento ambiental, como parte de sistemas de avaliação de poluentes ou produtos potencialmente tóxicos no ambiente conforme descrito por Livingstone (2003).

Arias *et al.* (2007) conceitua os bioindicadores ou biomarcadores como qualquer resposta a um contaminante ambiental ao nível individual, medidos no organismo ou matriz biológica, indicando um desvio do status normal que não pode ser detectado no organismo intacto.

Para obter uma visão completa e confiável do ecossistema, é necessário comparar as informações fornecidas por bioindicadores específicos (Gadzała-Kopciuch *et al.*, 2004).

Dentre os meios de observação dos níveis de segurança ambiental, a análise da atividade metabólica de biomarcadores enzimáticos assegura a verificação da eficácia de ação em organismos alvo, bem como diagnostica o efeito contaminante em organismos não alvo. Segundo Cogo *et al.* (2009) A análise da atividade dessas enzimas, isoladas dos bioindicadores, permite maior controle do ambiente e funciona como sinal de alerta de contaminação, além de permitir ratificar a atividade antrópica.

Da mesma forma, organismos bioindicadores podem expor os efeitos de toxidade para substâncias usadas no controle biológico de pragas a partir de testes para observância de efeitos genotóxicos advindos da exposição ao contaminante pelo organismo.

Dentre os principais marcadores enzimáticos relacionados à contaminação ambiental, destacam-se a Catalase (CAT), a Glutathione S-Transferase, a Fosfatase Alcalina (ALP) e a Fosfatase Ácida (ACP).

A catalase (CAT, EC 1.11.1.6), participa do complexo primário de defesa contra o estresse oxidativo, decompondo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxidando compostos hidrogenados, conforme descrito por Aebi (1984). Segundo Avilez *et al.* (2008), os níveis de ativação da catalase podem ser usados no monitoramento do estresse oxidativo, e por isso, Bairy *et al.* (1996) propõem seu uso como biomarcadores ambientais.

A Glutathione S-transferase e (GST, E.C. 2.5.1.18), é importante isoenzima pertencente à fase II do metabolismo celular. Conforme descrito por Huggett *et al.* (1992), A função da GST é catalisar a ligação entre radicais livres e a GSH, reduzindo possíveis danos ao DNA e moléculas metabólicas importantes. Por sua

resposta a estímulos tóxicos, Van der Oost et al. (2003) a consideram relevante para avaliação de toxicidade de compostos exógenos.

A Fosfatase Alcalina (ALP, EC 3.1.3.1) é uma enzima do tipo hidrolase, participante de várias vias metabólicas celulares. Estudos sobre a atividade das enzimas fosfatase alcalina estão sendo realizados em animais expostos a contaminantes, para verificação dos efeitos tóxicos desses poluentes sobre os sistemas enzimáticos desses animais como demonstram os estudos realizados por Atli e Canli (2007) e Martins (2009).

As fosfatases ácidas ou ortofosfato monoéster fosfohidrolases (E.C.3.1.3.2.) é uma hidrolase lisossomial biomarcadora sendo que, em situações de estresse celular, pode extravasar para fluidos intra e extracelulares ocasionando autólise celular e por isso pode ser tratada como indicadora de tal estresse.

Os processos de ativação/inibição destas enzimas podem ser modificados quando os organismos são expostos a agentes contaminantes por bioacumulação conforme descrito por Jonsson e Aoyama (2007)

Além dos processos já descritos, As plantas superiores são reconhecidas como excelentes indicadores dos efeitos citogenéticos e mutagênicos produzidos pela exposição a substâncias químicas ambientais e são aplicáveis para a detecção de poluentes tanto indoor e outdoor (Grant, 1999).

Segundo Ferreira *et al.* (2003), o teste de Micronúcleo com *Tradescantia pallida*, espécie pertencente à família Commelinaceae, é um ensaio de genotoxicidade para detecção de efeitos deletérios provocados por agentes poluidores.

De forma complementar, Rodrigues (1999) constatou que o teste de micronúcleos aplicado em *Tradescantia pallida* (Trad-MCN) tem se mostrado efetivo para determinação de contaminantes do ar, água e solo.

Avaliando os possíveis resultados de contaminação aquática por extravasamentos do látex de *Euphorbia milii* Des Moul. var. *splendens* (Ursch & Leandri) para o este ambiente, o teste de crescimento de *Pseudokirchneriella subcapitata* tem metodologia simplificada e pode elucidar o potencial de danos deste moluscicida para a biota aquática.

A *Pseudokirchneriella subcapitata* é um organismo teste de grande importância para ensaios ecotoxicológicos por se tratar de um produtor primário, compondo a base da cadeia alimentar. Considerando sua importância ecológica, as algas são utilizadas para avaliação da toxicidade aquática de compostos químicos

desde 1970. O objetivo teste com esta espécie é determinar a toxicidade de uma substância contra o crescimento de algas, expondo as algas na fase de crescimento exponencial para a substância de teste em diferentes dosagens e medição da taxa de inibição de crescimento contra o controle. Moreira-Santos *et al.* (2004) atestam a eficácia deste mecanismo de biomonitoramento recomendando-o para ambientes de poluição moderada.

Todos os testes são necessários para garantir conclusões sobre a eficácia do moluscicida e permitir a avaliação dos seus efeitos não desejados, guardando os preceitos da segurança ambiental como norteadores para uso de biocidas.

2. OBJETIVOS

2.1. Gerais

Determinar a eficácia do látex de *Euphorbia milii* Des Moul. var. *splendens* (Ursch & Leandri) como moluscicida para *Achatina fulica*, Bowdich, 1822 e seus efeitos em biomarcadores ambientais

2.2. Específicos

Determinar a DL₅₀ do látex de *Euphorbia milii* Des Moul. var. *splendens* (Ursch & Leandri) para *Achatina fulica*, Bowdich, 1822.

Avaliar o efeito das concentrações do látex de *Euphorbia milii* Des Moul. var. *splendens* (Ursch & Leandri) aplicados em *Achatina fulica*, Bowdich, 1822 e *Tradescantia pallida* sobre o comportamento enzimático da Catalase, Fosfatase Ácida, Fosfatase Alcalina e Glutathione S-Transferase.

Avaliar os efeitos da DL₅₀ do látex de *Euphorbia milii* Des Moul. var. *splendens* (Ursch & Leandri) aplicado em *Tradescantia pallida* sobre o comportamento genotóxico pela análise de micronúcleos (TRAD-MCN) como forma de qualiquantificar os efeitos de toxicidade na biota.

Avaliar os efeitos deletéricos da DL₅₀ do látex de *Euphorbia milii* Des Moul. var. *splendens* (Ursch & Leandri) sobre *Pseudokirchneriella subcaptata* como forma de qualiquantificar os efeitos de toxicidade no ambiente aquático.

3.0. METODOLOGIA

3.1. Coleta do látex de *Euphorbia milii*, Bowdich, 1822

O látex de *Euphorbia milii*, Bowdich, 1822 (Figura 1) foi coletado nos espécimes dos canteiros do SEST-SENAT (Serviço Social do Transporte – Serviço Nacional de Aprendizagem no Transporte) em Alto Lage, Município de Cariacica, ES, localizado na Lat.: 20°19'51.06"S e Long.: 40°22'30.06"O (Figura 2), no dia 20 de agosto de 2010. O caule foi seccionado transversalmente em 45° de inclinação em relação ao eixo principal, no ápice da planta, com auxílio de uma lâmina de bisturi. O látex foi drenado para recipiente de vidro opaco e estéril, revestido de papel alumínio, com auxílio de um funil de vidro. O material foi acondicionado em recipiente com gelo até transferência para geladeira, onde foi mantido em temperatura de 9° C até sua utilização. A densidade do látex coletado foi de $d=1,2912 \text{ g/cm}^3$.

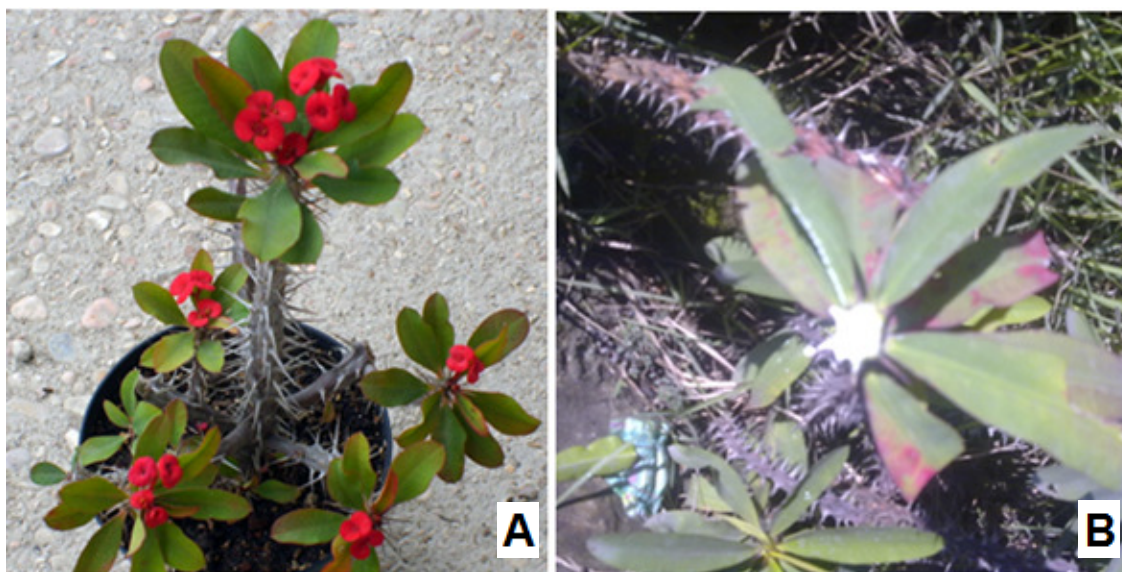


Figura 1 – *Euphorbia milii* var. *splendens*, Ursch & Leandri (A) Cultivo em vaso na casa de vegetação. (B) Corte no ápice caulinar para drenagem de látex.

3.2. Bioensaios

3.2.1. Determinação da DL_{50} para *Achatina fulica*

Para determinação da dose letal para 50% dos indivíduos submetidos ao tratamento com o látex de *Euphorbia milii*, foram coletados 180 caramujos na localidade de Nova Itaparica, Vila Velha, E.S. (Lat.: 20°22'30.46"S e Long.: 40°19'17.44"O) (Figura 3). Os indivíduos foram selecionados na coleta por comprimento ($5,6 \pm 0,3$ cm) e massa corporal ($30,0 \pm 4$ g) (Figuras 4B e 4C).



Figura 2 – SEST-SENAT Alto Lage – Cariacica, ES - Local de coleta do látex de *Euphorbia milii* var. *splendens*, Ursch & Leandri – Lat.: 20°19'51.06"S e Long.: 40°22'30.06"O - Fonte: IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística e IEMA – Instituto Estadual do Meio Ambiente do Estado do Espírito Santo).

Após a coleta, os caramujos foram imediatamente transportados para o laboratório de Bioindicadores de Contaminação Ambiental e Genotoxicologia do Centro Universitário Vila Velha, onde foram acondicionados em caixas plásticas, com dimensões de 40 cm de comprimento x 30 cm de largura e 25 cm de profundidade. As caixas foram forradas com 2 litros de substrato constituído com 50% de vermiculita, 30% de argila, 10% de calcário dolomítico e 10% de calcário de conchas, segundo método descrito por Bessa e Araújo (1995). Durante cinco dias, período de aclimação, os indivíduos foram mantidos em ambiente com temperatura de $22^{\circ}(\pm 4,4^{\circ})$, umidade do ar de 52% ($\pm 8,3$) e fotoperíodo de 12h claro/escuro.

Durante este período, os caramujos foram alimentados com ração comercial peletizada para coelhos, acrescida de folhas de alface e rodela de cenoura e banana *ad libitum*.



Figura 3 - Local de Coleta dos caramujos *Achatina fulica*, Bowdich, 1822. Bairro Nova Itaparica, Vila Velha, E.S. – Fonte: IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística e IEMA - Instituto Estadual do Meio Ambiente do Estado do Espírito Santo).

Todos os víveres foram substituídos a cada 24 horas (Figura 5a). Após o período de aclimação, a alimentação foi interrompida por 24 horas, e os indivíduos separados em grupos controle e grupos que receberam o tratamento com o látex em diferentes concentrações.

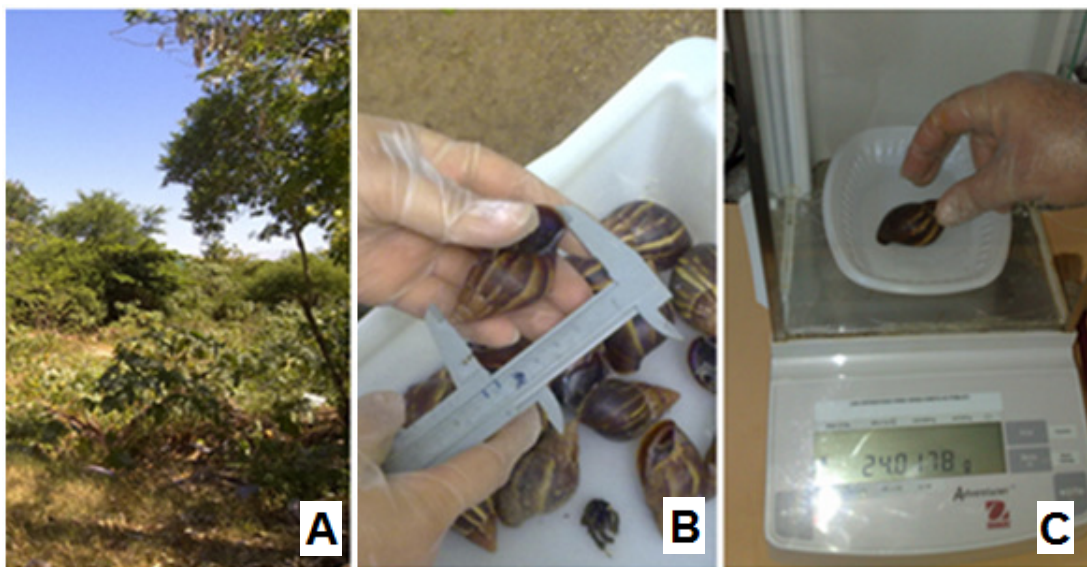


Figura 4 – Metodologia de Coleta e seleção dos espécimes (A) Local de coleta (terreno baldio com lixo e entulho) (B) Seleção dos caramujos para os bioensaios. (C) Pesagem dos caramujos.

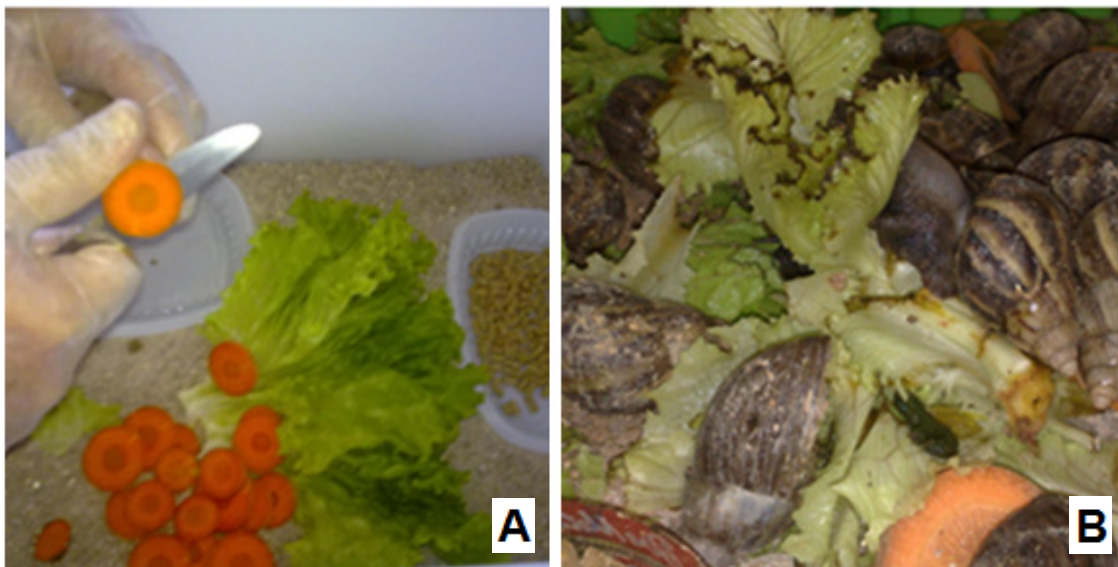


Figura 5 – Metodologia de confecção de terrários (A) Montagem do terrário dos caramujos para ambientalização. (B) Caramujos em ambientalização.

Para o desenvolvimento do bioensaio, os grupos (30 indivíduos) foram expostos à solução de látex (densidade do látex $d= 1,2912\text{g/cm}^3$), em água deionizada, nas concentrações de 3,75g/l, 5g/l, 6,25g/l e 7,50g/l. Os caramujos foram expostos por aspersão, com auxílio de um borifador, com jatos direcionados a 20 cm de distancia em toda a extensão corporal do caramujo protraído. (Figura 6). Os indivíduos foram então acondicionados, como descritos acima, com o mesmo substrato e suprimento de água, porém sem alimentação, durante as 96h do bioensaio.

Ao final de 96 horas, os resultados observados foram tratados em software específico para cálculo de DL (TRIMMED SPEARMAN-KARBER METHOD, version 1.5). (Hamilton *et al.* 1977). Após a determinação da DL_{50} , novo bioensaio foi desenvolvido com 30 caramujos, que foram expostos à concentração de 4,67g/l, seguindo o mesmo procedimento metodológico para confirmação de resultados.

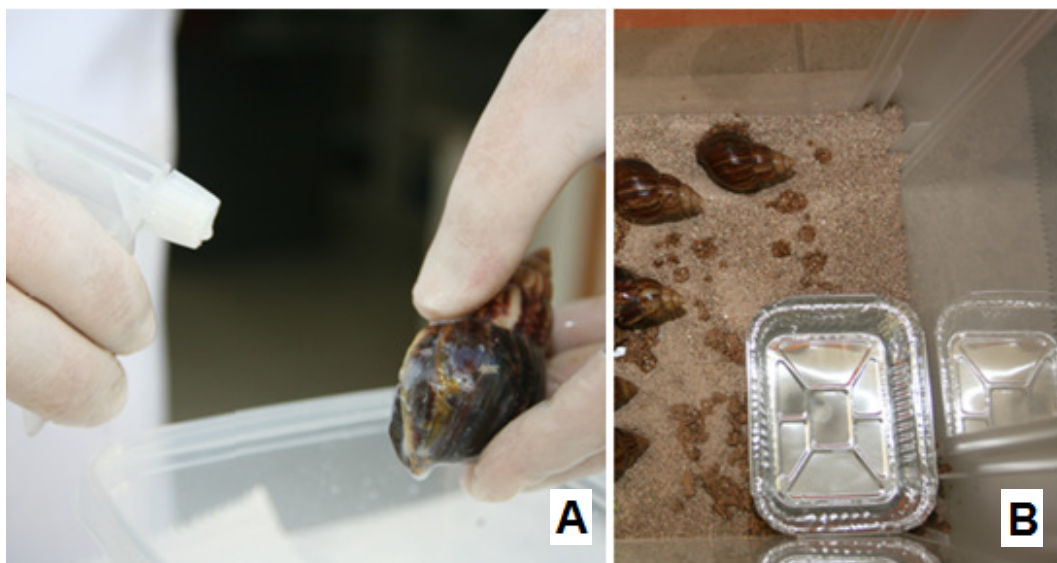


Figura 6 – Bioteste - (A) Exposição dos caramujos *Achatina fulica*, Bowdich, 1822 às concentrações do látex de *Euphorbia milii* var. *splendens*, Ursch & Leandri (B) Terrário de testes com supressão de alimentação.

3.2.2. Determinação da formação de micronúcleos em *Tradescantia pallida*

3.2.2.1. Preparo do Jardim

Mudas de *Tradescantia pallida*, coletadas no horto da prefeitura municipal de Vitória/ES, foram transferidas para Casa de Vegetação do Campus Nossa Senhora da Penha, Centro Universitário de Vila Velha-UVV (Figura 7A). No local do ensaio, vasos plásticos (43 cm de altura x 20 cm de diâmetro), com capacidade para aproximadamente 4 kg de terra foram preenchidos com mistura de duas partes de terra compostada para jardim, produzida pela empresa Pólen Planta, um quarto de húmus de minhoca e uma parte de vermiculita expandida. Cada vaso recebeu quatro mudas, que foram regadas com água tratada pela CESAN (Companhia Espiritosantense de Saneamento), duas vezes por semana, tomando-se sempre o cuidado de lavar as folhas a fim de se evitar o acúmulo de poeira e demais partículas.

3.2.2.2. Método de Colheita

A coleta das inflorescências na fase de tétrede deve ser feita, preferencialmente, pela manhã e os exemplares de *Tradescantia pallida* não devem

ser jovens e nem possuir flores já abertas. O formato da inflorescência é denominado de “barquinha” e encontrado na região apical da planta, como pode ser observado na Figura 8B.

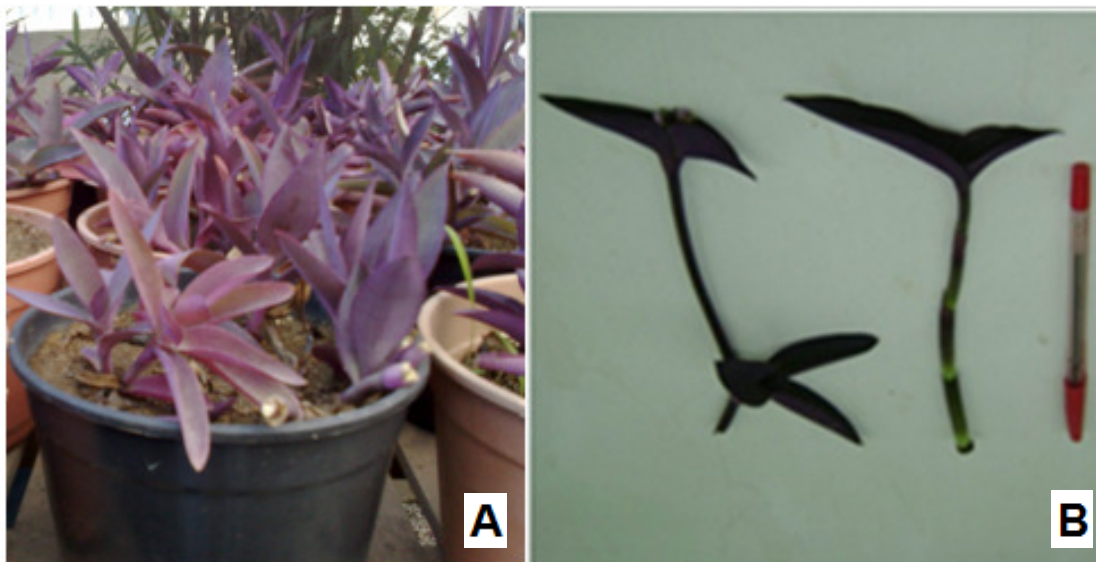


Figura 7 – Metodologia de cultivo e colheita de *Tradescantia pallida* – (A) Mudas para experimentação na casa de vegetação. (B) Inflorescência de *Tradescantia pallida*.

3.2.2.2. Metodologia de Intoxicação

3.2.2.2.1. Exposição de 8 e 30 horas

Hastes de *Tradescantia pallida*, com, aproximadamente, 15 cm de comprimento foram coletadas e transferidas para Becker de 250 mL, contendo água de torneira, por período de 24 horas (Figura 8A). Este período correspondeu à fase de recuperação ou adaptação e, as hastes que apresentaram folhas murchas ou flores desabrochadas, foram eliminadas. Para a montagem dos bioensaios, 40 hastes foram separados em dois grupos experimentais e expostas à solução de látex de *Euphorbia milii* var. *splendens*, Ursch & Leandri, em concentração com a DL_{50} para *Achatina fulica*, Bowdich, 1822 . O primeiro grupo ficou exposto à solução durante 8 horas e o segundo grupo, por um período de 30 horas. Outro grupo não exposto foi utilizado como controle.

Após o tempo experimental, as hastes foram fixadas em solução carnoy (3 partes de álcool etílico:1 parte de ácido acético) durante 48 horas e após, as inflorescências foram conservadas em álcool 70% para uso posterior.

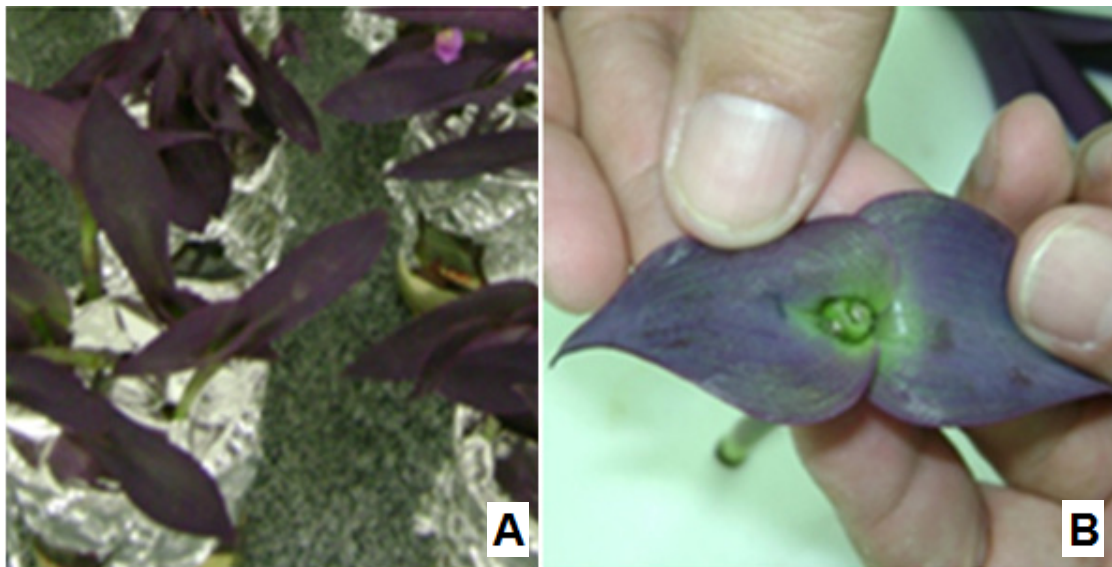


Figura 8 – Bioensaio *Tradescantia* - (A) *Tradescantia pallida* em período de exposição (B) Talo central com tamanho ideal para análise.

3.2.2.2.2. Exposição de 96 horas

Esta exposição simula o uso do látex no ambiente, no processo de controle do caramujo africano. Ao ser considerado que a aplicação no ambiente é feito por aspersão da solução, nesta metodologia, grupos de 20 plantas, com aproximadamente 20 cm de haste, receberam solução de látex de *Euphorbia millii* var. *splendens*, Ursch & Leandri, na concentração com a DL_{50} nas folhas, com auxílio de borifador manual (Figura 9A), mesmo processo utilizado com os caramujos para determinação da LD_{50} . Outro grupo de 20 plantas foi utilizado como controle. Após o tempo experimental (Figura 9B), as amostras foram processadas como relatado no item anterior.

3.2.2.3. Preparo da Lâmina e Contagem das Tétrades

O material fixado em álcool 70% foi utilizado no preparo da lâmina. Os botões jovens foram retirados das inflorescências, abertos com auxílio de pinça e estilete (Figura 10A) para remoção das anteras, e maceradas em gota de corante aceto-carmim (preparado por fervura de 0,5 g de carmim em 100 ml de ácido acético 45% v).

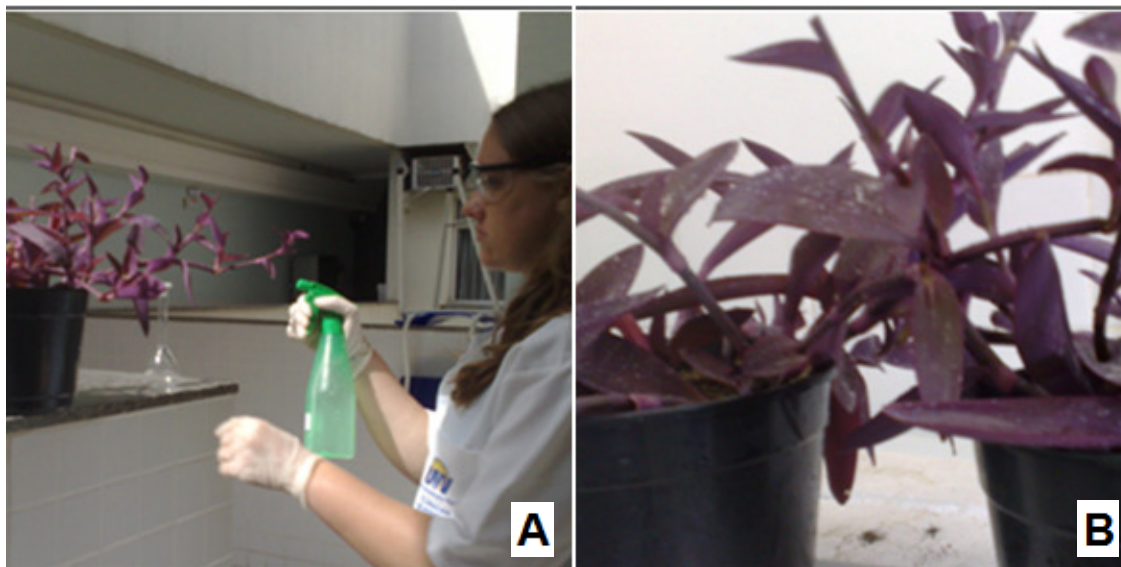


Figura 9 – Bioensaio – (A) Exposição de *Tradescantia pallida* ao látex de *Euphorbia milii* var. *splendens*, Ursch & Leandri. (B) Plantas em período de bioensaio.

Após posicionamento da lamínula, o conjunto foi rapidamente aquecido para procedimento da contagem de micronúcleos. A contagem foi realizada sob magnificação de 400x, e a quantificação dos micronúcleos foi realizada em grupo aleatório de 300 tétrades jovens por lâmina (Figura 10B). Esse procedimento foi repetido cinco vezes Rodrigues (1999).

Para um resultado fidedigno, Rodrigues (1999), descreve quantitativo de 1.500 tétrades por tratamento, o que perfaz uma amostra representativa para o grupo experimental. A codificação e análise das tétrades de todos os tratamentos foram realizadas pelo mesmo autor, a fim de evitar erros de contagem.

3.3. Exposição de microalgas da espécie *Pseudokirchneriella subcaptata* à DL_{50} do látex de *Euphorbia milii*.

A cultura da microalga da espécie *Pseudokirchneriella subcaptata* foi realizada de acordo com os protocolos estabelecidos por Blaise et al. (2000). Os efeitos do látex sobre a reprodução da microalga seguiu metodologia estabelecida por environmental Canada EPS1/RM/25, 1992, para ensaio de toxicidade crônica. (Figuras 11A). A contagem de células foi realizada em câmara de contagem hematocítômetro de Neubauer (Figura 11B e 11C)

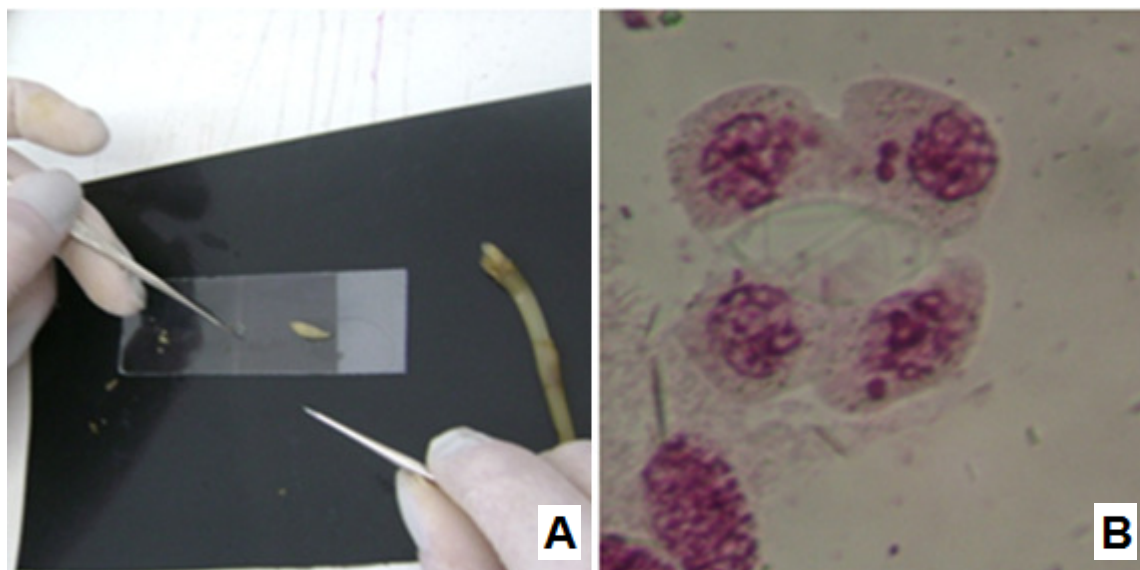


Figura 10 – Análise de genotoxicidade (A) Montagem da lâmina, com botão floral. (B) Tétrade de *Tradescantia pallida* com micronúcleo.

Os resultados foram apresentados em % de inibição, segundo cálculo matemático que determina a toxicidade crônica do agente contaminante, e relaciona número de células e média dos tratamentos, segundo equação:

$$\% \text{ inibição} = \frac{100 - \text{número de células}}{(T1+T2+T3+T4+T5)} \times 100$$

T = Tratamento (em concentrações de 89 mg/L; 134 mg/L; 178 mg/L; 223 mg/L e 357 mg/L)

3.4. Extração das enzimas

3.4.1. Caramujos africanos (*Achatina fulica*)

Após ensaio da DL₅₀, os indivíduos sobreviventes foram resfriados a -20°C por 15min, em conformidade com normas estabelecidas pelo Comitê de Ética Animal do Centro Universitário Vila Velha.

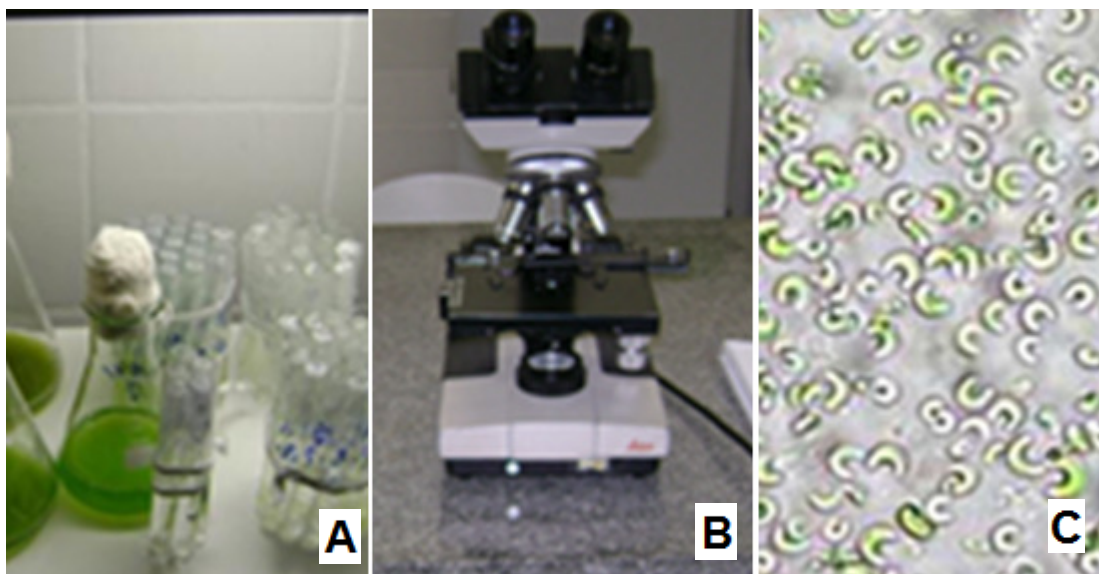


Figura 11 – Bioensaio microalgas – (A) Preparação do meio de cultura para *Pseudokirchneriella subcaptata*. (B) Contagem do número de indivíduos em câmara de contagem hematocítômetro de Neubauer. (C) *Pseudokirchneriella subcaptata*.

Para a retirada dos tecidos a concha foi esmagada e fígado e intestino isolados, pesados em balança analítica eletrônica Ohaus Adventurer, identificados e mantidos a -20°C em freezer.

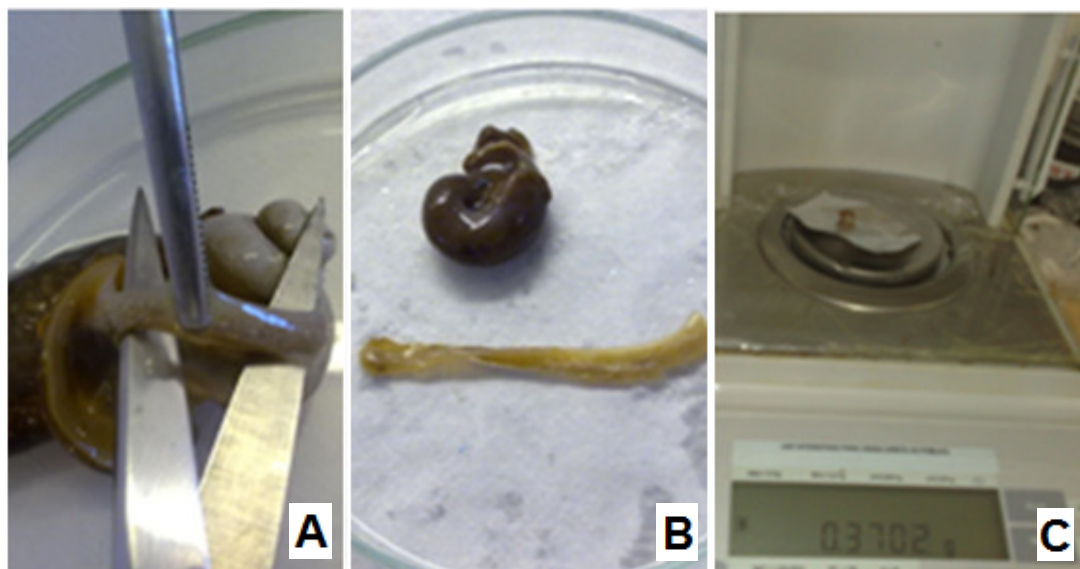


Figura 12 – Metodologia de bioensaio (A) Dissecção (B) Fígado e intestinos separados. (C) Pesagem do intestino.

Posteriormente, os tecidos foram homogeneizados em aparelho homogeneizador Glas-Col, com pistilo de teflon (Figura 13A), em solução tampão (1:5 p/v), de acordo com o ensaio enzimático e centrifugado em centrífuga refrigerada Sorvall Biofuge Stratos a 15000 x g durante 15 minutos a 4°C (Figura 13B), de acordo com a metodologia para isolamento de cada enzima. O sobrenadante obtido foi utilizado como fonte de enzimas. Todas as determinações enzimáticas foram realizadas em triplicatas a 25°C. As atividades foram acompanhadas em aparelho espectrofotômetro Ultrospec 2100 Pro (Amersham, Biosciences) (Figura 13C). Todo material descartado foi classificado como hospitalar/laboratorial infectante e destinado para coleta específica, onde foi incinerado.

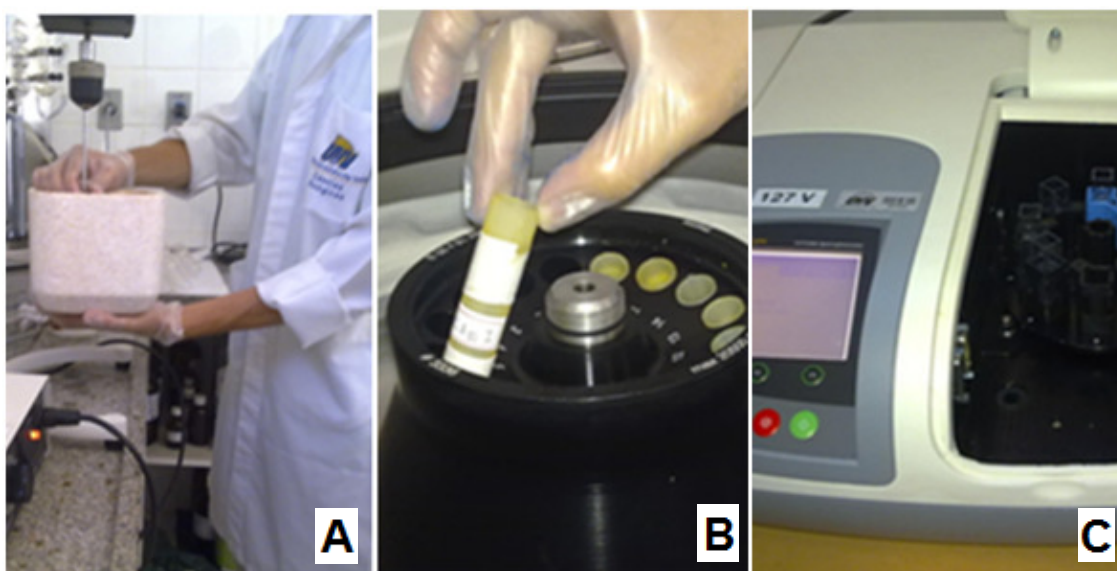


Figura 13 – Análise enzimática – (A) Homogeneização do órgão. (B) Centrifugação (C) Espectrofotômetro Ultrospec 2100 Pro (Amersham, Biosciences).

3.4.2. *Tradescantia pallida*

Depois de retirado os tecidos para determinação dos micronúcleos, o primeiro par de folhas, a partir do botão floral das plantas submetidas ao tratamento de 8 e 30 horas, foram isoladas para determinação enzimática, enquanto que no tratamento de 96 horas, foram retirados também o segundo par de folhas a partir do ápice caulinar. As folhas foram pesadas, identificadas (Figura 14A), trituradas em baixa temperatura (Figuras 14B e 14C) e centrifugadas em centrífuga refrigerada Sorvall Biofuge Stratos a 15000 x g durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi

utilizado para fonte de enzimas. As atividades foram acompanhadas em aparelho espectrofotômetro Ultrospec 2100 Pro (Amersham, Biosciences).

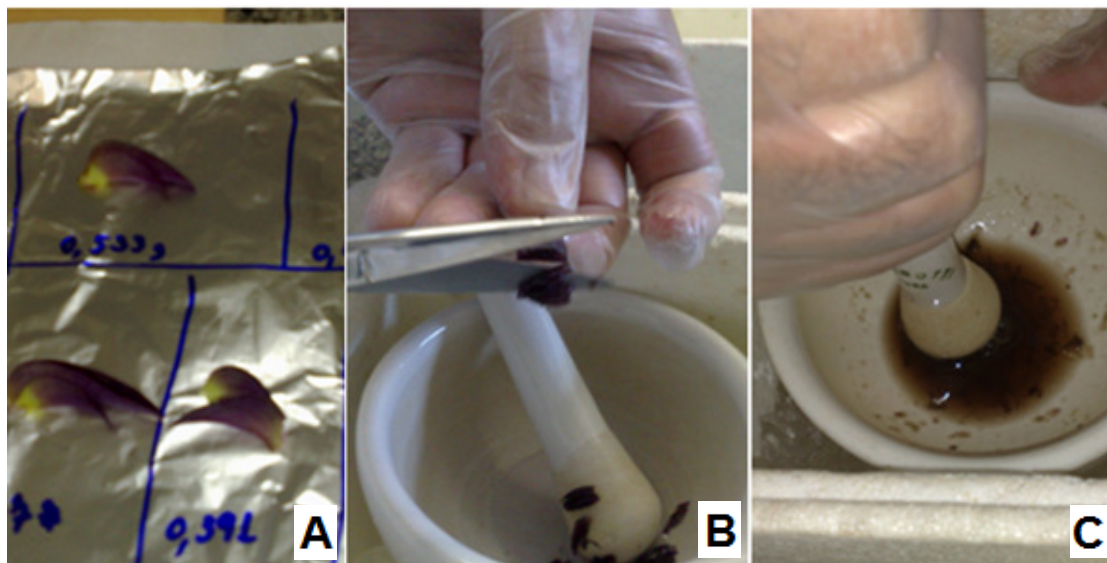


Figura 14 – Análise enzimática de *Tradescantia pallida* (A) - Separação de amostras. (B) Fracionamento das amostras (C) Extração do conteúdo celular por esmagamento.

3.5. Determinação da catalase (E.C.1.11.1.6)

A atividade da CAT foi determinada segundo metodologia descrita por Beutler (1975). Os tecidos foram homogeneizados em solução tampão TRIS-HCL, 50mM pH 8,0; contendo 5mM de EDTA e centrifugados a 15000 x g durante 15 minutos a 4°C. Amostras foram incubadas em meio de reação contendo tampão TRIS-HCL, 40mM pH 8,0; com 5mM de EDTA e 12mM de peróxido de Hidrogênio (H₂O₂). A reação foi iniciada pela adição de 10 µL do extrato bruto e acompanhada a 240nm, durante 30s. Uma unidade de Catalase é definida como a quantidade de enzima que catalisa a decomposição de 1 µmol de H₂O₂ por minuto a 25° C. A atividade foi expressa em unidade de µmol H₂O₂ min.⁻¹/ mg de proteína⁻¹.

3.6. Determinação da Glutathione S-Transferase (GST) – (EC 2.5.1.18)

A atividade da GST foi determinada segundo método definido por Habig *et al.* (1974). Os tecidos foram homogeneizados em tampão Fosfato de potássio 20mM, pH 6,5 e centrifugados a 15000 x g durante 15 minutos a 4°C. Amostras foram incubadas em meio de reação contendo tampão Fosfato de potássio 20mM,

pH 6,5; 80mM de Glutathiona reduzida (GSH)(Sigma G6529) e 20 mM de 1-cloro 2,4-dinitrobenzeno (CDNB)(Sigma C237329). A reação foi iniciada pela adição de 50 μ L de extrato bruto e acompanhada a 340nm. Uma unidade de enzima é definida como a quantidade capaz de transformar 1 μ mol de substrato por minuto, a 25 $^{\circ}$ C. A atividade foi expressa em μ mol GSH min. $^{-1}$ mg proteína $^{-1}$.

3.7. Fosfatase Alcalina - ALP (EC 3.1.3.1)

A fosfatase alcalina foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Barred (1972), porém usando pNPP como substrato. Amostras foram incubadas em meio de reação contendo tampão bicarbonato de sódio, 20mM, pH 9,2; 2mM pNPP e 100mM MgCl₂. A reação foi iniciada pela adição de 50 μ L de extrato bruto. Após 10 minutos, a reação foi interrompida por adição de 1M de NaOH, seguida de centrifugação a 3000 rpm durante 5 minutos e acompanhada a 405 nm a 25 $^{\circ}$ C. Uma unidade de enzima é definida como a quantidade capaz de transformar 1 μ mol de substrato por minuto a 25 $^{\circ}$ C. A atividade foi expressa em μ mol p-nitrofenol min. $^{-1}$ /mg proteína $^{-1}$.

3.8. Fosfatase Ácida – ACP (E.C. 3.1.3.2)

A atividade da ACP foi determinada de acordo com Barred (1972), porém utilizando para-nitrofenilfosfato (pNPP) como substrato. Os tecidos foram homogeneizados em 20mM tampão acetato de sódio, pH 5,0, em relação 1:5 p/v, e centrifugados a 15000 g durante 15 minutos a 4 $^{\circ}$ C. As amostras foram incubadas em meio de reação contendo tampão acetato de sódio 20mM pH 5,0, 10mM MgCl₂, 100mM pNPP. A reação foi iniciada pela adição de 50 μ L de extrato enzimático. Após 10 minutos de incubação, a reação foi interrompida por adição de 1M de NaOH, seguida de centrifugação a 3000 rpm durante 5 minutos e acompanhada a 405 nm a 25 $^{\circ}$ C. A atividade foi determinada baseada na formação de p-nitrofenol a 405 nm. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade capaz de formar 1 μ mol p-nitrofenol a 25 $^{\circ}$ C. A atividade específica foi expressa em μ mol p-nitrofenol min. $^{-1}$ /mg proteína $^{-1}$.

3.9. Determinação de proteínas totais

A determinação protéica dos homogenatos foi determinada segundo metodologia padronizada por Lowry et al. (1951), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão.(Figuras 15A, 15B e 15C)

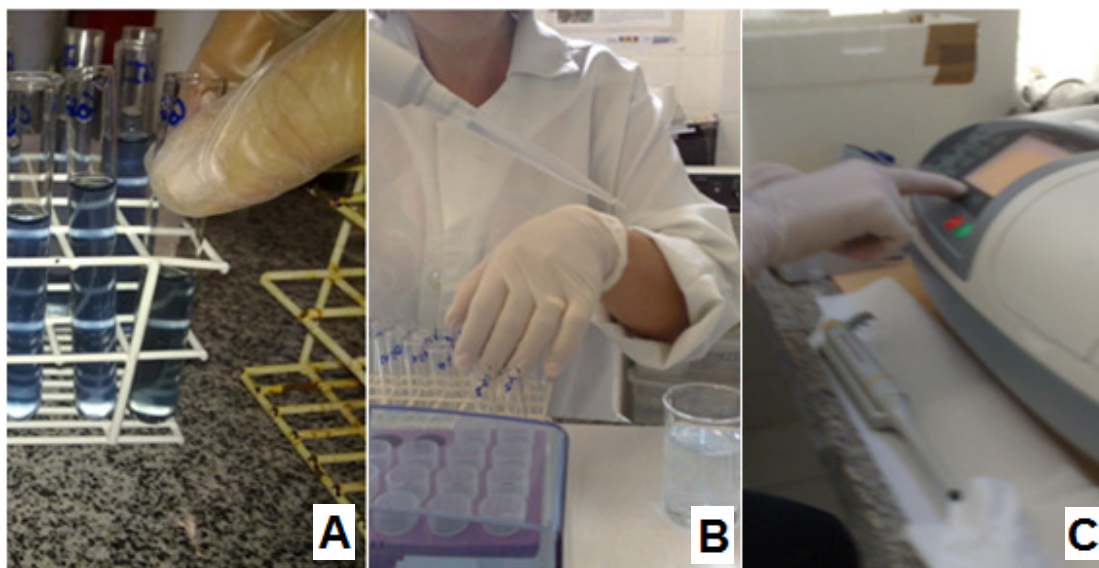


Figura 15 – Determinação de atividade enzimática – (A) Substrato + reagente. (B) Adição de meio de reação. (C) Espectrofotometria.

3.10. Análise Estatística

Para análise estatística descritiva, foram utilizados gráficos e tabelas, bem como a tomada de medidas de posição e de dispersão. Para a estatística inferencial, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) a fim de se comparar as diferentes combinações de médias dos diferentes tratamentos, e a metodologia de Tukey para múltiplas comparações. O *software* utilizado foi o STATISTICA 7 e o nível de significância adotado foi 5%. Quando necessário, fez-se uso de transformação de dados para normalizá-los ou para homogeneizar variâncias, a fim de se satisfazer os pressupostos da ANOVA, mas, para apresentação, os dados estão expressos em seu formato original.

4. RESULTADOS

4.1. Determinação da DL_{50}

Após 96 horas, os resultados obtidos demonstram uma relação direta entre concentração do látex e mortalidade, como pode ser observado na figura 16. Estes dados permitiram calcular a DL_{50} como concentração 4,67g/L, com doses mínima e máxima de confiabilidade de 3,89g/l e 5,60 g/l, respectivamente.

Concentrações inferiores a 3,75 g/L não resultaram em qualquer mortalidade enquanto que concentrações superiores a 7,50 g/L foram suficientes para causar 100% de mortalidade da população amostrada de *Achatina fulica*. A repetição do bioensaio com concentração 4,67g/L, demonstrou a confiabilidade dos dados segundo o teste do qui-quadrado $X^2 = 0,60$, $gl=2$ e $p= 0,74$ ($p \geq 0,05$).

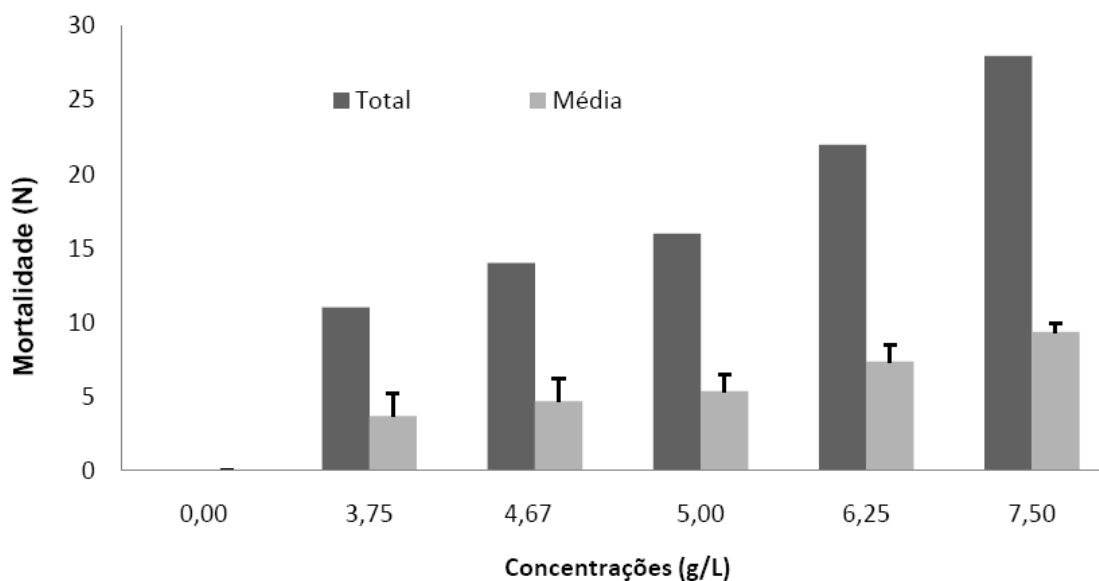


Figura 16 – Mortalidade total e média de mortalidade de *Achatina fulica* expostas ao látex de *Euphorbia milii*. Os indivíduos foram expostos às concentrações de 3,75; 5,0; 6,25 e 7,50 g/L de látex em água tratada. Os valores representam o total de 30 indivíduos ($n=30$), para cada concentração.

4.2. Atividade enzimática em *Achatina fulica*

4.2.1. Glutathione S-Transferase

O efeito do látex sobre a atividade da GST hepática pode ser comprovado na Figura 17. Ao serem considerados os valores das atividades do controle e dos testes é possível observar resposta positiva para todos os tratamentos, já que a atividade específica foi elevada significativamente em todas as concentrações ($F=55,501$ e $p=0,0001$).

O tratamento com 3,75 g/L de látex, apresentou uma elevação da atividade específica em 134,7% (1,99 μmol de GSH conjugado/min/mg de proteína) em relação ao controle (0,85 μmol de GSH conjugado/min/mg de proteína) valor superior às outras concentrações de látex utilizados. Da mesma forma, o tratamento correspondente à DL_{50} (4,67g/L), elevou a atividade enzimática em 103,12% (1,72 μmol de GSH conjugado/min/mg de proteína), valor inferior ao tratamento de 3,75, porém significativo ($p\leq 0,05$).

Ao serem considerados os ensaios acima da DL_{50} , é possível constatar a uniformidade em relação aos resultados, já que todos apresentaram ativação enzimática ($p=0,0001$), com valores significativos de 105,75% (5,0 g/L) e 98,08% (6,25 g/L) quando comparados ao controle, porém sem diferença significativa entre os tratamentos ($p\geq 0,05$).

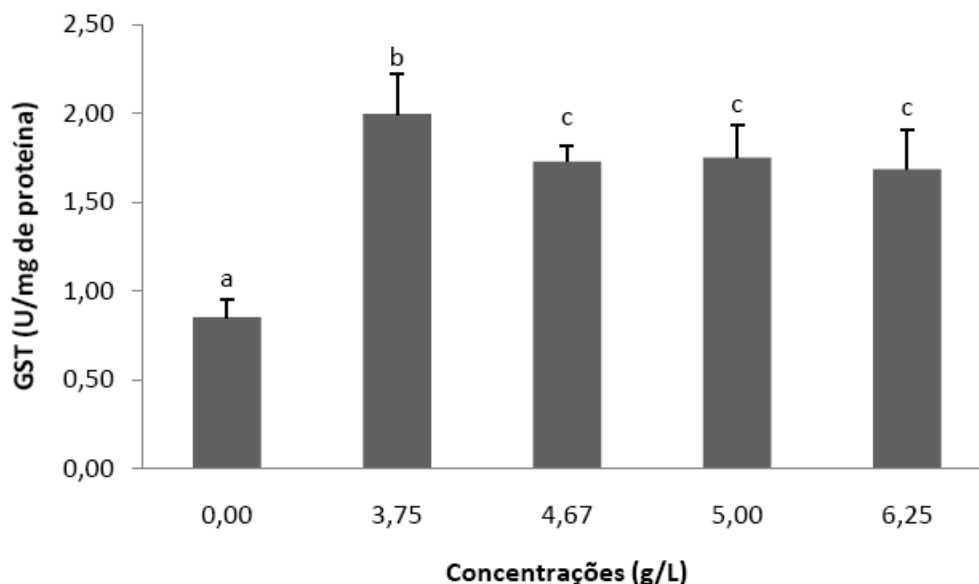


Figura 17 – Atividade da Glutathione S-Transferase em fígado de *Achatina fulica*, expostas às concentrações de látex de *Euphorbia milii*. O controle foi desenvolvido na ausência do látex. A atividade enzimática foi expressa em U/mg de proteína. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade capaz de transformar 1 μmol de substrato por minuto por mg de proteína. Letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os valores representam a média de seis indivíduos ($n=6$), com 03 determinações enzimáticas por indivíduo.

4.2.2. Catalase

Os resultados obtidos no bioensaio para a atividade da Catalase demonstraram diferença significativa entre o controle e os tratamentos com látex ($F=32,907$ e $p=0,0001$). Entretanto, como pode ser observado na Figura 18, a resposta entre os tratamentos com 3,75 g/L (29,2%); 4,67 g/L (39,98%) e 6,25 mg/L 41,68% , não apresentaram diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

Ao ser considerado a atividade específica do controle (3,61 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ min por mg de proteína) com aquela apresentada pelo tratamento 3,75 g/L (4,67 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ min por mg de proteína), é possível observar ativação de 29,2% da enzima.

A resposta da catalase à exposição de 5,0g/L, foi superior às concentrações anteriormente relatadas, com ativação enzimática de 70,39% (6,15 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ min por mg de proteína), quando relacionada ao controle.

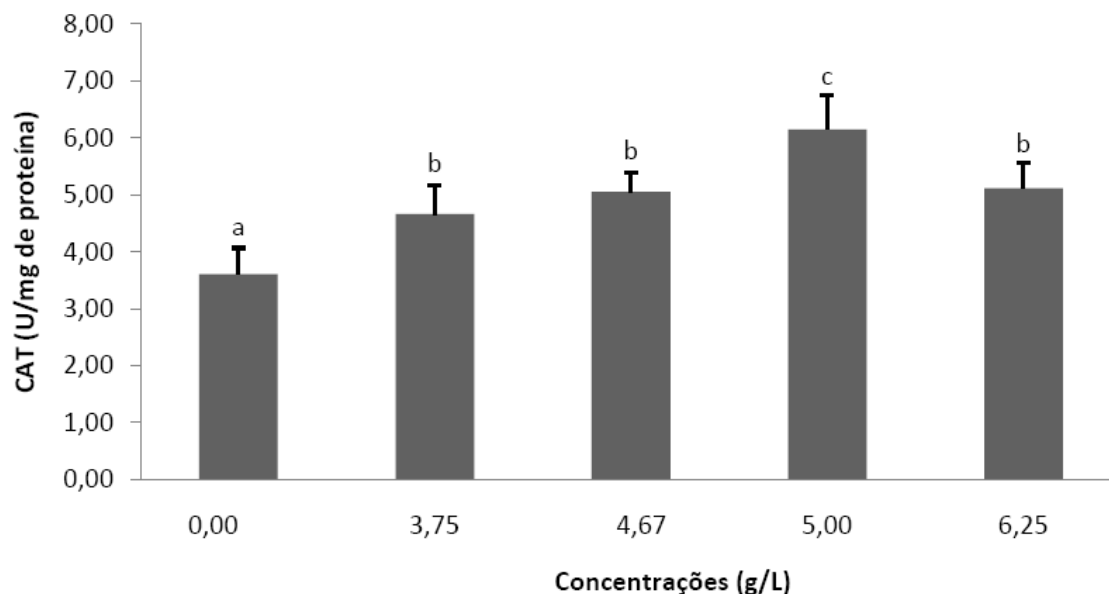


Figura 18 – Atividade da Catalase em fígado de *Achatina fulica*, expostas às concentrações de látex de *Euphorbia milii*. O controle foi desenvolvido na ausência do látex. A atividade enzimática foi expressa em U/mg de proteína. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade capaz de transformar 1 μ mol de substrato por minuto por mg de proteína. Letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os valores representam a média de seis indivíduos ($n=6$), com 03 determinações enzimáticas por indivíduo.

4.2.3. Fosfatase Alcalina

A fosfatase alcalina extraída de intestino dos indivíduos expostos às concentrações do látex apresentou inibições significativas quando relacionadas ao controle ($H=24,659$ e $p=0,0001$), com exceção da concentração 3,75 g/L ($p=0,079$), cujos valores de atividade específica (0,092 μ mol p-nitrofenol/min/mg proteína), não apresentou diferenças ao do controle (0,27 μ mol p-nitrofenol/min/mg proteína) (Figura 19).

Ao serem relacionadas as atividades específicas dos ensaios de 3,75 g/L; 4,67 g/L; 5,0 g/L e 6,25 g/L, ao controle, o percentual de inibição observados foram de: 65,93%; 65,93%; 83,24% e 84,76%, respectivamente. Em valores absolutos, é

possível observar uma redução inversamente proporcional da atividade enzimática, ao aumento da concentração.

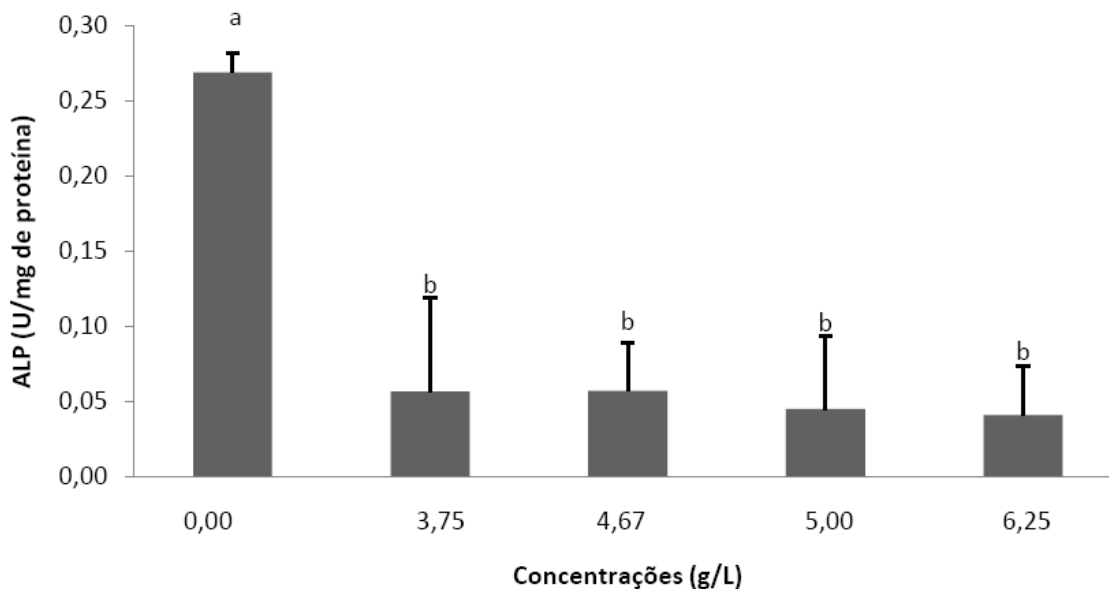


Figura 19 – Atividade da Fosfatase Alcalina em intestino de *Achatina fulica*, expostas às concentrações de látex de *Euphorbia milii*. O controle foi desenvolvido na ausência do látex. A atividade enzimática foi expressa em U/mg de proteína. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade capaz de transformar 1 μ mol de substrato por minuto por mg de proteína. Letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os valores representam a média de seis indivíduos ($n=6$), com 03 determinações enzimáticas por indivíduo.

4.3. Atividade enzimática em *Tradescantia pallida*, imersa em solução DL_{50}

4.3.1. Fosfatase ácida

Os resultados da atividade da Fosfatase Ácida em *Tradescantia pallida*, demonstram diferença significativa ($F=23,726$ e $p=0,0001$) na redução da atividade enzimática. Como pode ser observado na Figura 20, a resposta da ACP à exposição à DL_{50} do látex, durante 8 horas, foi redução na atividade enzimática, com percentual de inibição de 64,46% ($0,012 \mu$ mol p-nitrofenol/min/mg proteína) quando comparado ao controle ($0,033 \mu$ mol p-nitrofenol/min/mg proteína), enquanto que a

diferença em relação ao tratamento de 30 horas foi 57,57%. Entretanto, nenhuma diferença foi observada entre os tratamentos de 8 horas e 30 horas ($p=0,539$) (Figura 20)

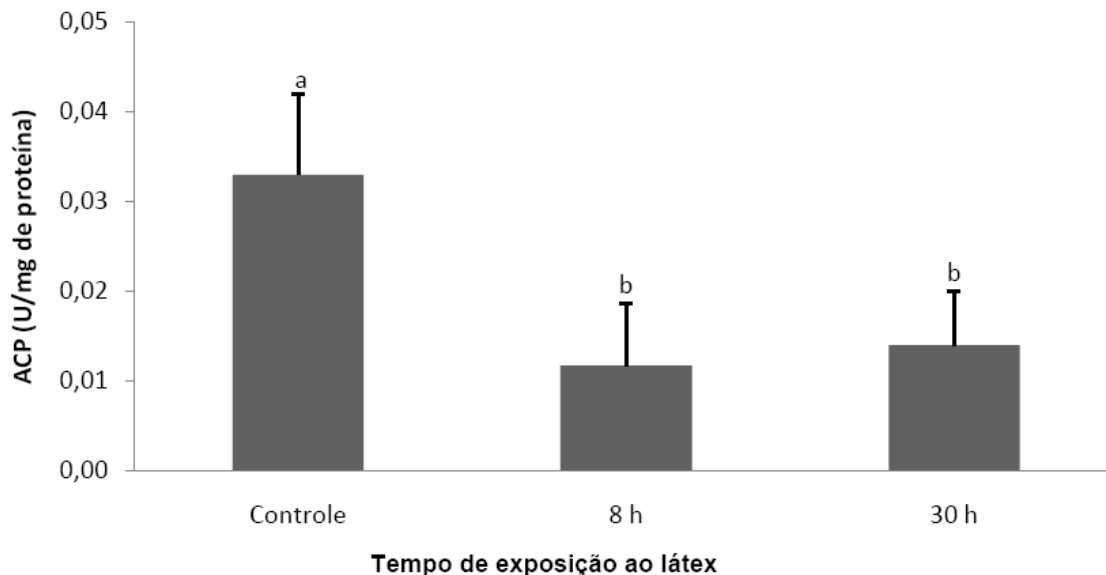


Figura 20 – Atividade enzimática da Fosfatase Ácida em *Tradescantia pallida* exposta, por imersão do caule, à concentração 4,67 g/L, durante 8 e 30 horas, ao látex de *Euphorbia milii*. A atividade enzimática foi expressa em U/mg de proteína. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade capaz de transformar 1 μmol de substrato por minuto por mg de proteína. Letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os valores representam a média de seis indivíduos ($n=6$), com 03 determinações enzimáticas por indivíduo.

4.3.2. Catalase

A atividade da catalase, nos espécimes expostos por metodologia de imersão do caule, à concentração da DL_{50} , aumentou de forma significativa, quando comparando ao grupo controle. Teste experimental mostrou elevação na resposta enzimática do controle, de 3,78 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ min por mg de proteína para 5,84 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ min por mg de proteína, após exposição de 8 horas, valor correspondente a 54,53% de ativação.

Por outro lado, a exposição de 30 horas não resultou em valores significativos quando comparado ao controle (1,86%). Entretanto, quando

comparados os tratamentos, a resposta ao longo de 8 horas foi superior ao de 30h de exposição (Figura 21).

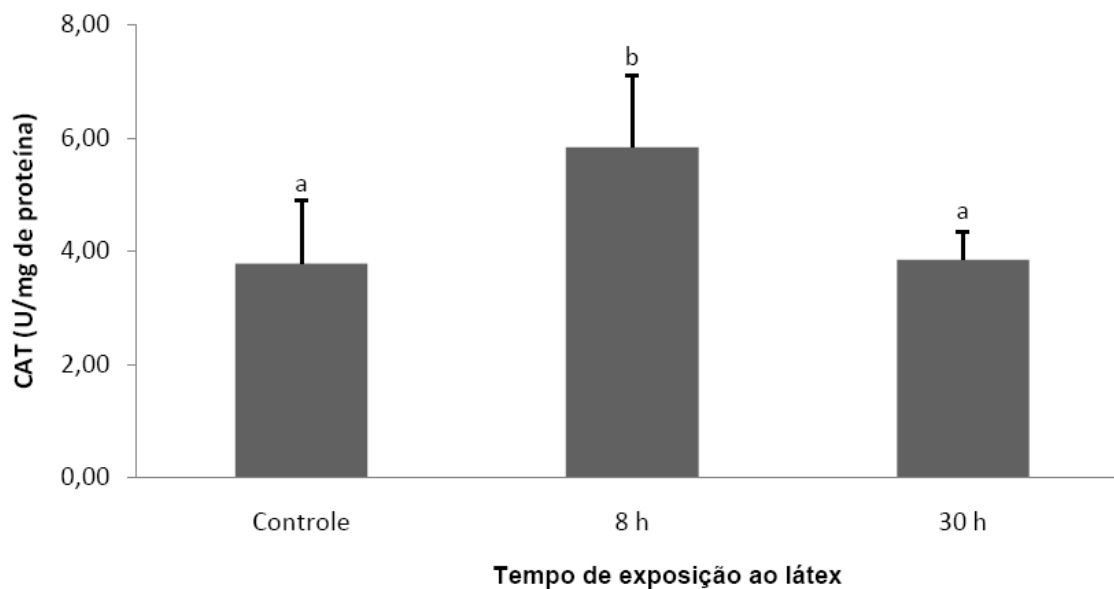


Figura 21 – Atividade enzimática da Catalase em *Tradescantia pallida* exposta por imersão do caule, à concentração 4,67 g/L, durante 8 e 30 horas, ao látex de *Euphorbia milii*. A atividade enzimática foi expressa em U/mg de proteína. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade capaz de transformar 1 μ mol de substrato por minuto por mg de proteína. Letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os valores representam a média de seis indivíduos ($n=6$), com 03 determinações enzimáticas por indivíduo.

4.4. Atividade enzimática em *Tradescantia pallida* (aspersão)

4.4.1. Fosfatase ácida

O tratamento dos espécimes com látex por aspersão foliar, não resultou em alterações significativas na atividade da fosfatase ácida, mesmo após 96 horas de tratamento (2,15%). Os resultados entre controle e tratamento ($t=-0,622$ e $p=0,541$) podem ser observados na figura 22.

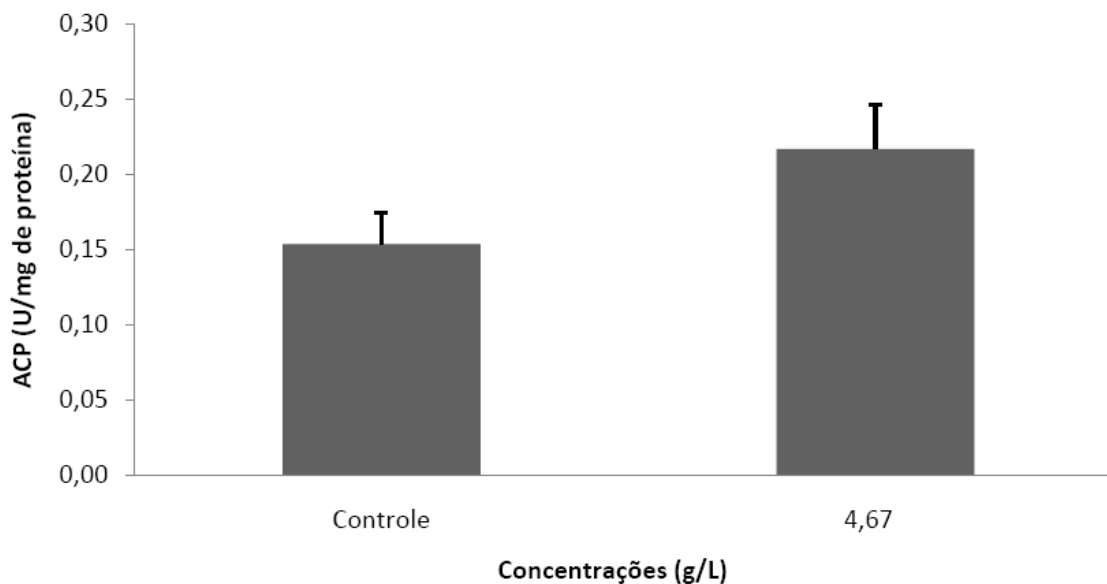


Figura 22 – Atividade enzimática da Fosfatase Ácida em *Tradescantia pallida* exposta por aspersão foliar, à concentração 4,67 g/L, durante 96 horas, ao látex de *Euphorbia milii*. A atividade enzimática foi expressa em U/mg de proteína. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade capaz de transformar 1 μ mol de substrato por minuto por mg de proteína. Letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os valores representam a média de seis indivíduos ($n=6$), com 03 determinações enzimáticas por indivíduo.

4.4.2. Catalase

Os resultados apresentados na figura 23 demonstram que o tratamento por aspersão foliar, durante 96 horas, da DL₅₀, não resultou em qualquer diferença significativa na atividade da catalase, extraída de folhas de *Tradescantia pallida*, ensaiada em presença de peróxido de hidrogênio ($t=-0,979$ e $p=0,341$).

Os resultados da atividade enzimática apontam para um aumento na ativação de somente 8,51%.

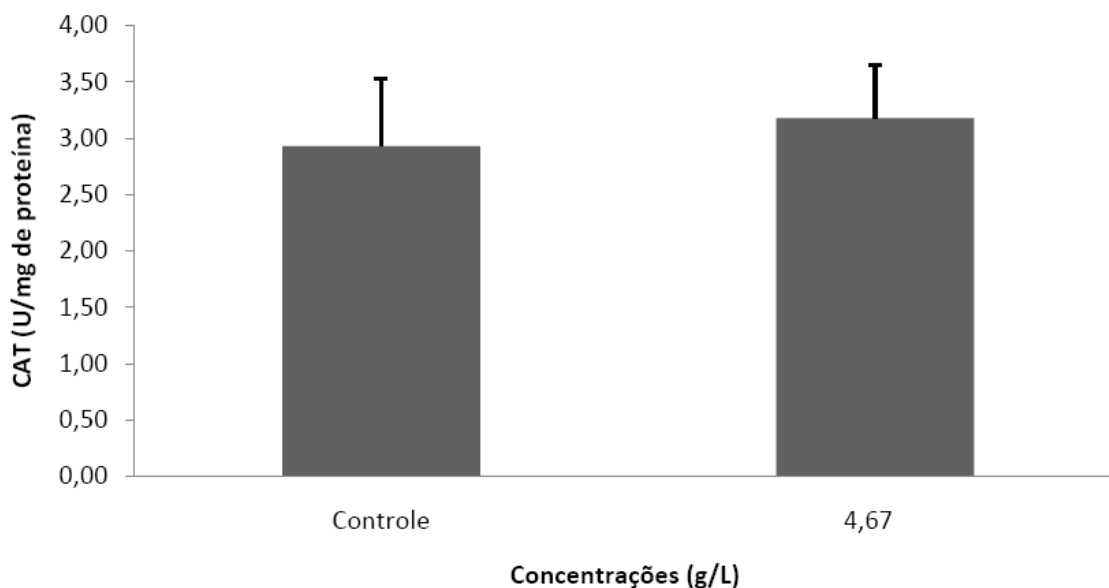


Figura 23 – Atividade enzimática da Catalase em *Tradescantia pallida* exposta por aspersão foliar, à concentração 4,67 g/L, durante 96 horas, ao látex de *Euphorbia milii*. A atividade enzimática foi expressa em U/mg de proteína. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade capaz de transformar 1 μ mol de substrato por minuto por mg de proteína.

4.5. Micronúcleos em *Tradescantia pallida*

Os resultados da análise de micronúcleos podem ser observados na Figura 24. A exposição da *Tradescantia pallida*, ao látex em concentração DL_{50} , mostrou ocorrência de micronúcleos, que foram diferentes em relação ao tempo de exposição. O aparecimento de micronúcleo foi maior no tratamento de 8 horas, quando comparado ao controle, onde não foi detectada nenhuma alteração micronuclear.

Quando comparada a ocorrência de micronúcleos em exposição de 30 horas, ao controle, a diferença foi menor quando relacionado ao tratamento de 8 horas. Entretanto, esta diferença é ainda significativa ($p \leq 0,05$).

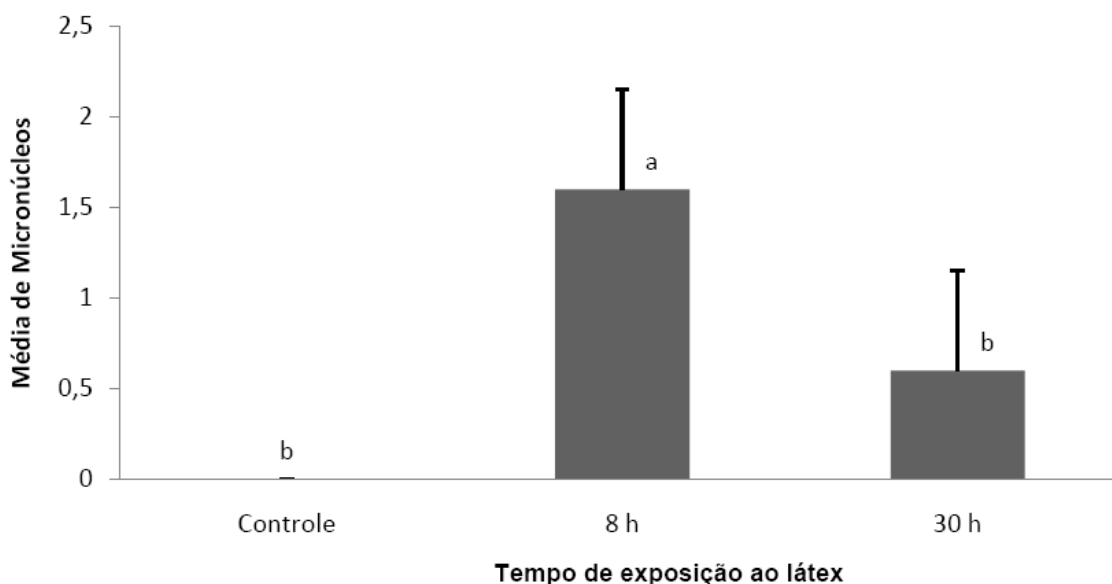


Figura 24 – Células micronucleadas de *Tradescantia pallida*, após exposição à concentração 4,67g/L de látex de *Euphorbia milii*, durante 8 e 30 horas. Letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os valores representam a média de 20 indivíduos ($n=20$).

4.6. Microalgas (*Pseudokirchneriella subcaptata*)

O efeito de concentrações de látex sobre o número de indivíduos de *Pseudokirchneriella subcaptata* pode ser observada na Figura 25. Na caracterização do controle, foram observados, em média, 25,8 indivíduos por campo. A exposição da alga ao látex resultou em diminuição na contagem dos indivíduos, que foi proporcional ao aumento da concentração da solução ($p \leq 0,05$).

Em presença de 89 mg/L do látex, a redução na contagem dos indivíduos foi de 28,94%, resposta significativa quando comparada ao controle. A redução do crescimento, quando em presença de 134 mg/L (39,28%), foi significativa em relação ao controle, porém se equiparou à concentração de 89 mg/L. Da mesma forma, a resposta da exposição à concentração 178 mg/L, foi redução de 52,20%. As maiores significância em relação à inibição foram detectados em presença de concentrações 223 mg/L e 357 mg/L, valores de 58,66% e 65,12%, respectivamente, em relação ao controle, porém não significativos entre eles.

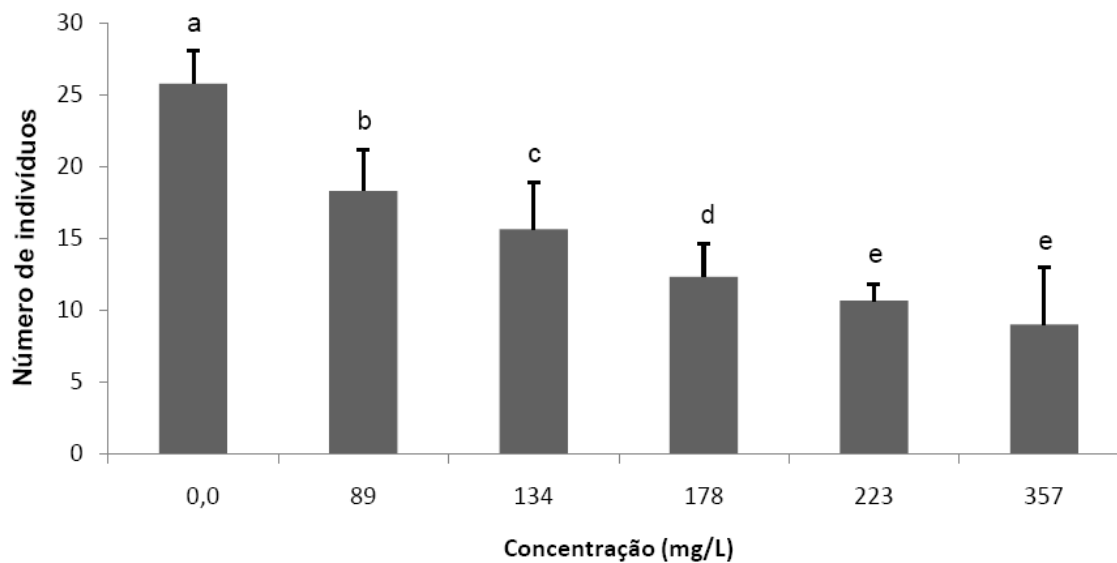


Figura 25 – Toxicidade crônica em *Pseudokirchneriella subcaptata*, expostas às concentrações de: 89 mg/L; 134 mg/L; 178 mg/L; 223 mg/L e 357 mg/L de látex de *Euphorbia milii*, segundo Environmental Canada EPS1/RM/25, (1992). Letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

5. DISCUSSÃO

A resistência de vários organismos invasores às substâncias químicas é muito preocupante porque, além dessas substâncias não exterminarem os indivíduos no ambiente, podem ser perniciosas para a saúde humana. Informações quanto à substância química são importantes na escolha do agente a ser utilizado no combate de algumas pragas (Egaas, 2000).

A substância escolhida para o desenvolvimento do presente trabalho é de origem vegetal e se mostra viável no controle de moluscos e convenientes do ponto de vista ecológico e econômico (Vasconcellos et al., 2003).

As concentrações utilizadas por vários pesquisadores estão na escala de microgramas, e por isso, ao ser caracterizada a concentração necessária para exterminar 50% dos indivíduos estudados, nos preocupou sobremaneira, quais possíveis impactos poderiam ocorrer no ambiente. Nesta linha de pensamento, foi importante a caracterização de biomarcadores, como ferramentas na identificação das alterações que ocorrem no organismo alvo, e entender a potencialidade em outros animais, além de caracterizar os riscos de contaminação ambiental em vegetais.

5.1. *Biometria dos indivíduos*

Na estruturação do trabalho ficou estabelecida a importância da biometria dos indivíduos para a fase experimental de determinação da DL_{50} . Quando substâncias químicas, de origem vegetal ou não, entram em contato com indivíduos alvo são absorvidas e podem interferir na hematologia, histologia, no perfil enzimático de vias metabólicas importantes, além de outros. Ao ser considerado que alguns fatores bióticos e abióticos podem afetar os resultados em um teste de toxicidade (USEPA, 2002), a seleção de *Achatina fulica* em relação ao tamanho, assim como a coleta em uma mesma fonte de cultura, foi importante para exclusão de qualquer influência no teste de toxicidade. Quanto mais jovem o organismo, maior o efeito dessas substâncias, e esta abordagem é importante ao ser considerado a quantidade de ovo postado por cada indivíduo. Desta forma, ao ser definido uma concentração de moluscicida para caramujos jovens, é esperada que

outros em escala menor de desenvolvimento sejam atingidos mais fortemente pela substância em questão (Sukumaran et al., 2004), apesar de Oliveira-Filho et al. (1999), terem demonstrado em estudos com *Biomphalaria glabrata*, que tamanho é fator que menos influencia no efeito letal do látex.

5.2 Determinação da DL_{50}

O uso do látex como moluscicida vem sendo testado em vários organismos, principalmente em indivíduos aquáticos, que demandam concentrações na escala de ppm, para mortalidade de 50% da população (Oliveira-Filho e Paumgarten, 1997).

No presente estudo, a determinação da concentração sub-letal do látex de *Euphorbia milli*, para *Achatina fulica*, resultou em várias tentativas e concentrações finais em escala g/L. A LD_{50} de 4,67g/L, foi superior ao valor descrito por Schall et al. (2001), para *Melanoides tuberculata*, cuja DL_{50} foi 3,57 mg/L, após 24 horas de bioensaio. Já Ferreira et al. (2009) trabalhando com cafeína sobre caramujos terrestres (*Subulina octona*), observaram 47% de mortalidade em concentração de 5 g/L para exposição.

Em relação à eficácia dos tratamentos com fitotóxicos, é possível destacar os resultados observados por Panigrahi e Raut (1994) ao testarem diferentes concentrações de extrato de sementes de *Thevetia peruviana*, com até 100% de mortalidade, em jovens de *Achatina fulica* (Bowdich, 1822).

Por outro lado, valores de DL_{50} na escala de microgramas foram observados por El-Gendy et al. (2009) ao utilizarem os caramujos terrestres da espécie *Theba pisana*, e ensaiados com pesticidas a base de cobre.

Uma observação importante, durante o desenvolvimento do presente estudo, foi a elevada secreção tegumentar, que sugere resposta fisiológica do indivíduo à ação do látex e, provavelmente, tenha sido a causa do uso de concentrações cada vez maiores para determinação da dose sub-letal, ao contrário dos observados para moluscos aquáticos.

No presente estudo, outra resposta importante do *Achatina fulica*, ao uso do látex, foi o deslocamento intenso e errático observado em todos os indivíduos. Este comportamento não foi consistente aos descritos para *Lymnaea columella*, que apresentou redução de mobilidade e letargia em mais de 90% dos indivíduos, após exposição ao mesmo moluscicida (Vasconcellos e Amorim, 2003).

Por outro lado, a exposição da massa cefalopodal e as mudanças no padrão de deslocamento dos eixos vertical e horizontal foi consistente ao descrito por Afonso-Neto *et al.* (2010), ao estudarem a ação do látex *E. milii* var. *splendens* sobre o caramujo terrestre *Leptinaria unilamellata*.

Nascimento *et al.* (2006) sugerem estudos aprofundados da variação do comportamento desses animais quando submetidos a extratos vegetais. Apesar da eficácia demonstrada pelos moluscicidas, o que se observa é a rápida recolonização dos locais antes tratados. O uso do látex no controle da população do molusco africano pode ser método natural alternativo para redução da população que infestam os grandes centros urbanos.

5.3. Biomarcadores enzimáticos

A quantificação de vários parâmetros enzimáticos tem sido caracterizada em organismos expostos a substâncias químicas, principalmente como objeto de entendimento das mudanças ocorridas nas condições metabólicas e nos processos de detoxificação. Peakall, (1992) reconheceu os testes enzimáticos como método popular e de fácil utilização como marcadores específicos de contaminação ambiental. Entre os marcadores utilizados estão a glutathione S-transferase, catalase, fosfatase alcalina e fosfatase ácida

5.3.1. *Achatina fulica*

5.3.1.2. *Glutathione S-Transferase*

A regulação do processo oxidativo nos organismos expostos a substâncias químicas ocorre primariamente no fígado, órgão considerado o mais importante, onde enzimas consideradas chaves no processo oxidativo são sintetizadas e responsáveis pela defesa contra a geração de Espécies Reativas do Oxigênio (Moreno *et al.*, 2005).

As respostas que ocorrem em um indivíduo são classificadas em três classes, entre as quais é possível destacar as substâncias redutoras solúveis em água, e, principalmente as enzimas classificadas como pertencendo a Fase I e Fase II das defesas antioxidantes. A glutathione S-Transferase é enzima pertencente a Fase II do processo oxidativo e sua principal característica é a capacidade de

resposta aos agentes impactantes na forma adaptação ao stress induzido por poluentes. A resposta enzimática está relacionada à capacidade de indutiva, com elevação na atividade específica, observada principalmente no tecido hepático (Di Giulio et al. 1989).

A resposta do organismo à exposição aos agentes químicos é determinada pelo equilíbrio dinâmico que envolve o processo de captação e sua depuração (Avilez et al., 2008). Segundo alguns autores, a elevação da atividade específica, como resposta indutora, podem ser influenciados pela alimentação, (Egaas, 2000), o que levou, no presente estudo, ao cuidado no desenho experimental, tanto durante ao período de aclimatação, como do bioensaio propriamente dito, com suspensão da alimentação durante as 96 horas, quanto os indivíduos ficaram em contato com o látex.

O aumento da ativação da Glutathione S-Transferase observado em fígado de *Achatina fulica*, sugere defesa antioxidante desencadeada pelo látex, e que se manteve ao longo do tratamento. A enzima participa de processos metabólicos detoxificantes e protetores da integridade celular, conforme descrevem Thom et al, (2001) e Edwards et al. (2000).

Esses resultados estão de acordo com os descritos por outros autores que relatam, *in vitro*, a elevação na atividade da GST em caramujos terrestres, *Theba pisana* (Müller, 1774) quando expostos à pesticida a base de cobre, como descritos por El-Gendy et al (2009). A mesma resposta foi observada por Rao (2006a) ao estudar a influência do organofosforado monocrotófos em peixes *Oreochromis mossambicus*. De forma similar, Rodrigues (2009) obtiveram ativação da GST de fígado de *Pterygoplichthys anisitsi* após exposição a organofosforado, enquanto que o mesmo resultado foi observado em *Oreochromis niloticus* após exposição a carbamatos.

Estudos desenvolvidos com Acefato, Difenconazol e Sulfluramida demonstraram aumento na atividade da GST em fígado de *Oreochromis niloticus*, ligando este importante marcador aos processos catalíticos detoxificadores e de proteção dos tecidos (Virgens 2009).

Entretanto, vários autores demonstraram resposta contrária, nas quais a GST, expostas a diversas substâncias apresenta percentuais expressivos de inibição, como os relatados por Regoli et. al, (1998) para metais pesados ou por Huang (2005), para tributiltina. Estas inibições podem ser explicadas pelo grau de geração de GSH, conforme sugerido por Elumalai et al., (2007).

Analisando as diferenças significativas que ocorrem entre os resultados da dose 3,75g/L e os demais tratamentos, postula-se que a atividade enzimática se mantém elevada em resposta a exposição ao látex, independente dos níveis de concentração, sugerindo a participação desta enzima nos processos de manutenção da homeostase bioquímica das células hepáticas. O mesmo resultado foi confirmado por Van der Oost et al. (2003) no qual a enzima catalisa a conjugação de GSH com uma variedade de metabólitos eletrofílicos resultantes da desintoxicação de reativos intermediários e radicais de oxigênio.

Por outro lado, a diminuição significativa da atividade da GST observada nas doses mais elevadas (4,67; 5,0 e 6,25 g/L) pode ser explicada pela falência da capacidade detoxificativa do fígado em decorrência do estresse oxidativo, conforme descrito por Liu et al. (2007)

5.3.1.3. Catalase

Os estudos desenvolvidos em *Achatina fulica* demonstraram ativação na CAT isolada de fígado, em resposta à exposição ao látex. Entretanto, o percentual de ativação não foi proporcional à concentração como demonstrado pela igualdade obtida nos ensaios com 3,75g/L e 4,67 g/L. Por outro lado, a concentração de 5 g/L foi a que resultou em maior resposta ativadora e, a redução em concentração 6,25 g/L, pode estar relacionada ao início da inibição enzimática provocada pelo excesso de radicais livres produzidos na célula. Isto pode ser sugerido baseado nos relatos de peroxidação lipídica em membranas, induzida por várias substâncias químicas. Esta resposta é semelhante àquela reportada por Possamai (2005), em experimentos com ratos Wistar, expostos ao malation. Possivelmente, em concentrações de látex, superior ao utilizado no presente estudo, a resposta seria inibição ao invés de ativação.

Uma das enzimas responsáveis pela manutenção do equilíbrio oxidativo é a catalase, que muitas vezes apresenta elevação em sua atividade específica, como observado no presente estudo. Por outro lado, dependendo do agente impactante o resultado é a inibição enzimática como resultado da redução na transcrição do RNA, como proposto por Woo et al., (2009).

Resultados semelhantes foram relatados para glândulas digestivas de caramujos terrestres *Theba pisana*, onde os autores demonstraram resposta de 40 a

80% de ativação da CAT, quando expostos ao moluscida oxiclureto de cobre, durante 48 horas (El-Gendy et al. 2009).

Entretanto, a sensibilidade da enzima varia de acordo com o bioindicador e o agente antropogênico. Vários autores reportaram resposta inibitória da CAT, como Ferreira-Cravo et al. (2009) para poliquetos da espécie *Laeonereis acuta*, expostas ao cobre; Miron (2009) para fígado de *Leporinus obtusidens* expostos ao clomazone; Crestani et al., (2007), em estudos com *Rhamdia quelen* expostas ao clomazone. Kono e Fridovich (1982); Branny et al. (1996) creditam a redução na atividade enzimática à elevada geração de peróxido de hidrogênio.

Mais recentemente, estudos desenvolvidos por Otitolaju e Olagoke (2011), comprovaram a capacidade de inibição da catalase, superóxido dismutase e glutatona S-transferase de *Clarias gariepinus*, expostas a produtos orgânicos como petróleo bruto, xileno, tolueno e benzeno. Os autores recomendam a utilização dessas enzimas como marcadores de contaminação ambiental, porém a ativação, como a detectada no presente estudo, credita a catalase como excelente biomarcadora de atividades antropogênicas (Atli e Canli, 2007).

5.3.1.4. Fosfatase Alcalina (ALP)

A fosfatase alcalina é importante enzima não específica que participa de importante etapa metabólica como detoxificação e biossíntese de moléculas energéticas. Rao (2006b) demonstrou que alterações na atividade da ALP resultam em sérios danos tanto à estrutura como o funcionamento celular. Por estar diretamente ligada a membrana celular e facilmente exposta a alterações ambientais, estudos quantitativos de alterações na cinética enzimática são utilizados como indicadores de contaminação, como o método na detecção de zinco, baseado na ativação da ALP, proposto por Satoh (1991).

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram resposta considerável no intestino do indivíduo controle, como pode ser constatado pela atividade específica. Esta elevada atividade permite considerar o importante papel desempenhado pela enzima, no que se refere ao transporte de aminoácidos defosforilação de compostos importantes na célula, entre outros. Entretanto, os indivíduos expostos ao biocida, independente da concentração, apresentaram redução na atividade, com valores inibitórios em torno de 65,3%. Esta inibição permite considerar possível dano tecidual, perturbações no sistema de transporte

celular, com mobilização de lisossomas e culminando com a necrose celular (Rao, 2006a).

Outros pesquisadores têm relatado alterações na atividade da fosfatase alcalina em várias situações, como Peterson (1980), que considera o excesso de fosfato presente na água, como redutor por competição, da atividade enzimática. Da mesma forma, ensaios realizados com agroquímicos em *Oreochromis niloticus* por Virgens (2009), resultaram em inibição da ALP, porém com valores menores daqueles do presente estudo.

Por outro lado, a enzima também pode apresentar resposta de ativação como o descrito por Atli e Canli (2007), ao exporem *Oreochromis niloticus* aos metais pesados.

5.3.2. Atividade enzimática em *Tradescantia pallida*

5.3.2.1. Fosfatase ácida (Exposição sistêmica) na folha de *Tradescantia pallida*

Os resultados apresentados demonstram o potencial inibitório do látex, utilizado como moluscicida nos ensaios realizados com imersão do caule seccionado. Independente do tempo de exposição, 8 ou 30 horas, a inibição foi semelhante entre eles, porém elevada quando comparado ao controle. Estes resultados são consistentes com os descritos por Skrebsky et al., (2008) ao estudarem plantas da espécie *Pfaffia glomerata*, expostas a concentrações crescentes de cádmio.

Por outro lado, o tratamento por aspersão foliar da DL₅₀, não resultou em diferenças nas atividades enzimáticas, em qualquer tempo de exposição. Esta resposta pode ser atribuída à anatomia foliar, que impede maior contato da solução com a estrutura interna da célula. Este fato é relevante ao ser considerado a forma de aplicação do moluscicida.

Outro aspecto a ser considerado é a função da fosfatase ácida, descrita por Saeed et al. (1990) como enzimas responsáveis pela hidrólise de uma grande variedade de ésteres de ortofosfato, atuantes em reações de transfosforilação e importante reguladora do metabolismo vegetal.

Os resultados inibitórios, comprovados no presente estudo, são consistentes com os descritos por Kong et al. (1998) ao comprovarem a ação dos

halogeno-benzenos sobre da atividade específica da fosfatase ácida em culturas de *Selenastrum capricornutum*.

Embora não tenha sido registrado diferença significativa entre os tratamentos de 8 e 30 horas, por imersão do caule, Dantzger et al. (2008) demonstraram declínio progressivo na atividade, ao exporem *Daphnia similis* a CE₅₀ em tempo que variaram de 24 a 48hs ao acefato, comprovando uma toxicidade proporcional ao tempo de exposição.

A ativação enzimática observada neste estudo antagoniza com aqueles obtidos por Krohling (2010), que constatou inibição da ACP em espécimes de *Coffea canephora* expostos, por aspersão foliar, a mistura de Chlorantraniliprole e Thiamethoxam, defensivos agrícolas muito utilizados no controle de pragas.

5.3.2.2. Catalase (Exposição sistêmica) na folha de *Tradescantia pallida*

Variações nos parâmetros cinéticos da Catalase estão relacionadas à defesa antioxidante de radicais livres gerados no organismo. Estas variações contribuem para a caracterização do processo de estresse ambiental em indivíduos de um ecossistema (Atli e Canli, 2007).

Ao analisar resposta enzimática da catalase à exposição do caule ao látex de *Euphorbia milii* var. *splendens* foi observada uma ativação no ensaio de 8 horas, indicando aumento nos níveis de radicais livres em *Tradescantia pallida*. Este comportamento enzimático pode ser explicado pelos estudos de Chance et al. (1979) ao demonstrar que a catalase, juntamente com a superóxido dismutase, constitui sistema de redução do teor de superóxido e peróxido de hidrogênio gerado na célula. Tal proposta é reforçada por Lissi et al. (1991), ao demonstrar que o estresse oxidativo se caracteriza por aumento na concentração de espécies oxidantes, e, portanto elevação nos riscos de danos teciduais.

Entretanto, com aumento no tempo de ensaio, foi possível observar redução na resposta ativadora do látex, em *Tradescantia pallida*, tanto que a atividade retornou ao valor basal do controle. Este comportamento está de acordo com relatos de inibição enzimática pelo excesso de agente estressor, o que supera a capacidade de resposta do vegetal, no equilíbrio de geração e consumo das espécies reativas do oxigênio.

O aumento da atividade observada no presente estudo está de acordo com os descritos por Krohling (2010) ao utilizar agroquímicos em solo, no controle de pragas em plantas de café Conilon. O mesmo autor descreve ainda inibição da catalase em elevadas concentração dos agroquímicos aplicados no solo.

Registros de inibição total da catalase foram descritos por Beffagna e Lutz (2007) ao utilizarem o fusicoccin, uma fitotoxina produzida pelo fungo *Fusicoccum amygdali*, que se mostrou potente inibidor da catalase, quando utilizada em ensaios com células de *Arabidopsis thaliana*.

A aspersão foliar pelo látex de *Euphorbia milii* var. *splendens* não resultou em qualquer alteração na atividade da catalase, mesmo após exposição de 96 horas, o que pode ser explicado pela capacidade do vegetal em restabelecer seu equilíbrio metabólico e/ou por causa da rápida fotodegradação do látex de *E.milii* conforme descreveram Oliveira-Filho e Paumgarten (1997).

5.4 Micronúcleos em *Tradescantia pallida*

O uso de plantas superiores, como *Tradescantia pallida*, na detecção de agentes ambientais com potencial mutagênico tem-se mostrado um mecanismo eficiente, pelo fato das plantas serem mais sensíveis aos agentes antropogênicos do que os animais, conforme descrito por Carvalho (2005).

No presente estudo, os resultados demonstraram efeito genotóxico nos indivíduos expostos ao látex, por 8 horas, quando comparados ao controle, o que comprova a eficácia do teste Trad-MCN no processo de identificação dos danos genéticos, induzidos pelo látex de *Euphorbia milii*, mesmo em pouco tempo de exposição. Por outro lado, o vegetal exposto durante 30 horas ao látex, apresentou maior frequência de micronúcleos, o que demonstra o efeito cumulativo do biocida na média de ocorrência da anomalia.

Segundo Rodrigues (1999), exposições de 30 horas, sem período de recuperação, é método recomendado em procedimentos com baixas concentrações de ingredientes ativos, metodologia adotada no presente estudo e que permite melhor análise da resposta do vegetal. Estes resultados são semelhantes aos observados por Villalobos et al. (1986), em estudos realizados com dicromato de potássio, substância capaz de elevar a frequência de micronúcleos em *Tradescantia pallida*.

A indução de danos ao material genético em *Tradescantia pallida* é também promovida por outras substâncias, inclusive pelos poluentes presentes no ar atmosférico. Esta abordagem é importante pelo fato da espécie ser planta ornamental facilmente encontrada em ambientes onde estão expostas a todo tipo de agente poluidor. Por isso, muitos pesquisadores fazem uso do vegetal no biomonitoramento da qualidade ambiental nos grandes centros urbanos (Du Four et al, 2005; MleÍK et. al., 2007)

Testes realizados por Silva et al. (2009) com *Allium cepa*, expostas a 2 g/L de solução de látex de *Euphorbia milii*, não resultou em qualquer alteração na frequência de anomalias, E, embora seja considerada uma planta tóxica, neste trabalho, não se detectou nenhuma ação genotóxica.

A combinação dos testes enzimáticos com os de micronúcleo em *Tradescantia pallida*, permite caracterizar a ação do látex permitem claramente distinguir os maiores efeitos toxicológicos no período de exposição de 8 horas, remetendo como justificativas para tal resultado, a fotodegradação do látex e falência dos sistemas de defesa. Este resultado pode sugerir tanto a diminuição da toxicidade do látex com o tempo e/ou o desmonte das estruturas celulares de manutenção da integridade, quanto a regeneração das estruturas celulares em adaptação ao estímulo..

5.5. *Pseudokirchneriella subcaptata*

Segundo Oliveira-Filho e Paumgarten (2000) doses de até 100mg/L de látex de *Euphorbia milii*, não causaram qualquer inibição no crescimento de sobre algas *Pseudokirchneriella subcaptata*, descrevendo IC₅₀ de 0,34mg/L.

Concordando com os dados acima descritos, os efeitos do látex de *Euphorbia milii* observados nesta pesquisa demonstraram inibição significativa no crescimento da população de *Pseudokirchneriella subcaptata*, sugerindo toxicidade aquática considerável para todas as concentrações testadas. Portanto o derrame ou contaminação do látex em *E. milii* nas concentração da DL₅₀ de 4,67g/L ou superiores é desaconselhada para as situações que possam expor o meio aquático a acidentes.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos realizados na presente pesquisa permitem afirmar a eficácia do látex de *Euphorbia milii*, como moluscicida para o caramujo gigante africano (*Achatina fulica*). Sua ação atinge o complexo metabólico celular causando efeito deletério nos organismos expostos.

Seu uso, no entanto, não pode ser realizado de forma indiscriminada, uma vez que na concentração letal para *Achatina fulica*, o látex provoca efeitos de toxicidade em organismos terrestres e aquáticos.

Estudos *in situ* devem ser realizados de forma complementar com o presente estudo para suprirem a necessidade de informações, garantindo a segurança ambiental.

REFERÊNCIAS

- Aebi H** (1984) Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*. **105**: p.121-126.
- Afonso-Neto I S, Bessa E A and Soares G L G** (2010) Avaliação da atividade moluscicida do látex de três espécies de *Euphorbia* (Euphorbiaceae) sobre *Leptinaria unilamellata* d'Orbigny, 1835 (Gastropoda - Subulinidae). *Rev. bras. plantas med.v.* **12**: p. 90-95.
- Araujo J L B** (1989) Moluscos de importância econômica no Brasil: I. Xanthonychidae: *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821). (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata, Stylommatophora). *Rev. Bras. Zool.v.* **06**: p. 583-592.
- Arias, ARL., Buss, DF., Albuquerque, C., Inácio, AF., Freire, MM., Egler, M., Mugnai, R. and Baptista, DF.** (2007). Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. *Ciência e saúde coletiva*, v. **12(1)**: p. 61-72.
- Atli G, Canli M** (2007) Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **145**: p. 282-287.
- Avilez I M, Hori T S F, Almeida L C, Hackbarth A, Bastos Neto J C, Bastos V L F C & Moraes G** (2008) Effects of phenol in antioxidant metabolism in matrinxã, *Brycon amazonicus* (Teleostei; Characidae). *Comparative Biochemistry and physiology Part C* **148**: p. 136-142.
- Bainy A C D, Saito E, Carvalho P S M & Junqueira V B C** (1996) Oxidative stress in Gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. *Aquatic Toxicology* **34**: p. 151-162.
- Barred A J** (1972) Lysosomal enzymes. In: Dingle, J.T. (Ed.), *Lysosomes: A Laboratory Handbook*. North-Holland, Amsterdam. p. **46-135**.
- Beffagna N, Lutz I** (2007) Inhibition of catalase activity as an early response of *Arabidopsis thaliana* cultured cells to the phytotoxin fusaric acid. *J. Exp. Bot.* **58(15-16)**: p. 4183-4194.
- Bessa E C A, Araújo J L B** (1995) Oviposição, tamanho de ovos e medida do comprimento da concha em diferentes fases do desenvolvimento de *Subulina octona*

(Bruguière) (Pulmonata, Subulinida) e em condições de laboratório. Revista Brasileira de Zoologia.v. **12(3)**: p. 647-654.

Blaise C, Forget G, Trottier S (2000) Toxicity screening of aqueous samples using a cost-effective 72-h exposure *Selenastrum capricornutum* assay. Technical Methods, **15**: 352-359.

Brainy C D A, Saito E, Carvalho S M P, Junqueira B C V (1996) Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. Aquatic Toxicology, v. **34**: p. 151-162.

Brasil (2005) Ministério da Saúde. Caramujo gigante (*Achatina fulica*) e os riscos à saúde – acessado em 10 de março de 2010 http://portal.saude.gov.br/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21979. Disponível em : <<http://portal.saude.gov.br/saude/visualizartexto.cfm?idtxt=21979>>

Brasil (2010) Ministério do Meio Ambiente. Espécies Exóticas Invasoras. <http://www.mma.gov.br>. 12 jul. 2010. Disponível em < <http://www.mma.gov.br/sitio/index.php?ido=conteudo.monta&idEstrutura=174/>>

Carvalho H A (2005) A Tradescantia como bioindicador vegetal na monitoração dos efeitos clastogênicos das radiações ionizantes. *Radiol Bras* [online]. v. **38(6)**: p. 459-462.

Carvalho O S, Teles H M S, Mota E M, Mendonça C L G F de, Lenzi H L (2003) Potentiality of *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca: Gastropoda) as intermediate host of the *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Céspedes 1971. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. [online]. v. **36(6)**: p. 743-745.

Chance B, Sies H, Boveris A (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian tissues. *Physiol. Rev.* **159**: p. 527-605.

Chang C P (2002) *Bradybaena similaris* (Férussac) (Bradybaenidae) as a pest on grapevines of Taiwan. pp.241- 244. In: BARKER, G.M.(ed.). Molluscs as crop pests. Miaoli,CAB International.

Cogo A J D; Siqueira A F, Ramos A C, Cruz Z M A, Silva A G (2009) Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. Natureza on line. **07**: p. 37-42.

Crestani M, Menezes C, Gluszczak L, Miron dos S D, Spanevello R, Silveira A, Gonçalves F F, Zanella, Loro V L (2007) Effects of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver satfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. *Chemosph.* **67**: p. 2305-2311.

Dams R I (2006) Pesticidas: Usos e perigos à saúde e ao meio ambiente. *Revista Saúde e Ambiente/ Health and Environment Journal.* v. **7(2)**: p. 37-44.

Dantzger M D; Dantzger D D, Prestes E B, Jonsson C M, Aoyama H (2008) Estudos de toxicidade de agroquímicos na atividade da fosfatase 'ácida de *Daphnia similis*. *Revista Ecotoxicologia,* **(1)**: p. 18-06.

Davis M A, Thompson K (2000) Eight ways to be a colonizer; two ways to be an invader: a proposed nomenclature scheme for invasion ecology. *ESA Bull.* **81**: p. 226-230.

Di Giulio R T (1989) Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environ. Toxicol. Chem.* **8**: p. 1103-1123.

Du Four V A, Janssen C R, Brits E & Van Larebeke N (2005) Genotoxic and mutagenic activity of environmental air samples from different rural, urban and industrial sites in Flanders, Belgium. *Mut. Res., Amsterdam,* v. **588(2)**: p. 106-117.

Edwards R, Dixon D P, Walbot V (2000) Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci.* **5**: p. 193-198.

Egaas E (2000) Effects of atrazine, endosulfan and butylated hydroxyanisole on glutathione-S-transferases in *Orthosia gothica*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* **127**: p. 117-122.

El-Gendy K S, Radwan M A, Gad A F (2009) In vivo evaluation of oxidative stress biomarkers in the land snail, *Theba pisana* exposed to copper-based pesticides, *Chemosphere.* V. **77(3)**: p. 339-344.

Elumalai M, Antunes C, Guilhermino L (2007). Enzymatic biomarkers in the crab *Carcinus maenas* from the Minho River estuary (NW Portugal) exposed to zinc and mercury. *Chemosphere.* **66**: p. 1249–1255.

Espinola L A, Ferreira J J H (2007) Espécies invasoras: conceptos, modelos y atributos. **32**: p. 580-585.

Ferreira M I, Rodrigues G S, Paulo M D (2003) *In Situ* Monitoring of Mutagenicity of Air Pollutants in São Paulo City Using *Tradescantia*-SHM Bioassay. Brazilian Archives of Biology and Technology. v.**46(2)**: p. 253-258.

Ferreira P, Soares G L G, D'Avila S, Bessa E C A (2009). The influence of caffeine and thymol on the survival, growth and reproduction of *Subulina octona* (Brugüière, 1789) (Mollusca, Subulinidae). *Braz. arch. biol. technol.* [online]. v. **52(4)**: p. 945-952.

Ferreira-Cravo M, Ventura-Lima J, Sandrini J Z, Amado L L, Geracitano L A, Rebelo M, Bianchini A, Monserrat J M (2009) Antioxidant responses in different body regions of the polychaeta *Laeonereis acuta* (Nereididae) exposed to copper, *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. **72(2)**: p. 388-393.

Fischer M L, Simião M S, Colley E, Zenni R D, Silva D A T & Latoski N (2006) O Caramujo exótico invasor na vegetação nativa em Morretes, PR: diagnóstico da população de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 em um fragmento de Floresta Ombrófila Densa Aluvial. *Biota Neotrópica*. **6(2)**: p 0-0.

Gadzala-Kopciuch R, Berecka B, Bartoszewicz J, Buszewski B (2004) Some Considerations About Bioindicators in Environmental Monitorin. *Polish Journal of Environmental Studies*. v **13(5)**: p. 453-462.

Grant W F (1999) Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations—a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. v **426(2)**: p. 107-112.

Habig W H, Pabst M J, Jakoby W B (1974) Glutathione S-transferases – The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249**. p. 7130-7139.

Hamilton M A, Russo R C, and Thurston R V (1977) The trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* **11**. (In press.)

Huang Z, Chen Y, Zhao Y, Zuo Z, Chen M, Wang C (2005) Antioxidant responses in *Meretrix meretrix* exposed to environmentally relevant doses of tributyltin, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v.**20(1)**: p. 107-111

- Huggett R J, Kimerly R A, Mehrle P M & Bergman H L (eds)** (1992) Biomarkers: biochemical, physiological, and histological marker of antropogenic stress. USA: Lewis Publishers.
- Jonsson C M, Aoyama H** (2007) In vitro effect of agriculture pollutants and their joint action on *Pseudokirchneriella subcapitata* acid phosphatase. v **69**: p. 849-855.
- Kong F X, Hu W, Liu Y** (1998) Molecular structure and biochemical toxicity of four halogeno-benzenes on the unicellular green alga *Selenastrum capricornutum*, Environmental and Experimental Botany, v. **40(2)**: p 105-111.
- Kono Y, Fridovich I** (1982) Superoxide radical inhibits catalase. J. Biol. Chem. **257**:p 5751-5754.
- Krohling C A.** (2010) *Efeito de inseticidas nos aspectos enzimáticos e fisiológicos em plantas de café Conilon (Coffea canephora) e na microbiota do solo.* Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ecossistemas Dissertação de Mestrado Centro Universitário Vila Velha-ES.
- Lissi E A, Videla L A, Gonzaleiz-Flecha B, Giulivi C, Boveris A** (1991) Metabolic regulation in oxidative stress: An overview. In: David, J. A., ed. *Oxidative damage and repair. Chemical biological and medical aspects.* Oxford: Pergamon Press: p. 444 - 448.
- Livingstone D** (2003) Biotechnology and pollution monitoring: Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. J Chem Tech Biotech **57**: p. 195-211
- Liu C Yu K, Shi X, Wang J, Lam PK, Wu RS, Zhou B.** (2007) Induction of oxidative stress and apoptosis and PFOS and PFOA in primary cultured hepatocytes of freshwater tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquatic. Toxicol. **82**: p. 135-143.
- Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, Randall R** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem, **193**: p. 265-275
- Luchini L C, Raetano C G, Antuniassi U R** (2004) Dinâmica ambiental dos agrotóxicos. In: Qualidade em tecnologia de aplicação. Botucatu: Fepaf, p. 36-39.
- Martins L** (2009) Variações bioquímicas em *Oreochromis niloticus* (tilápia), in situ, em região com despejo de efluente da indústria de polpa de celulose tipo Kraft. Revista Saúde e Ambiente. V. **10**: 1021 07

Mello-Silva C C, Vasconcellos M C de, Pinheiro J, Rodrigues M L A (2006) Physiological changes in *Biomphalaria glabrata* say, 1818 (Pulmonata: Planorbidae) caused by sub-lethal concentrations of the latex of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B (Euphorbiaceae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* [online]. v.**101(1)**: p. 3-8.

Mleík M et al. (2007) In situ biomonitoring of the genotoxic effects of mixed industrial emissions using the *Tradescantia* micronucleus and pollen abortion tests with wild life plants: demonstration of the efficacy of emission controls in an eastern European city. *Environ. Pollut., Barking*, v. **142(2)**: p. 459-466.

Miron D S (2009) Respostas Metabólicas e Enzimáticas Em Jundiás *Rhamdia quelen* (Heptapteridae) e Piavas *Leporinus obtusidens* (Anostomidae) Expostos a Herbicidas Utilizados na Cultura do Arroz Irrigado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Tese de Doutorado Universidade Federal de Santa Maria RS

Moreira-Santos M, Amadeu M V M, Soares R R (2004) An in situ bioassay for freshwater environments with the microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v **59 (2)**: p 164-173.

Moreno I, Pichardo S, Jos A, Gómez-Amores L, Mate A, Vazquez CM, Cameán AM. (2005) Antioxidant enzyme activity and lipid prooxidation in liver and kidney of rats exposed to microcystin-LR administered intraperitoneally. *Toxicol.* **45**: p. 395-402.

Moyle P B, Ellsworth S (2004) Alien invaders. Em Moyle P, Kelt D (Eds.) *Essays on wildlife conservation*. <http://marinebio.org/Oceans/Conservation/Moyle>. 12 dez. 2010. Disponível em <http://marinebio.org/Oceans/Conservation/Moyle.%2012%20dez.%202010>.

Nascimento C A A, Arévalo E, Afonso-Neto I S, Bessa E C A & Soares G L G (2006) Efeito do extrato aquoso de folhas de *Allamanda cathartica* L. (Apocynaceae) sobre *Bradybaena similis* (Férussac, 1821)(Mollusca, Bradybaenidae) em condições de laboratório *Revista Brasileira de Zociências* **8(1)**: 77-82.

Oliveira A E S, Machado C J S (2009) Quem é quem diante da presença de espécies exóticas no Brasil? Uma leitura do arcabouço institucional-legal voltada para a formulação de uma Política Pública Nacional. *Ambient. soc., Campinas*, v. **12 (2)**: p. 373-387.

Oliveira-Filho E C, De-Carvalho R R, Paumgarten F J R (1999) The influence of environmental factors on the molluscicidal activity of *Euphorbia milii* latex. *J. Environ. Sci. Health B* **34(2)**: 289-303.

Oliveira-Filho E C, Paumgarten F J R (1997) Photodegradation of the Molluscicidal Latex of "Crown-of-Thorns" (*Euphorbia milii* var *hislopilii*). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **92**: 657-659.

Oliveira-Filho E C, Paumgarten F J R (2000) Toxicity of *Euphorbia milii* Latex and Niclosamide to Snails and Nontarget Aquatic Species. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* **46**: 342-350.

Otitoloju A, Olagoke O (2011) Lipid peroxidation and antioxidant defense enzymes in *Clarias gariepinus* as useful biomarkers for monitoring exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons pp 1-9 *Environ Monit Assess.* Jan 7. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21213039.

Panigrahi A, Raut S K (1994) *Thevetia peruviana* (Family: Apocynaceae) in the Control of Slug and Snail Pests. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **89(2)**: 247-250.

Peakall D (1992) *Animal Biomarker as Pollution Indicators.* Chapman and Hall, London, pp: 291.

Petterson K (1980). Alkaline phosphatase activity and algal surplus phosphorus as phosphorus-deficiency indicators in Lake Erken. *Hydrobiologia*, **89**, 54-87.

Pimentel D, McNair S, Janecka J, Wightman J, Simmonds C, O'Connell C, Wong E, Russel L, Zern J, Aquino T & Tsomondo T (2001) Economic and environmental threats of alien plant, animal, and microbe invasions. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v. **84(1)**: p. 1-20.

Possamai F P (2005) Estudo do estresse oxidativo em órgãos de ratos wistar adultos induzidos à intoxicação por malation - Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais (Mestrado) da Universidade do Extremo Sul Catarinense, na área de concentração de Ecologia e Gestão de Ambientes Alterados. Criciúma

Rao J V (2006a) Sublethal effects of an organophosphorus insecticide (RPR-II) on biochemical parameters of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. **143**. p. 492-498.

Rao J V (2006b) Biochemical alterations in euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus* exposed to sub-lethal concentrations of an organophosphorus insecticide, monocrotophos. *Chemosphere*, v. **65**, p. 1814–1820.

Regoli F, Nigro M, Orlando E (1998) Lysosomal and antioxidant responses to metals in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. *Aquatic Toxicology* **40**:375-392.

Rodrigues A C F (2009) “Estudo de variações bioquímicas e morfológicas induzidas por pesticidas organofosforado e carbamato em tilápia (*Oreochromis niloticus*) e cascudo (*Pterygoplichthys anisitsi*), como biomarcadores de contaminação ambiental.” 81f. Dissertação de Mestrado. São José do Rio Preto.SP.

Rodrigues G S (1999) Bioensaios de toxicidade genética com *Tradescantia*. Embrapa Meio Ambiente, Documentos 14, Jaguariúna, SP, Brasil, 1999

Saeed A, Tremori E, Manao G, Camici G, Cappugi G, Ramponi G (1990) Bovine brain low Mr acid phosphatase: purification and properties. *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR*.**22 (2)**, 81-94.

Satoh I (1991) An apoenzyme thermistor microanalysis for zinc (II) ions with use of an immobilized alkaline phosphatase reactor in a flow system. *Biosens Bioelectron* **6(4)**, 375–379.

Schall V T, Vasconcellos M C, Rocha R S, Souza C P, Mendes N M (2001) The control of the schistosom-transmitting snail *Biomphalaria glabrata* by the plant Molluscicide *Euphorbia splendens* var. *hislop* (syn *milli* Des. Moul): a longitudinal field study in an endemic area in Brazil, *Acta Tropica*, Volume **79**, Issue 2, 25 May 2001, Pages 165-170.

Silva S A Ribeiro, S G; Bender, A E N; Timm, F C; Garcias, G da L; Martino-Roth, M da G. (2009) Estudo da atividade mutagênica das plantas, *Euphorbia millii* Des Moulins e *Ricinus communis* L através do teste de *Allium cepa*. *Rev. bras. farmacogn.* [online]. v.**19(2a)**: p. 418-422.

Skrebsky E C, Tabaldi L A, Pereira L B, Rauber R, Maldaner J, Cargnelutti D, Gonçalves J F, Castro G Y, Shetinger R C, Nicoloso F T (2008) Effect of

cadmium on growth, micronutrient concentration, and δ -aminolevulinic acid dehydratase and acid phosphatase activities in plants of *Pfaffia glomerata*. Brazilian Journal of Plant Physiology, v. **20(4)**: p. 285-294.

Sukumaran D, Parashar B D, Gupta A K; Jeevaratnam K; Prakash S (2004) Molluscicidal effect of nicotinanilide and its intermediate compounds against a freshwater snail *Lymnaea luteola*, the vector of animal schistosomiasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. **99(2)**: p. 205-210.

Teles H M S, Fontes L R (2002) Implicações da introdução e dispersão de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 no Brasil. Boletim do Instituto Adolfo Lutz **12**: 3-5.

Teles H M S, Vaz J F, Fontes L R, Domingos M F (1997) Registro de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca, Gastropoda) no Brasil: caramujo hospedeiro intermediário de Angiostrongilíase. Revista de Saúde Pública, **31**: 310-312.

Thom R, Dixon D P, Edwards R, Cole D L, Laphorn A J (2001) The structure of a zeta class glutathione *S*-transferase from *Arabidopsis thaliana*: characterisation of a GST with novel active-site tyrosine catabolism. J. Mol. Biol. **308**: 949–962.

USEPA (2002) Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving water to freshwater organisms. Fourty Edition. Washington, D.C. (EPA-821-R-02-13). 335p.

Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen N P E (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ. Toxicol. Pharmacol. **13**: 57–149.

Vasconcellos M C de, Pile E (2001) Ocorrência de *Achatina fulica* no Vale do Paraíba, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Rev. Saúde Pública* [online]. v **35(6)**: p. 582-584.

Vasconcellos M C, Amorim A (2003) Activity of *Euphorbia Splendens var hislopilii* N.E.B.(Euphorbiaceae) Latex against *Lymnaea columella* (Say, 1817) (Pulmonata: Lymnaeidae), Intermediate Host of *Fasciola hepatica*, Linnaeus, 1758 (Trematoda: Fasciolidae). 2: Limited Field-testing Memórias do Instituto Oswaldo Cruz Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz. v **98(7)**: p. 981-985.

Vasconcellos M C, Santos J A A, Silva I P, Lopes, F E F, Schall V T (2003), Molluscicidal activity of crown of christ (*Euphorbia splendens* var. *hislopii*) (Euphorbiaceae) latex submitted to pH variation. *Braz. Arch. Biol. Technol.*v. **46**: 415-429.

Venturini F P, Cruz C, Pitelli R A (2008) Toxicidade aguda do sulfato de cobre e do extrato aquoso de folhas secas de nim para o caramujo (*Pomacea canaliculata*). *Acta Sci. Biol. Sci*, v. **30(2)**: p. 179-184, 2008.

Villalobos P, Gómez R, Arroyo S, Flores-Márquez A R, Cisneros A (1986) *Tradescantia*-micronucleus test on potassium Revista Internacional de Contaminación Ambiental, v **2(1)**: p. 63-70.

Virgens, A C (2009) Biomarcadores enzimáticos, hematológicos e histológicos em tilápiado-Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.) em resposta à exposição ao acefato, difenoconazol e sulfluramida / Adriana Canal das Virgens. 2009. 113 f.: il.

Woo S, Yum S, Park H S, Lee T K, Ryu J C (2009) Effects of heavy metals on antioxidants and stress-responsive gene expression in Javanese medaka (*Oryzias javanicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, **149**: 289-299.