

NOTA SOBRE A CL_{50} DE BHC À *NERITINA VIRGINICA*

Eduinetty Ceci Pereira Moreira de SOUSA^{1*}; Rosa Penha dos SANTOS²;
Norival PEREIRA¹ & Luiz Roberto TOMMASI^{1,3}

1 Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo

2 Instituto de Geociências da Universidade de São Paulo

3 CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

Synopsis

The LC_{50} of *Neritina virginica* (gastropod) to hexachlorocyclohexane ($C_6H_6Cl_6$) was determined. A series of experiments was prepared during a period of 96 hours using different hexachlorocyclohexane concentrations. The LC_{50} to *Neritina virginica* was 1,482 mg hexachlorocyclohexane/l.

Descriptors: Gastropods, Toxicity tests, Lethal limits, BHC, *Neritina virginica*.

Descritores: Gastrópodes, Testes de toxicidade, Concentração letal, BHC, *Neritina virginica*.

Introdução

O uso de pesticidas sintéticos, especialmente organoclorados, tem representado uma importante fonte de poluentes de origem química para as comunidades aquáticas naturais (Ruivo, 1972).

Alguns inseticidas são considerados perigosos, por matarem organismos mesmo em concentrações extremamente baixas (Negherbon, 1959), enquanto outros manifestam sua ação por serem altamente resistentes à degradação física e microbiana (Wilkinson *et al.*, 1964; Croker & Wilson, 1965) ou por serem capazes de se acumular nos sistemas biológicos (Butler, 1968a).

Os animais aquáticos que vivem próximo às praias, ou nas praias, podem ser atingidos por pesticidas, devido a serem eles transportados pelos sistemas de drenagem até seus habitats, onde podem se acumular (Butler 1966, 1968a).

Resultados de estudos com inseticidas em organismos marinhos demonstram que concentrações insuficientes para o controle de muitas espécies de insetos inclusive vários mosquitos de "salt-marshes"**, matam ou imobilizam crustáceos, peixes e moluscos (Eisler 1969;

1970a e 1970b), matam ovos e larvas de moluscos bivalves (Davis, 1961), induzem mudanças deletérias na composição do tecido de moluscos (Eisler & Wenistein, 1967) e teleosteos (Eisler & Edmunds, 1966; Eisler, 1967) e interferem no desenvolvimento do ovário de moluscos (Eisler, 1970a) e teleosteos (Boyd, 1964).

Os moluscos têm grandes vantagens como animais-teste: são fáceis de serem coletados; especialmente o gastrópode *Neritina virginica*, freqüente na região do manguezal do Estuário de Santos. Podem ser mantidos em laboratório, até produzirem larvas que têm sido utilizadas em bioensaios (FAO, 1977). Entretanto, ao lado destas vantagens, encontrou-se a desvantagem de o animal possuir concha, o que o isola do meio ambiente e dificulta a observação.

Apesar do conhecimento da limitação que o animal oferece, optou-se pelo uso de *Neritina virginica*, por não serem conhecidos testes de toxicidade ao BHC para esta espécie, de ampla distribuição tropical (Keen, 1971).

O objetivo do experimento realizado foi o de estabelecer a CL_{50} para o pesticida organoclorado hexaclorociclohexano (BHC) e observar o comportamento dos animais sobreviventes após o período de testes. Para isso, foram realizados vários testes preliminares em intervalos de diferentes concentrações de BHC e, a partir destes, estabeleceu-se o intervalo-limite de sensibilidade dos organismos.

(*) Aluna do Curso de Pós-Graduação do Instituto Oceanográfico.

(**) "Salt-marshes" representam a região coberta por vegetais, geralmente fanerógamos, na zona entre-marés superior do estuário (McDonald & Barbour, 1974).

Material e métodos

Área de coleta do animal-teste

Os animais foram coletados no manguezal que circunda o Canal de Bertioga (24°5'S; 46°10'W), na Ilha de Santo Amaro, Município do Guarujá, São Paulo (Fig. 1).

Há no local uma alta densidade destes animais, os quais, na maré baixa, são facilmente capturados sobre folhas de *Spartina* sp. ou no fundo, próximo aos caules desta planta.

Para as três coletas realizadas, a variação de salinidade da água do local foi de 20 a 24‰.

Segundo a CETESB (1978), o teor de BHC no Estuário de Santos varia desde traços até 0,56µg/l.

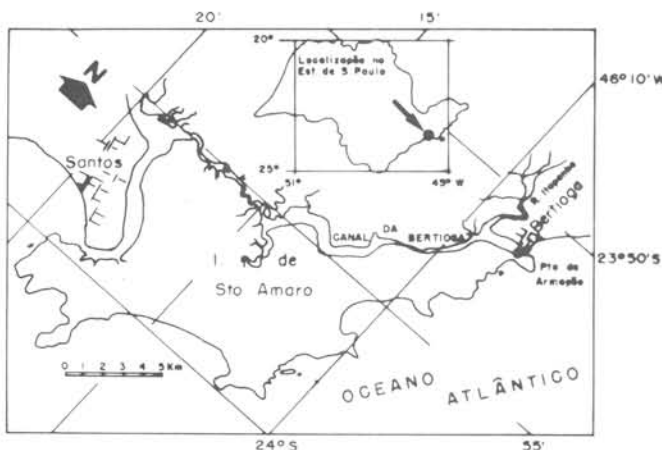


Fig. 1. Detalhe reduzido da carta náutica n. 1701 (DHN), com indicação da posição de coleta de *Neritina virginica*.

Metodologia

Após a coleta, os animais-teste foram transportados para aquários do laboratório do Instituto Oceanográfico da USP, onde permaneceram por período de uma semana em fase de aclimação, em água do mar retirada do próprio local de coleta. Foram, nesse período, alimentados com uma mistura de algas planctônicas.

A substância tóxica utilizada no teste foi o pesticida hexaclorociclohexano (BHC) de procedência da I.R.F. Matarazzo, com grau técnico de 12% do isômero gama. A concentração foi considerada 100% desse isômero, visto que os demais têm poder tóxico reduzido. O material tóxico foi solubilizado em acetona P. A., numa concentração de 2%.

O período de testes foi de 96 horas. Foram realizados vários testes em três

faixas-limite de concentração de BHC. Na primeira série de testes, as concentrações usadas foram: 0,0; 0,0010; 0,0056; 0,0100; 0,0560 mg/l. Na segunda série de experimentos, as concentrações de BHC usadas foram: 0,0; 0,5600; 1,0000; 5,6000; 10,0000 e 25,0000 mg/l. E na terceira, as concentrações de BHC foram: 0,0; 1,1200; 1,3000; 1,5000; 1,7400 e 2,0000 mg/l.

Para realização dos testes foram utilizados frascos Erlenmeyer de 1.000 ml. Os animais foram transportados para estes recipientes, onde foi colocada água do mar filtrada em filtro Millipore HA a temperatura ambiente que, no período de testes, variou entre 21 e 24°C; esta temperatura foi registrada para os aquários-teste e para os controles. A salinidade da água foi mantida a mesma da água local, isto é, entre 20 e 24‰, não havendo maior variação durante o teste. O pH foi mantido ao redor de 7,6. A água dos aquários foi aerada mecanicamente. Utilizou-se 10 animais para cada frasco.

Foram realizadas observações de 24 em 24 horas. Em cada observação, os animais foram retirados dos frascos-teste e colocados em placas de Petri com água do mar filtrada em filtro Millipore HA, para ser verificado se os animais estavam vivos ou mortos; o animal vivo abria seu opérculo após alguns minutos neste meio.

Depois de cada série de experimentos, os animais sobreviventes foram colocados em aquários com água do mar, com a alimentação já descrita, e aeração adequada. Foram observados pelo período de uma semana para avaliação de sua recuperação.

Resultados

Foram realizados experimentos preliminares com diferentes concentrações de BHC, a fim de ser determinada a faixa de concentração deste produto químico onde pudesse ser calculada a CL₅₀ para *Neritina virginica*, desde que não havia referências bibliográficas anteriores.

A primeira série de testes foi realizada com as concentrações de BHC variando entre 0,0 e 0,1000 mg/l.

A porcentagem de morte após 96 horas foi 0; após o teste, os sobreviventes foram colocados em aquário, com água do mar retirada do local de coleta, alimentados, arejados e observados durante uma semana. Durante este período, não foi constatada morte dos animais.

Para a segunda série de experimentos, as concentrações de BHC usadas foram as que variaram entre os limites de 0,0 a 25,000 mg/l. Na observação, após 24 horas de teste, verificou-se morte de 100% dos animais nas concentrações de 5,600, 10,000 e 25,000 mg/l de BHC.

A partir destes experimentos, estabeleceu-se as concentrações-limite de BHC para o teste de toxidez aguda e cálculo da CL₅₀; estas concentrações variaram entre 1,120 e 2,000 mg/l de hexaclorociclohexano.

Para os quatro experimentos realizados neste limite de concentração, obteve-se dois "pontos de morte" dos animais (Tab. 1): um, na concentração de 1,300 mg/l de BHC com 60% de morte; e outro, na concentração de 2,000 mg/l, com 90% de morte.

Após o teste de 96 horas, os animais sobreviventes foram colocados em aquários e observados pelo período de uma semana. Neste período, todos os sobreviventes das concentrações de 1,300, 1,500, 1,740 e 2,000 mg/l de BHC morreram, enquanto que 50% dos sobreviventes da concentração 1,120 mg/l continuaram vivos.

A CL₅₀ foi calculada a partir da análise de regressão linear dos dados obtidos. O valor calculado para 50% de morte em *Neritina virginica* foi 1,4815 mg/l de BHC. O valor obtido para o coeficiente de correlação linear de Pearson (r) foi 0,6703 que, para o teste de hipótese de Student(t), foi aceito.

Discussão

É relativamente simples determinar o nível de poluente que causa reações tóxicas agudas; como, por exemplo, estabelecer uma quantidade de pesticida requerida para matar uma espécie de animal em um dado período de tempo. Mas é mais difícil, e mais importante, determinar níveis crônicos de substâncias químicas

presentes no ambiente; neste caso, a substância em concentrações subletais pode interferir com o crescimento ou reprodução sem, muitas vezes, poder ser identificada (Butler, 1968).

O conhecimento da sensibilidade de moluscos a substâncias tóxicas foi um dos fatores para a escolha de *Neritina virginica* na realização de uma série de fatores-teste para determinação de doses letais de BHC.

Em todos os experimentos realizados na faixa de concentração estabelecida para a determinação da CL₅₀, obteve-se uma alta porcentagem de morte de indivíduos (60%), a uma concentração intermediária de BHC, e 90% de morte, em concentração mais elevada.

Nos experimentos realizados com *Neritina virginica*, observou-se que os animais colocados nas concentrações mais baixas (1,120 e 1,300 mg/l) do pesticida permaneciam deslocando-se pelo frasco, perdendo apenas a capacidade de subir e ficar na interface ar-água como os animais-controle.

Nas três concentrações mais altas de poluentes (1,500, 1,740 e 2,000 mg/l), entretanto, logo após serem colocados no frasco-teste, os animais fecharam seus opérculos. Segundo Keen (1971), gastrópodes do gênero *Neritina* têm um opérculo perfeitamente adaptável à abertura da concha, fechando-a em condições adversas do meio ambiente.

Nos experimentos realizados, as concentrações mais altas de poluentes condicionaram o fechamento do opérculo dos animais. Este comportamento isola o animal do meio ambiente, apenas permitindo, provavelmente, pequena absorção de pesticidas quando este abria a concha para inspecionar o meio, ou através da água ao encher sua concha e banhar sua câmara respiratória ao ser o animal colocado no frasco-teste.

Este comportamento peculiar é um fator limitante para o uso de *Neritina virginica* e de outros gastrópodes para teste de toxidez aguda, embora estes animais apresentem vantagens já enumeradas.

Resumo

Uma série de experimentos foi realizada com o objetivo de estabelecer a CL₅₀ para o molusco gastrópode *Neritina virginica* em relação ao hexaclorociclohexano conhecido, comercialmente, como

Tabela 1. Porcentagem de morte de *Neritina virginica* em presença de BHC nas concentrações variando de 1,120 a 2,000 mg/l

Concentrações	% morte 24 horas	% morte 48 horas	% morte 72 horas	% morte 96 horas	% morte total
0,000	0	0	0	10	10
1,120	10	0	0	0	10
1,300	0	0	20	40	60
1,500	10	0	0	10	20
1,740	30	0	10	0	40
2,000	50	10	10	20	90

BHC (Europa) e HC (EUA). As concentrações usadas de BHC variaram entre os limites de 1,120 a 2,000 mg/l e os experimentos tiveram a duração de 96 horas. O valor obtido de CL₅₀ 96 horas para *Neritina virginica* foi de 1,482 mgBHC/l.

Referências bibliográficas

- BOYD, C. E. 1964. Insecticides cause mosquito fish to abort. *Progve Fish Cult.*, 26(3):26-138.
- BUTLER, P. A. 1966. The problem of pesticides in estuaries. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 95(4), suppl:110-115.
- 1968a. Pesticides in the estuary. *Proc. Marsh Estuary Management*, Baton Rouge, La:120-124.
- 1968b. Pesticide residues in estuarine mollusks. *Proc. natn. Symp. Estuar. Pollut.*, Stanford, Ca., Stanford Univ., :107-121.
- CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). 1978. *Polluição das águas no Estuário e Baía de Santos*. São Paulo, CETESB, 2 v.
- CROKER, R. A. & WILSON, A. J. 1965. Kinetics and effects of DDT in a tidal marsh ditch. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 94(2):152-159.
- DAVIS, H. C. 1961. Effects of some pesticides on eggs and larvae of oysters (*Crassostrea virginica*) and clams (*Venus mercenaria*). *Comm1 Fish. Rev.*, 23(12):8-23.
- EISLER, R. 1967. Tissue changes in puffers exposed to methoxychlor and methyl parathion. *Tech. Pap. U.S. Fish Wildl. Serv.*, (17):1-15.
- 1969. Acute toxicities of insecticides to marine decapod crustaceans. *Crustaceana*, 16(3): 302-310.
- EISLER, R. 1970a. Latent effects of insecticide intoxication to marine mollusks. *Hydrobiologia*, 36(3/4): 345-352.
- 1970b. Acute toxicities of organochlorine and organophosphorus insecticides to estuarine fishes. *Tech. Pap. U.S. Bur. Sport Fish Wildl.*, (46):1-12.
- & EDMUNDS, P. H. 1966. Effects of eudrin on blood and tissue chemistry of a marine fish. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 95(2):153-159.
- & WENISTEIN, M. P. 1967. Changes in metal composition of the quahaug clam, *Mercenaria mercenaria* after exposure to insecticides. *Chesapeake Sci.*, 8(4):253-258.
- FAO. 1977. *Manual of methods in aquatic environment research*. Part. 4. Bases for selecting biological tests to evaluate marine pollution. *FAO Fish. tech. Pap.*, (164):1-31.
- KEEN, A. M. 1971. *Sea shells of tropical west America*. 2nd ed. California, Stanford University Press, 1064 p.
- MCDONALD, K. B. & BARBOUR, M. G. 1974. Beach and salt marsh vegetation of the North American Pacific Ocean. *In: Reimold, R. J. & Queen, W. H., ed. - Ecology of halophytes*. London, Academic Press, p.175-234.
- NEGHERBON, W. O. 1959. *Handbook of toxicology*.
- RUIVO, M., ed. 1972. *Marine pollution and sea life*. London, Fishing News Book, 624 p.
- WILKINSON, A. T.; FINLAYSON, D. G. & MORLEY, H. V. 1964. Toxic residues in soil 9 years after treatment with aldrin and heptachlor. *Science, N.Y.*, 146(3607):681-682.

(Recebido 05-out-1981;
aceito 24-nov-1982)