

SUELLEN CAROLINA SOUZA

**ESTUDO TOXICOLÓGICO DO BIOINSETICIDA BIODEGRADÁVEL ATÓXICO  
(BBA) DA UNIVILLE: EFEITO FOTODINÂMICO SOBRE ORGANISMOS  
AQUÁTICOS DULCÍCOLAS**

JOINVILLE

2012

SUELLEN CAROLINA SOUZA

**ESTUDO TOXICOLÓGICO DO BIOINSETICIDA BIODEGRADÁVEL ATÓXICO  
(BBA) DA UNIVILLE: EFEITO FOTODINÂMICO SOBRE ORGANISMOS  
AQUÁTICOS DULCÍCOLAS**

Dissertação de mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente da Universidade da Região de Joinville. Biotecnologia.  
Orientador: Prof. Dr. Gilmar Sidnei Erzinger.  
Coorientadora: Profa. Dra. Therezinha Maria Novais de Oliveira.

JOINVILLE

2012

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

S729e Souza, Suellen Carolina  
Estudo toxicológico do bioinseticida biodegradável atóxico (BBA) da UNIVILLE : efeito fotodinâmico sobre organismos aquáticos dulcícolas / Suellen Carolina Souza ; orientador Dr. Gilmar Sidnei Erzinger – Joinville: UNIVILLE, 2012.

80f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente – Universidade da Região de Joinville)

1. Ecotoxicologia aquática. 2. Bioinseticida. 3. Bioinseticida Biodegradável Atóxico da UNIVILLE (BBA – UNIVILLE). 4. Organismos aquáticos dulcícolas. 5. Toxicologia. 6. Doenças parasitárias humanas. I. Erzinger, Gilmar Sidnei (orient.). II. Título.

CDD 615.9

*Dedico este trabalho aos  
apaixonados pela pesquisa,  
aos que descobrem e redescobrem  
fatos importantes para o  
crescimento científico da humanidade.*

## AGRADECIMENTOS

Em todos os trabalhos que já tive contato, esta parte sempre inicia com agradecimentos a Deus, pois Ele, juntamente com a nossa dedicação, é o grande responsável de todos os acontecimentos em nossa vida. Obrigada Jesus pela oportunidade de poder aprimorar meus conhecimentos nesta passagem em vida terrena.

Agradeço ao meu pai Joel Souza e ao meu noivo Gleyson Maba que nunca me abandonaram e sempre me apoiaram. A ambos o meu profundo e sincero amor e carinho.

Aos meus professores Dr. Gilmar Sidnei Erzinger, na qualidade de orientador e Dra. Therezinha Maria Novais de Oliveira, na qualidade de coorientadora, pela dedicação e orientação prestada durante o período de pesquisa.

Ao meu amigo e Mestre Lineu Del Ciampo por ter me ofertado, juntamente com meu orientador, a oportunidade de estagiar na Alemanha em 2009, e aproveito para agradecer a Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg/Deutschland por ter me acolhido e possibilitado o meu aprendizado durante os meses de estágio.

Aos Doutores Donat-Peter Häder, Peter Richter e Sebastian M. Strauch que tornaram possível a minha experiência na Alemanha e que hoje, juntamente com meu orientador, continuam em favor do progresso científico.

À Fundação 25 de Julho por ceder o espaço físico e as amostras de peixes para a realização de parte dos experimentos.

Às meninas do Laboratório de Ecotoxicologia da UNIVILLE, Beatriz, Cláudia e Aline pelo apoio, pelo auxílio na coleta dos dados e pelas conversas.

Ao grupo de pesquisa em Ecotoxicologia Aquática, em especial à Carla Keite Machado pela realização das culturas das cepas de *E. gracilis* e por realizar parte dos meus experimentos em minha ausência.

Ao Fundo de Apoio à Pesquisa da UNIVILLE, que forneceu a bolsa durante todo o período de curso para que eu pudesse realizar mais esta etapa da minha vida com sucesso.

Por fim, a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desta pesquisa.

*“Católico, evangélico, budista, espírita ou ateu,  
todo mundo busca a paz interna,  
estamos aqui para ser lanterna.  
Foi assim que Ele escreveu, palavras e palavras,  
e ainda acham o Deus do outro não pode ser o meu.”*

*O Teatro Mágico*

## RESUMO

Em 2009, a UNIVILLE realizou um trabalho em parceria com os pesquisadores Dr. Donat Peter Häder e Dr. Gilmar Sidnei Erzinger, protocolando junto ao INPI o registro de patente do Bioinseticida Biodegradável Atóxico da UNIVILLE (BBA-UNIVILLE). Este novo produto, já com patente nacional e internacional, tem a propriedade de eliminar vetores de doenças humanas e de animais em ambientes aquáticos e possui a atividade fotodinâmica como princípio ativo. Possui fácil e barato método de extração, podendo ser aplicado em larga escala. A absorção máxima da maioria dos fotossensibilizadores está localizada na gama UV e visível, de modo que a radiação solar - que é abundante nos países tropicais e subtropicais como o Brasil - pode ser empregada como um agente natural para ativar as substâncias depois de terem sido aplicadas aos ambientes. Todo ano, milhares de pessoas morrem com os efeitos das doenças parasitárias humanas (por exemplo, malária), que muitas vezes são combatidas com o uso de inseticidas tóxicos (por exemplo, DDT). Os bioinseticidas já possuem eficácia comprovada na eliminação de vetores de doenças. A toxicologia está relacionada a efeitos tóxicos de substâncias químicas, que pode ser mensurado através de testes agudos e crônicos. O objetivo do presente estudo foi determinar o CL<sub>50</sub> (para efeito agudo) e o CEO (para efeito crônico) do bioinseticida da UNIVILLE sobre organismos aquáticos dulcícolas, visando à utilização desta substância em larga escala em baixas concentrações para substituir os inseticidas tóxicos na eliminação de vetores, criando-se um bioinseticida biodegradável atóxico. A metodologia de produção e conservação do BBA-UNIVILLE segue em sigilo segundo as regras do INPI. Foram utilizados neste estudo, larvas de peixes (*Cyprinus* sp. e *Astyanax bimaculatus*) com ensaios de toxicidade aguda e micro-organismos (*Daphnia similis* e *Euglena gracilis*) com ensaios agudos e crônicos. Para larvas de peixes utilizou-se uma metodologia com microcosmos composto de 6 lâmpadas mistas de 250 Wats, produzindo aproximadamente 300 W/m<sup>2</sup>, e potes plásticos contendo 1 litro de água com 10 exemplares das espécies testadas. Os organismos foram incubados na ausência de luz por 3 horas após a adição do bioinseticida e, posteriormente, permaneceram o mesmo período expostos aos microcosmos com luz solar simulada. Para *D. similis* utilizou-se a ABNT-NBR 12713 para ensaios de toxicidade aguda com microcrustáceos e metodologia adaptada para o crônico, sendo que para agudo e crônico de *E. gracilis*, utilizou-se a ferramenta de biomonitoramento em tempo real NGTOX. Os exemplares mortos foram considerados afetados pela ação fotossensibilizadora do bioinseticida. Os valores obtidos de CL<sub>50</sub> e CEO para os organismos testados indicam a necessidade de testes mais abrangentes, mesmo que apenas 2 mg/L do produto seja suficiente para eliminar larvas de vetores de doenças humanas, *D. similis* apresentou valores muito próximos a esta faixa. Estudos com outros organismos devem ser realizados para que se possa afirmar a utilização segura do produto em larga escala.

**Palavras-chave:** Ecotoxicologia Aquática. Bioinseticida. Organismos Dulcícolas.

## ABSTRACT

In 2009, UNIVILLE carried out work in partnership with researchers Dr. Donat Peter Häder and Dr. Gilmar Sidnei Erzinger by filing with the National Institute of Industrial Property (INPI) of the patent registration of Bioinsecticide Biodegradable Nontoxic UNIVILLE (BBN-UNIVILLE). This new product, as with national and international patent, has the property to eliminate vectors of human disease and animals in aquatic environments and has the photodynamic activity as the active ingredient. It features easy and inexpensive method of extraction and can be applied on a large scale. The absorption maximum of most photosensitizers is located in the UV and visible range, so that solar radiation - that is abundant in tropical and subtropical countries such as Brazil - can be used as a natural agent to activate the substances after they have been applied to environments. Every year, thousands of people die from the effects of human parasitic diseases (eg malaria), which are often fought with the use of toxic insecticides (eg DDT). The insecticides have already proven effective in eliminating disease vectors. The toxicology is related to the toxic effects of chemical substances, which can be measured by testing acute and chronic. The aim of this study was to determine the LC<sub>50</sub> (for acute effect) and CEO (for chronic effect) of the insecticide UNIVILLE on freshwater aquatic organisms in order to use this substance on a large scale at low concentrations to replace toxic insecticides in the elimination of vectors, creating a biodegradable non-toxic insecticide. The methodology for production and conservation of BBN-UNIVILLE following confidential under the rules of the INPI. Were used in this study, fish larvae (*Cyprinus* sp. and *Astyanax bimaculatus*) with acute toxicity tests and micro-organisms (*Daphnia similis* and *Euglena gracilis*) with acute and chronic tests. For fish larvae, we used a methodology consisting of six microcosms mixed lamps 250 Wats, producing approximately 300 W/m<sup>2</sup>, and plastic pots containing 1 liter of water with 10 specimens of the species tested. The organisms were incubated in the dark for 3 hours after the addition of the insecticide and then remained the same period in microcosms exposed to simulated sunlight. To *D. similis* used the ABNT-NBR 12713 for acute toxicity tests with microcrustaceans and methodology adapted to the chronic, and for acute and chronic *E. gracilis*, used the tool in real time biomonitoring NGTOX. The dead specimens were considered affected by the photosensitizing action of the insecticide. The values of LC<sub>50</sub> and CEO for the organisms tested indicate the need for more comprehensive tests, even if only 2 mg/L of the product is enough to eliminate the larvae of vectors of human diseases, *D. similis* showed values very close to this range. Studies with other bodies should be made so that it can be said the safe use of product on a large scale.

**Keywords:** Aquatic Ecotoxicology. Bioinsecticide. Freshwater Organisms.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Mosquitêrica artesanal de garrafa PET (A) e larvitrapa (B).....	31
<b>Figura 2</b> – Inseto <i>Anopheles</i> , larva do mosquito (A) e mosquito adulto (B).....	33
<b>Figura 3</b> – Parasita <i>Plasmodium falciparum</i> (direito acima) em meio às hemácias de uma pessoa infectada.....	34
<b>Figura 4</b> – Registro mensal dos casos de malária na Amazônia Legal.....	34
<b>Figura 5</b> – Estádios do ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i> (A) e mosquito adulto (B).....	36
<b>Figura 6</b> – Comparação entre os casos notificados de dengue em 2009 e 2010 no Brasil, destacando o exemplo alarmante do estado de Goiás.....	37
<b>Figura 7</b> – Esquema de funcionamento e composição da ferramenta NG TOX (1-lâmpada LED, 2-cubeta, 3-microscópio, 4-câmera CCD, 5-água destilada, 6-solução mãe de BBA-Univille, 7-suspensão de <i>E. gracilis</i> , 8-10-bombas peristálticas, 11-câmera de mistura, 12-placa eletrônica e 13-computador).....	45
<b>Figura 8</b> – Exemplo de espécie nativa da bacia amazônica <i>Astyanax bimaculatus</i> (lambari, piaba) (A) e de espécie exótica da Europa/Ásia <i>Cyprinus carpio</i> (carpa comum) (B).....	48
<b>Figura 9</b> – Esquema estrutural destacando o estigma (A) e exemplar de <i>Euglena gracilis</i> (B).....	49
<b>Figura 10</b> – Anatomia da fêmea: 1- coração, 2- olho composto, 3- antenas, 4- ocellus, 5- pelos, 6- pernas e 7- bolsa para ovos (A) e exemplar de <i>Daphnia</i> sp. (B).....	50
<b>Figura 11</b> – Larva de <i>Cyprinus</i> sp. (carpa colorida) (A) e larva de <i>Astyanax bimaculatus</i> (lambari) (B).....	53
<b>Figura 12</b> – Tubos de ensaio devidamente identificados e suas réplicas.....	61
<b>Figura 13</b> – Copos plásticos utilizados no experimento, devidamente identificados.....	63
<b>Figura 14</b> – Estrutura com lâmpadas mistas (A) e estrutura com potes plásticos e sistema de aeração (B).....	65
<b>Figura 15</b> – Amostras no escuro (A), sob radiação solar simulada (B) e ao fundo os controles ainda cobertos com a lona (X).....	66
<b>Figura 16</b> – Porcentagem de inibição da motilidade de <i>Euglena gracilis</i> exposta ao BBA-UNIVILLE em ensaios agudos. $CL_{50} = 8,81$ mg/L.....	70
<b>Figura 17</b> – Porcentagem de inibição do r-value de <i>Euglena gracilis</i> exposta ao BBA-UNIVILLE em ensaios agudos. $CL_{50} = 14,70$ mg/L.....	71
<b>Figura 18</b> – Porcentagem de inibição do alinhamento de <i>Euglena gracilis</i> exposta ao BBA-UNIVILLE em ensaios agudos. $CL_{50} = 16,33$ mg/L.....	71
<b>Figura 19</b> – Porcentagem de inibição da forma de <i>Euglena gracilis</i> exposta ao BBA-UNIVILLE em ensaios agudos. $CL_{50} = 14,0$ mg/L.....	72
<b>Figura 20</b> – Porcentagem de inibição da velocidade média [ $\mu\text{m/s}$ ] de <i>Euglena gracilis</i> exposta ao BBA-UNIVILLE em ensaios agudos. $CL_{50} = 7,1$ mg/L.....	72

<b>Figura 21</b> – Porcentagem de inibição da motilidade de <i>Euglena gracilis</i> exposta ao BBA-UNIVILLE em ensaios crônicos com inibição média de 42,98 % em concentração de BBA-UNIVILLE de 7,1 mg/L.....	74
<b>Figura 22</b> – Porcentagem de inibição do r-value de <i>Euglena gracilis</i> exposta ao BBA-UNIVILLE em ensaios crônicos com inibição média de 42,98 % em concentração de BBA-UNIVILLE de 7,1 mg/L.....	75
<b>Figura 23</b> – Porcentagem de inibição do alinhamento de <i>Euglena gracilis</i> exposta ao BBA-UNIVILLE em ensaios crônicos com inibição média de 42,98 % em concentração de BBA-UNIVILLE de 7,1 mg/L.....	75
<b>Figura 24</b> – Porcentagem de inibição da compactação de <i>Euglena gracilis</i> exposta ao BBA-UNIVILLE em ensaios crônicos com inibição média de 42,98 % em concentração de BBA-UNIVILLE de 7,1 mg/L.....	76
<b>Figura 25</b> – Porcentagem de inibição da velocidade de <i>Euglena gracilis</i> exposta ao BBA-UNIVILLE em ensaios crônicos com inibição média de 42,98 % em concentração de BBA-UNIVILLE de 7,1 mg/L.....	76
<b>Figura 26</b> – Porcentagem de mortalidade de <i>Daphnia similis</i> exposta ao BBA-UNIVILLE em ensaios agudos por 48h em fotoperíodo. CL <sub>50</sub> = 8,87 mg/L. Cada ponto no gráfico corresponde a 20 exemplares, caracterizando uma amostra.....	78
<b>Figura 27</b> – Número médio de descendentes de <i>Daphnia similis</i> após 21 dias de teste toxicológico crônico em presença de diferentes concentrações de BBA-UNIVILLE.....	79
<b>Figura 28</b> – Porcentagem de mortalidade de larvas de <i>Cyprinus</i> sp. expostas ao BBA-UNIVILLE, com incubação de 3h na escuridão e 3h em exposição à luz solar simulada. CL <sub>50</sub> = 16,55 mg/L. Cada ponto no gráfico corresponde a 10 exemplares, caracterizando uma amostra.....	81
<b>Figura 29</b> – Porcentagem de mortalidade de larvas de <i>Astyanax bimaculatus</i> expostas ao BBA-Univille, com incubação de 3h na escuridão e 3h em exposição à luz solar simulada. CL <sub>50</sub> = 29,96 mg/L. Cada ponto no gráfico corresponde a 10 exemplares, caracterizando uma amostra.....	82

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Seletividade reativa do Bioinseticida Biodegradável Atóxico da UNIVILLE baseada na CL <sub>50</sub> de diferentes gêneros de mosquitos com 3h horas de incubação na luz.....	29
<b>Tabela 2</b> – Comparação das principais condições-teste entre ensaios agudos e crônicos (CEO= concentração de efeito observada; CENO= concentração de efeito não observada).....	42
<b>Tabela 3</b> – Organismos-teste utilizados no estudo e tipo de teste realizado com cada grupo.....	56
<b>Tabela 4</b> – Resultados do cálculo de toxicidade (CL <sub>50</sub> ) dos testes agudos para <i>Euglena gracilis</i> obtidos através do NGTOX.....	70
<b>Tabela 5</b> – Avaliação da toxicidade crônica sobre <i>Euglenas gracilis</i> por sete dias em diferentes concentrações de BBA-UNIVILLE obtida através do NGTOX.	74
<b>Tabela 6</b> – Média de descendentes gerados por <i>Daphnia similis</i> em experimentos de toxicidade crônica até 21 dias sob concentrações de BBA-UNIVILLE.....	78

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ABNT** – Associação Brasileira de Normas Técnicas.  
**ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária.  
**BBA-UNIVILLE** – Bioinseticida Biodegradável Atóxico da UNIVILLE.  
**Bt** – *Bacillus thuringiensis*.  
**Bti** – *Bacillus thuringiensis var. israelensis*.  
**CE<sub>50</sub>** – concentração de efeito a 50%.  
**CENO** – concentração de efeito não observada.  
**CEO** – concentração de efeito observada.  
**CL<sub>50</sub>** – concentração letal a 50%.  
**DDD** – dicloro difenil dicloroetano.  
**DDE** – dicloro difenil dietileno.  
**DDT** – dicloro difenil tricloroetano.  
**DIVE** – Diretoria de Vigilância Epidemiológica.  
**Embrapa** – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.  
**FIOCRUZ** – Fundação Osvaldo Cruz.  
**FUNASA** – Fundação Nacional de Saúde.  
**INOVAPARQ** – Parque Tecnológico de Joinville.  
**INPI** – Instituto Nacional de Propriedade Industrial.  
**ISO** – *International Organization for Standardization*.  
**mg/L** – miligramas por litro.  
**NGTOX** – *New Generation Ecotox*.  
**OMS** – Organização Mundial da Saúde.  
**PARA** – Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos.  
**PNCD** – Programa Nacional de Controle da Dengue.  
**POPs** – Poluentes Orgânicos Persistentes.  
**SPSS** – *Statistical Package for Social Sciences*.  
**SVS** – Secretaria de Vigilância em Saúde.  
**UFRJ** – Universidade Federal do Rio de Janeiro.  
**UNIVILLE** – Universidade da Região de Joinville.  
**WIPO** – *World Intellectual Property Organization*.  
**µg/ml** – microgramas por mililitro.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	
<b>ABSTRACT</b>	
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	
<b>LISTA DE TABELAS</b>	
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	20
2.1 OBJETIVO GERAL.....	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
<b>3 REVISÃO</b> .....	21
3.1 INSETICIDA.....	21
<b>3.1.1 Dicloro-difenil-tricloroetano (DDT)</b> .....	22
<b>3.1.2 Mecanismos de Contaminação do DDT</b> .....	23
3.2 CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS.....	26
<b>3.2.1 Bioinseticida</b> .....	26
<b>3.2.2 Bioinseticida Biodegradável Atóxico da UNVILLE</b> .....	28
<b>3.2.3 Outros Métodos de Controle de Pragas</b> .....	29
3.3 DOENÇAS PARASITÁRIAS HUMANAS.....	31
<b>3.3.1 Malária, um Problema Mundial</b> .....	33
<b>3.3.2 A Dengue no Brasil</b> .....	35
3.4 TOXICOLOGIA.....	38
<b>3.4.1 Histórico e Conceito</b> .....	38
<b>3.4.2 Testes Toxicológicos</b> .....	40
3.4.2.1 <i>New Generation Ecotox</i> .....	43
<b>3.4.3 Organismos-Alvo em Testes Ecotoxicológicos</b> .....	46
3.4.3.1 Organismos Aquáticos Dulcícolas.....	47
3.4.3.1.1 <i>Euglena gracilis</i> .....	48
3.4.3.1.2 <i>Daphnia similis</i> .....	50
3.4.3.1.3 Peixes.....	51
3.5 LEGISLAÇÃO.....	54
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	55
4.1 MÉTODO DE PESQUISA.....	55
4.2 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	55
<b>4.2.1 Organismos-teste</b> .....	55

4.2.1.1 Condições de Cultivo dos Organismos-teste.....	56
4.2.1.1.1 Condição de Cultivo de <i>Euglena gracilis</i> .....	56
4.2.1.1.2 Condição de Cultivo de <i>Daphnia similis</i> .....	56
4.2.1.1.3 Condição de Cultivo das Larvas de Peixes.....	57
<b>4.2.2 Solução-teste (BBA-UNIVILLE)</b> .....	<b>57</b>
<b>4.2.3 Condução Experimental</b> .....	<b>58</b>
4.2.3.1 Procedimentos para Determinação de Toxicidade em Micro-organismos.	58
4.2.3.1.1 Toxicidade Aguda para <i>Euglena gracilis</i> .....	58
4.2.3.1.2 Toxicidade Crônica para <i>Euglena gracilis</i> .....	59
4.2.3.1.3 Toxicidade Aguda para <i>Daphnia similis</i> .....	60
4.2.3.1.4 Toxicidade Crônica para <i>Daphnia similis</i> .....	61
4.2.3.2 Procedimento para Determinação de Toxicidade Aguda em Larvas de Peixes.....	64
<b>4.2.4 Análise Estatística dos Dados</b> .....	<b>66</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>68</b>
5.1 ANÁLISE TOXICOLÓGICA EM PRODUTORES PRIMÁRIOS.....	68
<b>5.1.1 Teste Agudo para <i>Euglena gracilis</i></b> .....	<b>69</b>
<b>5.1.2 Teste Crônico para <i>Euglena gracilis</i></b> .....	<b>73</b>
5.2 ANÁLISE TOXICOLÓGICA EM CONSUMIDORES PRIMÁRIOS.....	77
<b>5.2.1 Teste Agudo para <i>Daphnia similis</i></b> .....	<b>77</b>
<b>5.2.2 Teste Crônico para <i>Daphnia similis</i></b> .....	<b>77</b>
5.3 ANÁLISE TOXICOLÓGICA AGUDA EM CONSUMIDORES SECUNDÁRIOS (PEIXES).....	80
<b>5.3.1 <i>Cyprinus</i> sp. (Carpa Colorida)</b> .....	<b>80</b>
<b>5.3.2 <i>Astyanax bimaculatus</i> (Lambari)</b> .....	<b>82</b>
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>84</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>85</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) é o mais conhecido dentre os inseticidas do grupo dos organoclorados (D'AMATO *et al.*, 2002). Walser (2008) faz advertência sobre o perigo do produto, que foi desenvolvido em 1939 durante a Segunda Guerra Mundial e rendeu o Prêmio Nobel de Medicina, em 1948, ao suíço Paul Hermann Müller.

No início dos anos de 1970, o DDT foi proibido na maioria dos países industrializados. Em 2001, 122 países assinaram a Convenção de Estocolmo sobre poluentes orgânicos persistentes (POPs). A convenção, no entanto, abre uma exceção: o uso do DDT para combater o mosquito da malária é permitido, desde que não existam alternativas mais baratas e inofensivas. A Organização Mundial da Saúde (OMS) é uma defensora do uso do DDT e argumenta que o pesticida pode salvar vidas (WALSER, 2008).

A biota aquática é um reservatório de DDT, apresentando as maiores concentrações nos organismos de nível trófico mais elevado, comprovando o processo de biomagnificação através da cadeia alimentar. Existem peixes que não estão em níveis tróficos superiores, mas que poderão atingir altos níveis de contaminação, ao absorverem nutrientes que possuem grande carga de poluentes, por estes se associarem aos sedimentos do fundo (D'AMATO *et al.*, 2002).

De acordo com Walser (2008), os adversários do DDT propagam uma estratégia integrada: combate biológico às larvas, mosquiteiros impregnados e aspersão do ambiente, mas não com um inseticida tóxico, e sim com o inofensivo piretróide, que segundo Sant'anna *et al.* (2002), é um composto químico que apresenta eficácia comprovada no tratamento e controle de ectoparasitas.

Dentre as recomendações da *Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants* (2008), está a implementação de alternativas imediatas para o controle de vetores, principalmente da malária, que eliminem o uso de DDT. A biotecnologia está constantemente em avanço, e a Convenção recomenda ainda que é necessário um maior suporte financeiro para inovar tecnologias para este tipo de pesquisa.

A biotecnologia trata de um conjunto de tecnologias que utilizam sistemas biológicos, organismos vivos ou seus derivados para a produção ou modificação de produtos e processos para uso específico, bem como para gerar novos serviços de alto impacto em diversos segmentos industriais (BRASIL, 2007).

Atualmente, novos produtos biotecnológicos, menos agressivos ao meio ambiente e aos ecossistemas, vêm sendo utilizados para eliminar pragas domésticas (por exemplo, borrachudo) e agrícolas. São os chamados bioinseticidas, produtos produzidos a partir de matérias-primas naturais, utilizadas para controle biológico. Wandscheer (2010), cita que a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) desenvolveu um produto chamado Bti a partir de uma bactéria específica (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*) para controlar borrachudos (insetos), que se mostra eficaz e não prejudica a saúde humana e o meio ambiente.

Frente a esta nova ideia, a UNIVILLE em parceria com Dr. Donat Peter Häder e Dr. Gilmar Sidnei Erzinger, desenvolveu um novo produto denominado Bioinseticida Biodegradável Atóxico (BBA-UNIVILLE), que está sob registro junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI). O produto é capaz de eliminar diversos vetores de parasitas que possuem alguma fase de vida em ambientes aquáticos (ERZINGER; HÄDER, 2009 e 2010; WOHLLEBE *et al.*, 2009 e 2011). O mecanismo de atividade é baseado na liberação de oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), através

da interação com a luz de modo a gerar um estímulo genético que resultará na ativação da cascata de caspases (SETÚBAL, 2007). São proteínas sinalizadoras que resultarão na indução de apoptose por parte dos parasitas, acarretando em sua morte.

Certo número de parasitas humanos vive em ecossistemas aquáticos, pelo menos por algum tempo do seu ciclo de desenvolvimento. Doenças parasitárias como a malária (vetor *Anopheles* sp.), a dengue (vetor *Aedes aegypti*) e a esquistossomose (vetor *Schistosoma* sp.) são um flagelo para milhões de pessoas em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. A Organização Mundial da Saúde alerta para 300 milhões de casos de malária ocorrendo no mundo anualmente e cerca de 1 milhão de pessoas morrendo a cada ano com esquistossomose (CÂMARA *et al.*, 2007).

No tocante à dengue, um problema sério e muito difundido em saúde pública no Brasil, o Ministério da Saúde (2010) e sua Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), denomina de semana epidemiológica as primeiras semanas do ano, ocorrendo no verão, sendo essas as de maior ocorrência da doença, independente da região ou classe social. Somente nas nove primeiras semanas do ano de 2010, a SVS notificou 227.109 casos de dengue, sendo a região centro-oeste (47,9%) e o estado do Acre (1.732,4 casos por 100 mil habitantes) com maior número de registros. Muitas campanhas são realizadas em estados onde já foram registrados focos da doença, contudo a dengue deve ser prevenida de acordo com as recomendações da SVS.

Testes biológicos são importantes para o bom desenvolvimento de programas voltados ao controle de vetores de doenças. Rezende *et al.* (2004, p.186) destaca que esses testes devem “oferecer condições de medição do índice de mortalidade

dos mosquitos, estimar o alcance da operação e otimizar os tratamentos com inseticidas, visando minimizar os efeitos tóxicos nos organismos não-alvo”.

A toxicologia aquática, como descrevem Magalhães e Ferrão Filho (2008, p.355), “é uma ciência que surgiu para dar suporte no enfrentamento dos problemas de contaminação dos corpos d’água por compostos tóxicos”. A toxicidade de agentes químicos no meio hídrico é avaliada por meio de testes toxicológicos utilizando organismos representativos da coluna d’água ou do sedimento, seja de água doce, salobra ou marinha. O conhecimento da toxicidade desses compostos tóxicos a diferentes organismos aquáticos possibilita avaliar o impacto momentâneo que esses poluentes causam à biota aquática (ZAGATTO, 2008).

Segundo Magalhães e Ferrão Filho (2008), a toxicologia é uma ferramenta que pode ser utilizada antes ou após um evento de contaminação ter ocorrido, e Azevedo e Chasin (2003) complementam que tal ciência deve ser utilizada para prever a ecotoxicidade de novos compostos químicos, evitando assim a contaminação ambiental, onde se estabelece o foco do presente trabalho.

Na década de 1940, vários testes de toxicidade utilizando peixes foram recomendados, por apresentarem maior resistência aos agentes químicos, serem representativos do ambiente aquático e possuírem importância econômica (RAND, 1995). A aplicação dos testes de toxicidade na análise ambiental é bastante abrangente e sua importância aumenta na proporção que cresce a complexidade das transformações químicas no meio ambiente, pois somente os sistemas biológicos podem detectar os efeitos tóxicos das substâncias (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008).

A fim de eliminar o uso e a produção de substâncias tóxicas, como DDTs, que segundo a *Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants* (2008) ocorrerá

até 2020, no combate contra vetores de doenças, torna-se necessário a descoberta de novas substâncias alternativas não tóxicas que podem ser aplicadas no ambiente sem prejudicar outras formas de vida, até mesmo a humana.

Desta pesquisa partirá o incentivo para a descoberta de novas substâncias não tóxicas que substituirá o uso de inseticidas tóxicos. Espera-se que o bioinseticida não seja tóxico para a fauna aquática testada, podendo então expandir o tratamento fotodinâmico na eliminação de parasitas humanos, testando-o no meio ambiente em grande escala, e esclarecendo aos países que ainda fabricam e fazem uso de inseticidas tóxicos, assim como a população que é afetada por este fator.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

O estudo tem como principal objetivo a verificação do efeito toxicológico do Bioinseticida Biodegradável Atóxico da UNIVILLE (BBA-UNIVILLE) no tratamento fotodinâmico em organismos aquáticos dulcícolas.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) determinar a concentração do bioinseticida que poderá causar algum efeito nos organismos aquáticos testados;
- b) avaliar o tempo de exposição que os organismos poderão suportar a uma determinada concentração.

### 3 REVISÃO

#### 3.1 INSETICIDA

Inseticida é uma classe de produtos tóxicos largamente utilizados em muitos países no combate contra insetos, tanto na agricultura (pesticida, fungicida, bactericida e herbicida) quanto no ambiente doméstico, apesar da resistência a este produto ter sido documentada em mais de 100 espécies de mosquitos (DIEL *et al.*, 2003). Os mesmos autores fizeram um estudo sobre o uso de inseticidas domésticos, e revelaram um maior índice de uso dos produtos com um grupo químico chamado piretróide, um composto inofensivo à saúde humana, mas que de acordo com Rey (1991), quando da aplicação domiciliar deste composto, a duração do efeito é de três meses, sendo menor quando comparado ao uso de outros inseticidas.

Com componentes tóxicos, os pesticidas podem acarretar uma série de contaminações, que ocorrem tanto pontualmente como nas áreas adjacentes, podendo atingir até mesmo locais mais distantes do ponto de aplicação. Dependendo de suas características, os pesticidas podem permanecer em diferentes compartimentos ambientais, tais como atmosfera, solo, água de superfície e subterrânea, sendo os recursos hídricos (rios e lagos) os mais afetados (CABRERA *et al.*, 2008). Segundo Caldas e Souza (2000), o Brasil é o quarto maior mercado de pesticidas no mundo e o oitavo em uso por área cultivada. Isso significa que o brasileiro se alimenta de produtos cultivados com altos índices de contaminação, podendo causar efeitos crônicos adversos, inclusive induzir o câncer. Implantado em 2003 pela Associação Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o

Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) visa implantar ações de controle e avaliação da qualidade dos alimentos em relação aos resíduos de agrotóxicos (ANVISA, 2010).

### **3.1.1 Dicloro-difenil-tricloroetano (DDT)**

Dentre os inseticidas, destaca-se o DDT que D'Amato *et al.* (2002) definem como um composto organoclorado, altamente tóxico para o meio ambiente e para a saúde humana, com alta lipossolubilidade (solubilidade em gordura), baixa hidrossolubilidade (solubilidade em água), e segundo Guimarães *et al.* (2007), possui alta persistência e lenta degradação nos locais onde se acumula. Este inseticida possui dois principais metabólitos, o dicloro-difenil-dicloroetileno (DDE) e o dicloro-difenil-dicloroetano (DDD) que também possuem níveis de toxicidade elevados, podendo ser o DDE – mais resistente à degradação e mais persistente em organismos vivos – um indicador de exposição dos seres vivos (por exemplo, peixes) ao DDT (D'AMATO *et al.*, 2002).

O DDT é produzido atualmente por três países: Índia, China e Coréia, sendo que a Índia é a principal produtora e faz utilização assídua do produto. A produção global do inseticida para controle de vetores de doenças parasitárias humanas (por exemplo, malária) foi estimada em 4550 toneladas em 2003, e só na Índia em 2007 foram produzidas 6344 toneladas. Estima-se que 5 mil toneladas de DDT foram usados em 2005 para controlar vetores de doenças. Anualmente, são usadas entre 4 mil e 5 mil toneladas de DDT e muitos dos países que ainda usam DDT (África do Sul, Malásia, Zâmbia, Zimbábue), possuem legislação inadequada ou falta de capacidade para implementar regulamentos de uso do produto. Alguns países ainda

possuem estoque de DDT (Angola, Equador, Senegal), mas somente para o uso em uma eventual epidemia de malária (*STOCKHOLM CONVENTION ON PERSISTENT ORGANIC POLLUTANTS*, 2008). Historicamente, a América do Sul é o continente que houve o mais pesado uso de DDT (D'AMATO *et al.*, 2002).

No Brasil, o uso do inseticida em saúde pública está sob responsabilidade da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), em seu Programa Nacional de Controle de Vetores. A última aplicação do DDT feita pela FUNASA foi em 1990, para controle da Leishmaniose (CALDAS; SOUZA, 2000). Porém, a demanda por pesticidas vem se acentuando a cada ano na indústria agrícola, sendo o Brasil um dos maiores consumidores mundiais de pesticidas. O estado do Rio Grande do Sul em 2006 foi responsável por 10,4% do consumo nacional de pesticidas, devido à intensa atividade agrícola, com destaque para o cultivo de arroz irrigado (CABRERA *et al.*, 2008).

### **3.1.2 Mecanismos de Contaminação do DDT**

Com relação à contaminação, D'Amato *et al.* (2002) destacam que o DDT e seus metabólitos são rapidamente absorvidos pelos organismos, e as taxas de acumulação variam de acordo com a concentração (nível perigoso considerado pela *United States Food and Drug Administration* – é de 2000 ng/g), com as condições ambientais (por exemplo, temperatura) e com o tempo de exposição.

O referente inseticida é pouco absorvido pela pele humana, mas o homem pode ser contaminado por inalação (via respiratória) ou ingestão (via digestiva) de alimentos contaminados, atuando principalmente no sistema nervoso central. Estima-se que cerca de 90% do DDT retido nos humanos é proveniente da

alimentação. Dentre as várias complicações que a inalação do DDT pode causar, identificam-se: alterações de comportamento, convulsões, broncopneumonia, paralisia e até morte (dependendo da dose e do tempo de exposição). Destacam-se também efeitos hormonais, como inibição e até mimetização de hormônios importantes aos humanos (por exemplo, estrogênio). A eliminação do produto se dá pela urina e pelo leite materno, colocando bebês lactentes em elevada exposição. Mães que se alimentam de peixes contaminados com DDT também colocam em risco a saúde dos filhos que ainda amamentam (D'AMATO *et al.*, 2002). Pardi *et al.* (1993) citam que a proibição da fabricação e comercialização do produto se deu pela sua ocorrência em níveis tóxicos no leite e na carne.

Já os animais acumulam estes compostos pelos alimentos ou pelo meio circundante, sendo que a absorção no meio aquático é mais rápida do que no meio terrestre (D'AMATO *et al.*, 2002). A bioconcentração (concentração do composto é maior no organismo do que no meio abiótico (BURATINI; BRANDELLI, 2008)) de organoclorados é maior em peixes do que nos invertebrados. Já a bioacumulação (absorção do composto pelo organismo do meio abiótico ou biótico (BURATINI; BRANDELLI, 2008)) de DDT nos peixes provém dos organismos que eles consomem, acumulando-se no tecido adiposo. A biomagnificação (concentração do composto aumenta ao longo da cadeia alimentar (BURATINI; BRANDELLI, 2008)) possui grande influência sobre a posição que o animal ocupa na cadeia alimentar, quanto mais no topo da cadeia maior a contaminação, variando de acordo com o hábito alimentar (D'AMATO *et al.*, 2002).

Em regiões tropicais, a remoção de organoclorados do ambiente pode ser influenciada favoravelmente pela radiação solar e altas temperaturas, gerando volatilização e degradação, semelhante ao comportamento destes compostos em

regiões temperadas, sendo que a sua degradação é menor nas regiões polares, onde a bioacumulação e biomagnificação continuam ocorrendo, possivelmente, através da via atmosférica, uma importante rota de absorção dos organoclorados. Em ambientes aquáticos eutrofizados (grande concentração de biomassa e matéria orgânica (TUNDISI; TUNDISI, 2008)) a diluição dos organoclorados é maior, já que são compostos bioacumulativos (D'AMATO *et al.*, 2002), ocorrendo um aumento da toxicidade nestes ambientes (TUNDISI; TUNDISI, 2008).

Apesar da proibição do uso do DDT, muitos países continuam utilizando, e outros ainda prevêm a reintrodução do produto somente como estratégia de controle no vetor da malária. Ross (2005) aponta a relação entre o custo/benefício, os riscos e efeitos positivos desta proposta. O mesmo autor ressalta que em locais onde não há alternativas no controle de vetores, faz-se necessário um maior investimento em pesquisas que resultem em vacinas ou outros inseticidas contra a malária.

Alguns métodos alternativos ao DDT são avaliáveis. A *Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants* (2008), aponta 17 métodos alternativos, dentre eles 5 são químicos e 12 são não químicos. Em geral, os métodos químicos apresentam resistência e toxicidade, como por exemplo, os larvicidas químicos. Enquanto que a maioria dos métodos não químicos não oferece riscos e elimina os vetores em estágio larval, como redução da fonte, manipulação do hábitat ou design das estruturas de irrigação, no caso do setor agrícola.

Durante muitos anos, a utilização do DDT esteve, e ainda se encontra, voltada no combate contra vetores de doenças. No entanto, destaca Silva (1999) que o uso indiscriminado e pouco criterioso deste produto trouxe e continua trazendo problemas muito sérios para o ambiente e para a saúde humana.

## 3.2 CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS

O controle biológico existe na natureza, reduzindo naturalmente a população de mosquitos através da predação, do parasitismo, da competição e de agentes patógenos que produzem enfermidades e toxinas. Pesquisas estão sendo realizadas no sentido de utilizar o controle biológico, que teria a grande vantagem de minimizar os danos ambientais que os inseticidas comuns podem causar (FUNASA, 2001).

Ressaltam Alles *et al.* (2009/2010) que há uma grande dificuldade no controle populacional de mosquitos vetores, devido às suas características biológicas como curto ciclo de vida, alta capacidade reprodutiva e de adaptação ao ambiente. O controle, através do uso de inseticidas químicos tem apresentado problemas devido ao seu modo de ação não específico, além da possibilidade de rápida seleção de resistência fisiológica, genética e evolutiva de insetos a estes compostos. Por estas razões, a procura por agentes mais seletivos aumentou e, com isso, a adoção de métodos de controle biológico cresceu.

### 3.2.1 Bioinseticida

As toxinas bacterianas com atividade inseticida foram casualmente descobertas no século XIX (COSTA *et al.*, 2009/2010), levando o homem a pesquisar profundamente as bactérias frente ao crescente interesse pela utilização de bioinseticidas no controle de insetos prejudiciais (AZAMBUJA *et al.*, 2009/2010).

O gênero *Bacillus* é uma bactéria encontrada em substratos variáveis devido ao complexo enzimático produzido pelas células (COSTA *et al.*, 2009/2010). Os mesmos autores descrevem 6 espécies que diferem por características

entomopatogênicas (formação de endósporos e produção de toxinas). Dentre as espécies promissoras, *Bacillus thuringiensis* (Bt) oferece as melhores alternativas como bioinseticida, mostrando-se um bom candidato à obtenção de formulações comerciais, bem como à engenharia genética de plantas, sendo considerado o micro-organismo mais utilizado em controle biológico a nível mundial. As formulações podem ser específicas para controlar mosquitos transmissores, e portanto, segundo Andrade *et al.* (2007) é inofensiva à saúde humana e ao meio ambiente, podendo ser utilizada em locais que acumulam água, como plantas, lagos e caixas d'água, entre outros.

*Bacillus thuringiensis* é encontrada em todos os tipos de solos, ambientes aquáticos e em todas as regiões do mundo. Não possui um hábitat natural bem definido, sendo saprofítica, sem exigências nutricionais restritas podendo se adaptar a condições ambientais adversas (AZAMBUJA *et al.*, 2009/2010).

Pinto *et al.* (2009/2010), descrevem a toxicidade de Bt como a síntese de proteínas que atuam diretamente no intestino das larvas dos insetos, organismos alvo das formulações com tal bactéria. Denominadas proteínas Cry, podem ter seu efeito alterado pela radiação solar, temperatura e pH. Contudo, Lucho *et al.* (2009/2010), citam alguns estudos feitos com organismos não-alvo do bioinseticida, como aves e mamíferos. O levantamento feito pelos autores, inclusive ingestão por humanos, indica que as formulações com Bt não produzem efeito significativo e destacam ainda, que para chegarem ao mercado, os bioinseticidas devem passar por diferentes análises para confirmar a não toxicidade em organismos não-alvo, revelando o princípio da presente pesquisa.

### 3.2.2 Bioinseticida Biodegradável Atóxico da UNIVILLE

O primeiro estudo visando usar a atividade fotodinâmica com o objetivo de levar à morte vetores de doenças em ambientes aquáticos foi feito por Wohllebe *et al.* (2009). Através do uso de feoforbídeo, o estudo revelou que apenas 8,44 µg/mL eram capazes de eliminar 50% dos mosquitos do gênero *Culex*, transmissor da filariose, em apenas 3 horas de exposição à radiação solar, ou seja, baixas concentrações podem matar larvas de mosquitos em poucas horas de exposição à radiação solar. Baseado nos princípios da atividade fotodinâmica, Erzinger e Häder (2009 e 2010) em parceria com a UNIVILLE, desenvolveram um novo bioinseticida.

O Bioinseticida Biodegradável Atóxico da UNIVILLE, denominado BBA-UNIVILLE (ERZINGER; HÄDER, 2009 e 2010), teve seu registro de patente nacional protocolado junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), sob o nº. PI0922458-0, e em patente internacional junto ao *World Intellectual Property Organization* (WIPO), Estados Unidos, sob o nº. WO/2011/075805. Este novo produto tem a propriedade de eliminar vetores de doenças humanas e de animais em ambientes aquáticos e possui como princípio ativo a atividade fotodinâmica. O mecanismo de ação deste novo bioinseticida é o processo de apoptose, que é induzido pela formação de oxigênio singlete, o qual desencadeia a ativação do sistema de caspases ao ser absorvido e em presença de luz, causando a morte do vetor das doenças em fase aquática. Wohllebe *et al.* (2011), confirmaram tal mecanismo através de alguns derivados de clorofila sobre o controle de larvas de mosquitos em estudos realizados junto a Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, Alemanha, no Instituto de Farmacologia Clínica e Toxicologia.

Erzinger e Häder (2009 e 2010), testaram a eficiência do BBA-UNIVILLE em diferentes famílias de mosquitos. Para a família Chaoboridae, gênero *Chaoborus*, a concentração letal (CL<sub>50</sub>) foi de 22,25 µg/mL. Para os em mosquitos da família Culicidae, gênero *Culex* sp. ficou demonstrado que a CL<sub>50</sub> foi de 6,88 µg/mL, sendo que para o gênero *Aedes* a CL<sub>50</sub> foi de 2,34 µg/mL.

O BBA-UNIVILLE foi 18% mais eficiente para a família Chaoboridae quando da comparação com o feoforbídeo descrito por Wohllebe *et al.* (2009), revelando outro fato importante por parte deste novo produto, que é a sua seletividade específica para as diferentes famílias de mosquito em função da concentração a ser usada, como descrito na Tabela 1.

**Tabela 1** – Seletividade relativa do Bioinseticida Biodegradável Atóxico da UNIVILLE baseada na CL<sub>50</sub> de diferentes espécies de mosquitos.

<b>Séries Experimentais</b>	<b>CL<sub>50</sub> in µg/mL na presença de luz</b>	<b>Grau de eficiência</b>	<b>Diferença de concentração</b>
<i>Culex</i> sp. 3 h	6,88	3,23	69,08
<i>Aedes</i> sp. 3 h	2,34	9,51	89,48
* <i>Chaoborus</i> sp. 3 h	22,25	1,00	0,00

\*mosquito tido como referência.

Fonte: Erzinger e Häder (2009 e 2010).

### 3.2.3 Outros Métodos de Controle de Pragas

Práticas para controle de insetos são muito antigas, pois segundo Braga e Valle (2007), os chineses utilizavam o controle biológico há mais de 2000 anos direcionado ao enfrentamento de pragas agrícolas.

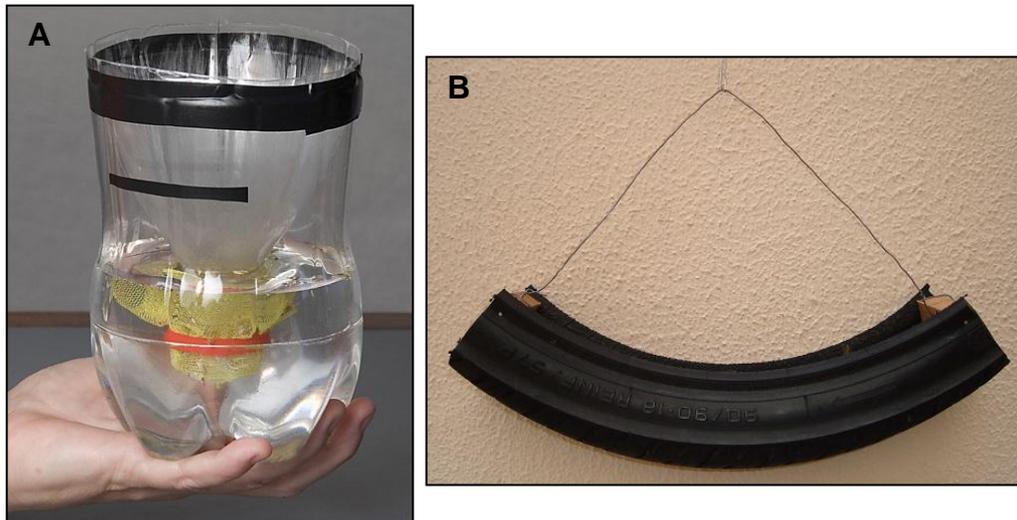
Atualmente são utilizados alguns inseticidas químicos, como cita Braga e Valle (2007): organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides, alguns deles já citados neste trabalho, sendo que alguns destes compostos estão presentes

nos repelentes comerciais. Conforme os mesmos autores, o uso continuado de inseticidas, tanto na agricultura e pecuária como na área da saúde pública, tem provocado o aparecimento de populações resistentes e ocasionado problemas para o controle de vetores.

Para tentar solucionar este problema de seleção de resistência, além das telas que protegem janelas e portas contra entrada de mosquitos, existe outro método artesanal para identificar e eliminar os vetores urbanos. Como reporta Zepeda (2008), o pesquisador Maulori Cabral da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), em parceria com a Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ), inventaram a mosquitérica (Fig. 1A), feita de material plástico (garrafa PET), fácil e econômico, que identifica os focos de mosquitos e os retém, além de contribuir para a reciclagem, retirando as garrafas PET do meio ambiente. Qualquer cidadão pode fazer e colocar em qualquer lugar da casa, desde que seja na sombra. O equipamento puramente artesanal funciona atraindo o mosquito com grãos em seu interior. O inseto deposita seus ovos perto da água, as larvas nascem, passam pela tela para alcançar o alimento, crescem e não conseguem voltar pela tela, ficando presas dentro da garrafa e morrem. O equipamento foi criado para tentar eliminar o mosquito transmissor da dengue (*Aedes aegypti*), porém, qualquer outra larva que necessite das mesmas condições que o antes citado, poderá cair nessa armadilha caseira.

A Diretoria de Vigilância Epidemiológica (DIVE, 2007) de Santa Catarina elaborou um Manual de Orientações Técnicas para Pessoal de Campo para controle do mosquito da dengue. Como ferramenta, os agentes de vigilância coletam semanalmente exemplares de mosquitos de uma larvitrapa (Fig. 1B) feita com pneu de moto que deve ser instalada onde não existam outras opções para a

postura da fêmea do *Aedes aegypti*. A finalidade da armadilha é detectar precocemente as infestações importadas. É um material de baixo custo que, além de identificar os focos do mosquito, auxiliam na eliminação do mesmo.



Fontes: [http://www.faperj.br/boletim\\_interna.phtml?obj\\_id=4424](http://www.faperj.br/boletim_interna.phtml?obj_id=4424) e DIVE (2007).

**Figura 1** – Mosquitérica artesanal de garrafa PET (A) e larvitampa (B).

### 3.3 DOENÇAS PARASITÁRIAS HUMANAS

Parasitismo é uma relação interespecífica (simbiose) negativa, em que indivíduos de uma espécie utilizam o corpo de outra espécie retirando o alimento dessa. Os indivíduos que se instalam no outro são os parasitas e os que abrigam são os hospedeiros (REY, 1991). Conforme o mesmo autor, os parasitas são patogênicos, ou seja, causam doenças graves nos seres humanos.

As doenças associadas com a água são classificadas em quatro categorias (TUNDISI; TUNDISI, 2008):

- a) doenças de organismos que se desenvolvem na água, tendo origem na mesma (ex: cólera);
- b) doenças de águas contaminadas (ex: leishmaniose);

- c) doenças causadas por vetores que se desenvolvem na água (ex: malária);
- d) doenças dispersadas pela água (ex: viroses).

A maioria das doenças parasitárias humanas é causada por vetores de veiculação hídrica, ou seja, parasitas que possuem pelo menos uma parte do seu ciclo de vida na água, como por exemplo, a malária, a dengue, a esquistossomose e a filariose (elefantíase). A transmissão da doença segundo Tundisi e Tundisi (2008), depende do ciclo de vida do vetor e podem ter seus efeitos exacerbados com alterações climáticas e, conseqüentemente, com mudanças climáticas globais.

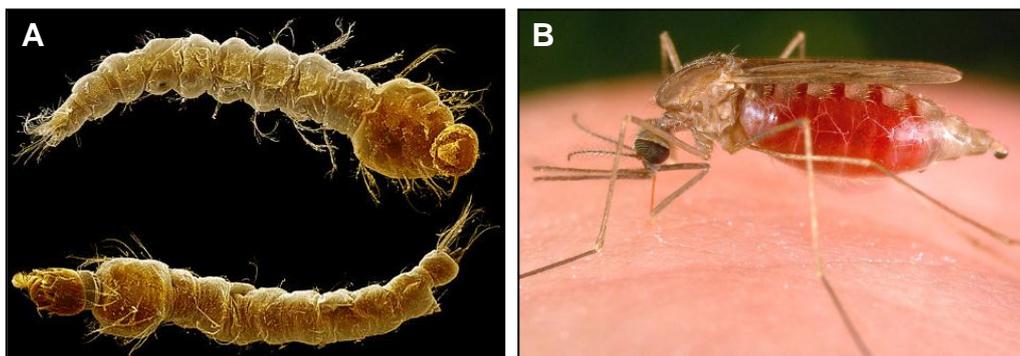
Doenças transmitidas por insetos vetores são muito difíceis de controlar. Salzano (2005, p. 67), ressalta que o problema se deve especialmente à “falta de vacinas efetivas, à irregularidade dos programas de saúde pública, ao desenvolvimento da resistência dos vetores aos inseticidas e dos parasitas às drogas”. É importante estabelecer novas estratégias de controle, sendo assim, o mesmo autor cita a produção de mosquitos transgênicos (introdução de um gene no vetor capaz de produzir atividade antimicrobiana) por pesquisadores norte-americanos. Porém, o custo/benefício deve ser cuidadosamente bem avaliado antes de lançar a idéia em saúde pública.

Um componente importante, mas frequentemente pouco valorizado no combate aos vetores é o manejo do ambiente, não apenas através daquelas ações integradas à pesquisa de focos e tratamento químico, tal como a eliminação e remoção de criadouros no ambiente domiciliar, mas também pela coleta do lixo urbano regular ou através de mutirões de limpeza, o que, na prática, tem sido feito apenas na vigência de epidemias (FUNASA, 2001).

### 3.3.1 Malária, um Problema Mundial

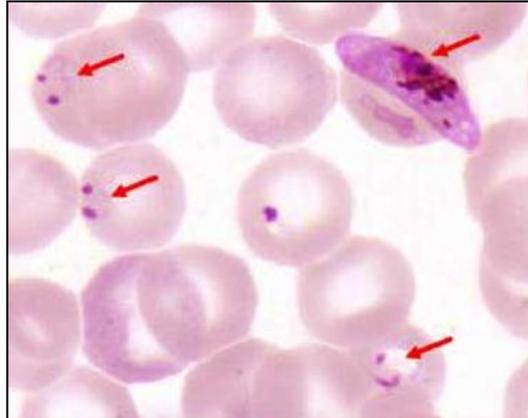
A malária, um típico exemplo de doença parasitária infecciosa, continua sendo um grande problema de saúde pública em diferentes regiões do mundo. As medidas tradicionais de controle da doença, consolidadas na campanha mundial de erradicação da mesma, foram bastante efetivas em países desenvolvidos e nas áreas desenvolvidas dos países em desenvolvimento (SILVEIRA; REZENDE, 2001).

A transmissão da doença ocorre através de mosquitos do gênero *Anopheles* (Fig. 2), insetos vetores que carregam consigo parasitas do gênero *Plasmodium*, sendo o *P. falciparum* (Fig. 3) causador do nível mais grave da doença. O parasita se aloca na corrente sanguínea durante a infecção, causando sintomas variados como febre, calafrios, cansaço, dores musculares e de cabeça, podendo culminar em morte quando confundida com uma virose e não sendo tratada de maneira adequada. Ainda não existe vacina contra malária disponível no mercado, mas já existem pesquisas em nível de laboratório no tocante ao desenvolvimento de vacina contra a doença (MARTINS *et al.*, 2008).



Fonte: [http://www.gasdetection.com/news2/health\\_news\\_digest27.html](http://www.gasdetection.com/news2/health_news_digest27.html)

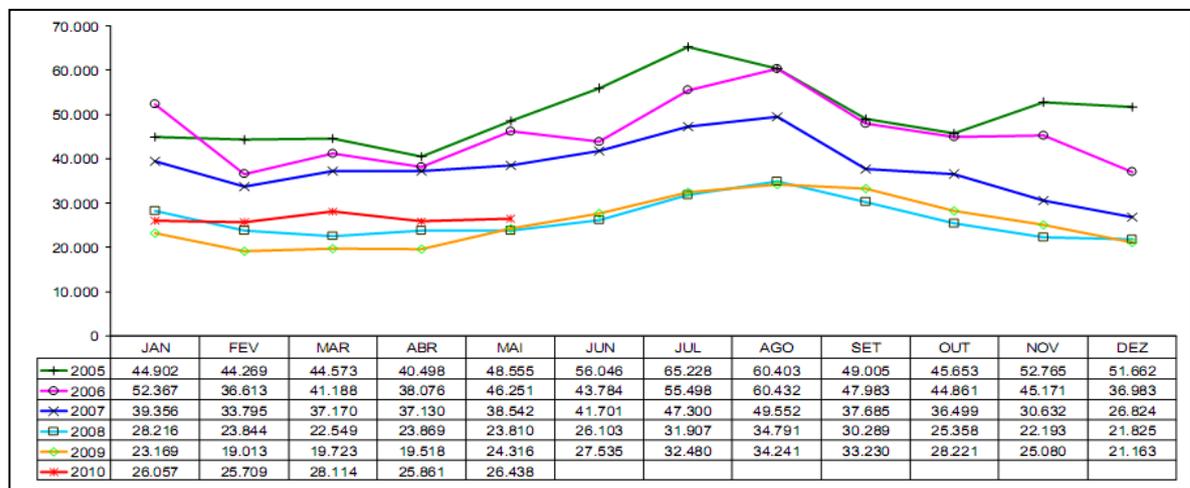
**Figura 2** – Inseto *Anopheles*, larva do mosquito (A) e mosquito adulto (B).



Fonte: <http://embryology.med.unsw.edu.au/Notes/placenta2.htm>

**Figura 3** – Parasita *Plasmodium falciparum* (direito acima) em meio às hemácias de uma pessoa infectada.

No Brasil, foram confirmados 306.908 casos de malária em 2009. A Figura 4 mostra o registro mensal de casos de malária na Amazônia, entre janeiro de 2004 e maio de 2010, sendo o estado do Pará com maior registro até abril de 2010, de 51.697 casos da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).



Fonte: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/avaliacao\\_malaria\\_jan\\_maio\\_19\\_07\\_2010.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/avaliacao_malaria_jan_maio_19_07_2010.pdf)

**Figura 4** – Registro mensal dos casos de malária na Amazônia Legal.

Uma nota publicada na revista Planeta (2010), destaca uma pesquisa feita pela Universidade do Alabama (EUA), onde os pesquisadores analisaram amostras de fezes de gorilas na África concluindo que, os parasitas da malária que atingem os

humanos se assemelham muito aos parasitas encontrados nos gorilas ocidentais, tendo como suposição que a malária veio dos gorilas.

O principal recurso disponível para interromper a transmissão da malária consiste na aplicação de inseticidas de ação residual, com aplicação intradomiciliária. O êxito desta operação está no fato de agirem no local onde se dará a transmissão mosquito/ser humano (D'AMATO *et al.*, 2002).

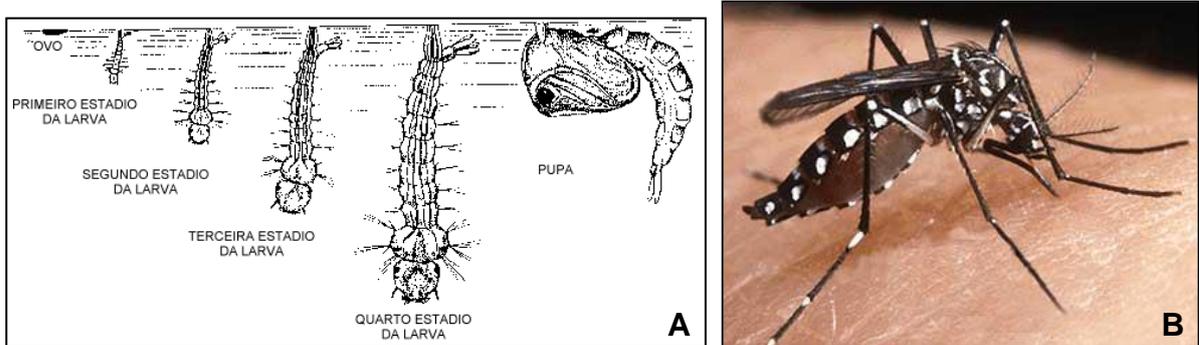
A pulverização interna está aumentando a intensidade de exposição do produto (DDT) que é altamente tóxico. Segundo a *Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants* (2008), o DDT ainda pode ser necessário para o controle da malária em curto período, mas a evidência com base em algumas das muitas consequências de doenças sérias e crônicas está aumentando, e isso precisa ser revisto.

### **3.3.2 A Dengue no Brasil**

A dengue é hoje uma das doenças com maior incidência no Brasil, atingindo a população de todos os estados, independentemente da classe social. Nesse cenário, torna-se imperioso que um conjunto de ações para a prevenção da doença seja intensificado, permitindo assim a identificação precoce dos casos de dengue, a tomada de decisões e a implementação de medidas de maneira oportuna, a fim de principalmente evitar óbitos. Para tais medidas, foi implantado em 2002 o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) do Ministério da Saúde (BRASIL, 2008).

A transmissão da doença ocorre através do mosquito *Aedes aegypti* (Fig. 5), uma espécie exótica originária da África e descrita no Egito. É adaptado ao ambiente urbano utilizando recipientes com água para o desenvolvimento da fase larval. Esse

inseto, vetor mais comum no Brasil, transmite aos humanos os arbovírus (*arthropod borne virus*), que são definidos pela OMS como vírus mantidos na natureza através da transmissão biológica entre hospedeiros vertebrados, principalmente artrópodes (BRAGA; VALLE, 2007).

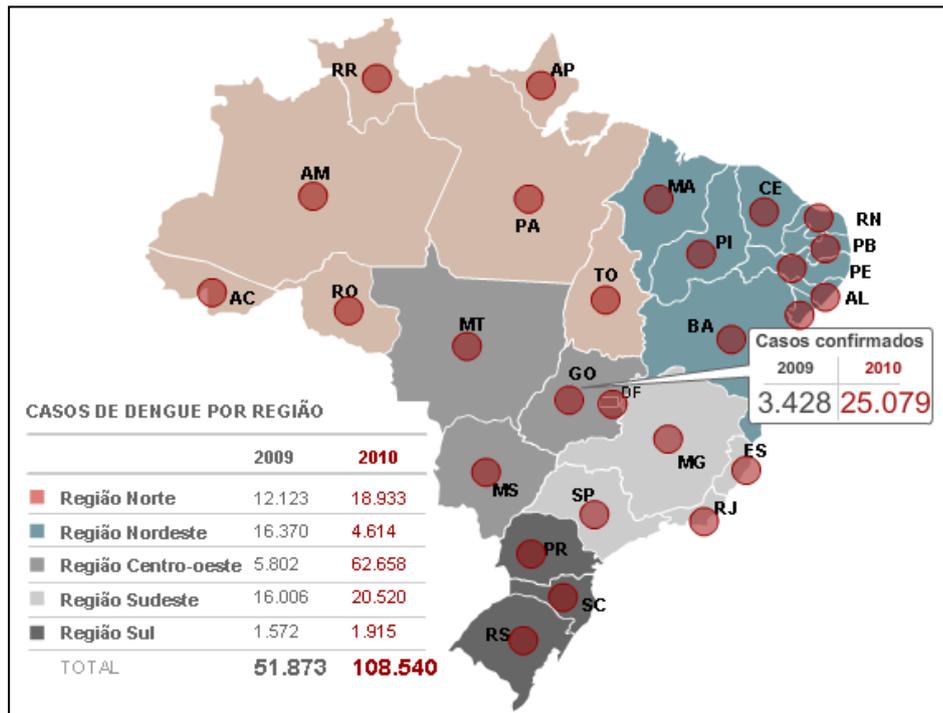


Fonte: <http://www.cecom.unicamp.br/dengue/mosquito.html>

**Figura 5** – Estádios do ciclo de vida do *Aedes aegypti* (A) e mosquito adulto (B).

A doença possui três classificações: dengue clássica, dengue com complicações e febre hemorrágica da dengue. No entanto, o Estudo Controle da Dengue da OMS mostrou que, usando um menor número de testes laboratoriais, é possível selecionar os casos que demandam maior atenção. O Brasil vai adotar a nova classificação, que serão apenas duas categorias: dengue sem gravidade/severidade e dengue grave/severa. Os principais e mais comuns sintomas da doença são: febre, dores de cabeça, musculares, nos ossos e articulações, dor atrás dos olhos, cansaço extremo, dentre outros (COMBATE À DENGUE, 2010).

A Figura 6 exhibe o mapeamento feito em Janeiro de 2011 pelo Ministério da Saúde sobre a dispersão da doença nos estados brasileiros no decorrer do ano de 2010, sendo Amazonas, Acre, Mato Grosso, Goiás e Espírito Santo os que apresentam aumento no número de casos da doença (OLIVEIRA, 2011).



Fonte: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde.

**Figura 6** – Comparação entre os casos notificados de dengue em 2009 e 2010 no Brasil, destacando o exemplo alarmante do estado de Goiás.

Amarilia (2011) afirma em sua reportagem que vacinas contra os quatro tipos virais da dengue já estão sendo testadas em crianças e adolescentes de vários estados brasileiros.

Além da vacina, entidades internacionais (Oxitec – empresa de biotecnologia britânica) e algumas universidades brasileiras (Universidade Federal do Ceará – UFC e Universidade de São Paulo – USP) estão modificando geneticamente os mosquitos machos, reduzindo a fertilidade do inseto (PLANETA, 2011). O Ministério da Saúde publicou em 2011 um manual técnico tratando sobre o diagnóstico e o manejo clínico da dengue voltado para crianças, e publica anualmente dados epidemiológicos da doença, principalmente das semanas epidemiológicas.

Torna-se cada vez mais necessário tomar medidas preventivas no caso da dengue. Em artigo jornalístico de Oliveira (2008), o autor destaca a cidade de Joinville (SC) como exemplo no controle da dengue. Porém, em outra reportagem do

Jornal A Notícia (2011), ressalta que Joinville é a única cidade do estado de Santa Catarina que vai receber recursos do Ministério da Saúde para combater a doença. Em três anos a cidade passou de exemplo no controle à cidade alvo de controle pelo Ministério da Saúde. Isso denota uma questão cultural e comportamental, onde os cidadãos não se engajam com devida responsabilidade de prevenir corretamente, lotando os hospitais públicos. Diversas campanhas estão sendo divulgadas por artistas e programas de televisão, reforçando que prevenir ainda é o melhor remédio.

### 3.4 TOXICOLOGIA

#### **3.4.1 Histórico e Conceito**

O avanço tecnológico tem permitido cada vez maiores conquistas para o meio ambiente, o ser humano e a sua saúde.

Com o objetivo de estabelecer a relação causa/efeito de substâncias químicas, foram implementados na década de 1930, testes de toxicidade aguda com organismos aquáticos (RAND, 1995). Já na década de 1960, foram desenvolvidas pesquisas com ênfase na escolha de organismos sensíveis e representativos do ambiente aquático. Na década de 1970, houve grande desenvolvimento de sistemas sofisticados para condução de testes utilizando ovos e larvas de peixes, para avaliação de toxicidade aguda e crônica de substâncias químicas em diferentes fases do desenvolvimento dos organismos. E assim ocorreram sucessivos progressos ao longo das décadas, como na de 1980, onde se aprimorou as relações

custo/benefício e a intensificação e especificidade das pesquisas na década de 1990 (ZAGATTO, 2008).

No Brasil, um programa internacional de padronização de testes de toxicidade aguda com peixes, foi desenvolvido em 1975 pelo Comitê Técnico de Qualidade das Águas TC 147 da *International Organization for Standardization* (ISO). Entretanto, realizou-se em 1971, por ROCHA *et al*, (apud ZAGATTO, 2008) um trabalho pioneiro utilizando a tilápia (peixe nativo da África) em testes de toxicidade para determinar o limite de tolerância médio, ou seja, a concentração da substância que causa 50% de letalidade aos peixes (CL<sub>50</sub>).

Ao aumento populacional demográfico, da capacidade tecnológica e do interesse do homem pelas questões ambientais, têm aumentado significativamente o monitoramento ambiental com pesquisas voltadas para avaliação de contaminação de efluentes por metais pesados e substâncias orgânicas dos mais variados ramos industriais. Atualmente, diversos segmentos como entidades ambientais, institutos de pesquisa, indústrias, laboratórios e universidades brasileiras vêm desenvolvendo e intensificando pesquisas toxicológicas para diversas finalidades.

Zagatto (2008), define Toxicologia como a ciência que estuda os efeitos adversos de determinada substância em um dado organismo, evidenciando o mecanismo de ação tóxica da mesma. É uma ciência com objetivo próprio, com finalidade e com método específico (AZEVEDO; CHASIN, 2003) que também permite prever impactos futuros, quando da comercialização de produtos químicos (ZAGATTO, 2008).

O fenômeno da intoxicação é caracterizado por Azevedo e Chasin (2003) como:

Conjunto de sintomas que demonstra o desequilíbrio orgânico promovido pela ação de uma substância tóxica. É um estado

patológico do organismo diante da presença de dada concentração de agente tóxico. Denota que a defesa ou a barreira homeostática do organismo foi rompida, com evidência de nocividade e prejuízo para a sua fisiologia normal. O organismo em foco pode ser o ser humano ou qualquer outro animal ou vegetal.

### 3.4.2 Testes Toxicológicos

Ensaio toxicológico com organismos representativos do ambiente serve para avaliar a toxicidade de agentes químicos no meio hídrico, utilizados para vários fins, destacando a avaliação da toxicidade relativa de diferentes substâncias e a sensibilidade relativa dos organismos aquáticos. Buikema e Voshell (1993) citam que o primeiro teste de toxicidade que se tem notícia foi realizado em 1816 com insetos aquáticos, já Aragão e Araújo (2008) reconhecem que foi na década de 1920, os primeiros relatos da utilização de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos, sendo os peixes os primeiros organismos a serem utilizados.

Rand e Petrocelli (1985) elencam as principais características de um ensaio de toxicidade, sendo elas:

- a) apresentar boa repetibilidade e reprodutibilidade;
- b) a espécie utilizada deve ser sensível e ecologicamente representativa do ambiente;
- c) o teste deve ser realístico, fácil e de baixo custo;
- d) os resultados devem ser quantificáveis por análise estatística.

Os ensaios podem ser realizados no campo ou em condições controladas de laboratório. Os desenvolvidos em laboratório exigem maior controle frente às condições abióticas que devem ser específicas como temperatura, pH, oxigênio dissolvido, fotoperíodo, tempo de exposição à substância-teste, entre outras. Os organismos-teste são expostos a várias concentrações da amostra a ser testada por

determinado período de tempo, sempre tendo um controle como forma de avaliar a viabilidade dos organismos expostos. Após o teste, verifica(m)-se o(s) efeito(s) da amostra sobre alguns parâmetros biológicos, como imobilidade para invertebrados e mortalidade para peixes (ARAGÃO; ARAÚJO, 2008).

Ainda dentro das condições que podem ser realizados os ensaios toxicológicos, esses podem avaliar somente uma ou várias espécies (teste multiespécies), onde em um estudo feito por Sloof *et al.* (1986), mostrou que os testes multiespécies não possuem resultados muito diferentes daqueles testes com uma única espécie. Em contrapartida, Mount (1985), menciona que os testes multiespécies são mais úteis para assegurar a proteção de ecossistemas, enquanto que o outro possui maior utilidade para manejo de lagos e rios.

Atualmente, aponta Castro (2008), que vários ensaios de toxicidade estão bem estabelecidos, sendo alguns padronizados nacional e internacionalmente por associações ou organizações de normalização como: Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), *Association Française de Normalisation* (AFNOR), *American Society for Testing and Materials* (ASTM), *Deutsches Institute für Normung* (DIN), *International Organization for Standardization* (ISO) e *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD).

Outro método além dos convencionais (agudo e crônico) é o biomonitoramento automático em tempo real, onde ocorre uma rápida avaliação de respostas comportamentais dos organismos e uma ótima relação custo/benefício. Nesses experimentos, são utilizados organismos sentinelas ou biosensores que possuem a função de detectar mudanças na toxicidade em curto prazo. Diversos grupos de organismos têm sido utilizados: algas (desenvolvido o *Algae Toximeter* pela empresa alemã BBE Moldaenke, que mede a atividade fotossintética da alga),

cladóceros (comportamento de natação é observado por sistema de câmeras de vídeo), bivalves (parâmetro biológico – abertura e fechamento das conchas – é monitorado por sensores eletromagnéticos de alta frequência), peixes (monitoramento dos parâmetros comportamentais – velocidade média, movimento opercular, número de giros – através de câmeras ou por eletrodos) e microorganismos (sistema ECOTOX desenvolvido por Häder e Lebert (1985)) (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008).

Os ensaios de toxicidade podem ser agudos ou crônicos. Rand (1995), define como teste agudo o que determina a concentração da substância que produz efeito deletério no organismo exposto durante um curto período de tempo. Aragão e Araújo (2008), definem o termo crônico como sendo o período de exposição de mais do que 10% da duração de vida do organismo, pois a substância pode se acumular causando efeitos que não podem ser observados em exposições mais curtas. Na Tabela 2 são mencionadas as principais diferenças entre ensaios agudos e crônicos.

**Tabela 2** – Comparação das principais condições-teste entre ensaios agudos e crônicos (CL= concentração letal a 50%; CE= concentração de efeito a 50%; CEO= concentração de efeito observada; CENO= concentração de efeito não observada).

<b>Condições</b>	<b>Ensaio Agudos</b>	<b>Ensaio Crônicos</b>
Tempo de duração	0-96 horas	30 meses (peixes) 5 meses (invertebrados)
Fase de vida do organismo-teste	Larval	Ciclo de vida completo
Quantidade de espécies	Uma ou multiespécies	Uma ou multiespécies
Efeitos avaliados	Imobilidade (invertebrados) Mortalidade (peixes)	Biológicos subletais (fisiologia, morfologia, comportamento)
Expressão dos resultados	CL <sub>50</sub> ou CE <sub>50</sub>	CEO e CENO
Custo	Baixo	Alto

Fonte: Baseado em Aragão e Araújo (2008).

### 3.4.2.1 *New Generation Ecotox*

Biotestes ou bioensaios são baseados na resposta de um organismo vivo a um estímulo, o que poderia ser, por exemplo, a exposição a uma determinada toxina. É possível usar microalgas, protozoários, bactérias, peixes e invertebrados como organismos-teste. Diferentes funções, tais como a taxa de crescimento, biomassa, fotossíntese, fluorescência, circulação e comportamento são investigadas durante o teste. Para a avaliação da toxicidade, testes de crescimento de algas estão comumente sendo usados onde as proporções das algas mortas são usadas como ponto final.

A ferramenta de biomonitoramento em tempo real chamada *New Generation Ecotox* (NGTOX), foi desenvolvida e homologada pela Ecobabitonga Tecnologia Ltda., empresa incubada junto ao INOVAPARQ (Parque Tecnológico de Joinville) (ERZINGER *et al.*, 2011). A ferramenta monitora através de análise de imagem em tempo real a qualidade da água, usando oito parâmetros de movimento (alinhamento, r-value, compactação, área, velocidade média, velocidade para baixo, velocidade para cima e velocidade lateral), analisando as influências imediatas das toxinas sobre o comportamento de movimento destes organismos (MILLÁN DE KUHN, *et al.*, 2006; AHMED, 2010; TAHEDL; HÄDER, 2001). O avanço tecnológico permitiu otimizar o processo reduzindo o tempo de diagnóstico e os custos. O sistema opera em tempo real e analisa de 300 a 400 imagens por segundo. O software usa os vetores da pista para calcular o número de células móveis, a porcentagem de células para cima em movimento, a velocidade média, a compactidade (fator forma, que é a razão da circunferência para a área normalizada para círculo) das células e a precisão de orientação (r-value). O software compara os

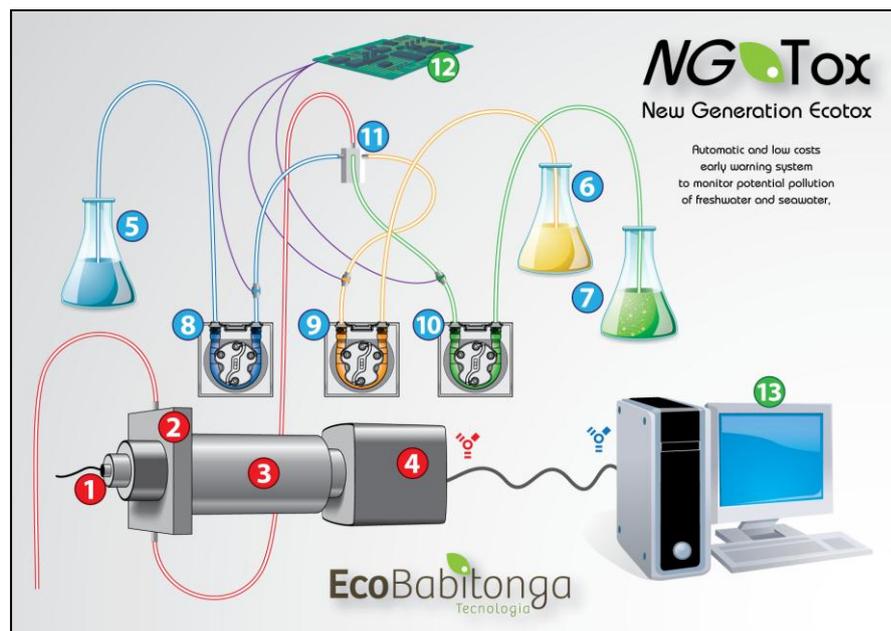
dados com os de uma medição de controle anterior, que foi realizada imediatamente antes da medição da amostra usando a água não contaminada (destilada) em vez da amostra de água com diferentes concentrações da substância-teste. O sistema opera em tempo real e controla um número virtualmente ilimitado de células em paralelo. O software usa os vetores das faixas para calcular vários parâmetros como motilidade, percentagem de células para cima em movimento, a velocidade média, compacidade celular e orientação sob a gravidade (r-value).

O parâmetro motilidade dá a percentagem de células que se deslocam a uma velocidade igual ou mais rápida do que a velocidade mínima fixada no programa, e todos os outros parâmetros são calculados apenas para os objetos que preenchem este critério. O parâmetro para cima dá a percentagem de células que se movem em direção à parte superior da cubeta. O valor orientação sob a gravidade é um parâmetro estatístico que varia de 0 (quando as células se movem aleatoriamente) para 1 (quando todas as células se movem em um único sentido). A compacidade da célula (fator de forma, que é a relação da circunferência para a área normalizada a um círculo) descreve a forma da célula e tem o menor valor de 1, quando o contorno do objeto é um círculo (absolutamente redonda) e aumenta à medida que a célula aumenta de comprimento. Os parâmetros calculados e compara os dados com os de uma medição de controle anterior, que foi realizada imediatamente antes da medição da amostra utilizando água em vez da amostra de teste.

As células de *E. gracilis* são bombeadas juntamente com a amostra de água destilada em uma cubeta de quartzo (até 106 células/mL), e as células são monitorados através de uma câmera CCD (*charged coupled device*) montado em um microscópio modificado. O microscópio está posicionado na horizontal, assim, os organismos mergulham na cuba vertical de modo que sua orientação sob a

gravidade possa ser analisada. A fim de excluir a orientação induzida pela luz, ou seja, fototaxia ou perturbação por oxigênio fotossinteticamente produzida pela luz de monitoramento, um diodo infravermelho ( $\lambda = 875\text{nm}$ ) serve como uma fonte de luz. A resolução da imagem do microscópio é de  $768 \times 576$  pixels. A imagem das células é digitalizada em um cartão grabber de vídeo do frame, que é exibido em um monitor de computador.

A composição e o funcionamento da ferramenta estão esquematizados na Figura 7. O sistema funciona automaticamente e é aplicável para curto prazo (direta exposição a toxinas) e uma medição completa usando o sistema NGTOX com uma concentração de toxina leva cerca de 10 minutos (ERZINGER *et al.*, 2010).



Fonte: Erzinger *et al.* (2010).

**Figura 7** – Esquema de funcionamento e composição da ferramenta NG TOX (1-lâmpada LED, 2-cubeta, 3-microscópio, 4-câmera CCD, 5-água destilada, 6-solução mãe de BBA-Univille, 7-suspensão de *E. gracilis*, 8-10-bombas peristálticas, 11-câmera de mistura, 12-placa eletrônica e 13-computador).

### 3.4.3 Organismos-Alvo em Testes Toxicológicos

Nas últimas décadas, testes de toxicidade vêm sendo realizados com organismos de águas continentais (doce), estuarinas (salobra) e marinhas (salgada), em condições laboratoriais e/ou em campo, a fim de se adquirir conhecimentos sobre a toxicidade e avaliar o efeito dos agentes químicos para a biota aquática (ARAÚJO; ARAGÃO, 2007).

Magalhães e Ferrão Filho (2008), recomendam o emprego de, no mínimo, três espécies que representem diferentes níveis da cadeia trófica, para que se possa detectar um efeito tóxico e resultados mais precisos, aumentando a probabilidade de se obter uma resposta tóxica com organismos de sensibilidades diferentes, pois não existe uma única espécie que represente integralmente os efeitos causados em um determinado ecossistema.

Para a escolha do organismo-teste, Rand e Petrocelli (1985), atribuíram os seguintes critérios de seleção de espécies, que foram utilizados para selecionar os organismos do presente estudo:

- a) abundância e disponibilidade;
- b) significativa representação biológica e econômica;
- c) conhecimento da sua fisiologia, biologia e hábitos alimentares;
- d) baixo índice de sazonalidade;
- e) sensibilidade constante e apurada.

Dentre os principais grupos de organismos utilizados nos ensaios laboratoriais padronizados, Magalhães e Ferrão Filho (2008), destacam: microalgas, microcrustáceos, equinóides, poliquetas, oligoquetas, peixes e bactérias, representando os mais variados ecossistemas e níveis tróficos. Para atingir o

objetivo geral do presente estudo, abordar-se-ão a seguir, alguns aspectos dos principais organismos utilizados nesta pesquisa.

#### 3.4.3.1 Organismos Aquáticos Dulcícolas

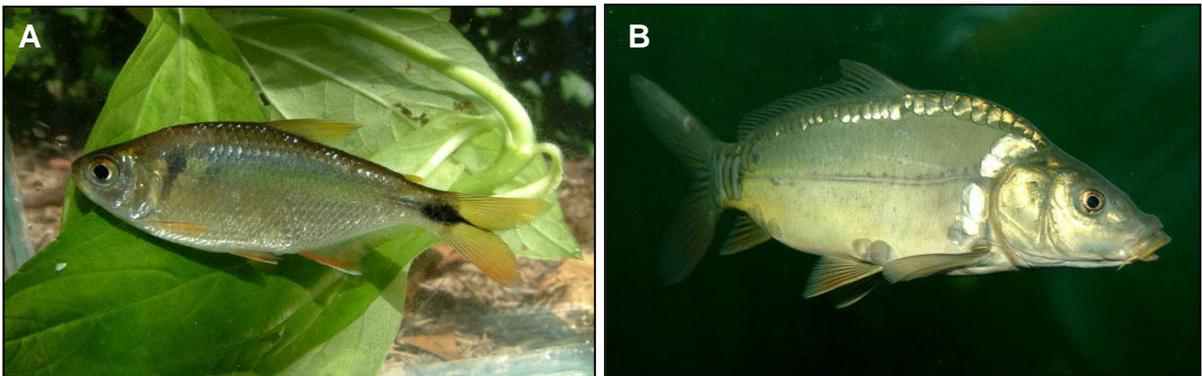
O Brasil possui uma grande rede hídrica formada por bacias hidrográficas que foram sendo formadas ao longo de fenômenos geológicos (FILHO, 2004). Esse fato permite que se tenha uma biota aquática muito diversificada. Dentro da evolução e ocupação dos organismos aquáticos aos ambientes, uma gama de conjecturas são estabelecidas, das quais tudo indica que os seres aquáticos foram os primeiros a habitarem a Terra.

Tundisi e Tundisi (2008), definem as espécies dulcícolas (água doce), todas aquelas que:

- a) dependem da água doce para todos os estágios do seu ciclo de vida (ex: peixes);
- b) necessitam de água doce para completar seu ciclo de vida (ex: anfíbios, insetos);
- c) dependem da água doce apenas para alimento ou hábitat (ex: pássaros);
- d) dependem somente de habitats úmidos (ex: artrópodes).

Aproximadamente 100.000 espécies identificadas são de animais de água doce, metade das quais representadas por insetos. Mas essa diversidade é relacionada ao hemisfério norte, pois particularmente no hemisfério sul ainda há uma vasta área de investigação a ser desenvolvida. Os vertebrados são os mais estudados e conhecidos, sendo que os estudos desenvolvidos para invertebrados são voltados para os vetores de doenças (TUNDISI; TUNDISI, 2008).

Existem diferentes adaptações entre os organismos aquáticos. Denomina-se espécie nativa (Fig. 8A), as oriundas de outra bacia hidrográfica, mas de uma mesma região biogeográfica (espécies alóctones) e espécies de uma mesma bacia hidrográfica (espécies autóctones) (FILHO, 2004). O mesmo autor conceitua espécie exótica (Fig. 8B) para organismos originários de outra região biogeográfica (por exemplo, África). Espécies exóticas são mais resistentes que as nativas, uma vez que estas se adaptam a diferentes condições, podendo até eliminar espécies nativas por competição, das quão bem adaptadas podem ficar ao ambiente onde foram introduzidas.



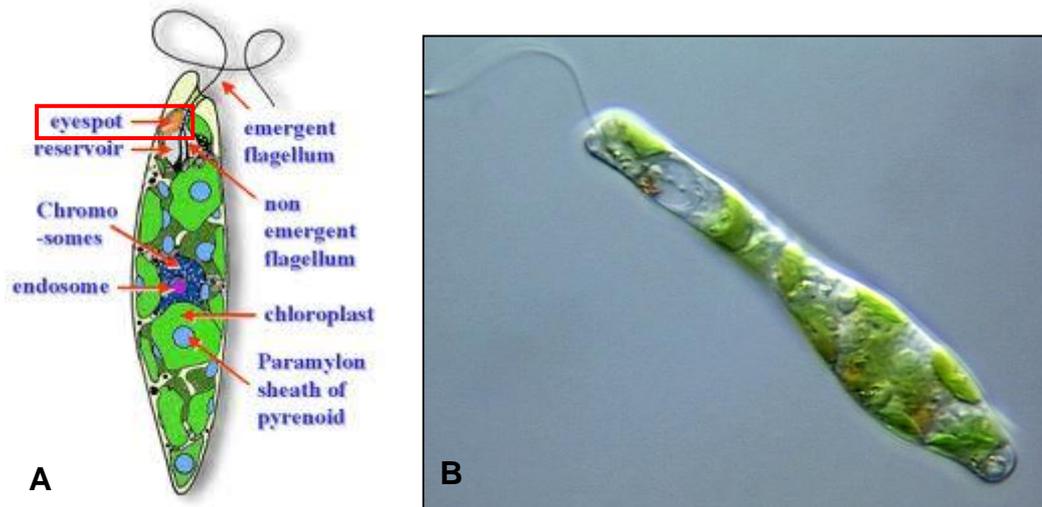
Fonte: [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org)

**Figura 8** – Exemplo de espécie nativa da bacia amazônica *Astyanax bimaculatus* (lambari, piaba) (A) e de espécie exótica da Europa/Ásia *Cyprinus carpio* (carpa comum) (B).

#### 3.4.3.1.1 *Euglena gracilis*

*Euglena* é um gênero de algas unicelulares da divisão Euglenozoa, classe Euglenophyceae. Enumera-se cerca de 1000 espécies, e dentre elas destaca-se a *Euglena gracilis* (Fig. 9), encontrada em ambientes dulcícolas, marinhos ou de águas salobras. Não possui parede celular, reproduz-se assexuadamente e é um protista mixotrofo, ou seja, possui hábito autotrófico, produzindo açúcares através da fotossíntese ou heterotrófico, consumindo partículas alimentares por fagocitose. Representantes deste gênero possuem dois flagelos com funções distintas,

utilizando o flagelo longo para orientação e movimentação. Para observar o ambiente e procurar a melhor posição para a fotossíntese, a célula possui um estigma (Fig. 8A), uma organela primitiva localizada na base do flagelo que filtra a luz solar em função da detecção de estruturas fotossensíveis (REVIERS, 2006).



Fonte: <http://www.biol.pmf.hr/e-skola/odgovori/odgovor383.htm>

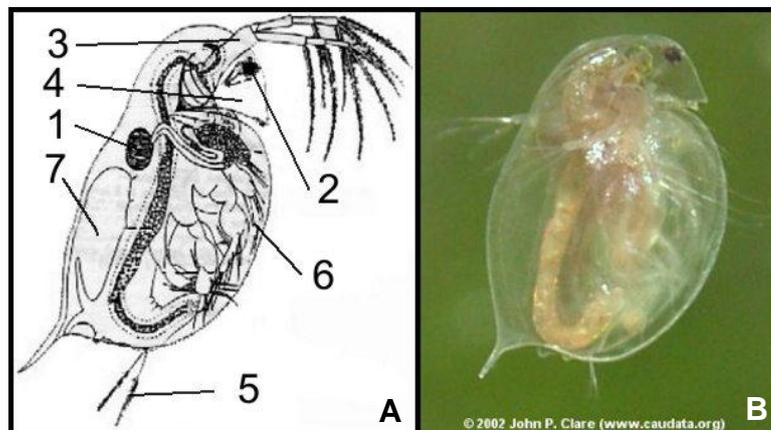
**Figura 9** – Esquema estrutural destacando o estigma (A) e exemplar de *Euglena gracilis* (B).

*Euglena gracilis* é um organismo utilizado como ferramenta para avaliação da toxicidade, de mudanças ambientais e bioensaios com substâncias biologicamente ativas devido à sua alta sensibilidade. Essa microalga orienta-se por gradientes químicos, de luminosidade e de gravidade em busca de uma ótima região para crescimento e reprodução. Gravitaxia (orientação gravitacional) é o movimento de orientação de *E. gracilis* na coluna d'água, um fenômeno conhecido há mais de 100 anos (LEBERT; HÄDER, 1999a). Quando a gravitaxia é negativa, significa que as células se movimentam na superfície da coluna d'água e quando é positiva, a orientação segue para o fundo (ARONSSON; ECKELUND, 2005).

### 3.4.3.1.2 *Daphnia similis*

Os microcrustáceos desempenham, conforme Araújo e Buratini (2007), um papel importante na cadeia alimentar, refletindo mudanças populacionais e comportamentais que podem interferir nos outros níveis tróficos do ecossistema aquático. As mesmas autoras confirmam que estes organismos possuem grande potencial para o uso em testes de toxicidade, pois são facilmente cultivados em laboratório, possibilitando a obtenção de populações homogêneas e com sensibilidade constante.

Um exemplo de microcrustáceo muito utilizado em testes toxicológicos padronizados é a *Daphnia* (Fig. 10), conhecido como “pulga d’água”, é facilmente encontrada em lagos, represas, e lagoas de águas continentais. Mede cerca de 0,5 a 5,0mm de comprimento, possui olho composto bem evidente que é sensível à mudança da qualidade e quantidade de luz. Possui hábito filtrador, alimentando-se de algas, bactérias, protozoários e detritos orgânicos presentes na água (ARAÚJO; BURATINI, 2007).



Fonte: <http://www.caudata.org/daphnia/>

**Figura 10** – Anatomia da fêmea: 1- coração, 2- olho composto, 3- antenas, 4- ocellus, 5- pelos, 6- pernas e 7- bolsa para ovos (A) e exemplar de *Daphnia* sp. (B).

As espécies recomendadas pelos principais procedimentos padronizados são *Daphnia magna*, *D. pulex* e *D. similis*, cada uma indicada para um grau de dureza da água de cultivo. *D. similis* é uma espécie introduzida no Brasil, mas que possui sensibilidade similar às outras espécies (ARAÚJO; BURATINI, 2007).

#### 3.4.3.1.3 Peixes

A grande variedade de ambientes aquáticos brasileiros permitiu o desenvolvimento de 24.600 espécies de peixes (HICKMAN *et al.*, 2004), sendo que destes, 3.000 espécies são descritas atualmente como dulcícolas (FILHO, 2004).

Os peixes (Fig. 8) são vertebrados aquáticos, possuem nadadeiras e escamas de origem dérmica e com adaptações que lhes fizeram dominar o ambiente aquático. O crescimento depende da temperatura, conseqüentemente, peixes que habitam regiões temperadas crescem rapidamente no verão, quando as temperaturas são elevadas e o alimento é abundante, mas quase param de crescer no inverno (HICKMAN *et al.*, 2004).

Para os peixes, a alimentação é o que há de mais importante, pois eles gastam mais tempo e energia para se alimentar ou procurar alimento do que para outras necessidades. De acordo com Hickman *et al.* (2004), seus hábitos alimentares variam de carnívoros (alimentos de origem animal), herbívoros (alimentos de origem vegetal), filtradores (comedores de partículas em suspensão), onívoros (alimentos de origem animal ou vegetal) e saprófagos (restos orgânicos).

A respiração se dá através das brânquias, que ficam cobertas pelos opérculos. Esse arranjo possibilita um sistema de bombeamento para mover a água através da boca, pelas brânquias, saindo pelo opérculo. Uma quantidade

surpreendente de peixes pode viver fora d'água por tempo variável por respirar ar (HICKMAN *et al.*, 2004).

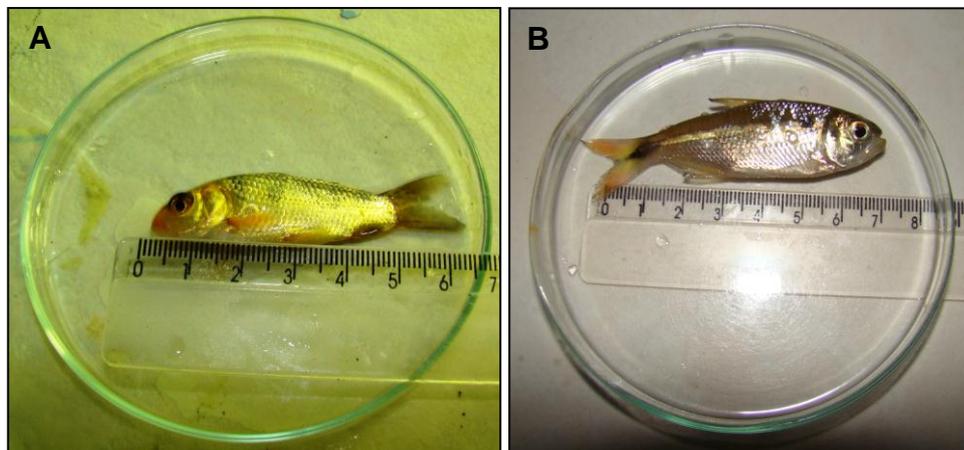
Conforme Tundisi e Tundisi (2008), os peixes possuem uma importância ecológica e econômica fundamental nos sistemas aquáticos, pois o funcionamento e a estrutura desses ecossistemas dependem dos peixes, assim como muitas populações humanas, no que tange à pesca e à aquicultura.

A ictiologia cuida do estudo de todo o desenvolvimento dos peixes, desde ovos, embriões, larvas, juvenis até os adultos, que revela o seu comportamento reprodutivo e a sua ecologia. Podem atingir tamanhos variados nas diferentes fases de vida, dependendo da espécie em questão.

A carpa, peixe da família Cyprinidae, é um peixe exótico de origem asiática, cultivado na China há mais de 2.000 anos, cita Clasen (2009). É o mais antigo peixe de criação doméstica da civilização humana. Denominado *nishikigoi*, com cerca de 100 variedades e com genética indefinida, somente há 160 anos existem as carpas coloridas, uma das variedades. É um peixe pacífico que se acostuma fácil à presença humana, de fácil cultivo, adapta-se também a diversos ambientes, possibilitando sua criação em todas as regiões, cuja temperatura adequada varia entre 8°C e 30°C (KUROKI, 1983).

Arana (2004), destaca a carpa como principal peixe exótico cultivado em Santa Catarina, participando de 32% de toda a produção (dados de 1998). Dados mais recentes apontam que, “apesar de sua carne não ser a melhor em termos culinários, mostra-se ascendente para a comercialização através de seus derivados e embutidos”, sendo ainda a espécie mais cultivada no estado (GRAEFF; TOMAZELLI, 2007, p. 1545).

É um peixe onívoro que se alimenta de invertebrados, plantas, algas, consome larvas de insetos e crustáceos, podendo alimentar-se também de pequenos peixes e alimentos humanos. Por ser cosmopolita, surgiram várias raças, segundo a região e o método de criação. As raças diferem principalmente por características ligadas ao formato, às escamas e ao tamanho da cabeça em relação ao corpo (CLASEN, 2009). A Figura 11A exibe uma das variedades da espécie, uma larva de carpa colorida, criada em cativeiro, utilizada na presente pesquisa.



Fotos: Suellen C. Souza.

**Figura 11** – Larva de *Cyprinus* sp. (carpa colorida) (A) e larva de *Astyanax bimaculatus* (lambari) (B).

O lambari ou piaba (*Astyanax* sp.), é um gênero nativo da bacia Amazônica, possui uma distribuição geográfica na América tropical e subtropical, e representa uma fonte alimentar significativa para peixes de nível maior na cadeia trófica. *Astyanax bimaculatus* (lambari do rabo amarelo ou lambari-guaçu) é uma espécie forrageira de hábito alimentar onívoro que se alimenta predominantemente de insetos (SILVA, 2009). A Figura 11B mostra um exemplar utilizado no estudo.

### 3.5 LEGISLAÇÃO

Salvaguardar a saúde da população nos produtos e serviços sujeitos ao controle sanitário e garantir que os mesmos sejam adequados aos fins propostos, é uma das filosofias da ANVISA, que propõe alguns regulamentos, desde o teste de novos produtos até sua comercialização.

Como a ANVISA não prevê legislação para experimentação de bioinseticidas, o produto testado na presente pesquisa pode se encaixar no subinciso a), inciso VII, art. 3º, da lei nº 6.360, de 23 de Setembro 1976, que classifica inseticida como saneante domissanitário. O registro deste produto só poderá ser feito quando o mesmo não oferecer riscos à saúde humana e aos animais de sangue quente, revelando o objetivo do presente trabalho de testar o produto em diversos níveis tróficos antes da sua comercialização.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 MÉTODO DE PESQUISA**

Um bom método é aquele que permite uma construção correta dos dados e uma reflexão sobre a dinâmica da teoria e, segundo Minayo e Sanches (1993, p. 238) “além de apropriado ao objeto de investigação e de oferecer elementos teóricos para a análise, tem que ser operacionalmente exequível.”

O método utilizado neste estudo será o quantitativo, que conforme Cordato e Nakama (2006, p. 35) “permite avaliar a importância, gravidade, risco e tendência de agravos e ameaças, tratando de probabilidades, associações estatisticamente significantes, importantes para se conhecer uma realidade.”

### **4.2 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS**

#### **4.2.1 Organismos-teste**

Foram utilizados para este trabalho diversos organismos aquáticos (Tab. 3), em diferentes níveis tróficos, sendo as larvas de peixes obtidas na Fundação Municipal para o Desenvolvimento Rural 25 de Julho e os micro-organismos obtidos na UNIVILLE. Ao término dos experimentos, quando não houve efeito letal, as larvas de peixes foram devolvidas ao ambiente de origem e os micro-organismos foram descartados.

**Tabela 3** – Organismos-teste utilizados e tipo de teste realizado com cada grupo.

<b>Grupo de Organismos</b>	<b>Micro-organismos</b>	<b>Larvas de Peixes</b>
<b>Exemplares</b>	<i>Euglena gracilis</i>	Carpa colorida ( <i>Cyprinus</i> sp.)
	<i>Daphnia similis</i>	Lambari ( <i>Astyanax bimaculatus</i> )
<b>Teste</b>	Agudo e Crônico	Agudo

#### 4.2.1.1 Condições de Cultivo dos Organismos-teste

##### 4.2.1.1.1 Condição de Cultivo de *Euglena gracilis*

As cepas de *E. gracilis* foram cultivadas no Laboratório de Fotoquímica e Fotobiologia da UNIVILLE utilizando culturas axênicas do flagelado de água doce *E. gracilis* cepa Z, obtidas a partir da coleção de cultura de algas da Universidade de Göttingen, Alemanha (SCHLÖSSER, 1994). As células foram cultivadas em uma mistura de meios de crescimento (orgânico e inorgânico) (STARR, 1964; CHECCUCCI *et al.*, 1976) a 22°C sob luz branca contínua de 20 W/m<sup>2</sup>, fotoperíodo de 12 horas na luz e 12 horas no escuro, em Erlenmeyers de 100 mL.

##### 4.2.1.1.2 Condição de Cultivo de *Daphnia similis*

A cultura deste micro-organismo foi feita no Laboratório de Ecotoxicologia da UNIVILLE que segue o estabelecido pela CETESB (2007). *D. similis* foi cultivada em água reconstituída em recipientes de vidro claro com tampa. Os micro-organismos foram alimentados com culturas unialgais e ração própria para tal finalidade, mantidos sempre em temperatura adequada (ótima de 20 ± 2°C) com iluminação sob fotoperíodo (16 horas na luz e 8 horas no escuro). As culturas de *D. similis*

passavam por processo de manutenção semanal ou sempre quando necessário, sendo que em cada litro de meio de cultivo foram cultivados 20 micro-organismos.

#### 4.2.1.1.3 Condição de Cultivo das Larvas de Peixes

As larvas de Carpa colorida (*Cyprinus* sp.) foram provenientes de taques de cultivo para reprodução de peixes em cativeiro da Fundação Municipal de Desenvolvimento Rural 25 de Julho. Já os exemplares de Lambari (*Astyanax bimaculatus*) foram capturados junto ao rio Krüger por técnicos em aquicultura da Fundação Municipal de Desenvolvimento Rural 25 de Julho. Cada espécie de peixe selecionada foi colocada em tanques contendo água corrente por 48 horas. Este procedimento teve como objetivo diminuir o estresse dos peixes pela captura e possibilitou selecionar somente os exemplares que possuíam boa vitalidade e tamanho adequado, em torno de 6 cm.

#### 4.2.2 Solução-teste (BBA-UNIVILLE)

Sua descrição e metodologia de obtenção estão sob domínio de sigilo decorrente do registro em patente nacional junto ao INPI (nº. PI0922458-0) e em patente internacional junto ao WIPO (nº. WO/2011/075805).

Para a determinação da concentração do BBA foi utilizado o método adaptado descrito por Porra *et al.* (1989) utilizando-se o espectrofotômetro Shimatzu UV 160A. Foram testadas diversas concentrações do produto a fim de se chegar aos valores confiáveis para a realização dos testes agudos e crônicos para todos os organismos.

### 4.2.3 Condução Experimental

#### 4.2.3.1 Procedimentos para Determinação de Toxicidade em Micro-organismos

As análises que envolveram os micro-organismos foram executadas nos Laboratórios de Ecotoxicologia e Fotobiologia da UNIVILLE. Foram realizados testes agudos e crônicos com diferentes metodologias, cada uma de acordo com o micro-organismo utilizado.

Os experimentos com *Euglena gracilis*, analisando a motilidade e orientação sob gravidade das células, foram medidas utilizando uma ferramenta de biomonitoramento em tempo real NGTOX. Ao final de cada análise, foram analisadas em média 6000 imagens.

##### 4.2.3.1.1 Toxicidade Aguda para *Euglena gracilis*

Para a determinação de toxicidade aguda pelo NGTOX foram utilizadas duas soluções mãe do BBA-UNIVILLE, sendo uma de 100 mg/L e outra de 3,7 mg/L, em diferentes concentrações, nas quais uma amostra controle foi misturada com água (1:1) e foi medido primeiro, seguido por medição de cinco diferentes concentrações tóxicas produzidas em uma série de diluições automáticas (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32) da solução estoque. As amostras controle são medidas em intervalos de tempo fixo. Todas as amostras foram medidas em duplicata. A cubeta de observação foi lavada automaticamente com água destilada e entre as medições.

As medições foram iniciadas com a concentração mais baixa, sem qualquer efeito a uma concentração máxima que causou a inibição a 100% de motilidade, a

fim de calcular os valores de  $CL_{50}$ . Para a primeira medição imediatamente após a aplicação do instrumento NGTOX, automaticamente, produz cinco diluições diferentes (crescente ou decrescente, dependendo da configuração) da solução de estoque fornecido. Neste estudo, foi utilizada a opção de diluições automaticamente decrescentes (1:31, 1:15, 1:7, 1:3 e 1:1). As medições foram feitas com duas soluções de estoque do BBA que foi ainda diluída pelo instrumento automaticamente. Medições de controle foram realizadas sem a adição do BBA, e água deionizada (Millipore) foi utilizada para a diluição do controle. Os vários parâmetros de células de *E. gracilis* foram medidos utilizando um método baseado na análise de imagem, NGTOX (ERZINGER, *et al.*, 2010).

Os resultados são expressos como percentagem de inibição para todos os parâmetros. Para 1, 6 e 24 h de exposição, as medições foram feitas com a opção de um controle para todas as concentrações. O tempo de enchimento da cubeta foi de 75 segundos e o tempo de lavagem foi de 45 segundos. Tempo de seguimento das células foi de 3 minutos. Áreas mínimas para os objetos a serem incluídos na análise vetorial foram definidas a  $400 \text{ m}^2$  e máximo em  $2000 \text{ m}^2$ . Velocidade mínima (motilidade) para a qual as células foram consideradas foi fixada em  $15 \text{ ms}^{-1}$ . Antes das medições serem feitas, as células de *E. gracilis* foram incubadas no escuro durante 30 minutos.

#### 4.2.3.1.2 Toxicidade Crônica para *Euglena gracilis*

Para a determinação de toxicidade crônica pelo NGTOX foi utilizado como parâmetro o cálculo da  $CL_{50}$  do BBA-UNIVILLE obtido no experimento agudo pela alga verde unicelular *E. gracilis*. Foi feita uma suspensão de 500 mL contendo a alga

e, em seguida, as amostras foram separadas em Erlenmeyer de 50 mL, sendo quatro a serem utilizadas como controle. Foram feitas seis concentrações diferentes a partir da  $CL_{50}$  contendo 09, 07, 05, 04, 03 e 01 mg/L de BBA-UNIVILLE como concentração final em Erlenmeyer de 50 mL. Todos os experimentos foram feitos em duplicata. As amostras foram incubadas e foram feitas leituras no NGTOX em três, cinco e sete dias conforme metodologia descrita por Azizullah *et al.* (2011). A toxicidade foi analisada pelos mesmos parâmetros descritos para a determinação do teste agudo.

#### 4.2.3.1.3 Toxicidade Aguda para *Daphnia similis*

Os procedimentos adotados para *Daphnia similis* foram os mesmos utilizados pela UNIVILLE, onde a mesma baseia-se na Norma Brasileira ABNT-NBR 12713 para testes toxicológicos com este microcrustáceo, descrita abaixo adaptada do roteiro da Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental (CETESB, 2007).

Todo o material utilizado no experimento era de vidro e estava quimicamente inerte. Foram utilizados organismos jovens (6 à 24h de idade) obtidos por metodologia de cultivo segundo a NBR 12713. Os micro-organismos foram previamente alimentados, pois durante o período de teste não era fornecido alimento. O ensaio foi realizado dentro do tempo permitido, não excedendo doze horas e todas as etapas do teste ocorreram em temperatura ambiente. Soluções do agente a ser testado (BBA-UNIVILLE) foram preparadas no momento da realização do teste, em diferentes concentrações para testar a exposição de *D. similis* por um período de 48 horas permitindo determinar a  $CL_{50}$ , realizada em testes definitivos, onde foi aplicada somente a concentração a 100%.

Em tubos de ensaio graduados em 10mL, foram adicionadas as concentrações do bioinseticida, previamente calculadas, completando-se o tubo com a água de diluição (para cultivo de *D. similis*) com volume total (10mL). O valor da concentração foi anotado em cada série de tubos com caneta hidrográfica. Para cada concentração e para o controle, foram adicionados 20 organismos, distribuídos em número de cinco em cada uma das quatro réplicas (Fig. 12).



Fotos: Suellen C. Souza.

**Figura 12** – Tubos de ensaio devidamente identificados e suas réplicas.

Em seguida, os tubos foram colocados sob temperatura de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  com fotoperíodo de 16 horas na luz e 8 horas no escuro e sem alimentação durante o período de teste. Após 48 horas, efetuou-se a leitura, registrando o número de organismos imóveis em cada tubo após imersão forçada.

#### 4.2.3.1.4 Toxicidade Crônica para *Daphnia similis*

A metodologia utilizada para realizar o experimento crônico com *D. similis* foi adaptada de Brentano (2006), que desenvolveu e aplicou um método de toxicidade crônica para *D. magna*, pois apesar de serem espécies diferentes, Araújo e Buratini (2007), afirmam que a sensibilidade delas é muito semelhante.

Os organismos utilizados neste experimento eram jovens obtidos a partir da quarta postura de fêmeas cultivadas em laboratório, o que garantiu que a espécie se reproduzisse partenogeneticamente, originando descendentes geneticamente idênticos às fêmeas progenitoras.

O parâmetro avaliado foi a capacidade de geração de descendentes. Sintetizando, para esta pesquisa um teste de toxicidade crônico válido, ao final de 21 dias, o controle deverá apresentar, no mínimo, 80% de sobrevivência; 4 posturas; e uma média de 20 filhotes por fêmea, considerando neste cálculo o número de posturas realizado por Brentano (2006).

O teste controle foi feito em tubos de ensaio de 10 mL, cada um com um organismo, com as concentrações de 2, 4, 6, 8 e 10 mg/L do bioinseticida para avaliar qual concentração poderia ser utilizada nas baterias seguintes do teste crônico. Este teste durou 48 horas em fotoperíodo.

Cada concentração, inclusive o controle, foi testada em 10 réplicas, em copos plásticos transparentes de 50 mL, corretamente identificados (Fig. 13), cada um contendo um organismo. Para o controle, foram colocados nos copos plásticos uma alíquota de 25 mL de meio de cultivo, e para as concentrações foram colocados 24 mL de meio de cultivo e 1 mL do bioinseticida, preparado no momento da realização do teste. Cada copo plástico foi higienizado com água deionizada antes da utilização. As baterias contaram com fotoperíodo (16h na luz e 8h no escuro) e temperatura adequada (entre 18°C e 22°C). Os organismos foram observados e alimentados diariamente com microalgas em concentrações próximas a  $13^{10}$  células.mL<sup>-1</sup>.

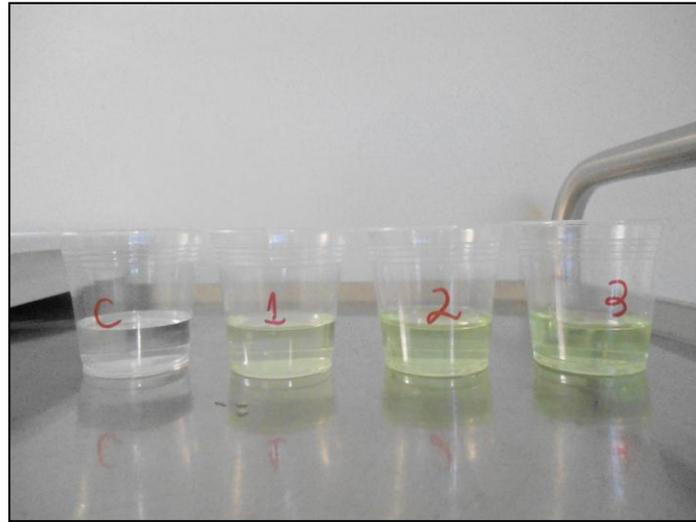


Foto: Suellen C. Souza.

**Figura 13** – Copos plásticos utilizados no experimento, devidamente identificados.

Os organismos foram submetidos às concentrações por um período de sete dias corridos em fotoperíodo, sem que houvesse renovação da solução-teste. Passada uma semana, os organismos foram transferidos para um novo copo plástico contendo uma nova solução-teste na mesma concentração. Para este procedimento, contavam-se os filhotes gerados, descartando-os em seguida, e o organismo adulto era transferido delicadamente, com auxílio de uma pipeta, para um copo plástico contendo somente o meio de cultivo para evitar que os metabólitos gerados alterassem a qualidade do ambiente de teste. Após novos copos com as concentrações estarem prontos, os adultos foram transferidos delicadamente, alimentados e submetidos às condições supra citadas de temperatura e fotoperíodo. Este procedimento de troca de solução-teste foi realizado três vezes por semana em dias intercalados (segundas, quartas e sextas-feiras). Os copos plásticos utilizados foram descartados, pois resíduos da microalga utilizada na alimentação dos organismos ficaram impregnados no plástico, preferindo-se então, utilizar copos novos e limpos a cada troca do bioinseticida.

Este teste é caracterizado por Aragão e Araújo (2008), como um sistema semi estático, onde os organismos-testes são periodicamente transferidos para novas soluções-teste. Também denominado sistema estático com renovação, é indicado para substâncias instáveis e, geralmente, é utilizado em espécies de *Daphnia*, porém, é mais trabalhoso e pode causar estresse ou danos durante o manuseio dos organismos.

#### 4.2.3.2 Procedimento para Determinação de Toxicidade Aguda em Larvas de Peixes

A parte experimental do trabalho que envolve larvas de peixes foi realizada na Fundação Municipal para o Desenvolvimento Rural 25 de Julho.

Este estudo foi caracterizado como ensaio toxicológico agudo, multiespécies, conduzido em laboratório, em sistema estático (sem renovação da solução) e utilizando microcosmos, definido por Rand e Petrocelli (1985), como estruturas constituídas de recipientes de vidro ou de plástico contendo amostras de ecossistema natural em pequena escala.

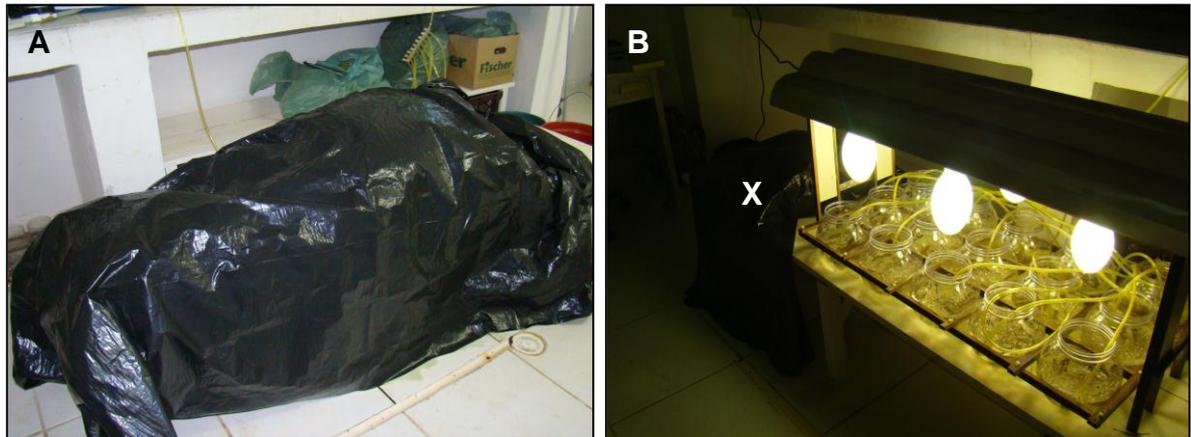
O microcosmo construído (Fig. 14A) era composto por 6 lâmpadas mistas, com 250W (watts) de potência cada, produzindo  $300\text{W}/\text{m}^2$ , correspondendo a aproximadamente 35% da luz solar, visto que em dias ensolarados o sol fornece uma radiação de aproximadamente  $900\text{W}/\text{m}^2$  (valores obtidos com o Luxímetro MS100 *Solar Power Meter*). Para alocação das amostras, foi construída uma estrutura com potes plásticos, contendo 1 litro de água cada (Fig. 14B) retirada do mesmo local onde as espécies testadas se desenvolvem.



Fotos: Suellen C. Souza.

**Figura 14** – Estrutura com lâmpadas mistas (A) e estrutura com potes plásticos e sistema de aeração (B).

Após calculadas as concentrações do bioinseticida, determinadas no espectrofotômetro Shimatzu UV-160A, tais concentrações foram diluídas em 1 litro de água, contido nos potes plásticos. 10 exemplares das espécies testadas foram colocados dentro dos potes contendo diferentes concentrações do produto e com sistema de aeração. A estrutura foi deixada por 3 horas no escuro, sob uma lona preta (Fig. 15A), e posteriormente, deixada o mesmo período sob radiação solar simulada (lâmpadas mistas) (Fig. 15B), sendo que os controles permaneceram no escuro. Após a fase escura e de irradiação, foi determinada a mortalidade dos organismos. Parâmetros abióticos como temperatura, pH e oxigênio dissolvido foram mensurados antes e ao término de cada análise utilizando a Sonda Multiprobe Hanna da UNIVILLE.



Fotos: Suellen C. Souza.

**Figura 15** – Amostras no escuro (A), sob radiação solar simulada (B) e ao fundo os controles ainda cobertos com a lona (X).

#### 4.2.4 Análise Estatística dos Dados

Os dados referentes aos ensaios agudos deste trabalho foram tratados de acordo com Gelber *et al.* (1985) onde, normalmente, estima-se a concentração da substância-teste que causa efeito a 50% (porcentagem que oferece uma maior reprodutibilidade e uma estimativa pontual) da população alvo testada, durante um período de tempo indeterminado.

Para a determinação da concentração letal ( $CL_{50}$ ) foi utilizada a Equação 1 que interpreta os dados experimentais (TAHEDL; HÄDER, 1999; WILLEMANN, 2002; MILLÁN DE KUHN *et al.*, 2006).

$$y = \frac{y_0}{1 + \left(\frac{c}{EC_{50}}\right)^b} \quad (1)$$

Onde  $y$  é a variável de resposta (porcentagem de organismos mortos),  $c$  é a concentração da substância,  $y_0$  é a resposta quando a concentração tende a infinito e  $b$  é um fator de escala.

Os dados foram processados usando o software Sigma-Plot para o Windows 2000, (*Statistical Package for Social Sciences – SPSS*). Este modelo corresponde à Equação 2, proposta por Emmens (TAHEDL; HÄDER, 1999) para interpretar as relações concentração-efeito.

$$SS = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y}_i)^2 \quad (2)$$

O software ajusta os valores de uma regressão não linear. O programa Sigma-Plot utilizado para elaborar o gráfico e obter a curva sigmoideal, usa o algoritmo de Levenberg-Marquardt (Equação 2) para determinar os parâmetros das variáveis independentes que dão o melhor ajuste entre a equação e os dados. Este algoritmo determina os valores dos parâmetros iterativamente de modo que a soma das diferenças ao quadrado entre os valores dos valores observados e preditos da variável dependente, é minimizado, sendo  $i$  o valor observado e  $y_i$  o valor previsto. Os parâmetros  $CL_{50}$ ,  $b$  e  $y_0$  (ver Equação 1) são otimizados para minimizar algoritmo (SS). Os intervalos de confiança do conjunto de parâmetros otimizados são calculados a partir da matriz de covariância com um nível de erro de 5%.

Com os dados obtidos através dos testes crônicos, foram elaborados histogramas no Microsoft Excel 2007, a fim de se estabelecer a CEO, baseando-se no Teste t, comparando o tratamento com o controle e detectando as significâncias (BURATINI; BERTOLETTI, 2008).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O bioinseticida em questão (BBA-UNIVILLE) possui sua eficácia comprovada apenas para algumas larvas de mosquitos, sendo necessário o teste agudo e crônico para verificação da toxicidade e modo de ação, sendo de difícil comparação por se tratar de um produto novo em teste.

### 5.1 ANÁLISE TOXICOLÓGICA EM PRODUTORES PRIMÁRIOS

Com o objetivo de avaliar o possível impacto ambiental sobre a cadeia alimentar, foi escolhida a alga unicelular *Euglena gracilis*. Microalgas são ecologicamente importantes na maioria dos ecossistemas aquáticos, pois elas podem responder de forma rápida e previsível para uma ampla gama de poluentes (McCORMICK; CAIRNS, 1994).

Devido à sua natureza altamente sensível, as microalgas são reivindicadas como possível indicador precoce de deterioração das condições ambientais, especialmente em ambientes aquáticos (McCORMICK; CAIRNS, 1994, DANILOV; ECKELUND, 1998). A alga verde flagelada *Euglena gracilis* é usada como um organismo teste na pesquisa fisiológica, bioquímica e genética, devido à sua alta sensibilidade a mudanças diferentes no ambiente (LUND; LUND 1996, PETERSEN-MAHRT, 1997). *E. gracilis* orienta-se pela utilização de produtos químicos externos e os parâmetros físicos, tais como luz e da gravidade em busca de uma região ideal para o crescimento e reprodução (HÄDER, 1987; HÄDER; GRIEBENOW, 1988, HÄDER; VOGEL, 1990, HEMMERSBACH-KRAUSE; HÄDER, 1990; HÄDER; LIU, 1990; LEBERT; HÄDER, 1999a, 1999b). Quando o campo gravitacional da Terra

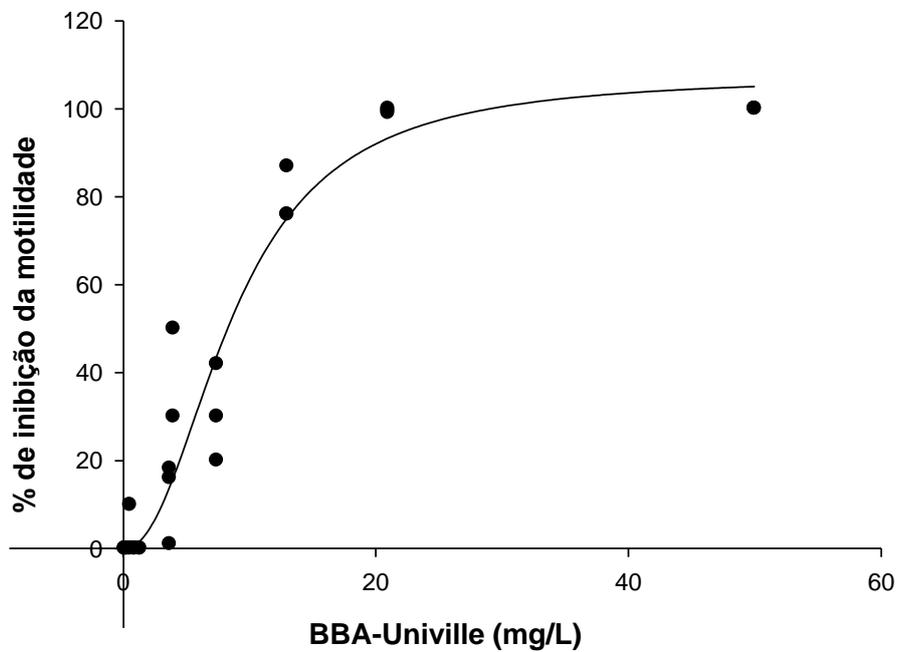
serve como uma pista externa para *E. gracilis* se orientar na coluna de água, é chamado de orientação sob gravidade (HÄDER *et al.*, 1990). *E. gracilis* mostra orientação sob gravidade exclusivamente negativa, o que significa que as células se movem para a superfície da coluna de água, especialmente na ausência de estímulo luminoso (HÄDER; VOGEL, 1990).

### 5.1.1 Teste Agudo para *Euglena gracilis*

As células de *E. gracilis* mostraram diferença significativa na inibição de cinco parâmetros analisados ( $p < 0,05$ ), como demonstrado na Tabela 4, tendo uma  $CL_{50}$  média de 12,73 mg/L. A inibição da motilidade em resultados percentuais entre as células e controle de células tratadas com BBA-UNIVILLE, mostrou-se o parâmetro com maior sensibilidade apresentando uma  $CL_{50}$  de 8,81 mg/L (Fig. 16). A velocidade média das células tratadas com BBA-UNIVILLE (Fig. 17) foi o segundo parâmetro mais sensível, com uma  $CL_{50}$  de 9,81 mg/L. Os parâmetros fisiológicos como r-value, alinhamento e compactação apresentaram toxicidade menor quando comparados aos outros parâmetros das células tratadas com o BBA-UNIVILLE, obtendo uma  $CL_{50}$  de 14,70 mg/L (Fig. 17); 16,33 mg/L (Fig. 18) e 14,00 mg/L (Fig. 19), respectivamente.

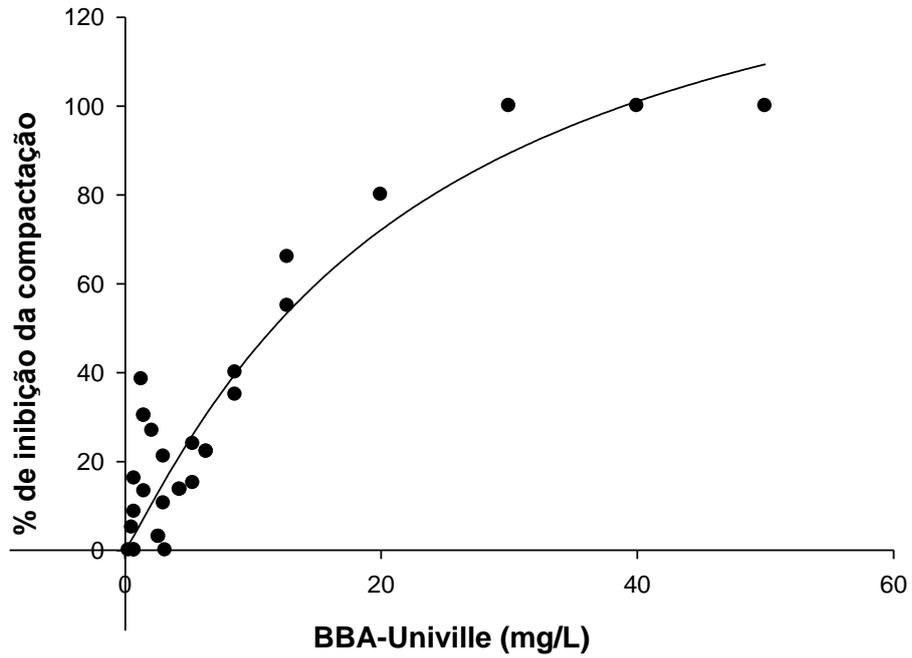
**Tabela 4** – Resultados do cálculo de toxicidade ( $CL_{50}$ ) dos testes agudos para *Euglena gracilis* obtidos através do NGTOX.

Parâmetro de avaliação	$CL_{50}$ (mg/L)	Desvio padrão	<i>P</i>
Motilidade	8,81	12,24	< 0,0001
r-value	14,70	13,36	< 0,0001
Alinhamento	16,33	10,53	< 0,0001
Compactação	14,00	18,28	< 0,0001
Velocidade média ( $\mu\text{m/s}$ )	9,81	4,46	< 0,0001
<b>Média</b>	<b>12,73</b>	<b>11,78</b>	

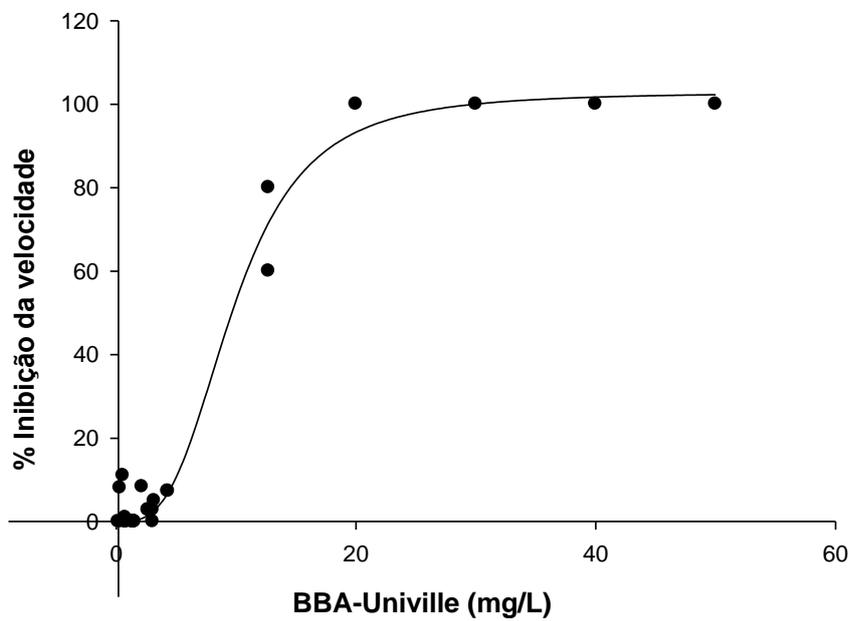


**Figura 16** – Porcentagem de inibição da motilidade de *Euglena gracilis* exposta ao BBA-UNIVILLE em ensaios agudos.  $CL_{50} = 8,81$  mg/L.





**Figura 19** – Porcentagem de inibição da compactação de *Euglena gracilis* exposta ao BBA-UNIVILLE em ensaios agudos.  $CL_{50} = 14,0$  mg/L.



**Figura 20** – Porcentagem de inibição da velocidade média [ $\mu\text{m/s}$ ] de *Euglena gracilis* exposta ao BBA-UNIVILLE em ensaios agudos.  $CL_{50} = 7,1$  mg/L.

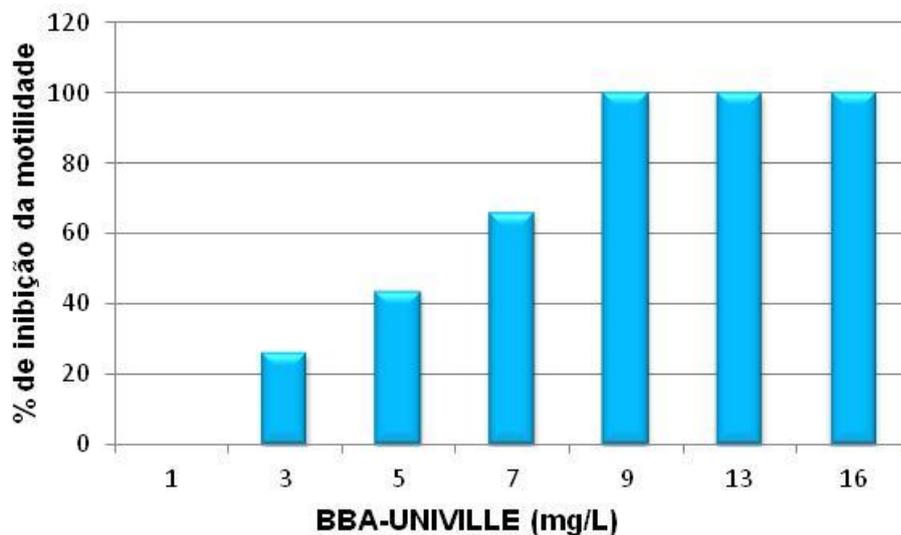
Os valores médios de  $CL_{50}$  encontrados nos testes agudos utilizando a alga flagelada *Euglena gracilis* denotam que os valores descritos na literatura para combater os mosquitos *Aedes* sp. e *Culex* sp. com  $CL_{50}$  2,34 e 6,88 mg/L respectivamente (ERZINGER; HÄDER, 2009 e 2010) sem contudo, eliminar a espécie *Chaoborus* sp. ( $CL_{50}$  22,25 mg/L), demonstram a seletividade por espécie em função da concentração do produto aplicado.

### 5.1.2 Teste Crônico para *Euglena gracilis*

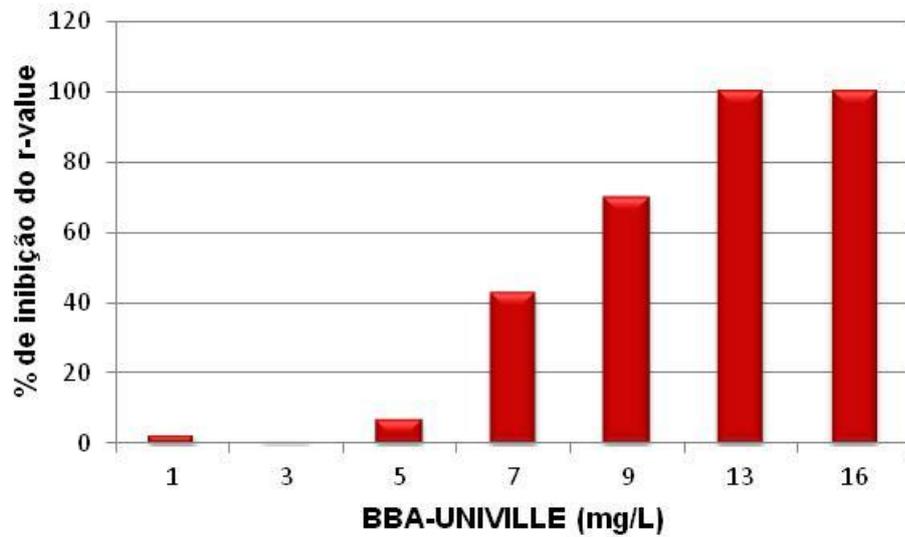
Para o experimento crônico, as células de *E. gracilis* foram cultivadas em um meio contendo diferentes concentrações de BBA-UNIVILLE por sete dias e mostrou uma sensibilidade para os mesmos parâmetros fisiológicos analisados no teste agudo, porém, com toxicidade mais acentuada, como demonstram a Tabela 5 e as Figuras 21 à 25. Os efeitos tóxicos do BBA-UNIVILLE sobre a fisiologia de *E. gracilis* nos parâmetros de motilidade e velocidade após sete dias, mostraram uma inibição de 100% em concentrações acima de 9,0 mg/L. Por outro lado, o parâmetro r-value apresentou uma inibição acima de 100% em concentração acima de 13,0 mg/L e o alinhamento e a compactação das células apresentaram uma inibição acima de 100% em concentrações acima de 16,0 mg/L. Quando analisados o conjunto destes dados, observa-se um valor médio de inibição de 42,98% na concentração de 7 mg/L de bioinseticida, admitido desta maneira que este valor representa a concentração limite para efeitos de toxicidade crônica para a *Euglena gracilis*, ou seja, CEO = 7 mg/L.

**Tabela 5** – Avaliação da toxicidade crônica sobre *Euglenas gracilis* por sete dias em diferentes concentrações de BBA-UNIVILLE obtida através do NGTOX.

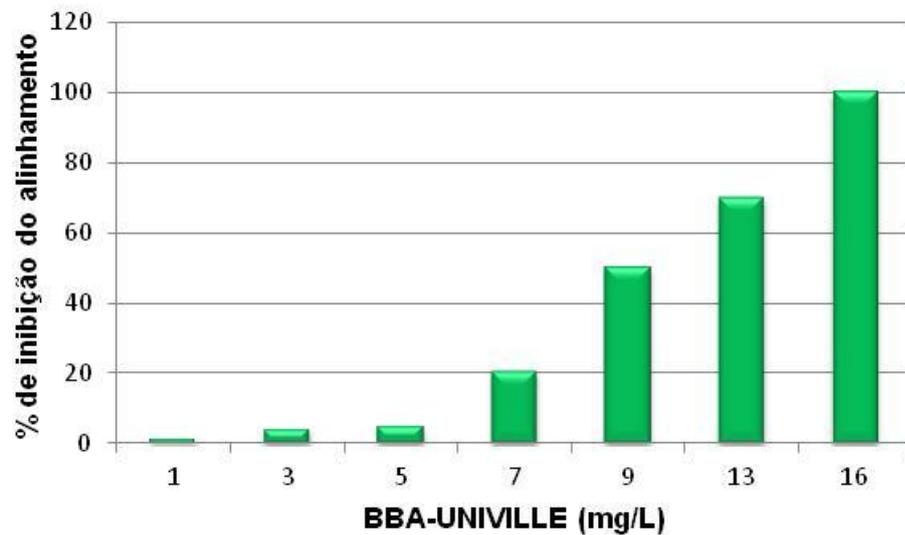
BBA-UNIVILLE (mg/L)	Inibição (%)				
	Motilidade	r-value	Alinhamento	Compactação	Velocidade ( $\mu\text{m/s}$ )
1,0	0,0	2,7	1,5	1,8	0,0
3,0	26,2	1,1	4,5	15,7	2,9
5,0	43,5	7,1	5,1	30,2	15,0
7,0	66,0	43,1	20,7	45,0	40,1
9,0	99,8	70,0	50,3	55,6	99,5
13,0	100,0	100,0	70,0	90,0	100,0
16,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0



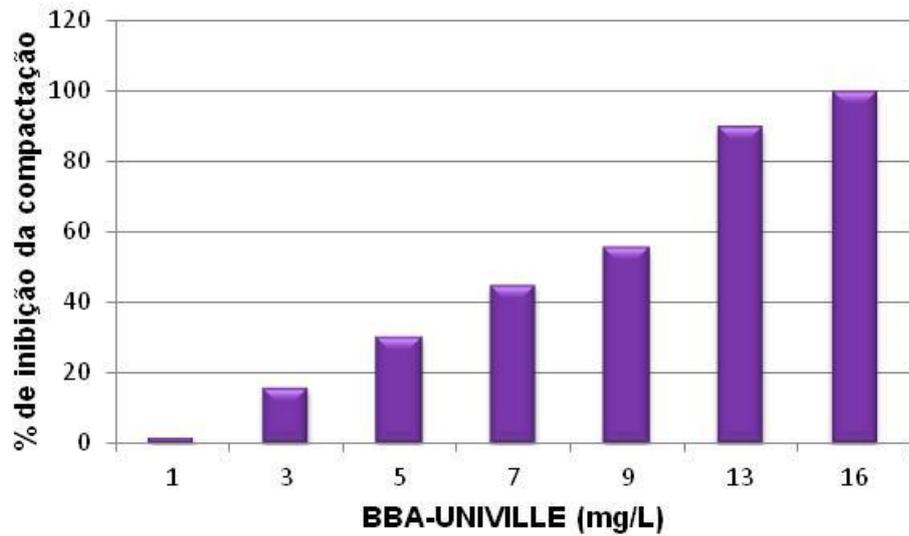
**Figura 21** – Porcentagem de inibição da motilidade de *Euglena gracilis* exposta ao BBA-UNIVILLE em ensaios crônicos com inibição média de 42,98 % em concentração de BBA-UNIVILLE de 7,1 mg/L.



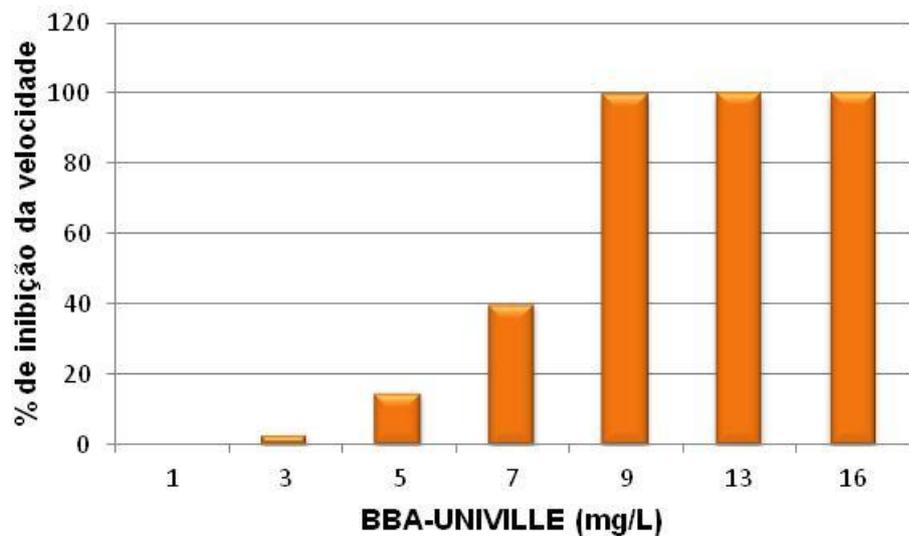
**Figura 22** – Porcentagem de inibição do r-value de *Euglena gracilis* exposta ao BBA-UNIVILLE em ensaios crônicos com inibição média de 42,98 % em concentração de BBA-UNIVILLE de 7,1 mg/L.



**Figura 23** – Porcentagem de inibição do alinhamento de *Euglena gracilis* exposta ao BBA-UNIVILLE em ensaios crônicos com inibição média de 42,98 % em concentração de BBA-UNIVILLE de 7,1 mg/L.



**Figura 24** – Porcentagem de inibição da compactação de *Euglena gracilis* exposta ao BBA-UNIVILLE em ensaios crônicos com inibição média de 42,98 % em concentração de BBA-UNIVILLE de 7,1 mg/L.



**Figura 25** – Porcentagem de inibição da velocidade de *Euglena gracilis* exposta ao BBA-UNIVILLE em ensaios crônicos com inibição média de 42,98 % em concentração de BBA-UNIVILLE de 7,1 mg/L.

## 5.2 ANÁLISE TOXICOLÓGICA EM CONSUMIDORES PRIMÁRIOS

Em função da disponibilidade da *D. similis* do Laboratório de Ecotoxicologia da UNIVILLE, o mesmo foi escolhido como padrão para testes de micro-organismos consumidores primários da cadeia alimentar.

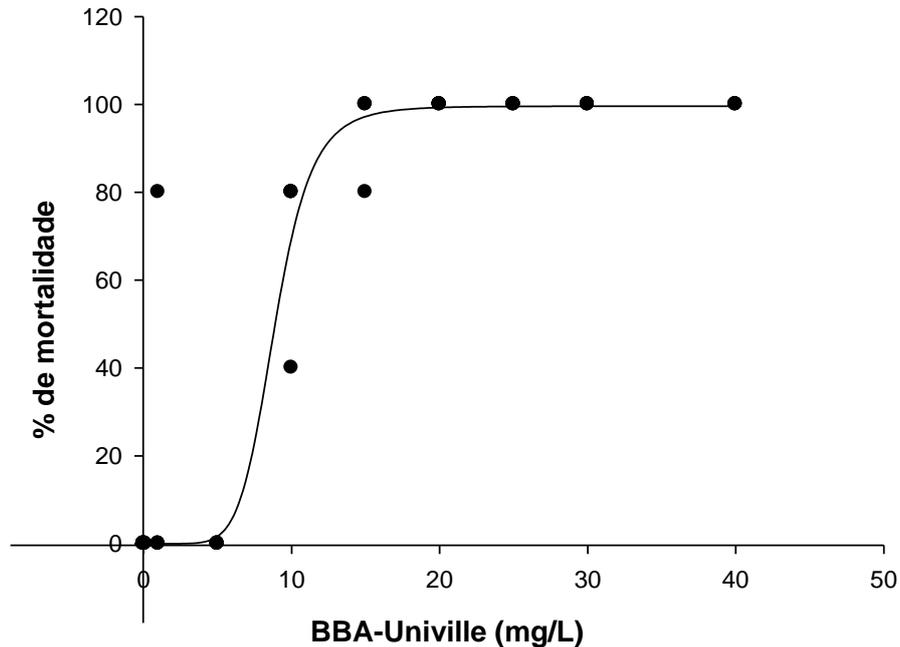
### 5.2.1 Teste Agudo para *Daphnia similis*

*D. similis* ainda é pouco utilizada em testes de toxicidade por não haver padronização para esta espécie. Apesar de apresentar sensibilidade semelhante ao de *D. magna*, existe certa dificuldade em encontrar trabalhos realizados testando novos produtos com *D. magna*, mas sim, trabalhos de teste de efluente ou substâncias já conhecidas quimicamente, tornando impossibilitada a comparação dos resultados deste bioinseticida.

Fazendo a análise da Figura 26, a concentração acima de 8 mg/L de BBA-UNIVILLE é considerada letal, sendo uma faixa próxima ao valor encontrado para eliminar 50% dos mosquitos de *Culex* sp.

### 5.2.2 Teste Crônico para *Daphnia similis*

Analisando os resultados obtidos (Tabela 6 e Figura 27), verifica-se um desvio padrão alto para todas as amostras, inclusive o controle, onde a maioria dos ensaios obteve amostras superiores a 20 descendentes. As concentrações acima de 4 mg/L de BBA-UNIVILLE apresenta toxicidade crônica significativa sobre o microorganismo ( $p= 0,0002$ ) em relação a amostra controle.

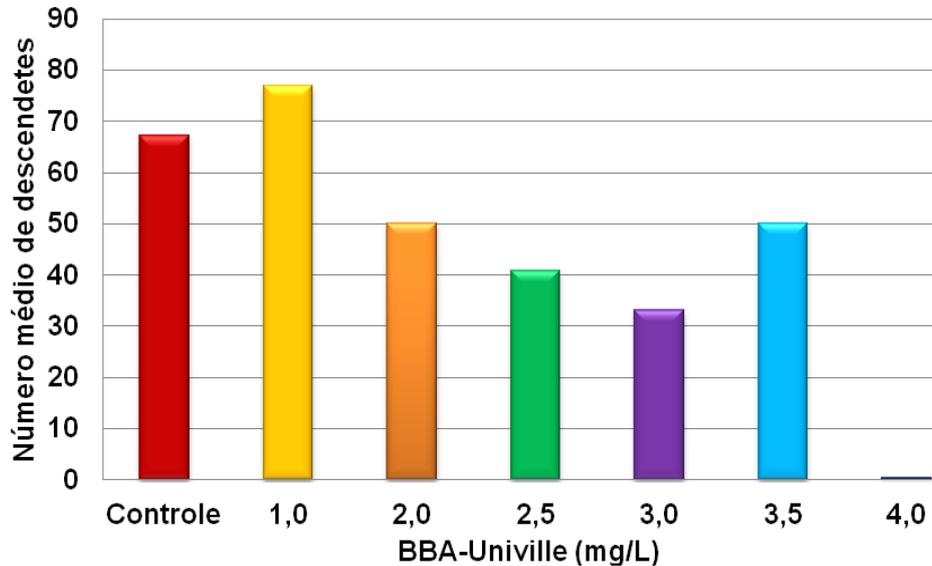


**Figura 26** – Porcentagem de mortalidade de *Daphnia similis* exposta ao BBA-UNIVILLE em ensaios agudos por 48h em fotoperíodo.  $CL_{50} = 8,87$  mg/L. Cada ponto no gráfico corresponde a 20 exemplares, caracterizando uma amostra.

**Tabela 6** – Média de descendentes gerados por *Daphnia similis* em experimentos de toxicidade crônica até 21 dias sob concentrações de BBA-UNIVILLE.

Dia	Controle	BBA-Univille (mg/L)					
		1,0	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0
7	79	61	19	146	41	8	0
8	127	26	56	21	22	11	0
11	166	175	114	203	78	78	0
12	97	39	40	24	31	52	0
13	50	61	37	29	20	74	0
14	14	15	1	0	13	36	0
15	31	118	33	39	31	31	2
18	115	200	164	162	91	79	3
19	39	119	51	18	32	161	0
20	31	32	33	75	27	9	0
21	15	0	4	14	21	11	0
<b>Total</b>	<b>759</b>	<b>846</b>	<b>552</b>	<b>797</b>	<b>424</b>	<b>550</b>	<b>5</b>
<b>Média</b>	70	77	50	66	37	50	0,5
<b>dp</b>	51	67	48	71	25	46	1
<b>p*</b>		0,1127	0,8536	0,8536	0,8536	0,0716	0,0002

p\* = Teste t - significância p<0,05 - 95% de confiança.



**Figura 27** – Número médio de descendentes de *Daphnia similis* após 21 dias de teste toxicológico crônico em presença de diferentes concentrações de BBA-UNIVILLE.

Erzinger e Häder (2009 e 2010), descreveram que o BBA-UNIVILLE na sua atual formulação apresenta forte biodegradação perante à luz solar ( $1395 \text{ W/m}^2$ ). Na presente pesquisa, foi observado que em uma potência de luz de  $350 \text{ W/m}^2$  (semelhante a um dia de chuva) o bioinseticida da UNIVILLE levava cinco horas para total degradação e que em  $950 \text{ W/m}^2$ , esta degradação pela luz ficava em torno de duas horas. Para os experimentos realizados na determinação crônica com *Daphnia similis* e com *Euglena gracilis*, o sistema de fotoperíodo utilizado possuía a potência de  $25 \text{ W/m}^2$ , o que possa justificar uma maior toxicidade.

Magalhães e Ferrão Filho (2008), citam que faz pouco sentido fixar um tempo de exposição do organismo à substância, pois a toxicocinética (velocidade de absorção da substância nos tecidos e sua eliminação) depende das propriedades dos organismos (área superficial/volume) e do composto químico (hidrofobicidade). Porém, para os experimentos de toxicidade aguda e crônica em microrganismos, é necessário utilizar o fotoperíodo, visto que a norma estabelece tal parâmetro. Para o

produto em teste, o tempo de exposição é um fator determinante para a correta ação do bioinseticida.

### 5.3 ANÁLISE TOXICOLÓGICA AGUDA EM CONSUMIDORES SECUNDÁRIOS (PEIXES)

Diante do alto índice de degradação do BBA-UNIVILLE, foram adotados apenas os testes agudos para os peixes.

A sensibilidade dos organismos a determinados agentes pode mudar em função das condições ambientais (temperatura, pH e oxigênio dissolvido) (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008).

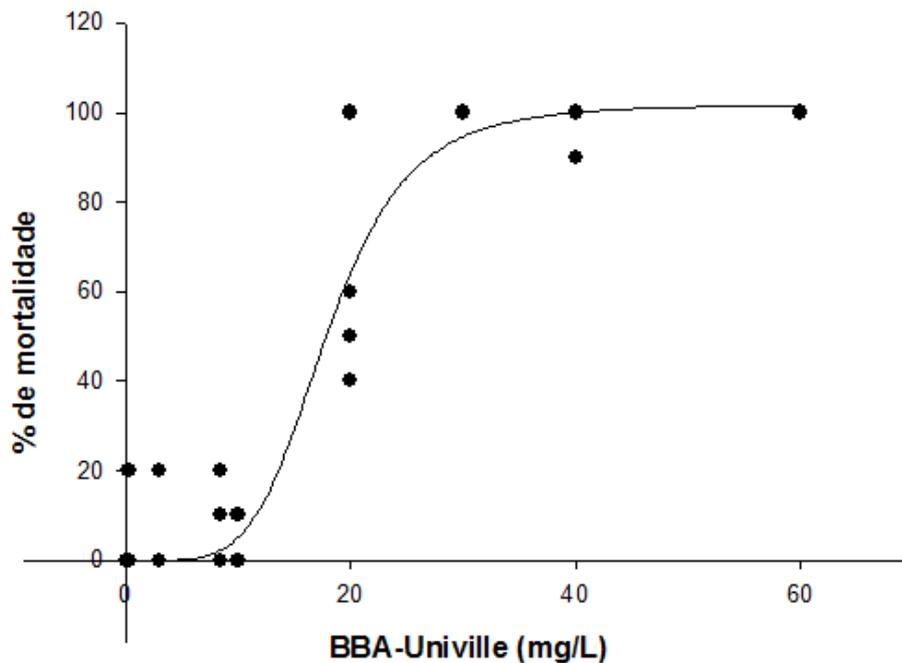
A temperatura da água, no início dos experimentos, era de aproximadamente 20°C, sendo que ao término dos mesmos, após a radiação solar simulada, havia se elevado para até 28°C. Já o pH variou entre 6,5 e 7,5 antes e após a diluição do BBA-UNIVILLE, revelando a neutralidade do meio. O oxigênio dissolvido manteve-se em 8,0 mg/L. Esses dados evidenciam que as condições controladas de laboratório não exerceram tanta influência nos resultados de toxicidade aguda para os peixes testados, pois os valores se mantiveram nos níveis de tolerância para as espécies testadas.

#### 5.3.1 *Cyprinus* sp. (Carpa Colorida)

Segundo Moreira *et al.* (2001), as carpas, pela sua capacidade de resistir a uma ampla faixa de temperatura, são hoje animais cosmopolitas, sendo que seu crescimento ótimo se dá com temperatura média de 28°C. Seu crescimento pode ser afetado por temperaturas abaixo de 15°C. Estas não se reproduzem

quando a temperatura cai abaixo de 20°C, e não ingerem alimentos quando a temperatura da água é inferior a 4°C. Resistem bem às quedas do teor de oxigênio dissolvido, suportando até 3,2 mg/L. Porém, pára de se alimentar com nível de 2,5 mg/L e pode morrer com 0,8 mg/L.

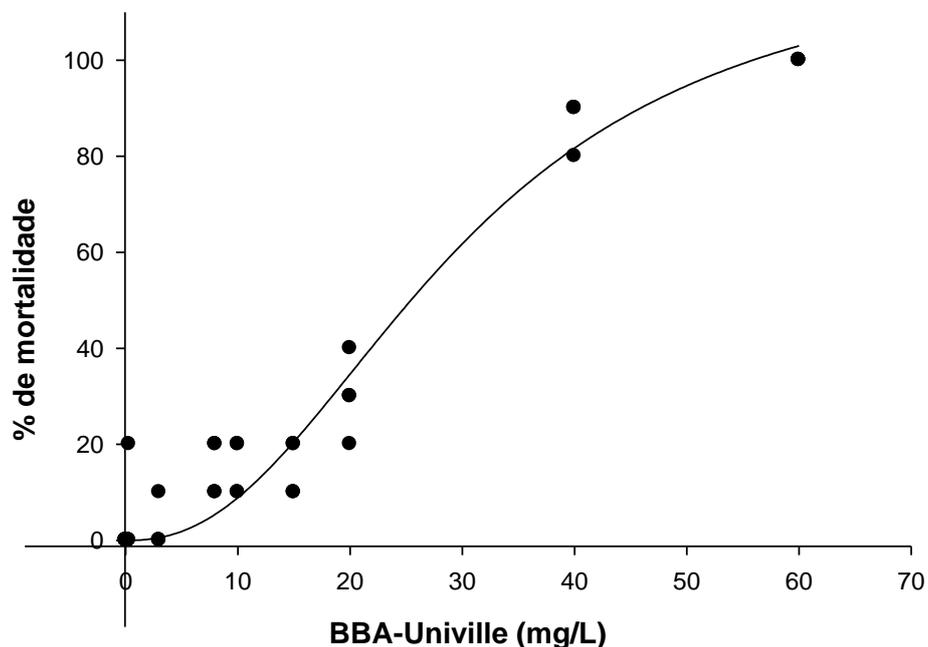
A  $CL_{50}$  foi calculada em 16,55 mg/L de BBA-UNIVILLE para as larvas de *Cyprinus* sp. em presença de luz (Fig. 28). Porém, observou-se nos controles (ausência de luz) que o valor de  $CL_{50}$  foi calculado em 20,30 mg/L. Para que o bioinseticida tenha um efetivo efeito, é preciso que ele seja exposto à luz, o que comprova a menor  $CL_{50}$  em comparação ao controle.



**Figura 28** – Porcentagem de mortalidade de larvas de *Cyprinus* sp. expostas ao BBA-UNIVILLE, com incubação de 3h na escuridão e 3h em exposição à luz solar simulada.  $CL_{50}$  = 16,55 mg/L. Cada ponto no gráfico corresponde a 10 exemplares, caracterizando uma amostra.

### 5.3.2 *Astyanax bimaculatus* (Lambari)

A sensibilidade das espécies nativas colabora, e muito, para estudos de toxicidade, visto que elas respondem melhor às condições encontradas nos ambientes naturais onde vivem (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008). Apesar da apurada sensibilidade, o valor de  $CL_{50}$  (29,96 mg/L, Fig. 29) mostra que esta espécie nativa é muito resistente ao BBA-UNIVILLE, sendo o valor mais alto obtido em toda a pesquisa. Talvez esta resistência tenha sido uma estratégia para que a espécie fugisse do estresse de estar sendo retirada do seu ambiente natural para o teste, podendo refletir um resultado diferente se o produto for testado em um rio onde ocorre o lambari.



**Figura 29** – Porcentagem de mortalidade de larvas de *Astyanax bimaculatus* expostas ao BBA-UNIVILLE, com incubação de 3h na escuridão e 3h em exposição à luz solar simulada.  $CL_{50}$  = 29,96 mg/L. Cada ponto no gráfico corresponde a 10 exemplares, caracterizando uma amostra.

Nas representações gráficas, verificou-se a curva sigmóide, ou seja, “concentrações abaixo das quais não ocorrem respostas adversas e concentrações acima de um valor que determinam efeitos deletérios sobre os organismos-teste” (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008, p.221). De acordo com os mesmos autores, a reta traçada para representar a verdadeira  $CL_{50}$ , aponta que a inclinação da mesma indica a variabilidade, a faixa de sensibilidade e o modo de ação do composto testado.

## 6 CONCLUSÕES

O objetivo maior desta pesquisa foi alcançado com êxito, visto que todas as amostragens renderam resultados que forneceram a resposta procurada quando da proposta de teste do novo produto.

Para o teste agudo em fotoperíodo de 48h com *E. gracilis*, a  $CL_{50}$  média de 12,73 mg/L dos parâmetros analisados, revelou que o valor está acima do descrito na literatura para matar mosquitos de doenças parasitárias humanas. Já para o teste crônico, também em fotoperíodo, mas de sete dias com *E. gracilis*, a CEO observada atingiu 7 mg/L, um valor mais aproximado do citado na literatura, revelando-se um valor perigoso se o micro-organismo ficar exposto pelo período de tempo supra citado ao bioinseticida.

*D. similis* revelou valores mais baixos, sendo que no teste agudo em fotoperíodo de 48h, a  $CL_{50}$  foi calculada em 8,87 mg/L e no teste crônico, em fotoperíodo e em 21 dias, concentrações acima de 4 mg/L são consideradas de efeito sobre a capacidade de gerar descendentes deste micro-organismo.

Já para os peixes foram encontrados valores mais elevados, sendo a  $CL_{50}$  de 16,55 mg/L para *Cyprinus* sp. e de 29,96 mg/L para *A. bimaculatus*, estabelecendo uma faixa segura de utilização do produto que não afetará a fauna em questão.

Esses dados refletem que o nível trófico do organismo pode tornar determinante a sua resposta negativa frente às mudanças na qualidade do ambiente.

Sugere-se que testes mais abrangentes (crônico em peixes), envolvendo outros organismos da cadeia alimentar, sejam elaborados a fim de que se possa afirmar com segurança a utilização do produto.

## REFERÊNCIAS

A NOTÍCIA. **Luta contra dengue: mais recursos para Joinville.** Jornal ANJoinville, ano 88, edição impressa 25.769, p. 8, 2011.

ADAMS, W. J. *et al.* Field comparison of laboratory – derived acute and chronic toxicity data. **Aquatic Toxicology and Hazard Assessment**: sixth symposium. Philadelphia, American Society for Testing and Materials, 1983. p. 367-385.

AHMED, H. A. el A. M. **Bio-Monitoring von Aquatischen Ökosystemen.** Doctor Thesis, Friedrich-Alexander University, Erlangen-Nürnberg, Germany. 174 p. 2010.

ALLES, G. C.; HÜBNER, M.; FIUZA, L. M. Toxicologia de *Bacillus thuringiensis* às pragas urbanas e vetores. In: Edição especial: ecotoxicologia de *Bacillus thuringiensis*. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, ano 11, n. 38, 2009/2010.

AMARILIA, A. R. **Vacina contra dengue está na última etapa de teste antes da comercialização.** 2011. Disponível em: <http://www.midiamax.com/noticias/774510-vacina+contra+dengue+esta+ultima+etapa+teste+antes+comercializacao.html>  
Acesso em: 09 nov. 2011.

ANDRADE, C.F.S. *et al.* **Uma comparação entre Vectobac AS e Bt-horus para larvas de *Aedes aegypti* (Linhagem Rockefeller).** Ecologia Aplicada - Instituto de Biologia da UNICAMP. 2007. Disponível em:  
[http://www.ib.unicamp.br/profs/eco\\_aplicada/artigos\\_tecnicos.htm](http://www.ib.unicamp.br/profs/eco_aplicada/artigos_tecnicos.htm)  
Acesso em: 31 jul. 2009.

ANVISA. **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA).** Relatório de atividade de 2009. Brasília, 22 de junho de 2010. Disponível em:  
[http://www.sgc.goias.gov.br/upload/links/arq\\_228\\_RELAT%C3%93RIO+DO+PARA+2009.pdf](http://www.sgc.goias.gov.br/upload/links/arq_228_RELAT%C3%93RIO+DO+PARA+2009.pdf) Acesso em: 3 set. 2010.

ARAGÃO, M. A.; ARAÚJO, R. P. de A. Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Eds.) **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações.** 2. ed. São Carlos: RiMa, 2008. 486p. p. 117-152.

ARANA, L. V. **Fundamentos de Aquicultura.** Florianópolis: Editora da UFSC, 2004. 349p.

ARAÚJO, R. P. de A.; ARAGÃO, M. A. Testes de toxicidade com organismos aquáticos. In: **Métodos de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos**. CETESB (Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental), Cursos e Treinamentos. Volume 1, 2007.

ARAÚJO, R. P. de A.; BURATINI, S. V. Aspectos gerais: cultivo e testes de toxicidade com *Daphnia*. In: **Métodos de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos**. CETESB (Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental), Cursos e Treinamentos. Volume 1, 2007.

ARONSSON, K. A.; ECKELUND, N. G. A. Effects on motile factors and cell growth of *Euglena gracilis* after exposure to wood ash solution: assessment of toxicity, nutrient, availability and pH-dependency. **Water, Air and Soil Pollution**, v.162, p.353-368, 2005.

AZAMBUJA, A. O. de *et al.* Ecologia de *Bacillus* entomopatogênicos. In: Edição especial: ecotoxicologia de *Bacillus thuringiensis*. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, ano 11, n. 38, 2009/2010.

AZEVEDO, F. A. de; CHASIN, A. A. da M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: RiMa, 2003. 340p.

AZIZULLAH, A.; RICHTER, P. R.; HÄDER, D-P. **Responses of morphological, physiological, and biochemical parameters in *Euglena gracilis* to 7-days exposure to two commonly used fertilizers DAP and urea**. v.24, n.1, p.21-33. 2011.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, n. 16, v. 4, p. 279-293, out./dez. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretoria Técnica de Gestão. **Dengue: manual de enfermagem – adulto e criança**. Brasília: Ministério da Saúde, 2008. 48p.

BRASIL. Decreto nº 6.041, de 8 de fevereiro de 2007. **Institui a Política de Desenvolvimento da Biotecnologia**, cria o comitê nacional de biotecnologia e dá outras providências. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2007-2010/2007/decreto/d6041.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2007/decreto/d6041.htm) Acesso em: 06 set. 2010.

BRASÍLIA. Lei nº 6.360, de 23 de Setembro 1976. **Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos (...) saneantes e outros produtos, e dá outras providências.** Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/consolidada/lei\\_6360\\_76.pdf](http://www.anvisa.gov.br/legis/consolidada/lei_6360_76.pdf) Acesso em: 23 nov. 2011.

BRENTANO, D. M. **Desenvolvimento e aplicação do teste de toxicidade crônica com *Daphnia magna*: avaliação de efluentes tratados de um aterro sanitário.** 2006. 145f.. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental – Toxicologia Ambiental) – Centro Tecnológico, Universidade de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

BUIKEMA, A. L.; VOSHELL, J. R. Toxicity studies using freshwater benthic macroinvertebrates. In: ROSENBERG, D. M.; RESH, V. H. (Eds.) **Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates.** Nova York: Chapman and Hall, 1993. 488p. p. 344-398.

BURATINI, S. V. ; BERTOLETTI, E. Análise estatística. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Eds.) **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações.** 2. Ed. São Carlos: RiMa, 2008. 486p. p. 221-249.

BURATINI, S. V.; BRANDELLI, A. Bioacumulação. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Eds.) **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações.** 2. Ed. São Carlos: RiMa, 2008. 486p. p. 55-88.

CABRERA, L.; COSTA, F. P.; PRIMEL, E. G. Estimativa de risco de contaminação das águas por pesticidas na região sul do Estado do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1982-1986, 2008.

CALDAS, E. D.; SOUZA, L. C. K. R. de. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n. 5, p. 522-528. out. 2000.

CÂMARA, F. P. *et al.* Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 192-196, mar./abr. 2007.

CASTRO, A. A. A. S. de. **Avaliação ecotoxicológica de efluentes industriais utilizando *Danio rerio* Hamilton-Buchanan, 1822 (TELEOSTEI, CYPRINIDAE).** 2008. 63f.. Dissertação (Mestrado em Bioecologia Aquática) – Departamento de Oceanografia e Limnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2008.

CETESB. Roteiro de testes de toxicidade aguda com *Daphnia similis*. In: **Métodos de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos**. São Paulo: CETESB, 2007. 286p.

CHECCUCCI, A.; COLOMBETTI, G.; FERRARA, R.; LENCI, F. Action spectra for photoaccumulation of green and colorless *Euglena*: evidence for identification of receptor pigments. **Photochemistry and Photobiology**, 23, p.51-54, 1976.

CLASEN, B. E. **Biomarcadores de estresse oxidativo em carpas (*Cyprinus carpio*) expostas aos inseticidas carbofuran e fipronil em condições de lavouras de arroz**. 2009. 80f.. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Bioquímica Toxicológica) – Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Santa Maria, 2009.

COMBATE À DENGUE. **Dengue terá nova classificação a partir de 2011**. 2010. Disponível em: <http://www.combateadengue.com.br/?p=606> Acesso em: 01 nov. 2010.

COSTA, E. L. N.; LUCHO, A. P. R.; FRITZ, L. L.; FIUZA, L. M. Artrópodes e bactérias entomopatogênicos. In: Edição especial: ecotoxicologia de *Bacillus thuringiensis*. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, ano 11, n. 38, 2009/2010.

CORDATO, L. A. B.; NAKAMA, L. Pesquisa em saúde: metodologia quantitativa ou qualitativa? **Revista Espaço para a Saúde**, v. 8, n. 1, p. 34-35, dez. 2006.

D`AMATO, C.; TORRES, J. P. M.; MALM, O. DDT (dicloro difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental – uma revisão. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 995-1002. 2002.

DANILOV, R.; ECKELUND, N. **Correlation between different levels of waste substances from the forest industry and the growth rate of *Euglena gracilis***. Report from Mid. Sweden University, Sweden, 1998.

DIEL, C.; FACCHINI, L. A.; DALL'AGNOL, M. M. Inseticidas domésticos: padrão de uso segundo a renda per capita. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 1, p. 75-82. fev. 2003.

DIRETORIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA (DIVE). **Dengue. Orientações Técnicas para Pessoal de Campo**. Ago/2007. 64p.

ERZINGER, G. S.; CIAMPO, L. F.; HÄDER, D-P. Equipamento e processo para análise de toxicidade em ambientes aquáticos. **Instituto Nacional de Propriedade Intelectual** (INPI), Brasil. PI1102317-1. 2010.

ERZINGER, G. S.; HÄDER, D-P. Non-toxic and biodegradable insecticide formulation. **World Intellectual Property Organization** (WIPO), EUA. WO2011075805. 2010.

ERZINGER, G. S.; HÄDER, D-P. Formulação inseticida atóxica e biodegradável. **Instituto Nacional de Propriedade Intelectual**. INPI PI0922458-0. 2009.

FILHO, E. Z. Piscicultura das espécies nativas de água doce. In: POLI, C. R.; POLI, A. T. B. (Orgs.). **Aquicultura: experiências brasileiras**. Florianópolis: Multitarefa, 2004. 456 p. p. 337-368.

FUNASA. **Controle biológico e manejo ambiental**. 2001. Disponível em: [http://portal2.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ipcv\\_013.pdf](http://portal2.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ipcv_013.pdf) Acessado em: 07 set. 2010.

GELBER, R. D. *et al.* Statistical analysis. In: RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. (Eds.) **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. 1985. 662p. p. 110-123.

GRAEFF, A.; TOMAZELLI, A. Fontes e níveis de óleos na alimentação de carpa comum (*Cyprinus carpio* L.) na fase de crescimento. **Ciências Agrotécnicas**, Lavras, v. 31, n. 5, p. 1545-1551, set./out., 2007.

GUIMARÃES, R. F.; ASMUS, C. I. R. F.; MEYER, A. DDT reintroduction for malaria control: the cost-benefit debate for public health. **Caderno de Saúde Pública**, v. 23, n. 12, p. 2835-2844. 2007.

HÄDER, D-P. Polartaxis, gravitaxis and vertical phototaxis in the green flagellate, *Euglena gracilis*. **Archive Microbiology**, n.147, p.179-183, 1987.

HÄDER, D-P.; GRIEBENOW, K. Orientation of the green flagellate, *Euglena gracilis*, in a vertical column of water. **FEMS Microbiology Ecology**, n. 53, p.159-167, 1998.

HÄDER, D-P.; LEBERT, M. Real time computer controlled tracking of motile microorganisms. **Photochemistry and Photobiology**, v. 42, p. 509-514. 1985.

HÄDER, D-P.; VOGEL, K. **Graviorientation in photosynthetic flagellates.** ESA SP307, p.521-526, November 1990.

HÄDER, D-P.; LIU, S. Motility and gravitactic orientation of the flagellate, *Euglena gracilis*, impaired by artificial and solar UVB radiation. **Currence Microbiology**, n. 21, p.161-168, 1990.

HÄDER, D-P.; VOGEL, K.; SCHDFER, J. Responses of the photosynthetic flagellate, *Euglena gracilis*, to microgravity. **Microgravity Science Technology III**, n. 2, p.110-116, 1990.

HEMMERSBACH-KRAUSE, R.; HÄDER, D-P. Negative gravitaxis (geotaxis) of paramecium—Demonstrated by image analysis. **Apply Microgravity Technology II**, n. 4, p.221-223, 1990.

HICKMAN JR., C. P.; ROBERTS, L. S.; LARSON, A. **Princípios integrados de zoologia.** 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 846 p.

KUROKI, T. **Introdução ao nishikigoi.** Shimonoseki (Japão): Shuji Fujita, 1983. 272 p.

LEBERT, M; HÄDER, D-P. Aquarack: Longterm growth facility for professional gravisensing cells. In: **Proceedings of the 2nd European Symposium on the Utilisation of the International Space Station**, pp. 533–537, ESTEC, Noordwijk. The Netherlands. 16–18 November 1998. (ESA SP-433), February, 1999a.

LEBERT, M; HÄDER, D-P. Gravitaxis and graviperception in flagellates and ciliates. In: **Proceedings 14th ESA Symposium on European Rocket and Balloon Programmes and Related Research**, pp. 479–486, Potsdam, Germany. 31 May–3 June 1999, (ESA SP- 437), September, 1999b.

LUCHO, A. P. R.; BERLITZ, D. L.; COSTA, E. L. N.; FIUZA, L. M. Toxicidade de *Bacillus thuringiensis* em organismos não-alvo. In: Edição especial: ecotoxicologia de *Bacillus thuringiensis*. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, ano 11, n. 38, 2009/2010.

LUND, H.; LUND, J. **Freshwater algae, their microscopic world explored.** Biopress, Bristol, 1996.

MAGALHÃES, D. de. P.; FERRÃO FILHO, A. da S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 355-381. 2008.

MARTINS, F. S. V.; CASTIÑEIRAS, T. M. P. P.; PEDRO, L. G. F. CIVES. Centro de Informação em Saúde para Viajantes. **Malária**. 2008. Disponível em: <http://www.cives.ufrj.br/informacao/malaria/mal-iv.html> Acesso em: 01 nov. 2010.

McCORMICK, P. V.; CAIRNS, J. Algae as indicators of environmental change. **Journal Apply Phycology**, n. 6, p.509–526, 1994.

MILLÁN DE KUHN, R; STREB, C; BREITER, R; RICHTER, P; NEEBE, T; HÄDER, D-P. Screening for unicellular algae as possible bioassay organisms for monitoring marine water samples. **Water Research**, n. 40, p. 2695-2700. 2006.

MINAYO, M. C. de S.; SANCHES, O. Quantitativo-qualitativo: oposição ou complementaridade? **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro. v. 9, n. 3, p. 237-248, jul./set. 1993.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Informe epidemiológico da dengue**. 2010. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe\\_da\\_dengue\\_ate\\_a\\_semana9.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_da_dengue_ate_a_semana9.pdf) Acesso em: 01 nov. 2010.

MOREIRA, H. L. M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P.; ZIMMERMANN, S. **Fundamentos da Moderna Aquicultura**. Canoas: Ed. ULBRA, 2001. 200p.  
MOUNT, D. I. Scientific problems in using multispecies toxicity tests for regulatory purposes. In: CAIRNS, J. Jr. (Ed.) **Multispecies toxicity testing**. Cap. 2, 1985.

MOUNT, D. I. Scientific problems in using multispecies toxicity tests of regulatory purposes. In: CAIRNS, J. **Multispecies toxicity testing**. 1985.

OLIVEIRA, M. de. Controle da dengue. **Jornal Notícias do Dia**. Opinião. 2008.

OLIVEIRA, L. **Ministério da Saúde divulga novo mapa de risco da dengue no Brasil**. 2011. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id\\_area=1450&CO\\_NOTICIA=12073](http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id_area=1450&CO_NOTICIA=12073) Acesso em: 12 jan. 2011.

PARDI, M. C.; SANTOS, I. F. dos; SOUZA, E. R. de; PARDI, H. S. **Ciência, higiene e tecnologia da carne**. Goiânia: EDUFF-UFG, 1993. 586p.

PETERSEN-MAHRT, S. K. **The surface complex of *Euglena gracilis***. Involvement in cellular movements and biochemical and molecular analyses of the components. Thesis, Lund University, Lund, Sweden, 1997.

PINTO, L. M. N.; BERLITZ, D. L.; CASTILHOS-FORTES, R.; FIUZA, L. M. Toxinas de *Bacillus thuringiensis*. In: Edição especial: ecotoxicologia de *Bacillus thuringiensis*. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, ano 11, n. 38, 2009/2010.

PLANETA. Volta ao Mundo. Malária veio dos gorilas. **Revista Planeta**, ano 38, edição 458, p.12, nov. 2010.

PLANETA. Volta ao Mundo. Genética contra o mosquito da dengue. **Revista Planeta**, ano 39, edição 462, p.23, mar. 2011.

PORRA, R. J., THOMPSON, W. A., KRIEDEMANN, P. E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 975, p.384-394, 1989.

RAND, G. M. **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. Effects, environment fate and risk assessment. 2. ed. Washington: Taylor & Francis, 1995. 1125p.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. Introduction. In: RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. (Eds.) **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. 1985. 662p. p. 1-10.

REVIERS, B. de. **Biologia e filogenia das algas**. Porto Alegre: Artmed, 2006. 280p.

REY, L. **Parasitologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 731p.

REZENDE, M. C. de. *et al.* Instruções para bioensaios para avaliação de aplicações espaciais de inseticidas. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 13, n. 3, p. 185-190. jul./set. 2004.

ROSS, G. **Risks and benefits of DDT**. *Lancet*, v. 366, p.1771-1772. 2005.

SALZANO, F. M. Transgenia: amiga ou inimiga? In: SALZANO, F. M. **DNA, e eu com isso?** São Paulo: Oficina de Textos, 2005. 88p. p. 63-71.

SANT'ANNA, F. B. *et al.* Eficácia do piretróide sintético alfametrina no controle de *Rhipicephalus sanguineus* em cães. **Parasitologia Latinoamericana**, v. 30, p. 30-33, 2002.

SCHLÖSSER, U. G. SAG-Sammlung von algenkulturen at the University of Göttingen. Catalogue of strains. **Acta Botanica**, 107, p.113-186,1994.

SEBBEN, A.; SCHWARTZ, C. A.; CRUZ, J. dos S. A defesa química dos anfíbios. **Ciência Hoje**, v. 15, n. 87, p. 25-33, jan./fev. 1993.

SETÚBAL, C. A. **Procura por novos fotossensibilizadores para uso em terapia fotodinâmica.** 2007. 111f.. Dissertação (Mestrado em Química – Físico-Química) – Ciências Exatas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

SILVA, R. R. P. da. **Avaliação da toxicidade aguda e genotoxicidade de extrato de floração de *Microcystis* spp. para peixes de água doce.** 2009. 110f.. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

SILVA, S. C. Brasil é o quarto maior consumidor de agrotóxicos. **O Estado de São Paulo**, Geral Ambiente, p. A16, 18 jul.1999.

SILVEIRA, A. C.; REZENDE, D. F. de. **Avaliação da estratégia global de controle integrado da malária no Brasil.** Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, 2001. 120p.

SLOOF, W.; VAN OERS, J. A. M.; De ZWART, D. Margins of uncertainty in ecotoxicological hazard assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 5, p. 841-852. 1986.

STARR, R. C. The culture collection of algae at Indiana University. **American Journal of Botany**, n.51, p.1013-1044, 1964.

STOCKHOLM CONVENTION ON PERSISTENT ORGANIC POLLUTANTS, 2008, Geneva. **Global status of DDT and its alternatives for use in vector control to prevent disease.** Geneva: United Nations Environment Programme, 2008.

TAHEDL, H.; HÄDER, D-P. Automated biomonitoring using real time movement analysis of *Euglena gracilis*. **Ecotoxicological and Environmental Safety**, v. 48, p.161-169, 2001.

TAHEDL, H; HÄDER, D-P. Fast examination of water quality using the automatic biotest ECOTOX based on the movement behavior of a freshwater flagellate. **Water Research**, v. 33, p. 426-432. 1999.

TUNDISI, J. G.; TUNDISI, T. M. **Limnologia**. São Paulo: Oficina de Textos, 2008. 631p.

ZAGATTO, P. A. Ecotoxicologia. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Eds.) **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. 2. ed. São Carlos: RiMa, 2008. 486p. p. 1-13.

ZEPEDA, V. **Dengue põe em evidência pesquisas realizadas no Rio de Janeiro**. 2008. Disponível em: [http://www.faperj.br/boletim\\_interna.phtml?obj\\_id=4424](http://www.faperj.br/boletim_interna.phtml?obj_id=4424) Acesso em: 02 nov. 2010.

WANDSCHEER, L. **Embrapa cria inseticida biológico para combater borrachudos**. 2010. Disponível em: <http://noticias.ambientebrasil.com.br/clipping/2010/04/27/54178-embrapa-cria-inseticida-biologico-para-combater-borrachudos.html> Acesso em: 20 mai. 2010.

WALSER, C. **O retorno do polêmico inseticida DDT**. 2008. Disponível em: [http://www.swissinfo.ch/por/capa/O\\_retorno\\_do\\_polemico\\_inseticida\\_DDT.html](http://www.swissinfo.ch/por/capa/O_retorno_do_polemico_inseticida_DDT.html) Acesso em: 17 jun. 2009.

WILLEMANN, R. L. **Development of an application of the ECOTOX system in the estuarine zone of the Baía da Babitonga, SC, Brazil**, Master Thesis, Friedrich-Alexander University, Erlangen-Nürnberg, Germany. p. 1-72. 2002.

WOHLLEBE, S. *et al.* Photodynamic control of human pathogenic parasites in aquatic ecosystems using chlorophyllin and pheophorbid as photodynamic substances. **Parasitol Research**, v. 104, n. 3, p. 593-600, fev. 2009.

WOHLLEBE, S. *et al.* Photodynamic treatment of *Chaoborus crystallinus* larvae with chlorophyllin induces necrosis and apoptosis. **Photochemistry and Photobiology**, v.85, n.5, p.1113-1122, 2011.