

SÁVIO HENRIQUE CALAZANS CAMPOS

**AVALIAÇÃO DE BIOCIDAS DISSOLVIDOS E
MICROENCAPSULADOS PARA O CONTROLE DO MEXILHÃO
DOURADO *LIMNOPERNA FORTUNEI* (DUNKER, 1857).**

*Dissertação apresentada á coordenação do
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
(UFRJ) como parte dos requisitos necessários
para a obtenção do grau de Mestre em
Ciências Biológicas (Biofísica).*

Orientador: Mauro de Freitas Rebelo



**Programa de Biofísica Ambiental
Laboratório de Radioisótopos Eduardo Pena Franca
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
Universidade Federal do Rio de Janeiro**

RIO DE JANEIRO

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

AVALIAÇÃO DE BIOCIDAS DISSOLVIDOS E MICROENCAPSULADOS PARA O CONTROLE DO MEXILHÃO DOURADO *LIMNOPERNA FORTUNEI* (DUNKER, 1857).

SÁVIO HENRIQUE CALAZANS CAMPOS

Orientador: Mauro de Freitas Rebelo

Rio de Janeiro, 31 de Julho de 2009.

Dissertação apresentada á coordenação do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (UFRJ) como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica).

Aprovado por:

Dra. Andrea de Oliveira Ribeiro Junqueira – UFRJ

Dra. Sandra Maria Feliciano de Oliveira e Azevedo - UFRJ

Dr. Flavio da Costa Fernandes - IEAPM

Dr. Mauro de Freitas Rebelo - UFRJ

**RIO DE JANEIRO
2009**

FICHA CATALOGRÁFICA

Calazans Campos, Sávio Henrique

AVALIAÇÃO DE BIOCIDAS DISSOLVIDOS E MICROENCAPSULADOS PARA O CONTROLE DO MEXILHÃO DOURADO *LIMNOPERNA FORTUNEI* (DUNKER, 1857). UFRJ, IBCCF, 2009.

63f. 21 il. 3 Tab.

Orientador: Mauro de Freitas Rebelo.

Dissertação de Mestrado – UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.

Referências bibliográficas: Páginas 61-63

Palavras chaves:

1. Espécies Invasora
2. *Limnoperna fortunei*
3. Mexilhão Dourado
4. Controle
5. Biocida Microencapsulado

Dedico esta dissertação a minha família, as pessoas que eu gosto, aos meus amigos e aos que acreditaram em mim.

AGRADECIMENTO

“Uma dissertação envolve muito trabalho sob pressão. Em momentos vividos de forma solitária e em outros de forma solidária. O produto final é sempre resultado da contribuição de várias pessoas, embora erros e acertos sejam de responsabilidade exclusiva do autor.” Desta forma, neste espaço, dedico e agradeço aos que estiveram envolvidos, de alguma forma, na conclusão desta dissertação.

A uma pessoa muito especial que me incentivou e abriu caminhos para que este trabalho fosse realizado, como um professor pôde me transmitir conceitos de forma ímpar envoltos de paciência e perseverança, por ser um exemplo de homem, pesquisador e orientador. Obrigado por ter acreditado e depositado em mim sua confiança e por ter compartilhado seus conhecimentos.

Agradeço ao prof. Mauro de Freitas Rebelo por ter me aceitado como aluno, pela paciência e ensinamentos científicos.

Ao Professor David Aldridge por ter depositado sua confiança e gentilmente ter fornecido produto de seus estudos, ainda em desenvolvimento, para que pudessem ser testados longe de seus olhos.

Agradeço ao IEAPM pela estrutura e o espaço. A todos os militares e civis que contribuem com o desenvolvimento dos trabalhos. Em especial, para a nossa chefe do departamento, Dra Eliane Gonzalez Rodrigues. Receba meus sinceros agradecimentos - Eu nunca esquecerei o apoio, a preocupação e o reconhecimento que recebi ao longo do nosso convívio.

Ao meu amigo de caminhadas de fim de tarde, de conversas e opiniões e Prof. Cadu, “- Sua Mula! Tudo vai dar certo!”.

Aos meus dois grandes companheiros de laboratório Orlemir Carrerete (Sô Lemir) e Thiago dos Santos (O mundo é insano) sem o apoio de vocês o trabalho seria triplicado e eu nunca teria aprendido a impermeabilizar uma laje.

A minha grande amiga Lívia Fernandes, que também participou das análises de laboratório. Você me fez ser mais atento (nunca mais uma lamparina acesa).

Agradeço também as pessoas que me apoiaram com muita paciência na confecção da dissertação: Laura, Márcio; na revisão: Luciana Brito, Maria Soledad; Prof. João Paulo (UFRJ). Com o apoio de vocês eu consegui melhorar muito na escrita e forma final.

A todos os “Maus” elementos do Radioisótopos. Márcio; Petrus; Cláudio; Rodrigo – “Vai caipira! Hô sô! Chico Bento! Sumério!”.

Saninha! Agradeço sua companhia e “paciência” no período que compartilhamos juntos. Muitas confusões, conflitos e aprendizado, sem me esquecer dos muitos bons momentos.

Agradeço a minha família, podendo não ser a melhor, mas é sem dúvida a maior ligação que possuo com outro ser humano. Iniciando pelo provimento e o suporte de minha existência. Ao meu Pai – Reconheço e agradeço a ajuda que foi substancial em diversos momentos difíceis. A minha Mãe – Obrigado pela companhia e apoio nestes anos de vida.

Aos compenetrados convictos:

“Infelizmente a ciência, utilíssima, especialista em saber como as coisas funcionam, tudo ignora sobre o coração humano. É preciso sonhar para se decidir sobre o destino da navegação. Mas o coração Humano, lugar dos sonhos, contrário da ciência, é coisa imprecisa. Disse certo poeta “Viver não é preciso”. Primeiro temos o impreciso desejo de navegar. Só depois vem a precisa ciência de navegar.”

ALVES, Rubem. Entre a ciência e a Sapiência – o dilema da educação.

Aos desatentos:

“É melhor tentar e falhar, que se preocupar e ver a vida passar; é melhor tentar, ainda que em vão, que se sentar fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar que em dias tristes em casa me esconder. Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver....”

Martin Luther King Jr., 1968.

RESUMO

Limnoperna fortunei é um bivalve conhecido como “mexilhão dourado” e se tornou invasor nas águas continentais da América do Sul. No Brasil, este mexilhão se tornou peste nas bacias do Rio Paraná, Rio Paraguai e Lagoa dos Patos - RS. O *L. fortunei* se fixa em qualquer substrato firme e forma aglomerados (incrustação), que causam grandes prejuízos econômicos e ambientais. A principal forma de controle das infestações deste mexilhão é a utilização de substâncias biocidas, que muitas vezes são um sério risco para outras espécies. Este estudo teve por objetivo avaliar o efeito biocida de substâncias dissolvidas (cloreto de potássio – KCL, dicloroisocianurato de sódio, dióxido de cloro líquido ativado e o hipoclorito de sódio) e substâncias microencapsuladas (KCL e Amina DB45) sobre o bivalve *L. fortunei* através de ensaios toxicológicos, determinando o efeito do biocida através da mortalidade. Foi utilizada uma metodologia semi-estática com 48h de exposição com todas as substâncias avaliadas. Além desta, foi desenvolvido um sistema com fluxo contínuo de água em calhas, simulando as condições de instalações hidráulicas. Neste sistema, foi testado 6h de exposição intermitente aos microencapsulados. Nas metodologias utilizadas, os organismos foram expostos em diferentes concentrações que continham no mínimo 3 replicações. O cálculo da CL50 foi realizado tanto pelo método do probitos (PROBITOS 1.5/USEPA) quanto pelo método de Trimmed Spermam Karber (TSK 1.5/USEPA). Os valores de CL50 avaliadas com a metodologia semi-estática com 48h de exposição para as substâncias foram os seguintes: 108,96 mg.L⁻¹ para o dicloroisocianurato de sódio; 13,99 mg.L⁻¹ para o dióxido de cloro líquido ativado e 0,516 mg.L⁻¹ para o hipoclorito de sódio. O KCL avaliado como controle positivo apresentou CL50 = 293,38 mg.L⁻¹. Os microencapsulados variaram entre 270,65 mg.L⁻¹ para os microencapsulados de cloreto de potássio e 29,99 mg.L⁻¹ para os microencapsulados de amina DB45. Foi possível concluir que as substâncias cloradas utilizadas apresentam alta variabilidade no efeito de mortalidade dos mexilhões e que os microencapsulados de amina DB45 foram mais tóxicos para o *L. fortunei* que os de KCL em todos os ensaios realizados. Foi possível verificar também que a forma microencapsulada desponta como uma alternativa de fornecer biocidas para o controle de mexilhões com um menor risco para o ambiente.

ABSTRACT

Limnoperna fortunei (common name “golden mussel”) is an invasive bivalve in Brazil and South America continental waters. The mussel has become plague throughout the basin of the Parana and Paraguay rivers. It has also invaded the Patos’lagoon and Guaiba river in Porto Alegre in south of Brazil. The Golden mussel is able to fix in any hard substrate and form clusters called macrofouling that can cause economic and environmental damage. Biocides have been the primary way to control infestations, which pose great collateral environmental risk. Thus, it is necessary to evaluate what substances are most effective with the least environmental risk. This study aimed to evaluate the biocide effect of dissolved substances (Potassium chloride - KCL and 3 types of chlorine) and microencapsulated substances (KCL and Amina DB45) on the bivalve *L. fortunei*, by determining the lethal effect of the biocides. We used a semi-static 48h exposure methodology to all substances evaluated. In addition, a system was developed with continuous flow of water in pipeline and was tested for 6 hours of intermittent exposure to microcapsules, which simulates the conditions of hydraulic installations. The methodology used organisms exposed to different concentrations containing at least 3 replicates. The LC50 was calculated by probit (PROBIT 1.5/USEPA) and Trimmed Sperma Karber (TSK 1.5/USEPA). The LC50 values were assessed by the semi-static methodology with 48h of exposure to the substances were: chlorine was between 108.96 mg.L⁻¹ for sodium dichloroisocyanurate, 13.99 mg.L⁻¹ for liquid chlorine dioxide activated and 0.516 mg.L⁻¹ for sodium hypochlorite. The KCL assessed as positive control showed LC50 = 293.38 mg.L⁻¹. The microencapsulated ranged between 270.65 mg.L⁻¹ (potassium chloride) and 29.99 mg.L⁻¹ (DB45 amine). We concluded that chloride substances used has a variable effect on mortality in mussels and DB45 amine microcapsules were more toxic to *L. fortunei* than potassium chloride in all tests. It can also verify that microencapsulated emerge as an alternative and safer way to supply biocides for mussels control.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - <i>LIMNOPERNA FORTUNEI</i> – “MEXILHÃO DOURADO”. (A - MEXILHÕES MANTIDOS EM LABORATÓRIOS. B – PROJEÇÃO DO PÉ, MEXILHÃO SE LOCOMOVENDO. C - MEXILHÕES ADULTOS SE AGREGANDO. D - MEXILHÃO FILTRANDO).....	14
FIGURA 2 - HISTÓRICO DA DISPERSÃO E ATUAL OCORRÊNCIA DE <i>LIMNOPERNA FORTUNEI</i> PELA AMÉRICA DO SUL	18
FIGURA 3 - INCRUSTAÇÕES (“MACROFOULING”) GERADAS POR ADESÃO DO <i>LIMNOPERNA FORTUNEI</i> (A – INCRUSTAÇÕES EM EMBARCAÇÕES AUMENTANDO A RUGOSIDADE E O PESO DO CASCO; B – DETALHE DE FLUTUANTES PARA EMBARQUE E DESEMBARQUE DE PASSAGEIROS; C – MOLUSCO NATIVO, <i>ANODONTITES TRAPESIALIS</i> , RECOBERTO POR <i>LIMNOPERNA FORTUNEI</i> , CAUSANDO IMPEDIMENTO DE ALIMENTAÇÃO E RESPIRAÇÃO).	19
FIGURA 4 - A IDÉIA DE ENCAPSULAMENTO DE BIOCIDA PARA O CONTROLE DE MEXILHÕES.....	21
FIGURA 5 - DESENHO EXPERIMENTAL DAS ATIVIDADES REALIZADAS (A - ESQUEMA DE EXPERIMENTO SEMI-ESTÁTICO; B – MEXILHÕES NO BÉQUER; C – MEXILHÕES NAS CALHAS; DICS = DICLOROISOCIANURATO DE SÓDIO; DIOXCLORO = DIÓXIDO DE CLORO LÍQUIDO ATIVADO; KCL = CLORETO DE POTÁSSIO).	25
FIGURA 6 – ÁREA DE COLETA: EM DESTAQUE, O QUADRADO EM VERMELHO MARCA A ÁREA DE COLETA DOS MEXILHÕES, ILHA DAS FLORES (29°58’11,99” – S / 51°16’56,16” – O), PORTO ALEGRE – RS (FOTO ADAPTADA DO GOOGLE EARTH© - 13/05/2008).....	26
FIGURA 7 – SISTEMA DE TANQUES CONSTRUÍDOS PARA MANUTENÇÃO DE MEXILHÕES, LABORATÓRIO DE CULTIVO DE ORGANISMOS DO IEAPM	28
FIGURA 8 - MICROCÁPSULAS DE CLORETO DE POTÁSSIO UTILIZADAS NESTE ESTUDO (FOTO DE MICROSCÓPIO ÓTICO 50X.).....	29
FIGURA 9 - ESQUEMA DA RÉGUA DE SELEÇÃO DOS ORGANISMOS.	31
FIGURA 10 - SISTEMA DE CALHAS COM FLUXO CONTÍNUO UNIDIRECIONAL SEM O REUSO DA ÁGUA.....	35
FIGURA 11 - MORTALIDADE DO <i>LIMNOPERNA FORTUNEI</i> EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO DCIS.....	38
FIGURA 12- MORTALIDADE DO <i>LIMNOPERNA FORTUNEI</i> EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO DIÓXIDO DE CLORO LÍQUIDO ATIVADO.....	39
FIGURA 13 - MORTALIDADE DO <i>LIMNOPERNA FORTUNEI</i> EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO HIPOCLORITO DE SÓDIO.....	40
FIGURA 14 - MORTALIDADE DO <i>LIMNOPERNA FORTUNEI</i> EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO CLORETO DE POTÁSSIO – KCL.	41
FIGURA 15 - MORTALIDADE DO <i>LIMNOPERNA FORTUNEI</i> EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO MICROENCAPSULADOS DE CLORETO DE POTÁSSIO – SEMI-ESTÁTICO 48H.....	42
FIGURA 16 - MORTALIDADE DO <i>LIMNOPERNA FORTUNEI</i> EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO MICROENCAPSULADO DE AMINA - SEMI-ESTÁTICO 48H.	43
FIGURA 17 - REMOÇÃO DE PARTÍCULAS EM SUSPENSÃO ESTIMADA PELO RESÍDUO DE CLOROFILA-A APÓS APLICAÇÃO DE 500 MG DE <i>SPIRULINA SP</i> CORRESPONDENTE A 63 MG.L ⁻¹ (A) E 50 MG DE <i>SPIRULINA</i> CORRESPONDENTE A 6,3 MG.L ⁻¹ E (B); C – TESTE DE MORTALIDADE UTILIZANDO AGENTE OXIDANTE DILUÍDO ÁC. TRICLOROISOCIANÚRICO.	44
FIGURA 18 - MORTALIDADE DO <i>LIMNOPERNA FORTUNEI</i> EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO MICROENCAPSULADOS DE CLORETO DE POTÁSSIO – FLUXO 6H.....	45
FIGURA 19 – MORTALIDADE DO <i>LIMNOPERNA FORTUNEI</i> EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO MICROENCAPSULADOS DE AMINA – FLUXO 6H	46
FIGURA 20 - ORGANISMOS EXPOSTOS ÀS ALTAS E BAIXAS CONCENTRAÇÕES DE DIÓXIDO DE CLORO (SETA: MATRIZ ORGÂNICA OXIDADA, REGIÕES ESBRANQUIÇADAS PRÓXIMO À CHARNEIRA).	55
FIGURA 21 - ORGANISMO VIVO, COM REAÇÃO LETÁRGICA. MANTO PARA FORA DA CONCHA, SENDO LENTAMENTE RETRAÍDO.	56

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DO BIVALVE, SEGUNDO NEWELL (1969).	14
TABELA 2 - SUBSTÂNCIAS AVALIADAS.	30
TABELA 3 - RESULTADOS DE CL50 EM FUNÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS TESTADAS.....	47

ÍNDICE

FOLHA DE ROSTO	I
FOLHA DE APROVAÇÃO	II
FICHA CATALOGRÁFICA	III
AGRADECIMENTO.....	V
RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS.....	X
ÍNDICE	XI
1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVO.....	23
3. METODOLOGIA.....	24
3.1. DESENHO EXPERIMENTAL	24
3.2. SUBSTÂNCIAS TESTADAS.....	28
3.3. ENSAIOS TOXICOLÓGICOS	31
3.3.1. Seleção dos organismos e montagem	31
3.3.2. Exposição aos biocidas	32
3.3.3. Período de recuperação	36
3.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	36
4. RESULTADOS	38
4.1. AGENTES OXIDANTES DISSOLVIDOS	38
4.1.1. Dicloroisocianurato de sódio - DCIS.....	38
4.1.2. Dióxido de Cloro líquido ativado.....	39
4.1.3. Hipoclorito de sódio.....	40
4.2. CONTROLE POSITIVO (SAL CLORETO DE POTÁSSIO - KCl).....	41
4.3. MICROENCAPSULADOS	42
4.3.1. Microencapsulado de cloreto de potássio – KCl	42
4.3.2. Microencapsulado de amina quaternária DB45.....	43
4.3.3. Sistema de fluxo contínuo	44
4.4. ESTIMATIVA DA CL50.....	47
5. DISCUSSÃO	48
5.1. CONSIDERAÇÕES METODOLÓGICAS	49
5.2. A TOXICIDADE DAS SUBSTÂNCIAS.....	49
5.2.1. Agentes oxidantes.....	49
5.2.2. Controle Positivo (KCl).....	51
5.2.3. Microencapsulado.....	52
5.3. COMPARAÇÕES E OBSERVAÇÕES.....	54
6. CONCLUSÕES.....	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

1. INTRODUÇÃO

A bioinvasão ou invasão biológica consiste na chegada de espécies em locais onde não existiam historicamente (Carlton, 1979). Em pequenas escalas, este é um processo natural, porém, as taxas e vias pelas quais as espécies percorrem o planeta têm sido alteradas pela intensificação dos transportes terrestres, aéreos e marítimos, gerando desequilíbrio ecológico e econômico (Elton, 1958; Williamsom, 1996; Vitousek et al., 1997). Os custos com as invasões biológicas são estimados em escalas de milhões a bilhões de dólares anuais com o seu controle ou reparo dos danos (Pimentel et al., 2005). Os danos ambientais causados por espécies invasoras são tão sérios que hoje elas são consideradas uma das maiores causas da perda de biodiversidade no mundo, atrás apenas da destruição dos habitats e das mudanças climáticas e seguida pela super exploração dos recursos e do incremento de nutrientes (Convenção da Diversidade Biológica, 2006).

Um organismo ao ser introduzido em um novo ambiente enfrenta dificuldades para se estabelecer. Cinco etapas necessitam ser superadas para que uma espécie seja considerada invasora: transporte, liberação, estabelecimento, dispersão e impacto. As três primeiras são limites estabelecidos pelas barreiras naturais que determinam a distribuição dos organismos e as caracterizam como uma espécie não nativa. Quando se ultrapassa as cinco etapas, a espécie é considerada invasora (Kolar e Lodge, 2001; Darrigran e Damborenea, 2006).

A ameaça representada pelas espécies invasoras incide sobre todos os sistemas bióticos, incluindo terrestres e aquáticos, controlados (cativeiros) ou selvagens. Em grande escala de tempo e espaço, as bioinvasões podem causar homogeneização da biota (Carroll e Dingle, 1996; Williamsom, 1996; Cox, 1999). Ao se estabelecerem, as

espécies invasoras acabam modificando as relações ecológicas, aumentando interações negativas, como a competição por recursos alimentares e espaço, com espécies nativas (Race, 1982; Brenchley e Carlton, 1983; Byers, 2000). Os bioinvasores também podem ser predadores, parasitas ou patógenos e geralmente são transmitidos as espécies nativas através de vetores que também podem ser invasores (Oguz et al., 2000; Dobson e Crawley, 1994; Mc Callum e Dobson, 1995). No Brasil, temos o exemplo do copépode parasita *Lernaea cyprinacea* introduzido junto com o peixe *Cyprinus carpio* (Garcia et al., 2004).

O *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1758), classificação taxonômica na tabela 1, é um bivalve (mexilhão) que possui uma coloração dourada distinta que o denominou popularmente de “mexilhão dourado”, (Figura 1). No entanto, algumas populações podem apresentar uma coloração mais escura.

O mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*) ocorre naturalmente em água doce no sudeste da Ásia, incluindo China, Tailândia, Coréia, Laos, Camboja, Vietnã e Indonésia (Ricciardi, 1998). Vive em ambientes como rios, lagos e córregos sobre diferentes tipos de superfícies, fixando-se através do bisso. É encontrado em grande densidade nos reservatórios artificiais em profundidades variando desde poucos centímetros até muitos metros (Morton, 1977; Uryu et al., 1996). Em ambientes naturais, as maiores densidades são encontradas em locais de remanso, com baixo hidrodinamismo.

Tabela 1- Classificação taxonômica do mexilhão dourado, segundo Newell (1969).

Filo:	Mollusca
Classe:	Bivalvia
Subclasse:	Pteriomorpha
Ordem:	Mytiloidea
Superfamília:	Mytiloidea
Família:	Mytilidae
Gênero:	<i>Limnoperna</i>
Espécie:	<i>L. fortunei</i> (Dunker, 1856)

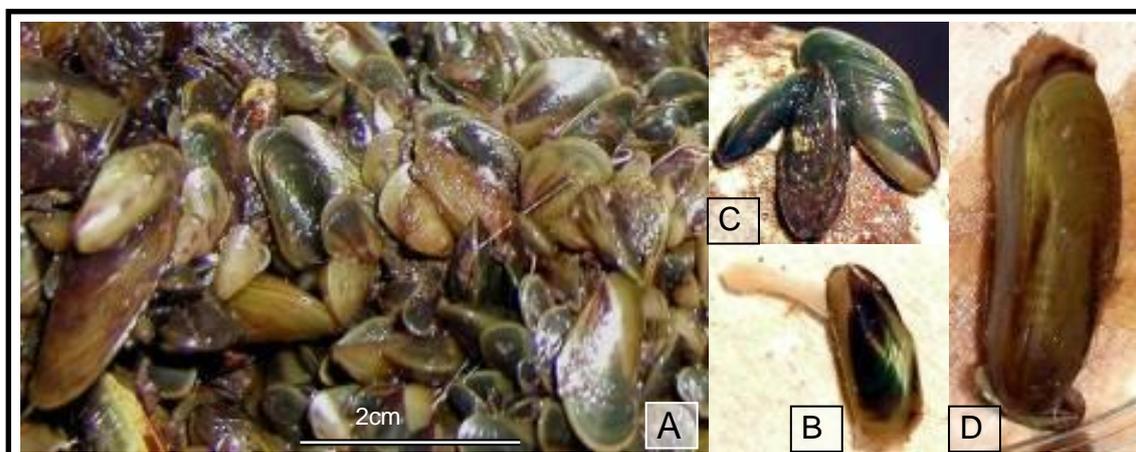


FIGURA 1 - *Limnoperna fortunei* – “mexilhão dourado”. (A - mexilhões mantidos em laboratórios. B – projeção do pé, mexilhão se locomovendo. C - mexilhões adultos se agregando. D - mexilhão filtrando).

O mexilhão dourado apresenta características similares a de outros macroincrustantes invasores que hoje estão presentes nos rios da América do Norte, como *Dreissena polymorpha*, *Dreissena bugensis* e em estuários, *Mytilopsis leucophaeata*. No entanto, as diferenças na fisiologia do *Limnoperna fortunei* comprometem o uso das informações obtidas com tais organismos de ambientes temperados do hemisfério norte ao serem aplicadas em espécies de regiões subtropicais do hemisfério sul (Cataldo et al., 2002). Comparando o *Limnoperna fortunei* com as espécies de bivalves nativos da América do Sul, ele se diferencia pela forma valvar, anatomia interna, forma de vida (sédil), estratégia de vida (agregamento), ciclo de vida

curto, mecanismo de dispersão e impacto negativo nos ambientes (Darrigran e Damborenea, 2006).

Uma espécie necessita de algumas características para se tornar invasora. Morton (1996) e Darrigran (1999) descrevem algumas dessas características, que se aplicam ao bivalve *Limnoperna fortunei*: Curto período de vida (dois – três anos), rápido crescimento individual, rápida maturação sexual, gametogênese constante com alta fecundidade propiciando alta disponibilidade de larvas (2 a 3 picos anuais) e constante assentamento, eurióicos (coloniza diferentes habitats), euritópicos (alta tolerância fisiológica), comportamento de agregação, associação a alguma atividade humana (transporte aquaviário), ampla variabilidade genética etc. No entanto, quatro características foram preponderantes para transformar o *Limnoperna fortunei* em uma espécie invasora: amadurecimento sexual precoce, alta fecundidade, larga tolerância ambiental, falta de predadores e parasitas (Darrigran, 2002).

A colonização de outros ambientes ocorreu através do transporte marítimo, água de lastro de navios. Primeiramente, para Hong Kong (Morton, 1975), Japão (Margara et al., 2001) e recentemente se espalhando na América do Sul, sendo encontrado na Argentina, Uruguai, Paraguai, Bolívia e Brasil (Darrigran, 2002).

Na América do Sul, o *Limnoperna fortunei* foi detectado pela primeira vez em setembro de 1991 na bacia de Bagliard no Rio da Prata, Argentina, provavelmente trazido por navios da Coreia e Hong Kong (Pastorino et al., 1993). Estudos indicam que sua transferência tenha ocorrido através de tanques de água bruta ou água de lastro durante um período de intensa importação de Hong Kong e Coreia (Darrigran e Pastorino, 1995). No Brasil, o mexilhão iniciou sua invasão a partir de dois locais distintos e possivelmente de duas formas diferentes. Uma delas pelo transporte aquaviário, incrustado nos cascos das embarcações e também por água de lastro. Os primeiros registros foram realizados

por Oliveira e Barros (2003) no início de 1998 no Rio Paraná – MS, e no final do mesmo ano um inventário faunístico detectou juvenis do mexilhão no Rio Guaíba, Porto Alegre – RS (Mansur et al, 2003).

A dispersão do mexilhão na América do Sul ocorreu por tráfego de embarcações, estimulada pela atividade comercial entre os países do MERCOSUL, que o transportaram ao longo das hidrovias rio acima, em regiões distantes de sua área de invasão. Uma vez estabelecido nas cabeceiras dos rios sua dispersão hidrocórica (pelas correntezas) ampliou sua distribuição ao longo de toda hidrovia. O mexilhão possui desenvolvimento larval que facilita sua dispersão através das correntes. A dispersão também pode ocorrer por juvenis fixados em materiais flutuantes. A gametogênese constante e intensa produção de larvas, com dois a três picos reprodutivos anuais propiciam uma alta disponibilidade de larvas e contínuo assentamento (Darrigran, 1999). Atividades de pesca esportivas também atuam possibilitando a colonização em ambientes a montante das barragens. Especula-se que aves migratórias também possam transportar larvas e organismos agarrados em suas patas (Darrigran, 2002), como também peixes podem ser vetores de transporte ao eliminar, através das fezes, organismos vivos que tenham resistido à passagem por todo o trato digestivo (Belz, 2006).

Atualmente, o *Limnoperna fortunei* encontra-se em praticamente toda a extensão dos Rios Paraguai, Paraná e Guaíba (figura 2). No Rio Paraguai, encontra-se até a altura de Bela Vista do Norte, acima da confluência com o rio Cuiabá, no estado do Mato Grosso. No rio Miranda, um dos tributários do rio Paraguai, o mexilhão dourado foi registrado na região conhecida como Passo do Lontra, no ano de 2003 (Oliveira, 2003). No Rio Paraná, foi notificada a presença do mexilhão na Usina de Itaipu em 2001 e em 2002, em usinas hidroelétricas a montante de Itaipu. A usina São Simão, da Companhia Energética de Minas Gerais – CEMIG, município de Rosana, no Estado de São Paulo,

registrou o mexilhão em 2003. Em 2004 foi encontrado na usina hidrelétrica de Barra Bonita no rio Tietê. Terra et al. (2007), em contato com ribeirinhos levantaram a suspeita da ocorrência em três localidades visitadas na bacia do Rio Uruguai (Itaqui, Uruguiana e Barra do Quaraí), não confirmado devido à cheia dos rios.

O *Limnoperna fortunei* é hoje uma espécie comum no estuário do Rio Guaíba e outros corpos de água adjacentes. Os estudos de Mansur et al. (2003) e de Terra et al. (2007) confirmam a presença do molusco não só em todo o lago Guaíba como também nos rios contribuintes como Rio do Sino, Rio Caí, Rio Taquari, Rio das Antas, Rio Jacuí e foz do Rio Pardo.

BACIAS HIDROGRÁFICAS DO BRASIL

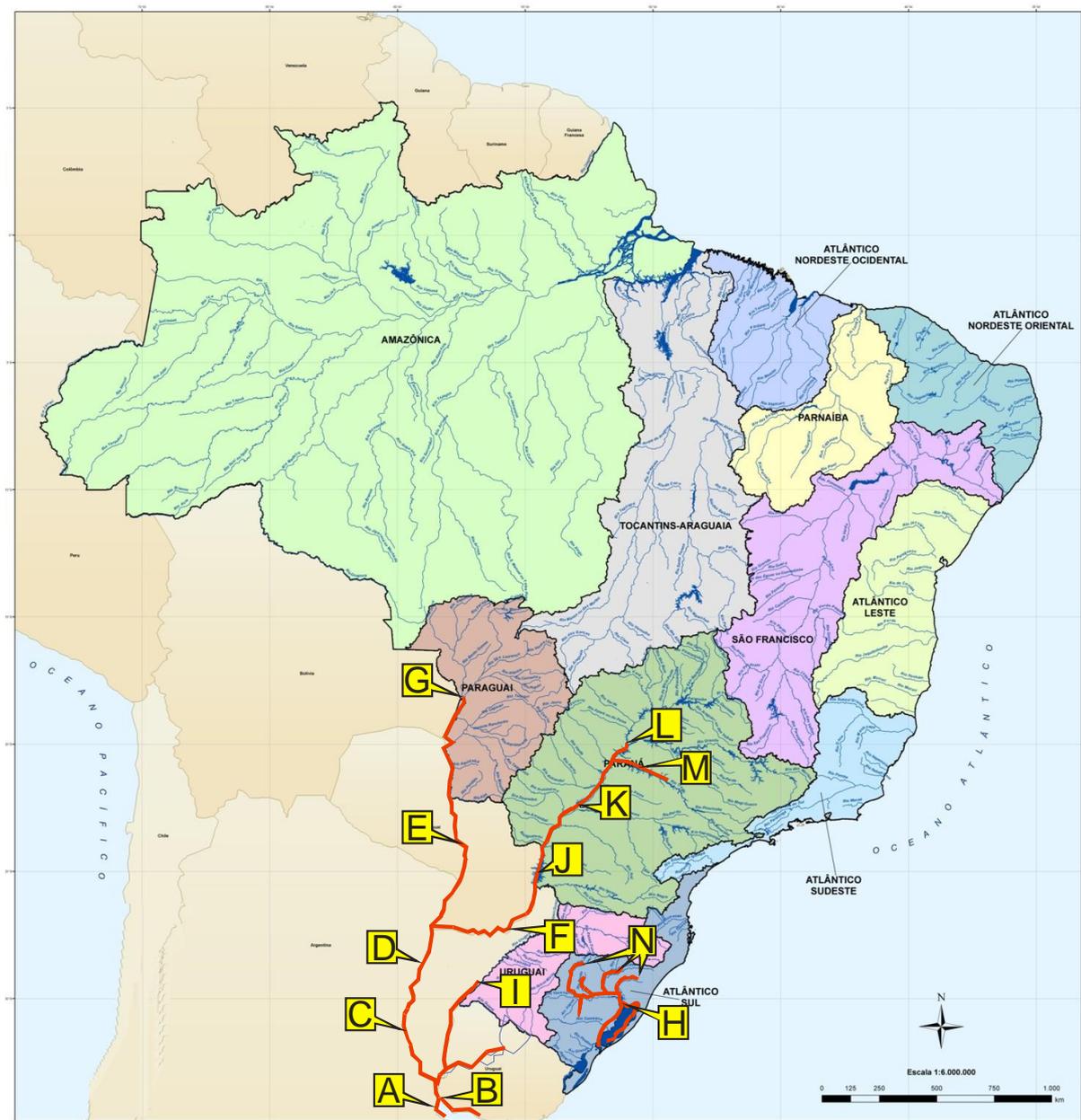


Figura 2 - Histórico da dispersão e atual ocorrência de *Limnoperna fortunei* pela América do Sul onde: A - 1991 Balneário de Bagliardi – Pastorino et al., 1993; B - 1994 costa uruguaia do Rio da Prata, colônia de Sacramento – Scarabino & Verde, 1994; C - 1995 – Darrigran & Ezcurra de Drago, 2000; D - 1996 – Di Pérsia e Bonetto, 1997; E - 1997 Porto de Assunção Paraguai Rio Paraguai - Darrigran & Ezcurra de Drago, 2000; F - 1998 Porto de posadas rio Paraná - Darrigran & Ezcurra de Drago, 2000; G - 1998 bacia do alto rio Paraguai – Callil & Mansur, 2002; H - 1999 praia de Itapuã e porto das Pombas município de Viamão RS – Mansur et al., 1999; I - 1998 rio Uruguai – Ezcurra de Drago, 1998; J - 2001 usina de Itaipu – Zanella & Marena, 2002; K - 2002 município de Rosana – Avelar et al., 2004; L - 2003 usina de São Simão rio Paranaíba CEMIG – comunicação pessoal; M - 2004 usina de Barra Bonita rio Tietê – comunicação pessoal; N - rio dos Sinos, rio Caí, rio Taquari, rio das Antas, rio Jacuá e foz do rio Pardo - Terra et al., 2007.

Os prejuízos econômicos causados pelo *Limnoperna fortunei* são oriundos da sua colonização, formação de aglomerados ou incrustações em flutuantes, embarcações, instalações industriais etc, gerando também muita preocupação para as hidroelétricas, devido ao desenvolvimento populacional da espécie em regiões de represa e lagos (Boltovskoy et al., 2006). Através da sua incrustação, o *Limnoperna fortunei* gera a redução da passagem de água diminuindo a velocidade e o volume, criando fluxo turbulento e entupimento de tubulações e sistemas coletores de água, oclusão de bombas, filtros e sistemas de refrigeração, como também acúmulo de conchas vazias e contaminação da água com organismos mortos (Darrigran & Ezcurra, 2000; Mansur et al., 2003; Simeão et al., 2006). Além dos prejuízos às instalações de empresas, a incrustação gerada pelo *Limnoperna fortunei* aumenta o peso de estruturas flutuantes, aumenta os custos de navegação e interfere nas comunidades de organismos nativos (Figura 3).



FIGURA 3 - Incrustações (“macrofouling”) geradas por adesão do *Limnoperna fortunei* (A – Incrustações em embarcações aumentando a rugosidade e o peso do casco; B – Detalhe de flutuantes para embarque e desembarque de passageiros; C – Molusco nativo, *Anodontites trapesialis*, recoberto por *Limnoperna fortunei*, causando impedimento de alimentação e respiração).

No intuito de mitigar os danos causados com a infestação do mexilhão dourado nas instalações industriais, uma variedade de medidas já foram propostas. Métodos físicos

(raspagem manual, jatos de água, filtros fixos ou móveis, separação de partículas por vórtex, choques térmicos com injeção de vapor, campos elétricos, luz ultravioleta, ultrassom etc.) e químicos (substâncias dissolvidas na água, pinturas anti-incrustantes, ozonização etc.). Dentre as propostas citadas, as substâncias dissolvidas na água são a escolha mais utilizada e o cloro (hipoclorito de sódio) é o mais aplicado no controle da infestação do *L. fortunei* em tubulações e condutores de água (Cataldo et al., 2002), como também para o *D. polymorpha* (Boelman et al., 1997), apesar dos riscos que este produto oferece tanto na manipulação quanto com a formação de subprodutos cancerígenos (THM - Trihalometanos) (Macedo, 2004). Os métodos físicos, se não são os mais práticos, são no momento, um dos mais eficientes para o controle do mexilhão sem maiores danos ambientais.

Os tratamentos breves com cloro não afetam os moluscos, provavelmente pela capacidade de detectarem o biocida na água e fechar fortemente suas valvas, evitando o contato (Cataldo et al., 2002). Esta característica também foi verificada por Mansur et al. (2003) notificando que, quando em condições ambientais desfavoráveis, o mexilhão dourado responde fechando suas conchas por períodos prolongados. Isto significa que biocidas dissolvidos, podem necessitar de dosagem contínua por longos períodos para apresentar os efeitos desejados para o controle de moluscos invasores (Aldridge et al., 2006). Quando são lançados como efluentes em ecossistemas abertos, estes biocidas podem impactar outras espécies além dos organismos alvo no corpo receptor, causando sérios danos ambientais.

Outros produtos (sais, biocidas orgânicos ou naturais etc.) e diferentes formas de disponibilizá-los, como microcápsulas ou micropartículas, podem ser boas alternativas para a gestão deste problema. Testes com mexilhão zebra, *Dreissena polymorpha*, sugerem os biocidas microencapsulados como uma alternativa com menor dano

ambiental para o controle de bivalves invasores (Elliot, 2005; Aldridge et al., 2006 e Costa, 2008).

As microcápsulas são pequenas partículas que contêm ingredientes ativos revestidos completamente por uma cobertura ou proteção (Figura 4). Microcápsulas comerciais geralmente possuem de 3 – 800 μm , onde o recheio constitui de 10 – 90% do peso total da partícula (Thies, 1996). Microcápsulas podem ter uma variedade de estruturas. O recheio pode ser esférico ou irregular, líquido ou sólido, entre outros (Nack, 1970). Os materiais de recobrimento mais comuns são gorduras, graxas esterases, açúcares alginatos, proteínas e lipídeos (Gibbs et al., 1999).

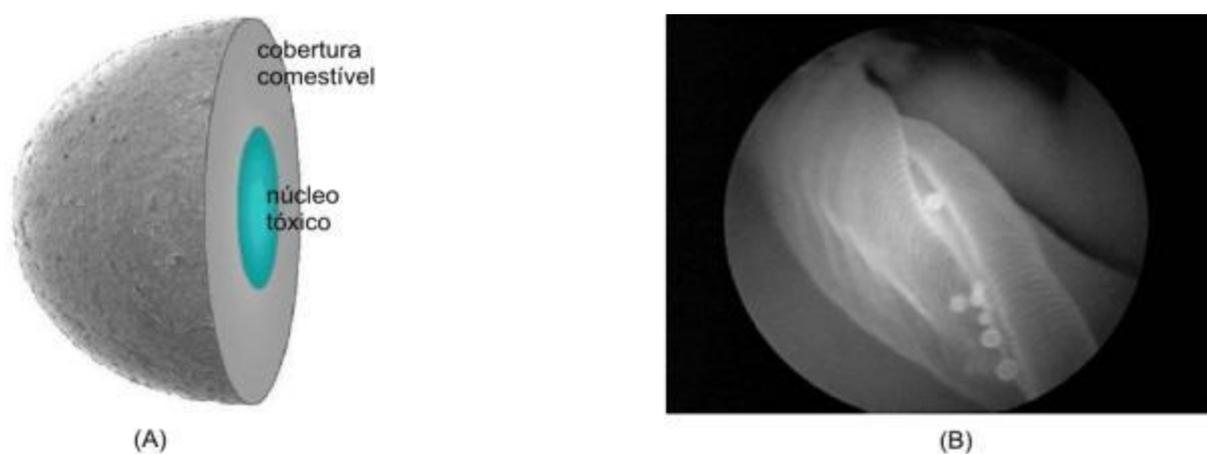


FIGURA 4 - A idéia de encapsulamento de biocida para o controle de mexilhões. A - representação de biocida encapsulado; B - fotografia de endoscópio, biocida microencapsulado sendo transportado pelas brânquias de um mexilhão zebra vivo (créditos: Dr. Paul Elliot, Universidade de Cambridge-UK).

O uso de partículas microencapsuladas tem o potencial de superar a reação do mexilhão de fechar as conchas, geralmente observados quando os mexilhões estão expostos a alguma ameaça. Considerando a capacidade de filtração dos mexilhões, as

microcápsulas possibilitam diminuir o volume de biocida utilizado, enquanto o mexilhão ingere uma concentração letal mínima, evitando que grande quantidade de biocida seja disperso no ambiente (Aldridge et al., 2006). Assim, é uma alternativa às substâncias dissolvidas que são amplamente utilizadas com um alto custo ambiental e baixa eficiência com mexilhões (bivalves filtradores).

É necessário destacar que o desenvolvido desta dissertação estava vinculado ao Programa de Controle do Mexilhão Dourado nas águas Jurisdicionais Brasileiras, financiado pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), sobre edital do CT-Hidro (Fundo Setorial Dos Recursos Hídricos) e de interesse do Ministério do Meio Ambiente – MMA.

2. OBJETIVO

O presente estudo buscou avaliar, através de ensaios toxicológicos, o efeito biocida de substâncias dissolvidas e microencapsuladas sobre o bivalve *Limnoperna fortunei*.

Objetivos específicos:

1. Verificar o efeito de quatro substâncias solúveis em água (dicloroisocianurato de sódio, dióxido de cloro líquido, hipoclorito de sódio, cloreto de potássio) e duas substâncias microencapsuladas (amina DB45 e cloreto de potássio) em diferentes concentrações, na mortalidade da espécie *Limnoperna fortunei*.
2. Verificar o efeito das substâncias microencapsuladas em sistema de fluxo contínuo, na mortalidade da espécie *Limnoperna fortunei*.

3. METODOLOGIA

3.1. DESENHO EXPERIMENTAL

A figura 5 descreve as etapas experimentais, mostrando o número de testes, réplicas e concentrações estudadas com cada substância, além do número de organismos e do método utilizado. Ao longo de cada uma destas etapas, as condições vitais dos organismos utilizados eram verificadas.

É necessário destacar que houve diferença no número de experimentos devido ao fato das réplicas dos testes apresentarem uma resposta variável ao ponto de exigir mais repetições para a confirmação dos resultados e uma definição da curva de mortalidade de algumas substâncias, como o dióxido de cloro. Houve também uma limitação na quantidade de produto disponível, restringindo principalmente os testes com microencapsulados, no sistema de fluxo. As substâncias hipoclorito de sódio e cloreto de potássio receberam um esforço de análise menor por terem sido utilizadas para orientar possíveis comparações, como também em virtude de serem substâncias com muitas informações na literatura.

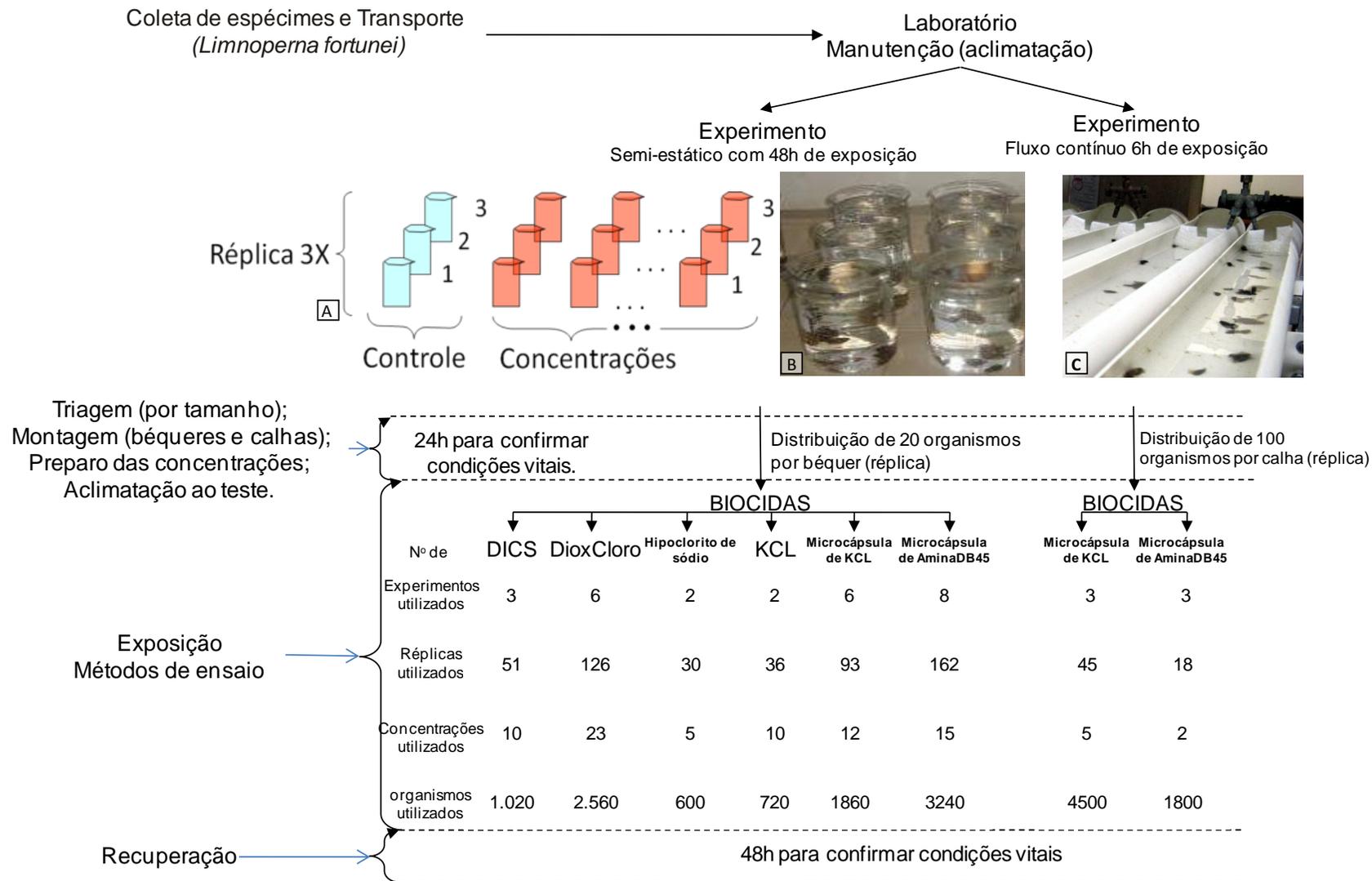


FIGURA 5 - Desenho experimental das atividades realizadas (A - Esquema de experimento Semi-estático; B – Mexilhões no béquer; C – Mexilhões nas calhas; DICS = Dicloroisocianurato de sódio; DioxCloro = Dióxido de cloro líquido ativado; KCL = Cloreto de potássio).

COLETA DOS ORGANISMOS

Os organismos utilizados nos experimentos foram coletados no delta do Rio Jucuí a montante do Lago Guaíba (RS) no entorno da Ilha das Flores (Figura 6), região próxima de Porto Alegre – RS. Os indivíduos foram retirados de estruturas flutuantes (detalhe na figura 3-B), removidos manualmente e/ou com auxílio de espátulas.



FIGURA 6 – Área de coleta: Em destaque, o quadrado em vermelho marca a área de coleta dos mexilhões, Ilha das Flores ($29^{\circ}58'11,99'' - S / 51^{\circ}16'56,16'' - O$), Porto Alegre – RS (foto adaptada do google earth© - 13/05/2008).

Os mexilhões coletados foram transportados para o laboratório do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira - IEAPM em sacolas plásticas sem água, dado que em coletas prévias, foi verificado que o mexilhão resistia melhor ao transporte sem estar imerso na água. Os organismos foram transportados em caixas de isopor para evitar grandes variações de temperatura. O tempo entre o momento da coleta e seu acondicionamento, em tanques de manutenção no laboratório, não foi superior às 12h.

Os tanques de aclimação dos organismos em laboratório eram de 500 Litros (Figura 7). A qualidade da água (Temperatura: 24 – 26 °C; pH: 7; Oxigênio: Saturado) foi mantida através de aeração constante, circulação de água, filtração em sistema de filtro biológico, e também com a substituição semanal de um terço do volume dos tanques. A alimentação dos mexilhões no laboratório foi à base de *Saccharomyces cerevisiae*, e complementada com as microalgas *Ankistrodesmus sp.* e *Selenastrum capricornutum*, sendo fornecidas duas vezes ao dia. Os mexilhões foram retirados dos tanques de manutenção e transplantados para aquários para aclimatização antes dos testes toxicológicos. Os organismos foram mantidos no ambiente de realização dos testes, sala refrigerada a 25°C, de 5-7 dias antes do início dos testes, mantidos com alimentação e aeração dentro de aquários de 180 litros equipados com filtro biológico interno e externo.

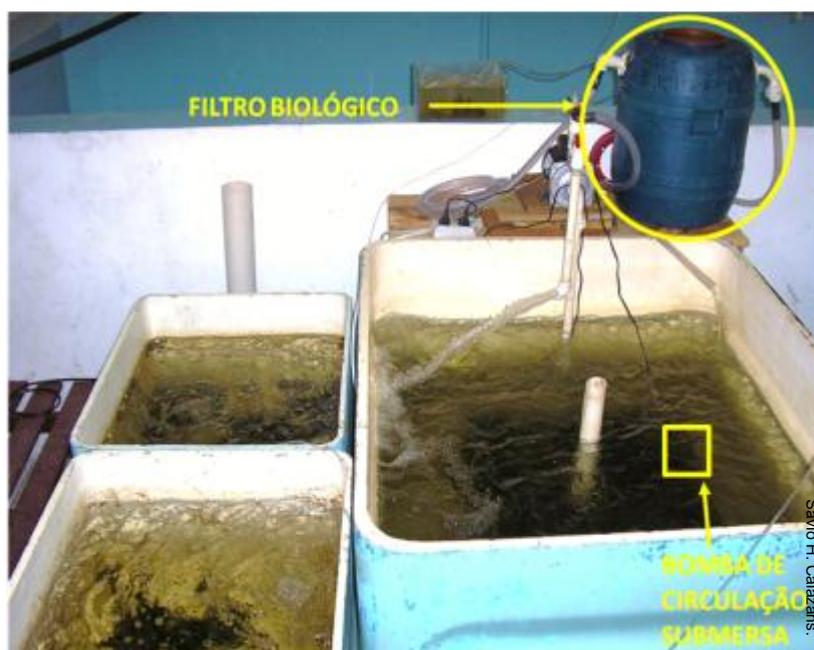


FIGURA 7 – Sistema de tanques construídos para manutenção de mexilhões, laboratório de cultivo de organismos do IEAPM (bomba hidráulica e submersa para circulação de água combinado com ar comprimido para oxigenação).

3.2. SUBSTÂNCIAS TESTADAS

Seis substâncias foram testadas neste trabalho, sendo quatro delas solúveis em água e duas microencapsuladas (Tabela 2). Diferentes substâncias cloradas foram utilizadas em razão de serem as substâncias atualmente mais utilizadas para a prevenção de incrustações em instalações e neste estudo representam as substâncias dissolvidas. O cloreto de potássio, um sal reconhecidamente moluscocida, foi utilizado tanto em sua forma dissolvida como também microencapsulado. O encapsulamento de toxinas para o controle de mexilhões representa um meio de acesso do tipo “cavalo de tróia”, contra a resposta defensiva de fechamento das conchas (Costa, 2008). Os microencapsulados utilizados neste estudo foram gentilmente cedidos pelo Dr. David Aldridge da Universidade de Cambridge -UK. Os estudos de Elliot (2005) e Costa (2008) abordaram os métodos de desenvolvimento e aperfeiçoamento dos microencapsulados para o

controle do mexilhão zebra (*Dreissena polymorpha*). Neste método, o biocida está envolto de um recobrimento nutritivo ou atrativo para os mexilhões (Figura 8).

A composição dos microencapsulados é de 20 - 30% peso/peso dependendo do biocida; menos de 10% peso/peso de óleo vegetal e cera vegetal; menos de 10% peso/peso de Esterato de magnésio, dióxido de silicone mono e diglicerídeo de ácidos graxos; surfactante não iônico; ácido palmítico (Aldridge et al., 2006).

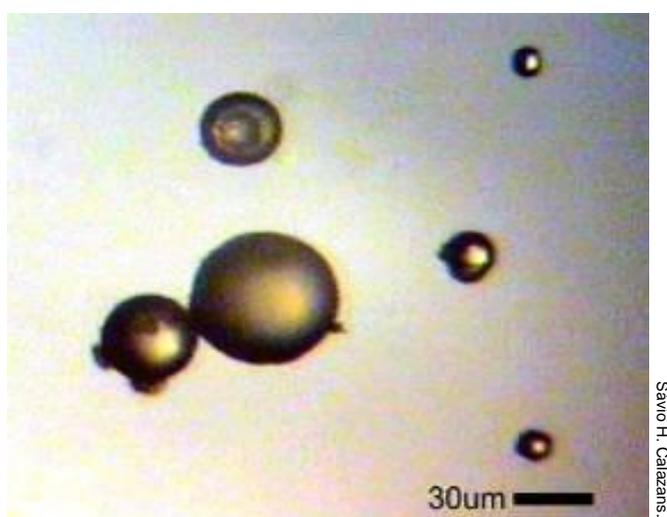


FIGURA 8 - Microcápsulas de cloreto de potássio utilizadas neste estudo (foto de microscópio ótico 50x.).

TABELA 2 - Substâncias avaliadas. Forma de apresentação, características e concentrações avaliadas.

Forma de Apresentação	Composto	Substâncias	Características	Concentrações utilizadas - mg.L⁻¹ (mMol/L de Cl)	
Dissolvidos	Orgânico	Dicloroisocianurato de sódio - DCIS	O DCIS foi cedido pela empresa HydroAll do Brasil Ltda, apresentavam-se como um granulado branco com 60% de princípio ativo.	1 (0,005); 5 (0,03); 10 (0,05); 50 (0,27); 100 (0,55); 500 (2,73); 1000 (5,46); 1500 (8,19); 2000 (10,91)	
	Agentes oxidante (Cloros)	Inorgânico	Dióxido de cloro líquido	Líquido estabilizado, necessitando ativação com uma solução ácida, ambos fornecidos pela empresa Beraca Sabará Químicos e Ingredientes Ltda. Solução levemente viscosa e transparente numa concentração de 5%.	0,25 (0,004); 0,75 (0,01); 1 (0,015); 1,5 (0,022); 2 (0,033); 2,5 (0,037); 3 (0,044); 10 (0,15); 20 (0,30); 25 (0,37); 30 (0,45); 40 (0,59); 50 (0,74); 60 (0,89); 75 (1,11); 100 (1,48); 150 (2,22); 200 (2,96); 250 (3,70); 300 (4,45)
			Hipoclorito de sódio	Solução líquida de hipoclorito de sódio com coloração levemente esverdeada. Concentração avaliada pelo método DPD.	0,01 (0,001); 0,1 (0,006); 0,5 (0,028); 1,0 (0,056)
		Controle positivo (Sal)	Cloreto de potássio	Granulado em padrão analítico.	10; 100; 200; 1000; 2000; 4000; 6000; 8000; 10000
Microencapsulados	Sal	Cloreto de potássio	Pó granulado de cor branca amarelada, composto de 30% de ingrediente ativo.	12; 25; 125; 250; 500; 1500; 1600; 3000; 6000; dissolvido 6000; filtrado 6000; <u>No Sistema de fluxo: 500; 1500; 3000; 6000</u>	
	Amina quaternária	Amina DB45	Pó granulado de cor branca amarelada, composto de 20% de ingrediente ativo.	12; 25; 50; 100; 125; 200; 250; 400; 500; 800; 1000; dissolvido 500; dissolvido 800; filtrado 800 <u>No Sistema de fluxo: 500</u>	

3.3. ENSAIOS TOXICOLÓGICOS

3.3.1. SELEÇÃO DOS ORGANISMOS E MONTAGEM

Os mexilhões foram desagregados com o auxílio de um estilete, cortando-se o bisso. Durante a triagem, os mexilhões foram mantidos em água. As conchas vazias, animais que estavam debilitados, com lentidão de fechamento ou conchas quebradas foram descartados. Após desagrupados, os mexilhões foram separados por classe de tamanho da concha, sendo utilizado para os experimentos somente os mexilhões que estavam na faixa entre 1,5 cm e 2,5 cm de comprimento total da concha. Como referência, uma estrutura de madeira com essas medidas foi utilizada para facilitar o trabalho de triagem (Figura 9).

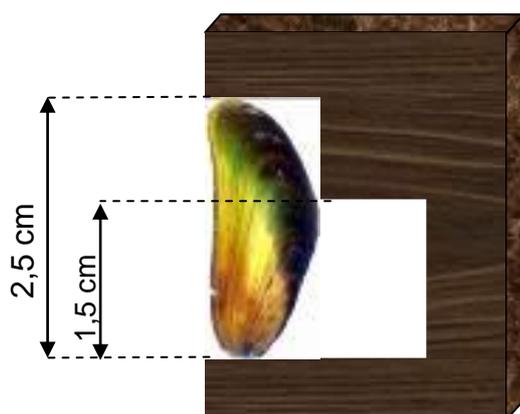


FIGURA 9 - Esquema da régua de seleção dos organismos.

Após a triagem, os organismos foram acondicionados nos recipientes dos bioensaios (béqueres 2L) ou calhas devidamente organizadas em réplicas e mantidos por 24 horas com água desclorada (por dois dias de repouso e aeração) (ver figura 5 destaque A e B).

Os critérios para escolher os organismos utilizados nos experimentos foram através da observação das características vitais, tais como, produção de bisso, filtração e locomoção. Os organismos que não produziam bisso ou que apresentavam suas conchas

abertas sem atividade filtrante, eram descartados, sendo mantidos somente os que manifestavam suas características vitais. Devido a esta seleção, sempre foram distribuídos mais de vinte organismos em cada réplica, para garantir que os vinte organismos utilizados em cada réplica, ao iniciar a exposição ao biocida, estivessem vivos e sobre as mesmas condições, evitando também, que conchas fechadas vazias fossem selecionadas como organismos inteiros.

3.3.2. EXPOSIÇÃO AOS BIOCIDAS

Os testes foram feitos com exposição semi-estática por 48h para todas as substâncias avaliadas, com base nas Normas Brasileiras de Regulamentações (NBR-12713; NBR 13373; NBR 00:01:44-003) e nos trabalhos de diferentes autores (Waller et al., 1993; Cezar et al., 1997; Rajagopal et al., 2003).

A primeira leitura de mortalidade foi realizada com 24 h do bioensaio, juntamente com a substituição das soluções do biocida. Os organismos mortos foram contados e retirados, para que não prejudicassem a qualidade das soluções. A segunda leitura foi realizada 48 h após o início do teste, com substituição da solução teste por água limpa sem biocida.

Nos experimentos envolvendo as substâncias microencapsuladas, foram utilizadas duas concentrações controle, uma chamada de “dissolvido”, representando o princípio ativo dissolvido após dissolução das microcápsulas por 96h antes do início do teste, e outra de “filtrado”, representando o remanescente do princípio ativo, dez minutos após a dispersão em água, seguida de filtração em malha de acetato de celulose de 0,45 micrômetros. Todos os experimentos com os biocidas microencapsulados, excetuando os com fluxo contínuo, foram realizados com o provimento de aeração por borbulhamento no intuito de manter as microcápsulas em suspensão.

Uma metodologia complementar de fluxo contínuo foi desenvolvida e aplicada somente com os microencapsulados, utilizada para testá-los em condições dinâmicas, mais semelhantes às encontradas nas instalações industriais. Foi construído um sistema de calhas independentes feito com tubulações de PVC, abertas longitudinalmente, com fluxo unidirecional, sem reutilização da água, simulando os dutos e condutores de água (Figura 10). Neste sistema, os mexilhões permaneceram dentro das calhas, por onde percorria a dispersão de microencapsulados. A entrada de água em cada calha foi controlada por registros independentes. O fluxo foi de $3,5 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$ em cada calha, o qual, depois de ajustado, não apresentou variações na vazão, entretanto, foi conferido duas vezes ao longo do período de exposição.

Os biocidas avaliados com o sistema de fluxo foram os microencapsulados de amina DB45 e cloreto de potássio. Estes biocidas foram misturados em água de manutenção (água de abastecimento público mantida por 1 semana em tanques sem luz) antes de serem administrados. Os biocidas foram dosados nas calhas (réplicas) a cada 30 minutos, tempo correspondente de vazão do volume interno das calhas. O período de exposição total foi de seis horas. Nos testes de toxicidade de fluxo contínuo, foram utilizados indivíduos maiores que 1 cm, devido ao uso de 100 organismos por réplica.

A funcionalidade do sistema de calhas foi avaliada através de dois testes de filtragem de partículas com *Spirulina sp.* desidratada, dosagem de 500mg e 50mg (Correspondentes a $63 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e $6,3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), ministradas no início das calhas. Quatro calhas com mexilhões em jejum de 24h e quatro calhas sem mexilhões. Na saída de cada calha foi coletado um volume de 5 litros de água para a análise de clorofila-a residual, 15 minutos após o início, tempo de troca do volume interno. A análise da clorofila-a residual foi o remanescente da perda por deposição da *Spirulina sp.* e da remoção realizada pela filtração dos mexilhões. Outro teste, com concentrações de ácido tricloro isocianúrico, em

triplicatas, verificou a possibilidade do sistema de fluxo criado permitir expor os mexilhões a um biocida dissolvido de maneira que fosse possível registrar mortalidade.

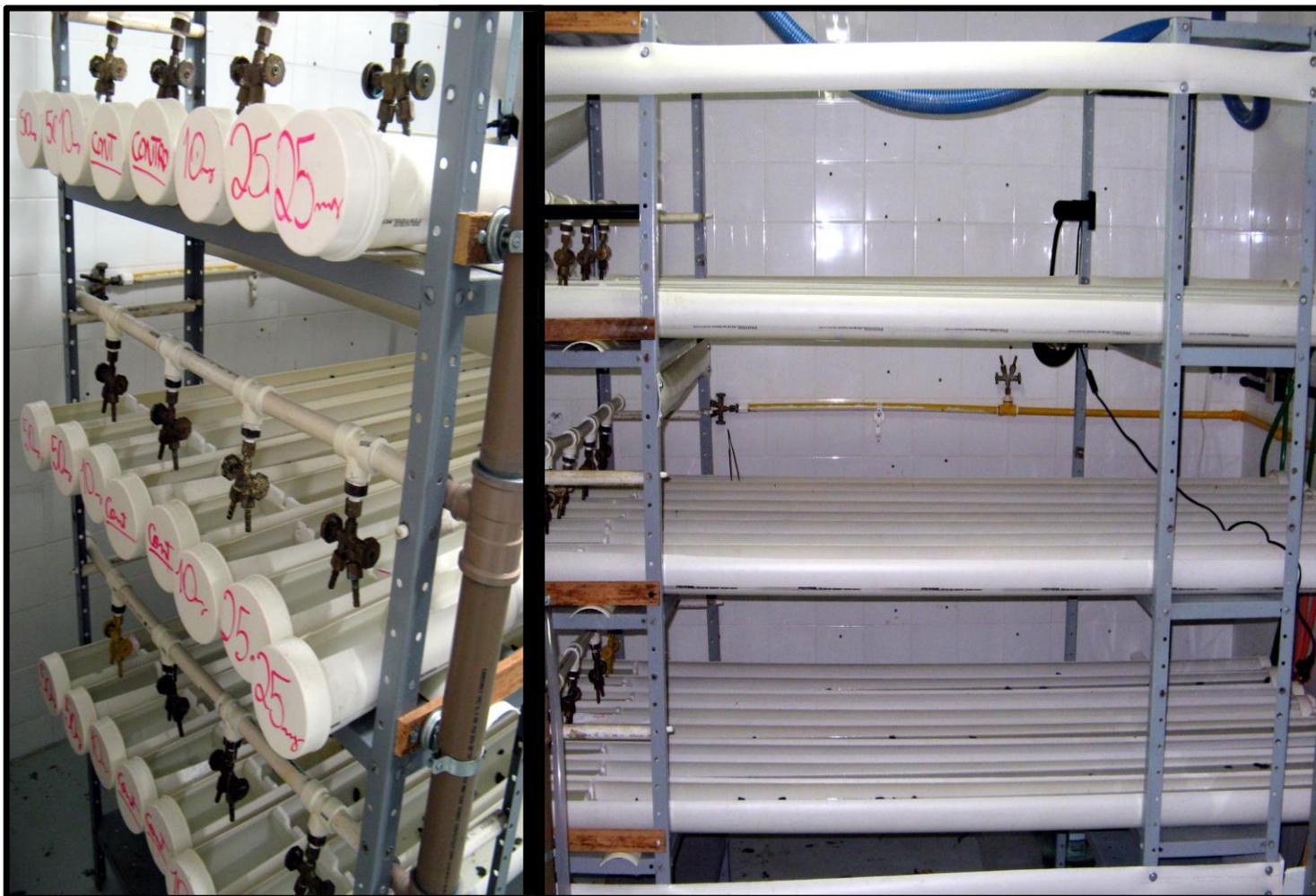


FIGURA 10 - Sistema de calhas com fluxo contínuo unidirecional sem o reuso da água.

3.3.3. PERÍODO DE RECUPERAÇÃO

O período de recuperação foi utilizado para confirmação da mortalidade ou sobrevivência dos organismos expostos. Ao fecharem suas conchas, os mexilhões não permitem que sejam percebidos os seus sinais vitais (mobilidade do pé, manto e atividade filtradora). Desta forma, os organismos permaneciam sob observação durante 48 horas. Após esse período, como premissa para a caracterização, foram considerados mortos os organismos com suas conchas abertas, o manto exposto e sem reação aos estímulos (toque com um bastão de vidro), e vivos os organismos com suas conchas semi-abertas, fechando-as em resposta aos estímulos externos, com seus sifões expostos (caracterizando a posição de filtração), produzindo bisso ou se locomovendo.

3.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os cálculos da concentração letal estimada para 50% da população – CL50 foram determinados com os resultados obtidos nos experimentos de toxicidade de cada substância. Os cálculos de CL50 foram realizados com o auxílio de softwares específicos, PROBITOS 1.5 e Trimmed Spearman-Karber (TSK) 1.5, o método de probitos quando os dados eram normais e homocedásticos (variações homogêneas) e pelo método de Trimmed Spearman-Karber quando não apresentavam estes requisitos, ambos os programas produzidos e recomendados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 2002). Os estudos da CL50 nos permitem avaliar a toxicidade intrínseca do agente tóxico ou da substância química, avaliar a suscetibilidade da espécie como também promove informações para o delineamento e seleção dos níveis de dose para estudos mais prolongados.

Os resultados obtidos com as repetições das mesmas concentrações de uma mesma substância, através de experimentos independentes, foram agrupados como réplicas e analisados em conjunto. Desta forma, as concentrações estudadas possuem de 3 a 9 réplicas por concentração. Este tipo de agrupamento dos dados também foi utilizado nos experimentos de Harrington et al. (1997).

Foi calculada a mediana do percentual da mortalidade, quartis de 25 e 75% dos dados, faixa de desvio para cada concentração, como também “outliers” e extremos quando fossem registrados. Estas análises gráficas foram realizadas com o auxílio do programa STATISTICA 7.0 (StatSoft, Inc., 2004). Em um mesmo gráfico foram inseridas todas as réplicas estudadas de uma mesma substância.

4. RESULTADOS

Os resultados estão apresentados por substância e por categoria (dissolvido x encapsulado). Primeiramente, serão apresentados os resultados obtidos com as substâncias cloradas dissolvidas, em seguida com os sais que foram os controles positivos e, finalmente, com os microencapsulados.

4.1. AGENTES OXIDANTES DISSOLVIDOS

4.1.1. Dicloroisocianurato de sódio - DCIS

A figura 11 mostra a curva de mortalidade dos mexilhões expostos ao DCIS. Foram testadas 9 concentrações entre 1 e 2.000 mg.L⁻¹. A CL50 estimada foi de 108,96 mg.L⁻¹. As concentrações de 10 mg.L⁻¹ e 100 mg.L⁻¹ apresentaram os maiores valores de desvios, sendo que na concentração 100 mg.L⁻¹, esse desvio foi de 100% (ainda que as medianas destas concentrações permanecessem próximas a 20% de mortalidade). Nota-se que as concentrações inferiores a 100 mg.L⁻¹ apresentam mortalidade abaixo de 10%, enquanto que as concentrações acima desta, foram letais para praticamente todos os organismos.

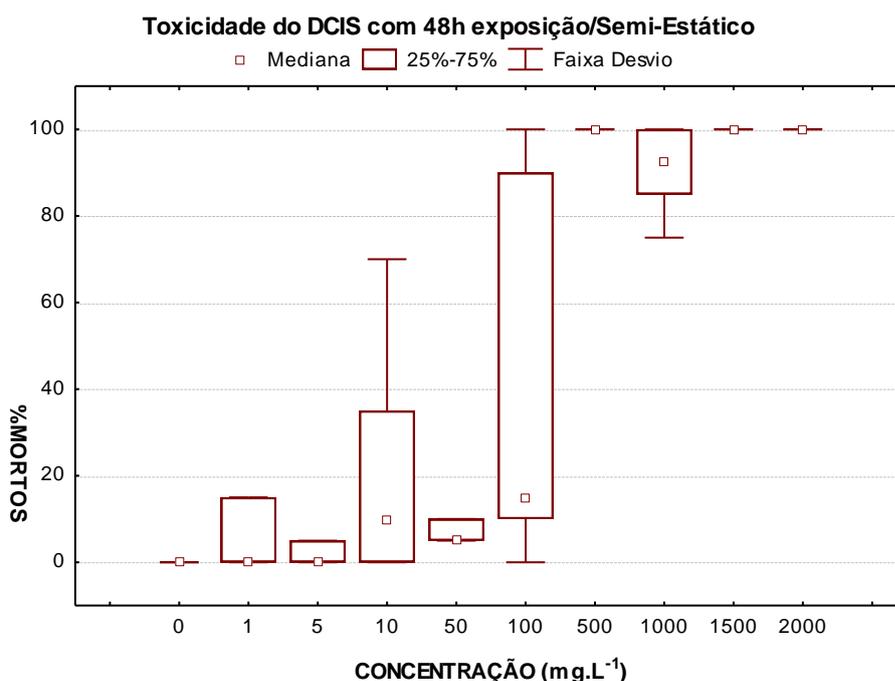


FIGURA 11 - Mortalidade do *Limnoperna fortunei* em diferentes concentrações do DCIS.

4.1.2. Dióxido de cloro líquido ativado.

A figura 12 mostra a curva de mortalidade encontrada com o dióxido de cloro líquido ativado. Foram testadas 22 concentrações diferentes entre 0,25 a 300 mg.L⁻¹. A CL50 estimada foi de 13,99 mg.L⁻¹. O controle apresentou mortalidade em duas réplicas, mas inferior a 10% (valor máximo aceito em bioensaios toxicológicos), além disto, foram considerados valores extremos pela análise. As concentrações iniciais de 0,25 até 3 mg.L⁻¹ apresentaram mortalidade abaixo de 20%. As concentrações entre 10 até 60mg.L⁻¹ apresentaram resultados com desvios acima de 40%, excetuando a concentração de 25mg.L⁻¹, onde todas as réplicas registraram 100% de mortalidade. As concentrações acima de 60 mg.L⁻¹ apresentaram suas medianas entre 90% e 100% de mortalidade dos organismos expostos, com desvio máximo de 20% na concentração de 75mg.L⁻¹ (Figura 12).

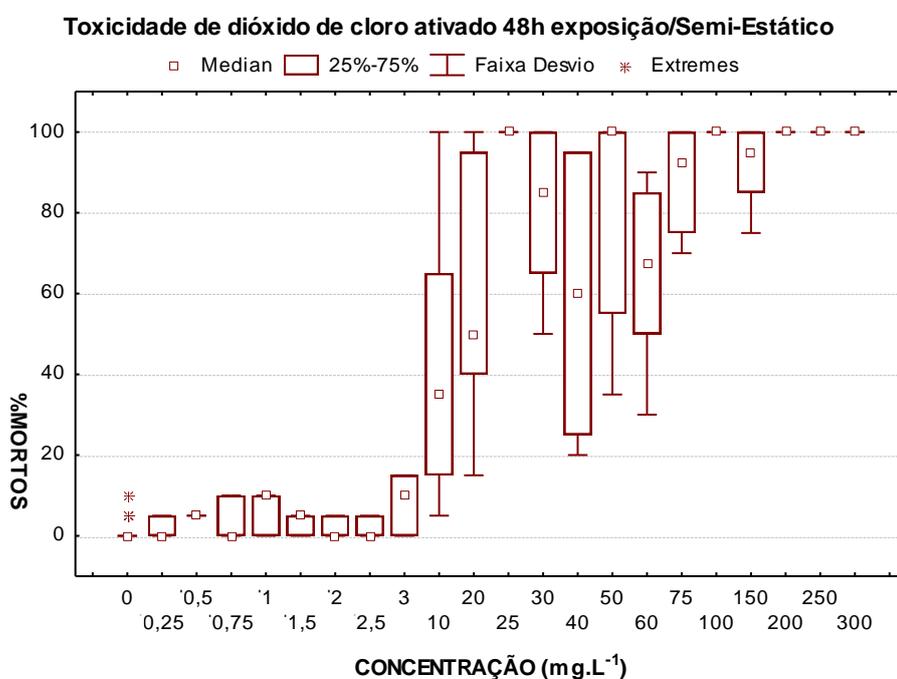


FIGURA 12- Mortalidade do *Limnoperna fortunei* em diferentes concentrações do dióxido de cloro líquido ativado.

4.1.3. Hipoclorito de sódio

A figura 13 mostra a curva de mortalidade encontrada com hipoclorito de sódio. Foram testadas 4 concentrações diferentes entre 0,01 e 1 mg.L⁻¹. A CL50 estimada foi de 0,516 mg.L⁻¹. O controle apresentou mortalidade em duas réplicas, mas inferior a 10% (valor máximo aceito em bioensaios toxicológicos). A concentração de 0,01 mg.L⁻¹ apresentou um desvio de mortalidade inferior ao do controle. Nesta mesma concentração, uma das réplicas estudadas se destacou, apresentando uma mortalidade de 15%, valor que foi considerado como “outlier” pela análise. As concentrações 0,1 mg.L⁻¹; 0,5 mg.L⁻¹ e 1,0 mg.L⁻¹ apresentaram uma mortalidade crescente, dose dependente. Na maior concentração, 1,0 mg.L⁻¹, a mediana permaneceu próxima aos 70%. No entanto, em duas de suas réplicas a mortalidade atingiu 95% (Figura 13).

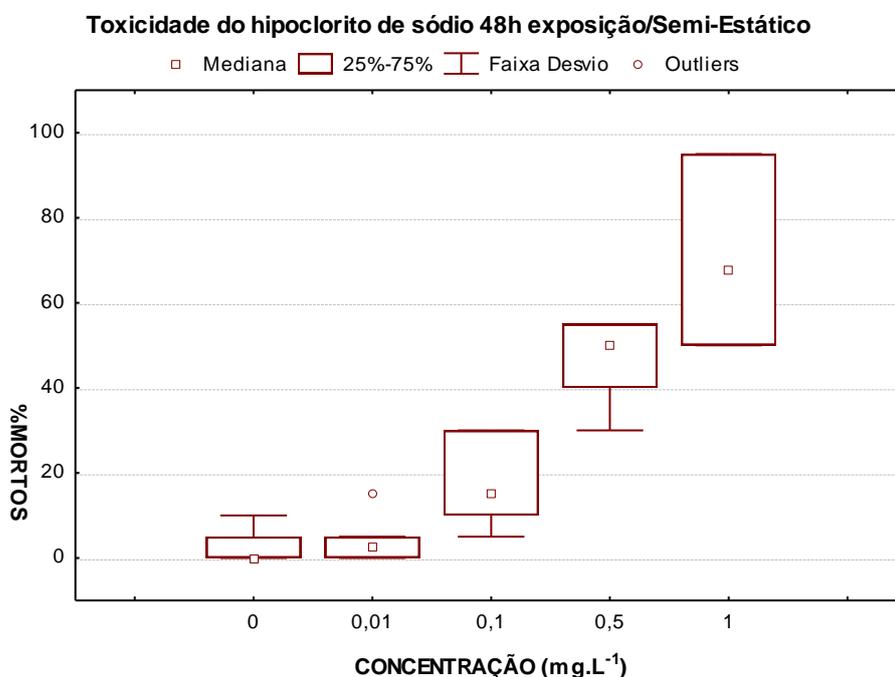


FIGURA 13 - Mortalidade do *Limnoperna fortunei* em diferentes concentrações do hipoclorito de sódio.

4.2. CONTROLE POSITIVO (Sal Cloreto de potássio - KCl)

A figura 14 mostra a curva de mortalidade encontrada com a substância cloreto de potássio. Foram testadas 9 concentrações diferentes entre 10 e 10.000 mg.L⁻¹. A CL50 estimada foi de 293,38 mg.L⁻¹. As concentrações de 1.000 e 2.000 mg.L⁻¹ apresentaram os maiores desvios em relação as concentrações avaliadas. Particularmente, a concentração de 2.000 mg.L⁻¹ que apresentou um desvio de 80%. As concentrações acima de 4.000 mg.L⁻¹ apresentaram 100% de mortalidade.

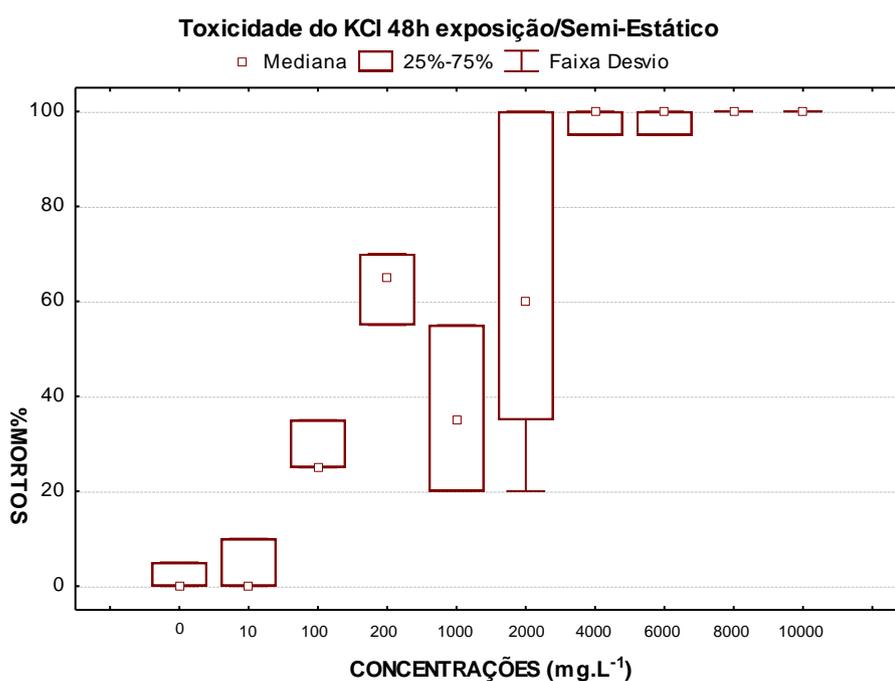


FIGURA 14 - Mortalidade do *Limnoperna fortunei* em diferentes concentrações do cloreto de potássio – KCL.

4.3. MICROENCAPSULADOS

Os resultados obtidos com os microencapsulados estão descritos em função do tipo do seu conteúdo (Cloreto de potássio e Amina DB45), como também do método utilizado para o teste (semi-estático e fluxo contínuo).

4.3.1. Microencapsulado de cloreto de potássio – KCl

A figura 15 mostra a curva de mortalidade com o cloreto de potássio microencapsulado. Foram testadas 11 concentrações diferentes entre 12 e 6000 mg.L⁻¹. A CL50 estimada foi de 270,65 mg.L⁻¹ (considerando somente KCL no produto). Nas concentrações estudadas, a mortalidade atingiu o valor máximo de 85% e até 100% de letalidade em uma das réplicas. Entre 25 e 3000mg/L, a mortalidade apresentou-se de forma dose dependente. Enquanto que, as concentrações de 3000mg.L⁻¹ e 6000mg.L⁻¹ apresentaram as medianas em 80% e 85% de mortalidade. Os controles “dissolvido” e “filtrado” de 6000mg.L⁻¹ apresentaram valores em torno de 80% de mortalidade.

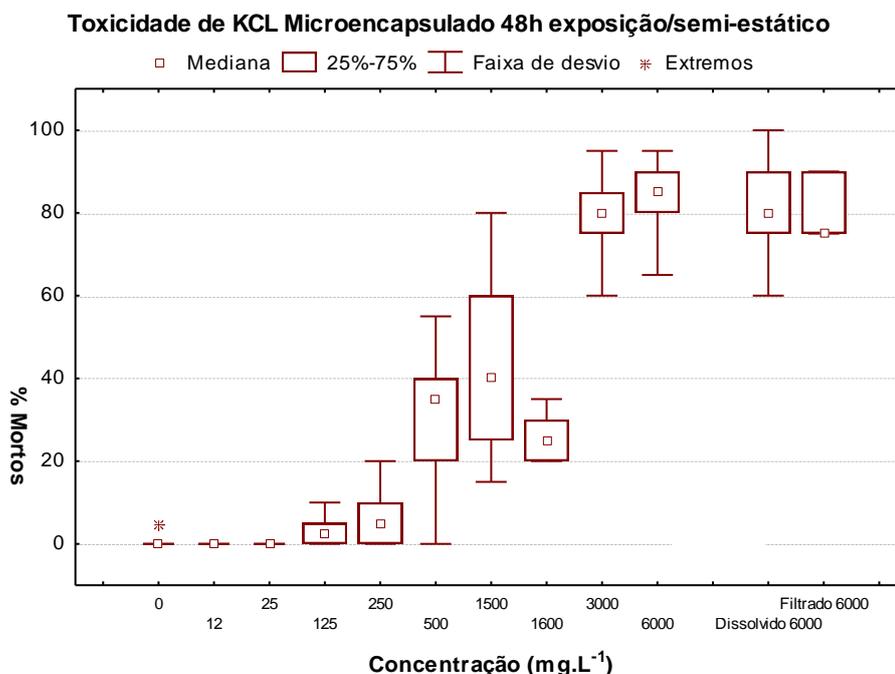


FIGURA 15 - Mortalidade do *Limnoperna fortunei* em diferentes concentrações do microencapsulados de cloreto de potássio – semi-estático 48h.

4.3.2. Microencapsulado de amina quaternária DB45

A figura 16 mostra a curva de mortalidade para a amina quaternária DB45 microencapsulada. Foram testadas 14 concentrações diferentes entre 12 e 1000 mg.L⁻¹. A CL50 estimada foi de 29,99 mg.L⁻¹ (considerando somente a amina DB45 no produto). A mortalidade foi dose dependente, registrando valores de 100% de mortalidade em réplicas das concentrações de 500 mg.L⁻¹, 800 mg.L⁻¹ e 1000 mg.L⁻¹ do produto. As concentrações que apresentaram as maiores diferenças entre suas réplicas foram as de 25 mg.L⁻¹, 50 mg.L⁻¹, 100 mg.L⁻¹, 200 mg.L⁻¹ e o controle dissolvido de 500 mg.L⁻¹. Os controles “dissolvido” e “filtrado” de 800mg.L⁻¹ apresentaram mortalidade com medianas de 70% e 80% respectivamente, sendo de 10 a 20% abaixo da concentração correspondente de 800mg.L⁻¹ de microencapsulado.

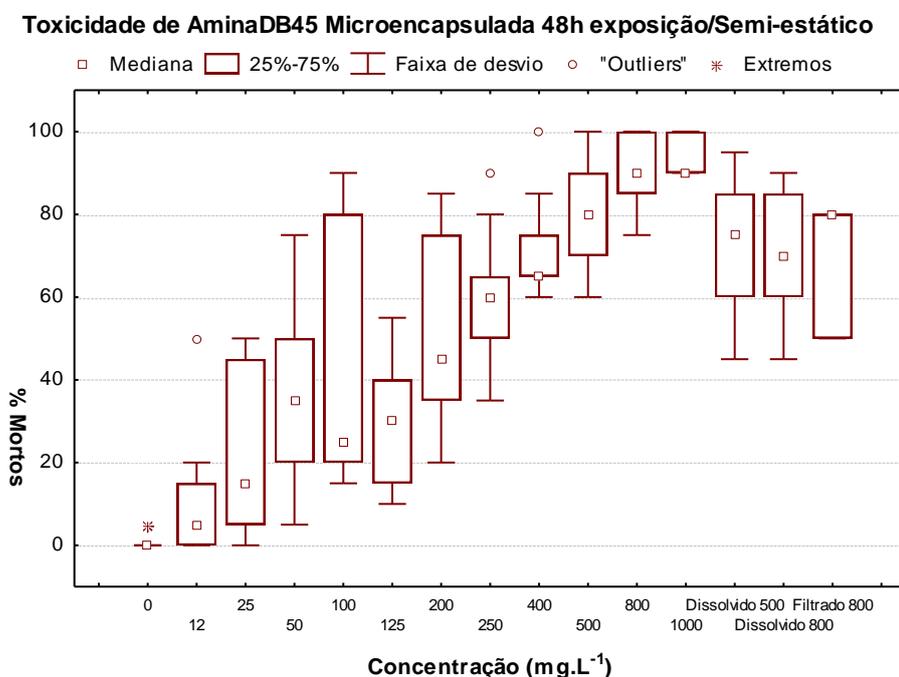


FIGURA 16 - Mortalidade do *Limnoperna fortunei* em diferentes concentrações do microencapsulado de amina - semi-estático 48h.

4.3.3. SISTEMA DE FLUXO CONTÍNUO

Os resultados dos testes de funcionalidade do fluxo estão na figura 17 (A, B e C) mostrando que nas calhas sem mexilhões há, em torno de 30% mais clorofila-a residual do que nas calhas com mexilhões, indicando a capacidade dos mexilhões de remover partículas em suspensão no sistema desenvolvido. Outro teste, com concentrações de ácido tricloro isocianúrico, em triplicatas, demonstrou que o sistema de fluxo criado permitia expor os mexilhões a um biocida dissolvido, de maneira que fosse possível registrar mortalidade.

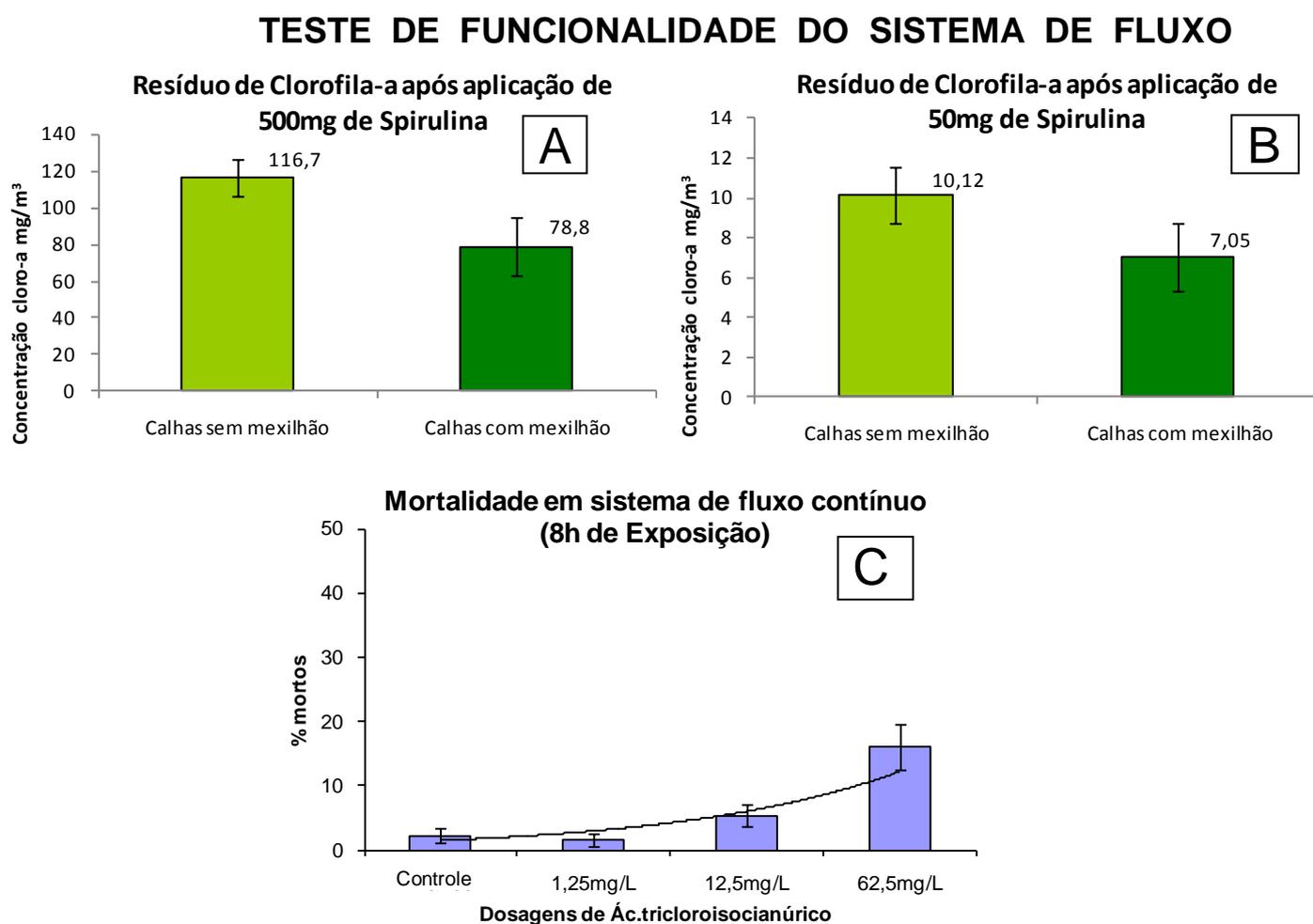


FIGURA 17 - Remoção de partículas em suspensão estimada pelo resíduo de clorofila-a após aplicação de 500 mg de *Spirulina sp* correspondente a 63 mg.L⁻¹ (A) e 50 mg de *Spirulina* correspondente a 6,3 mg.L⁻¹ e (B); C – Teste de mortalidade utilizando agente oxidante diluído ác. tricloroisocianúrico.

A figura 18 mostra a curva de mortalidade encontrada com a substância cloreto de potássio microencapsulada. Foram testadas 4 concentrações diferentes entre 500 e 6000 mg.L⁻¹. Não foi possível estimar a CL50 com os resultados obtidos. O controle apresentou mortalidade em duas réplicas, mas inferior a 10% (valor máximo aceitável em bioensaio toxicológico), ainda assim, sendo consideradas como “outlier” pela análise estatística. A mortalidade similar foi observada na dosagem de 500 mg.L⁻¹ com uma das réplicas registrando 10% de mortalidade, sendo classificada como valor extremo. Nas concentrações de 1500 mg.L⁻¹; 3000 mg.L⁻¹ e 6000 mg.L⁻¹, a mortalidade apresentou-se de forma dose dependente, apesar dos desvios de até 40%.

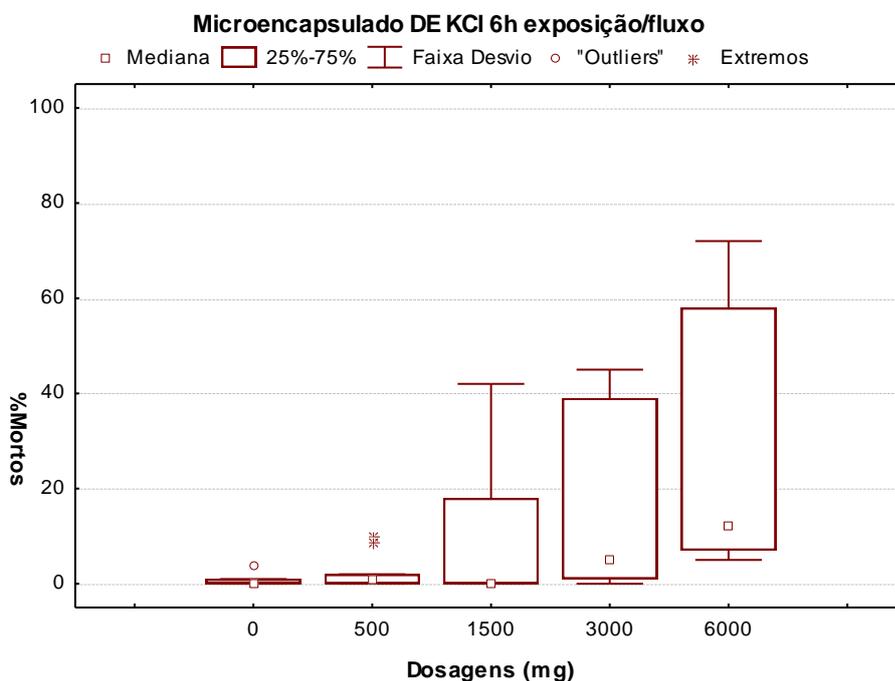


FIGURA 18 - Mortalidade do *Limnoperna fortunei* em diferentes concentrações do microencapsulados de cloreto de potássio – fluxo 6h.

A figura 19 mostra a mortalidade encontrada com a substância amina quaternária DB45 microencapsulada no sistema de fluxo contínuo. Foi testada apenas uma concentração de 500 mg.L⁻¹, não sendo possível estimar a CL50 com o resultado obtido. O valor de mortalidade foi baixo, com a mediana próxima a 10% e um valor máximo de até 40% de mortalidade (Figura 19).

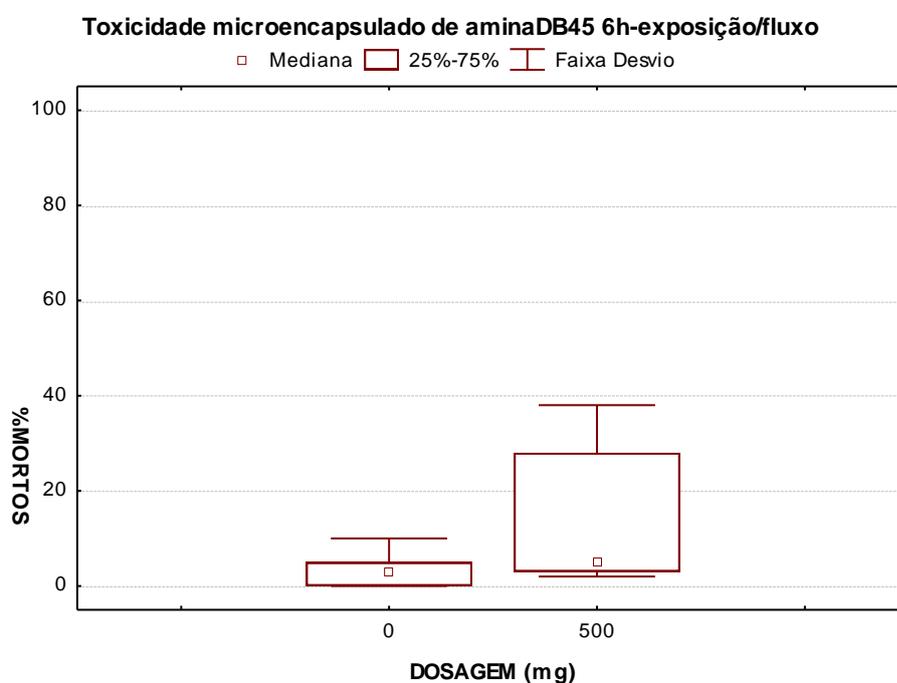


FIGURA 19 – Mortalidade do *Limnoperna fortunei* em diferentes concentrações do microencapsulados de amina – fluxo 6h.

4.4. ESTIMATIVA DA CL50

As concentrações letais (CL50) para as diferentes substâncias analisadas estão resumidas na tabela 3. Dentre as substâncias cloradas avaliadas, os compostos clorados inorgânicos apresentaram os menores valores de CL50. Entre os microencapsulados, o produto de amina DB45 apresentou a menores CL50 com 149,95 mg/L⁻¹. Os resultados das CL50 com os microencapsulados estão em função da quantidade do produto utilizado, tal como todas as concentrações descritas.

TABELA 3 - Resultados de CL50 em função das substâncias testadas.

Substâncias		CL50-48h (mg.L ⁻¹)			Método	
		- δ	Limite de 95% confiança	+ δ		
Cloros	Orgânico	DICS	90,86	108,96	130,68	TSK
	Inorgânicos	Dióxido de cloro líquido ativado	12,43	13,99	15,74	TSK
		Hipoclorito de sódio	0,407	0,516	0,658	PROBITOS
Controle Positivo (Sal)		KCl	197,43	293,38	435,95	TSK
Microencapsulado		Cloreto de potássio	697,66	902,18 (produto) 270,65 (biocida)	1104,53	PROBITOS
		Amina DB45	123,12	149,95 (produto) 29,99 (biocida)	182,62	TSK

δ = Desvio

(com os microencapsulados, a CL50 de biocidas, foi estimada considerando a porcentagem correspondente de 20% para amina e 30% para KCL)

5. DISCUSSÃO

O mexilhão dourado tornou-se um grande problema para distintos setores da indústria devido a sua fixação e desenvolvimento sobre os diferentes substratos. O setor que provavelmente sofreu o maior efeito econômico e social foi o setor hidroelétrico com suas centrais mantidas sobre vigília no intuito de evitar possíveis falhas no fornecimento de energia, devido aos entupimentos e paradas para limpeza. O controle do mexilhão começou a ser realizado de diferentes formas, no entanto, o uso de substâncias químicas, principalmente o uso de cloro, tornou-se a opção mais oportuna e aceita, sendo um produto de baixo custo com uma legislação regulamentando sua disposição no ambiente. Os métodos químicos são genericamente utilizados para tratamento de água e o uso do cloro geralmente é empregado com frequência (Macedo, 2004). Quando a escolha de uso é pela cloração, a atenção deve ser redobrada devido à formação de compostos perigosos e cancerígenos como os trihalometanos (THM), que apesar de não terem sido estudados neste trabalho, são ressaltados por diversos estudos que falam a respeito (Meyer, 1994; Colares et al., 2002; Environmental Working Group, 2002; Macedo, 2004). Waller et al. (1993) ao avaliarem diversos biocidas para controlar o *Dreissena polymorpha* afirmaram que os químicos e compostos persistentes, ou mesmo o cloro, que forma subprodutos perigosos, são péssimas escolhas para aplicações ambientais, já que quando utilizados diretamente no meio ambiente, podem causar impactos ambientais consideráveis, tanto à praga quanto às espécies nativas. Desta forma, é imprescindível uma avaliação prévia do uso e da aplicação dos diversos métodos químicos (Filippo, 2003).

5.1. CONSIDERAÇÕES METODOLÓGICAS

A metodologia semi-estática com 48h de exposição ao agente tóxico forneceu dados de mortalidade do *Limnoperna fortunei* com os diferentes biocidas testados, permitindo análise da letalidade das substâncias dissolvidas e microencapsuladas. Os métodos aplicados neste estudo são conhecidos e utilizados para determinar os diferentes efeitos de substâncias em diferentes organismos (FEEMA, 1990; USEPA, 2002). As metodologias aplicadas neste estudo foram semelhantes às utilizadas por outros autores (Waller et al.,1993; Wildridge et al. 1998; Elliot, 2005; Costa, 2008). Ampliando a avaliação, um sistema de fluxo contínuo foi desenvolvido e testado com os biocidas microencapsulados. No desenvolvimento deste sistema, foram considerados vários aspectos que contribuíram para a precisão dos resultados, tais como, aferição de volumes e de vazão, teste de funcionalidade e repetição dos bioensaios. Os primeiros bioensaios realizados no sistema de fluxo contínuo, com *Spirulina sp.* e ácido tricloroisocianúrico dissolvido, verificaram a sua funcionalidade, corroborando os resultados obtidos com os microencapsulados.

5.2. A TOXICIDADE DAS SUBSTÂNCIAS

5.2.1. Agentes oxidantes

O dicloroisocianurato de sódio (DCIS) apresentou um alto desvio nas concentrações de 10, 100 e 1.000 mg.L⁻¹, onde a concentração de 100mg/L⁻¹ apresentou 100% de desvio entre as réplicas. Os valores reduzidos de mortalidade em réplicas da concentração de 100 mg/L⁻¹ demonstram a alta capacidade do mexilhão de resistir, mesmo quando exposto a concentrações que são capazes de lhe causar morte. Esta evidência também é nítida com a sobrevivência de até 30% em réplicas da concentração de 1.000 mg.L⁻¹.

O dióxido de cloro ativado foi a substância que mais apresentou desvios entre as réplicas das concentrações utilizadas. Por isso, esta substância exigiu mais repetições dos bioensaios, no intuito de caracterizar a variabilidade de resposta e visualizar a curva de mortalidade. Os testes com concentrações a partir de 10 mg.L⁻¹ apresentaram grandes desvios, sugerindo que essas sejam concentrações críticas para a sobrevivência do mexilhão e capazes de matar 100% dos mexilhões expostos. Essas ocorrências de desvios geram incertezas na expectativa de morte dos mexilhões, onde numa concentração de 10 mg.L⁻¹, verificou-se ser capaz de matar 100% e numa concentração de 150 mg.L⁻¹ observa-se resultados com 25% de sobrevivência dos mexilhões expostos. Na concentração de 25 mg.L⁻¹, foi constatado 100% de mortalidade em todas as suas réplicas. Possivelmente, concentrações menores sejam suficientes para matar o mexilhão. Enquanto isso, as concentrações de 0,25 até 3 mg.L⁻¹ são insuficientes para causar morte acima de 10% e não registram grandes desvios.

O hipoclorito é uma substância conhecida e utilizada para a desinfecção em geral (Morton et al., 1976; Meyer, 1994; Cataldo et al., 2002; Filippo, 2003; Macedo, 2004), portanto, não justificaria muitos esforços sobre esta substância. Neste estudo, os experimentos com o hipoclorito auxiliaram a comparação dos efeitos entre as substâncias cloradas. Os resultados com o hipoclorito de sódio confirmaram sua capacidade letal sobre o *L. fortunei*. Foi registrado na concentração de 1 mg.L⁻¹ uma mediana de 65% de mortos. A CL50 estimada foi de 0,5 mg.L⁻¹, um quarto do valor máximo determinado pelo Ministério da Saúde (portaria 518), para água de distribuição e abastecimento. Ressalta-se que o número de experimentos utilizados com o hipoclorito neste estudo, possivelmente, não foi suficiente para registrar as amplitudes de desvios de resposta que foram encontrados com os outros clorados. No entanto, resultados encontrados por outros autores também indicam que o mexilhão é sensível a baixas concentrações de hipoclorito.

Cataldo et al. (2002) encontraram uma $CL_{50} = 5,5 \text{ mg.L}^{-1}$ e Morton et al. (1976) controlavam a re-infestação do mexilhão dourado em instalações de hidroelétricas com $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de cloro ativo. Porém, inicialmente, altas concentrações de cloro (200 mg.L^{-1}) foram utilizadas durante vários dias, até semanas e depois doses reduzidas ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$) foram usadas para remoção da população do molusco. Portanto, como se observa também em outros trabalhos (Doherty, 1986; Belanger et al., 1991; O'Neill, 1995; Van der Velde, 1997- citado em Cataldo, et al., 2002), os tratamentos de curto período de tempo de contato com cloro não afetam os moluscos, provavelmente pela capacidade dos mexilhões em detectar o elemento tóxico na água e fechar fortemente suas valvas. Rajagopal et al. (2003), concluíram que com uma dose constante de 1 mg.L^{-1} de hipoclorito por 588 a 1104 h é possível obter 100% de mortalidade dos adultos de *Dreissena polymorpha*; *Mytilopsis leucophaeta*; e *Mytilus edulis*. Cataldo et al. (2002) também encontraram muita resistência para combater o mexilhão dourado em aplicações industriais, com uma concentração de 5 mg.L^{-1} a 15°C , sendo aplicada por mais de um mês para matar a metade dos animais expostos, obtendo contudo, uma mortalidade maior com o aumento da temperatura, demonstrando que a temperatura influencia no efeito letal do hipoclorito. Os tratamentos de longa duração ressaltam a possibilidade de que os mexilhões estão sendo controlados por inanição causada pelo fechamento das conchas e não por ação direta do biocida, que em baixas concentrações já teriam eficiência para a prevenção do assentamento de larvas.

5.2.2. Controle Positivo (KCl)

Os resultados obtidos com o cloreto de potássio permitiram a comparação do efeito desta substância na forma dissolvida contra a microencapsulada. O cloreto de potássio é um sal sabidamente moluscocida, causando um choque osmótico como também relaxamento muscular. A CL_{50} calculada para os resultados obtidos foi de $293,38 \text{ mg/L}^{-1}$,

concentração que não está entre as mais tóxicas para o molusco, em relação a outros moluscocidas. O KCl apresentou grandes desvios nas concentrações de 100 até 2000 mg.L⁻¹, onde é bem provável que estas sejam concentrações críticas para a sobrevivência do molusco e, portanto, prováveis de se obter maior desvio. Fisher et al. (1991) encontraram uma concentração letal mediana de 138 mg.L⁻¹ em 24h de exposição para o mexilhão zebra. Waller et al. (1993), realizando estudos com diferentes biocidas com 48h de exposição e diferentes organismos, encontraram uma seletividade desejada com o cloreto de potássio, porém este sal, foi tóxico para o mexilhão zebra somente em altas concentrações, CL50 de 150 mg.L⁻¹, um resultado duas vezes menor que o encontrado no presente estudo (CL50= 293 mg.L⁻¹). No entanto, Wildridge et al. (1998) com 24h de exposição notaram que uma dose de 1000 mg.L⁻¹ de KCl é requerida para causar paralisia em 50% de mexilhão zebra, enquanto que a dose de 5.500 mg.L⁻¹ é requerida para levar a morte de 50% dos mexilhões zebras expostos.

5.2.3. Microencapsulado

A utilização dos microencapsulados baseia-se no princípio da mínima dosagem. Quando o biocida direcionado ao organismo está envolto por uma camada protetora, ele não necessita ser lançado em quantidades para transformar o seu entorno em uma concentração letal. As microcápsulas são lançadas no meio contendo baixas concentrações de princípio ativo, que alcançarão valores críticos para o mexilhão apenas dentro do organismo, após serem concentradas por sua atividade filtrante, sem necessidade de grandes dispersões de biocida no meio aquático. O estudo com as substâncias microencapsuladas foi organizado para fornecer a maior quantidade de informações possíveis com um número de replicações confiáveis. A estimativa da concentração letal mediana para o produto microencapsulado de KCL na metodologia semi-estática foi de 902 mg.L⁻¹ (considerando que 30% são de composto ativo, CL50 de

KCl = 270,65 mg.L⁻¹). Utilizando microcápsulas semelhantes para matar o mexilhão *Dreissena polymorpha*, Elliot (2005) encontrou uma concentração letal mediana desse composto ativo igual a 88,2 mg.L⁻¹ para experimentos estáticos de 72h. Neste caso, demonstrando a possibilidade de uma maior eficiência, potencializando o efeito biocida.

Resultados com uma mortalidade maior foram obtidos com os microencapsulados de amina DB45. Obteve-se mortalidade de até 100% com a metodologia semi-estática 48 horas de exposição e uma CL50 = 149,95 mg.L⁻¹ do produto, CL50 seis vezes menor do que a encontrada com os microencapsulados de KCl, com esta mesma metodologia em relação ao peso dos produtos. Considerando que 20% é o biocida amina DB45 a CL50 do biocida ficou estimada em 29,99 mg.L⁻¹, 9 vezes menor em relação a quantidade de biocida nos microencapsulados de KCl. Em exposições de 48 horas estáticas sobre o mexilhão zebra, Costa (2008) não encontrou diferença entre o biocida de amina DB45 encapsulado e não encapsulado, com resultados de concentração letal mediana (de composto ativo) estimados em 30 e 28 mg.L⁻¹, respectivamente, valor semelhante ao encontrado com os microencapsulados de amina DB45, no presente estudo.

Com o microencapsulado de cloreto de potássio, foram realizados experimentos com diferentes concentrações no fluxo contínuo. Os resultados obtidos possibilitaram visualizar a tendência de aumento da mortalidade e sua variação nas concentrações testadas. Devido às concentrações nestes experimentos apresentarem baixa mortalidade, todas entre 0 e 15%, não foi possível realizar o cálculo da concentração letal mediana (CL50-6h) pelos métodos utilizados neste estudo. Em sistemas de fluxo contínuo, Elliot (2005) encontrou mortalidade do mexilhão zebra de 81% no início e 53% no final do sistema de fluxo com 4 metros de comprimento com 12h de exposição a 150 mg.L⁻¹ de KCl microencapsulado.

Os experimentos com o fluxo contínuo de microencapsulados de amina DB45 apresentaram um valor de mortalidade baixo em todas as repetições (mediana de mortalidade de 5%). Esta baixa mortalidade, provavelmente, esteja relacionada com a concentração de partículas, não sendo suficiente a quantidade de biocida para causar morte no período de exposição.

5.3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.

Os mexilhões possuem uma característica de fechar suas conchas aumentando sua resistência à exposição a condições desfavoráveis e possivelmente essa característica influenciou as amplitudes de desvios encontrados. Outros autores como Cataldo et al. (2002), em trabalhos com o mexilhão dourado, e Rajagopal et al. (2003), com o mexilhão zebra, também registram estas evidências. Esta resistência à exposição de substâncias agressivas, como o cloro, faz com que as dosagens de biocidas sejam realizadas continuamente sem efeito considerável até que a resistência do molusco seja superada. Isto gera um alto custo ambiental, através dos impactos, para substâncias deste tipo.

Nos experimentos com o dióxido de cloro, as conchas dos mexilhões sofreram oxidação. As concentrações acima de 10 mg.L^{-1} , foram as concentrações que visivelmente causaram uma forte oxidação nas conchas dos mexilhões (Figura 20). Ao manipular os mexilhões, no momento de verificar sua mortalidade, foi possível observar que a oxidação impedia a abertura das conchas. Ao tentar abrir uma concha de um organismo morto, a concha se partia facilmente, porém não abria por completo. As altas concentrações de cloro, provavelmente, oxidavam a matriz orgânica impossibilitando o movimento da charneira das conchas. Analisando os organismos sobreviventes a

exposição ao dióxido de cloro, foi observado que os mexilhões não possuíam imperfeições nas conchas, permitindo-lhes uma ótima vedação. No entanto, estas observações não foram quantificadas nem testadas. Este tipo de biocida é muito agressivo não só para os organismos como também para as instalações industriais.



FIGURA 20 - Organismos expostos às altas e baixas concentrações de dióxido de cloro (seta: matriz orgânica oxidada, regiões esbranquiçadas próximo à carneira).

No estudo com o biocida cloreto de potássio, foram encontrados mexilhões em um estado letárgico. Os mexilhões permaneciam abertos com o manto desfalecido, respondendo lentamente a estímulos externos, em alguns casos fechavam suas conchas deixando o manto para fora (Figura 21). O efeito anestésico provocado pelo cloreto de potássio em moluscos causa uma vulnerabilidade na defesa do mexilhão ao evitar que suas conchas se fechem (Elliot, 2005). Por outro lado, o mexilhão poderá sobreviver ao

estado letárgico e continuar com a sua infestação. Waller et al. (1993) encontraram, com o cloreto de potássio, uma seletividade desejada, onde este biocida foi mais tóxico para o mexilhão zebra que para outros organismos não alvo. Contudo, foi tóxico para o mexilhão zebra somente em altas concentrações ($CL_{50} = 150 \text{ mg.L}^{-1}$), e comentam que o seu uso pode ser economicamente inviável.



FIGURA 21 - Organismo vivo, com reação letárgica. Manto para fora da concha, sendo lentamente retraído.

O sal cloreto de potássio (KCl) foi testado na sua forma dissolvida e também microencapsulada. Com o KCl livre obtivemos concentração letal mediana de $293,38 \text{ mg.L}^{-1}$. Na mesma metodologia, a concentração letal mediana de KCl microencapsulado foi $270,65 \text{ mg.L}^{-1}$, considerando ser 30% do produto utilizado (CL_{50} do produto = $902,18 \text{ mg.L}^{-1}$), valor menor que o encontrado com o KCl livre. Apesar de este valor ser menor, não foi possível afirmar que o microencapsulamento potencializou o efeito biocida do KCl sobre o mexilhão dourado. Pois, nas duas concentrações utilizadas como controle do encapsulamento, chamadas de “dissolvido” e “filtrado”, as mortalidades encontradas

corresponderam à concentração análoga do material encapsulado. Poderia ser considerado que os microencapsulados permaneciam com o seu efeito mesmo após uma semana em solução ou que os mexilhões estavam sob exposição a um biocida dissolvido. Isto indica algum problema com o encapsulamento, já que o esperado era que a concentração “dissolvido” não fosse suficiente para obter o mesmo efeito das microcápsulas recém dosadas e que o controle “filtrado”, onde todas as microcápsulas íntegras foram removidas, não deveria apresentar efeito algum. Esses resultados indicam que as microcápsulas estavam permitindo o extravasamento dos biocidas e, portanto, provavelmente, os organismos estavam expostos a biocidas dissolvidos e não encapsulados. Resultado semelhante foi encontrado com algumas formulações de microencapsulados avaliadas por Elliot (2005) e Costa (2008). Em seus estudos Elliot (2005) encontrou que dentre oito diferentes microencapsulados, o de maior resistência, liberava 90% das toxinas em 170 minutos, registrando que, se as partículas vazam seus conteúdos antes de serem filtrados pelos mexilhões, poderá não existir nenhum efeito resultante do encapsulamento, e a mortalidade não será incrementada. Costa (2008), por sua vez, encontrou uma mortalidade maior, porém não significativa, com amina DB45 microencapsulada em relação à livre, utilizando uma metodologia semi-estática de 12h com renovação constante das soluções. Provavelmente esta diferença se deve a novas formulações, principalmente nos envoltórios das microcápsulas ou mesmo devido ao fornecimento constante de novos microencapsulados.

A capacidade de evitar o vazamento do biocida para o meio aquoso está intimamente relacionada com a capacidade de dissolução do Biocida. O KCl é um sal bastante ionizável e portanto muito solúvel em água. A amina DB45 é menos ionizável e possui um peso molecular maior, portanto menos solúvel, reduzindo a difusão através das

cápsulas. Provavelmente, isto explique a menor mortalidade na concentração “filtrado” de amina DB45 (Figura17).

É importante destacar que nem neste estudo, nem naqueles descritos na literatura, as metodologias de controle da infestação visaram o controle em ambientes abertos. Nas áreas ambientais afetadas, a possibilidade de controle com métodos físicos e químicos é mínima. Portanto, o uso de biocidas visa o controle dos mexilhões principalmente em instalações industriais. O tempo de retenção do biocida pela microcápsula deve ser calculado para atuar basicamente o tempo suficiente de trânsito dentro das tubulações, onde o desprendimento das toxinas microencapsuladas, possui dois lados; por um lado é bom, por não permanecer ativo no meio ambiente, sendo diluída; por outro lado, perde a eficiência ao longo do tratamento, caso o desprendimento ocorra em um curto período de tempo.

No presente estudo, tal como descrito nos estudos de Elliot (2005), foi possível verificar a rejeição de algumas microcápsulas junto às pseudofezes. Estes microencapsulados que eram rejeitados pelo mexilhão, provavelmente pelo tamanho das partículas, depositavam-se junto com o muco das pseudofezes do mexilhão. Apesar de haver esta deposição, o provimento de aeração atuava re-suspendendo as partículas depositadas.

A maioria dos tratamentos químicos, com substâncias dissolvidas, protege de incrustações todo o sistema de tubulações de água das instalações, desde a entrada até a saída. No entanto, o custo econômico das dosagens contínuas e a contaminação do ambiente por estas substâncias, são desvantagens que obrigam o uso de medidas mitigadoras, estabelecidas pelas regulamentações ambientais vigentes. O uso de químicos não deve ser exclusivamente a única solução para o controle do mexilhão dourado, mas uma seleção de substâncias que possuam efeito potencialmente biocida

para os mexilhões através do modo de ação e aplicação, portanto, significando uma redução na contaminação dos ambientes de descargas e minimizando o perigo sobre as espécies não-alvo.

Os microencapsulados possuem o potencial de oferecer uma alternativa viável ao uso da cloração para o controle de pragas filtradoras como os mexilhões, com as vantagens de que oferecem tratamentos com dosagens únicas, sem a necessidade de dosagens contínuas, e sem o uso de soluções com ingredientes tóxicos superando os problemas de poluição ambiental (Aldridge et al., 2006). O uso dessas substâncias para o controle de pragas, como o mexilhão dourado e mexilhão zebra, desponta como uma esperançosa alternativa, onde através deste método e utilizando a habilidade de filtração e de remoção das partículas do meio líquido que os moluscos possuem. Ao considerar que diferentes espécies de moluscos filtram diferentes tamanhos de partículas, a seleção do tamanho das microcápsulas pode ser de acordo com a espécie. Além disto, pode-se levar qualquer substância até o mexilhão, em concentrações dosadas e específicas, reduzindo drasticamente a concentração de biocidas, comparado com as dosagens diretas na água.

6. CONCLUSÕES

- ✓ As substâncias cloradas utilizadas neste estudo são conhecidamente fortes oxidantes, muito variáveis no efeito de mortalidade que causam nos mexilhões, chegando a desvios de 100%. Sendo assim, não são as melhores alternativas de combate controlado do mexilhão dourado. Além disso apresentam dano ambiental por formação de compostos cancerígenos e por não serem seletivos.
- ✓ Apesar de ter registrado uma CL50 para KCl microencapsulado menor que KCl dissolvido, não foi possível afirmar que o encapsulamento potencializou o efeito biocida do KCl sobre o mexilhão dourado.
- ✓ Os microencapsulados são capazes de matar o mexilhão, apresentando desvios menores que as substâncias cloradas utilizadas, apesar de ser necessário concentrações maiores.
- ✓ A metodologia de fluxo contínuo desenvolvida é uma ferramenta que pode fornecer informações úteis sobre a ação dos biocidas em sistemas dinâmicos nas hidroelétricas ou estações de tratamento de água, devido à maior semelhança com as condições reais de sua utilização. Os estudos com o sistema de fluxo contínuo devem ser repetidos, como também testados agentes tóxicos dissolvidos possibilitando uma melhor análise para o controle do mexilhão.
- ✓ A forma microencapsulada desponta como uma alternativa de fornecer biocidas para o controle de mexilhões.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- NBR12713. 1993.** Avaliação de toxicidade aguda, utilizando *Daphnia similis* Claus, 1876 (Cladocera, Crustacea). *ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas*.
- NBR 00:001.44-003. 1º texto base. Ecotoxicologia aquática** - Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com *Lytechinus variegatus* (Echinoderma: Echinoidea). *ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas*.
- NBR 13373. 17º 2005 reunião. Ecotoxicologia aquática** - Ensaio de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia* sp (Crustácea, Cladocera). 13p. *ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas*.
- Aldridge, D.C.; Elliott, P.; Moggridge, G.D. 2006.** "Microencapsulated biobullets for the control of biofouling zebra mussels", *Environ. Sci. Technol.*, 40, 975-979.
- Avelar, W. E. P.; Martim, S. L. & Vianna, M. P. 2004.** A new occurrence of *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1856) (Bivalvia, Mytilidae) in the State of São Paulo, Brazil. *Braz. J. Biol.*, 64(4): 739-742.
- Belanger, S. E.; Farris, J. L.; Cherry, D. S. & Jr. Cairns, J. 1985.** Sediment preference of the freshwater Asiatic clam, *Corbicula fluminea*. *The Nautilus*. 99(2-3) 66-73.
- Belz, Carlos Eduardo. 2006.** Análise de risco de bioinvasão por *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857): Um modelo para a bacia do rio Iguaçu, Paraná. *Tese doutorado*. Universidade Federal do Paraná.
- Boelman, S. F., Neilson, F. M., Dardeau, E. A. & Cross, T. 1997.** Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) control handbook for facility operators, first edition. Miscellaneous paper. EL-97-1. *US Army Engineer Waterways Experiment Station*, Vicksburg, MS.
- Boltovskoy, Demetrio; Correa, Nancy; Cataldo, Daniel & Sylvester, Francisco; 2006.** Dispersion and ecological impact of the invasive freshwater bivalve *Limnoperna fortunei* in the Río de la Plata watershed and beyond. *Biological Invasions* (2006) 8: 947–963 _ Springer 2006. DOI 10.1007/s10530-005-5107-z
- Brenchley, G.A., Carlton, J.T. 1983.** Competitive displacement of native mud snails by introduced periwinkles in the New England intertidal zone. *Biol. Bull.* v. 165 pp.543-558.
- BYERS, J.E. 2000.** Competition between two estuarine snails: implications for invasions of exotic species. *Ecol.* v. 81 pp.1225-1239.
- Callil, C. T. & Mansur, M. C. D. 2002.** Corbiculidae (Mollusca, Bivalvia) in Pantanal of Mato Grosso, high Paraguay Basin, Brazil: distribution and population density. *Amazoniana*, 17 (1/2): 1-15.
- Carlton, J.T. 1979.** History, biogeography, and ecology of the introduced marine invertebrates of the Pacific coast of North America. *D. Sc. University of California*. California.
- Carroll, S.P., Dingle, H. 1996.** "The biology of post-invasions events". *Biol. Conserv.* v. 78 pp.207-214.
- Cataldo, D.; Boltovskoy, D. & Pose, M. 2002.** Control del molusco incrustante *Limnoperna fortunei* mediante el agregado de moluscicidas al agua. *In. Tercera jornada sobre conservación de la fauna íctica en el río Uruguay, Paysandu, Uruguay*.
- CBD - Secretariat of the Convention on Biological Diversity. 2006.** Global Biodiversity Outlook 2. Montreal, 81 + vii pages
- César, Augusto; Rodrigues da Silva, S. L. & Santos, A. R. 1997.** Testes de Toxicidade Aquática no controle da poluição. *Manual técnico, Universidade Santa Cecília - UNISANTA*; Santos, São Paulo - SP. 37 p.
- Colares, E.R., Suminsky, M., Bendati, M. M. 2002.** Diagnóstico e Controle do Mexilhão Dourado, *Limnoperna fortunei*, em Sistemas de Tratamento de Água em Porto Alegre (RS/BRASIL) – *VI Simpósio Ítalo Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*.
- Costa, Raquel . 2008.** Improved solutions for zebra mussel control R Costa (2008) *University of Cambridge*.
- COX, G.W. 1999.** Alien species in North America and Hawaii. Island Press.
- Daniel Cataldo; Demetrio Boltovskoy; Mónica Pose. 2002.** Control del molusco incrustante *Limnoperna fortunei* mediante el agregado de moluscicidas al agua. Apresentado em "Tercera jornada sobre conservación de la fauna íctica en el río Uruguay" Organizada por la Comisión Administradora de Río Uruguay. Entre el 25 y 26 de abril del 2002, Paysandu Uruguay.
- Darrigran, Gustavo; Cristina Damboronea. 2006.** Bio-invasión del mejillón dorado en el continente americano. *1a ed. - La Plata : Univ. Nacional de La Plata*. 226 p.
- Darrigran, Gustavo. 1999.** Longitudinal distribution of molluscan communities in the Rio de la Plata estuary as indicators of environmental conditions. *Malacological Review, Suppl 8, Freshwater Mollusca I* : 1–12

- Darrigran, G.; Ezcurra de Drago, I. 2000.** Invasion of *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia: Mytilidae) in America. *Nautilus* 2:69–74.
- Darrigran, G.; Pastorino, G. 1995.** The recent introduction of Asiatic bivalve, *Limnoperna fortunei* (Mytilidae) into South America. *The Veliger* 38(2):183–187.
- Darrigran, Gustavo. 2002.** Potential impact of filter-feeding invaders on temperate inland freshwater environments. *Biological Invasions*. 4: 145–156, 2002.
- Di Persia, D. & Bonetto, A. A. 1997.** Nuevas citas de *Limnoperna fortunei* para la cuenca del río Paraná, Argentina. *Neotropica*. 43(109-110): 119-120.
- Dobson, A., Crawley, M. 1994.** "Pathogens and the structure of plant communities". *Trend Ecol. Evol.* v. 9 pp.393-397.
- Doherty, F.G.; Cherry, D.S.; Cairns J. Jr. 1986.** Control of the freshwater fouling bivalve *Corbicula fluminea* by halogenation. *Arch Environ Contam Toxicol* 15:535–542
- Elliott, P. 2005.** "The zebra mussel in England: Biology, impacts and control using micro-encapsulated toxins", Ph.D. Thesis, *Univ. of Cambridge*.
- ELTON, C.S. 1958.** "The ecology of invasions by animals and plants". *John Wiley and Sons*. New York.
- Environmental Working Group. 2002.** Primeira avaliação nacional de subprodutos da cloração na água de torneira demonstra que 137.000 grávidas norte americanas estão sob elevado risco de aborto e má-formação fetal. http://www.hidroall.com.br/br/download/library/primeira_avaliacao_nacional_trihalometanos. 1718 Connecticut Ave., N.W., Suite 600 – Washington, DC 20009 – info@ewg.org January 8.
- Ezcurra De Drago, I.; Darrigran, G.; Scarabino, F. & Oliveros, O.B. 1998.** Actualización de la distribución de *Limnoperna fortunei* (Bivalvia, Mytilidae): Río Uruguay y algunos tributarios. *V Congreso Latinoamericano de Ecología*.
- FEEMA. 1990.** Critérios e Padrões para Controle da Toxicidade em Efluentes Líquidos e Industriais. Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente, Rio de Janeiro, Brasil, *nt*- 213.r-4 ed.
- FILIPPO, R. de. 2003.** Mexilhão dourado nos ecossistemas brasileiros. SEPRONEWS. *Série meio ambiente*. Ano 1 no3 Maio.
- Harrington, Donald K; John E. Van Benschoten; James N. Jensen; Donald P. Lewis; Edward F. Neuhauser. 1997.** Combined use of heat and oxidants for controlling adult zebra mussels. *War. Res.* Vol. 31, No. 1, pp. 2783--2791.
- Kolar, C. S. & D.M. Lodge. 2001.** Progress in invasion biology: predicting invaders. *Ecology & Evolution* 16(4): 199-204.
- Macêdo, J.A.B.de. 2004.** Águas e Águas. 2ª edição, Ed. Conselho Regional de Química – MG, 977 pág.
- Magara, Yasumoto; Matsui, Yoshihiko; Goto, Yoshinori and Yuasa, Akira. 2001.** Invasion of the non-indigenous nuisance mussel, *Limnoperna fortunei*, into water supply facilities in Japan. *J Water Supply: Res Technol—Aqua* 50:113–124
- Mansur, M.C.D.; dos Santos, C.P.; Darrigran, G.; Heydrich, I.; Callil, C.T. and Cardoso, F.R. 2003.** Primeiros dados quali-quantitativos do mexilhão-dourado, *Limnoperna fortunei* (Dunker), no Delta do Jacuí, no Lago Guaíba e na Laguna dos Patos, Rio Grande do Sul, Brasil e alguns aspectos de sua invasão no novo ambiente. *Revista Brasileira de Zoologia* 20: 75–84.
- Mc Callum, H., Dobson, A. 1995.** "Detecting disease and parasite threats to endangered species and ecosystems". *Trends Ecol. Evol.* v.10 pp.190-194.
- MEYER, Sheila T. 1994.** Chlorine use in water disinfection, trihalomethane formation, and potential risks to public health. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 10, n. 1. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X1994000100011&lng=&nrm=iso>. Acesso em: 13 2008. doi: 10.1590/S0102-311X19940010 0011.
- Morton, B. 1975.** The Colonization of Hong Kong's raw water supply system by *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia: Mytilacea) from China. *Malacol. Rev.*, 8: 91-105.
- Morton, B. S., 1977.** The population dynamics of *Limnoperna fortunei* (Dunker 1857) (Bivalvia: Mytilacea) in Plover Cove reservoir, Hong Kong. *Malacologia* 16: 165-182.
- Nack, Herman. 1970.** Microencapsulation Techniques, Applications and Problems. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, Vol. 21, No. 2, 85-98
- Terra, Nara Regina; Lemieszek, Márcia Bonow; Lemos, Clarice Torres de; Leite, Enio Henriques. 2007.** Presença de *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) nas bacias hidrográficas do Rio Uruguai e Lago Guaíba, Rio Grande do Sul, Brasil. *Fepam em Revista*, Porto Alegre, v.1, n.1, p.12-19, jan./jun. 2007."
- O'Neill, C. R. Jr. 1997.** Economic impact o zebra mussels – results of the 1995 National zebra mussel information clearinghouse study. *Great Lakes Research Review*. 3(1). 35-42.

- Oguz, T., Ducklow, H.W., Purcell, J.E., Malanotte-Riz-Zoli, P. 2001.** "Modeling the response of top-down control exerted by gelatinous carnivores on the Black Sea pelagic food web". *J. Geophys. Res. C. Oceans*. v.106 pp.4543-4564
- Oliveira, Márcia Divina de. 2003.** Ocorrência e Impactos do Mexilhão Dourado (*Limnoperna fortunei*, Dunker 1857) no Pantanal Mato-Grossense. *Circular Técnica*38. ISSN 1517-1965.
- Oliveira, M. D. & L. F. Barros. 2003.** Mexilhão dourado no Pantanal – Um problema ambiental e econômico. *EMBRAPA*, p. 1-3 (<http://www.cpap.embrapa.br>).
- Pastorino, G; Darrigran, G; Martin S, Lunaschi L. 1993.** *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1957) (Mytilidae) nuevo bivalve invasor en aguas de1 Río de la Plata. *Neotropica* 39: 101-102.
- Pimentel, D.; Zuniga, R.; Morrison, D. 2005.** "Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States", *Ecology Economics*, 52, 273-288.
- Race, M.S. 1982.** "Competitive displacement and predation between introduced and native mud snails". *Oecologia* v.54 pp.337-347.
- Rajagopal, S.; Venugopalan, V. P.; Van der Veld, G.; Jenner, H. A. 2003.** Response of fouling brown mussel, *Perna perna* (L) to chlorine. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 44, 369-376.
- Ricciard, A. 1998.** Global range expansion of the asian mussel *Limnoperna fortunei* (Mytilidae): another fouling threat to freshwater systems. *Biofouling*, 13(2): 97-106.
- Scarabino, F. & Verde, M. 1994.** *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) em la costa Uruguay del Río de la Plata (Bivalvia; Mytilidae). *Com. Soc. Malac. Urug.* 7(66-67): 374-376.
- Simeão, C. M. G.; C. B. Martinez & P. S. Formagio. 2006.** *Limnoperna fortunei* : situação atual e perspectivas futuras. Florianópolis, SC: *Anais V Simpósio Brasileiro sobre Pequenas e Médias Centrais Hidroelétricas, Comitê Brasileiro de Barragens*, Abril 03 a 06 de 2006: 1-9.
- StatSoft, Inc. 2004.** STATISTICA (data analysis software system), version 7. www.statsoft.com. //StatSoft – Inc, 2004. *Manual Eletrônico*, Estatística versão 7.0.
- Thies, C. 1992.** Encapsulation processes for controlled delivery applications. Second Workshop on the Controlled Delivery in Consumer Products. May 13-15. *Controlled Release Society*, Secaucus, NJ.
- Uryu, Y.; K, Iwasarki & M. Hinue. 1996.** Laboratory experiments on behavior and movement of a freshwater mussel, *Limnoperna fortunei* (Dunker). *The Journal of Molluscan Studies*. London. 62: 327-341.
- USEPA, 2002.** Short-term methods for estimating the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. 5th Ed. EPA-821-R-02-012. *US. Environmental Protection Agency. Office of Water*, Washington, DC. 4th Ed.
- Vitousek, P.M., Walker, L.R., Whiteaker, L.D. 1997.** "Biological invasion by *Myrica faya* alters ecosystems development in Hawaii". *Science*. v.238 pp.802-804.
- Waller, D. L.; Rach, J. J.; Cope, W. G.; Marking, L. L.; Fischer, S. W.; Dabrowska, H. 1993.** Toxicity of Candidate Molluscicides to Zebra Mussels (*Dreissena polymorpha*) and selected nontarget organisms. *J. Great Lakes Res.* 19(4): 695-702.
- Wildridge, P.J., Werner, R.G., Doherty, F.G., Neuhauser, E.F., 1998.** "Acute toxicity of potassium to the adult zebra mussel *Dreissena polymorpha*", *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 34, 265-270.
- Williamson, M. 1996.** Biological Invasions. *Chapman & Hall*, London, 244 pp.
- Zanella, O. & Marenza, L.D. 2002.** Ocorrência de *Limnoperna fortunei* na Central Hidrelétrica de Itaipu. In: *V Congresso Latinoamericano de Malacologia*. Instituto Butantan/ Instituto de Biociências – USP. São Paulo, Brasil: p. 41.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)