



PUC
RIO

OTÁVIO SARMENTO PIERI

COMPORTAMENTO DE Biomphalaria glabrata (SAY, 1818),
CARAMUJO VETOR DA XISTOSOMOSE, EM RELAÇÃO AOS MOLUSCICIDAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Departamento de Psicologia
Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro, 30 de dezembro de 1979

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA
DO RIO DE JANEIRO

Rua Marquês de São Vicente, 225 - Gávea
CEP 22453-900 Rio de Janeiro RJ Brasil
<http://www.puc-rio.br>

N.Cham. 150 P615 TESE UC

Título Comportamento de biomphalaria glabrata(Say, 1818), cara



Ex.1 PUCB

0103854

Dissertação apresentada ao Departamento de Psicologia da PUC/RJ, fazendo parte da banca examinadora os seguintes professores:



Prof. CHARLES A. ESBERARD (Orientador)
PUC/RJ



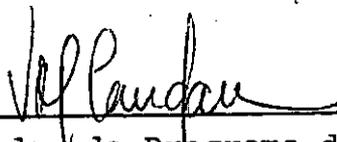
Prof. W. LOBATO PARAENSE
Instituto Oswaldo Cruz



Prof. OCTAVIO S. LEITE
PUC/RJ

Visto e permitida a impressão.

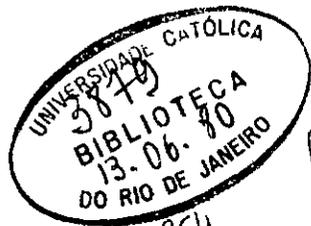
Rio de Janeiro, 29 de abril de 1980



Coordenador do Programa de Pós graduação do Centro de Ciências Humanas

24

70938



al

103854

150
2615

TESE VC

SC 7

OTÁVIO SARMENTO PIERI

B B10700-8

COMPORTAMENTO DE Biomphalaria glabrata (SAY, 1818),
CARAMUJO VETOR DA XISTOSOMOSE, EM RELAÇÃO AOS MOLUSCICIDAS

Dissertação apresentada ao Departamento de Psicologia da PUC/RJ como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM PSICOLOGIA TEÓRICO-EXPERIMENTAL (área de especialização: ETOLOGIA).

Orientador: CHARLES A. ESBERARD

Departamento de Psicologia
Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro, 30 de dezembro de 1979.

A meus pais.

A minha mulher e a meus filhos.

MEUS AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Charles A. Esberard, Orientador da dissertação, pelo apoio e confiança depositados.
- Ao Laboratório de Comportamento Animal do Instituto de Psicologia e Comunicação Social da UERJ, pelos equipamentos colocados à disposição.
- A Moacélio Verânio da Silva Filho e Jorge da Silva Raymundo, colegas do Instituto Oswaldo Cruz, pela prestimosa colaboração.
- Ao Prof. Walter Hugo de A. Cunha, do Departamento de Psicologia Experimental da USP, pelos inestimáveis ensinamentos e dedicação.
- Ao Dr. Pedro Jurberg, Chefe do Laboratório de Comportamento Animal do Instituto Oswaldo Cruz, pelo incentivo e empenho sem os quais este trabalho não seria possível.

Trabalho realizado no
Laboratório de Comportamento Animal
do Instituto Oswaldo Cruz

R E S U M O

A importância dos dados comportamentais no controle químico dos moluscos vetores da xistosomose / foi considerada sob dois aspectos: (1) a possibilidade de os caramujos escaparem aos moluscicidas graças a comportamentos de proteção, como retração na concha, afastamento de locais dessecados, saída da água, enterramento no substrato e afastamento de áreas tóxicas e (2) a possibilidade de a toxidez de um produto / ser caracterizada através de parâmetros comportamentais fidedignos. Quanto ao comportamento como meio de proteção, foi enfatizada a necessidade de uma abordagem etológica, cujas técnicas de categorização, descrição, mensuração e registro comportamental e cujos princípios / de análise causal e funcional proporcionariam um enfoque global das relações envolvidas. Quanto ao comportamento como critério de toxidez, foi desenvolvida uma metodologia baseada nos procedimentos padronizados pela O.M.S. para ensaios biológicos com moluscicidas e envolvendo registro comportamental por cinematografia / com lapso de tempo: adultos de Biomphalaria glabrata / eram submetidos a diferentes concentrações sub-letais de sulfato de cobre durante 24 horas e, em seguida, / transferidos para recuperação em água destilada desionizada; a partir da análise dos registros foram computados (a) o tempo decorrido até a primeira subida à superfície, (b) frequência de subidas, (c) frequência de saídas de água, (d) tempo de permanência fora da água e (e) proporção de indivíduos nos terços superior, médio e inferior do aquário. O método LITCHFIELD-WILCOXON / foi empregado para determinação das concentrações de

efeito comportamental de 50% (CEC₅₀) em relação a cada parâmetro, e os índices obtidos - (a) 0,0016, (b) 0,0105, (c) 0,006 (d) 0,007 e (e) 0,029 ppm de cobre - não só evidenciaram a exequibilidade da aplicação sistemática de critérios comportamentais de toxidez, como se revelaram capazes de detectar o efeito tóxico do produto em concentrações muito inferiores às obtidas nas determinações convencionais de letalidade. Os dados evidenciaram também uma relação linear efeito/log dose para os parâmetros (b), (c), (d) e (e) e mostraram alterações na atividade dos caramujos em decorrência do ciclo de iluminação. Em conclusão, foi ressaltado que, embora o esclarecimento dos aspectos etológicos envolvidos no problema do controle do vetor dependa da análise das relações entre o indivíduo e seu ambiente natural, estudos de laboratório com mensurações acuradas de parâmetros relacionados aos comportamentos de proteção podem fornecer subsídios relevantes a respeito.

ABSTRACT

The role of behavioral data on the chemical control of schistosomiasis vector mollusks was taken into account from two standpoints: (1) the possibility of snails to escape molluscicides by means of protective behaviors such as retracting into shell, avoiding dry places or toxic areas, crawling out of water and burrowing and (2) the possibility of using reliable behavioral parameters in toxicity determinations. As concerns (1), there was stressed the necessity of an ethological approach for a broader assessment of the relations involved, making use of the techniques of behavioral categorization, description, measurement and recording, and following the principles of causal and functional analysis. With regard to (2), a method was developed based on W.H.O. standard procedures for bioassaying molluscicides and involving behavioral records by time-lapse cinematography: Biomphalaria glabrata adults were subjected to different sub-lethal doses of copper sulfate during 24 hours and then transferred to deionized distilled water for recovery; from those records it was possible to compute: (a) the time elapsed until the first climb to surface, (b) frequency of climbs to surface, (c) frequency of crawlings out of water, (d) time spent out of water and (e) proportion of individuals on the upper, middle and bottom thirds of the test pond. The LITCHFIELD-WILCOXON test was employed in determining the concentration of behavioral effect of 50% (CBE_{50}) in relation to each parameter. The indices thus obtained - (a) 0,0016, (b) 0,0105, (c) 0,006, (d) 0,007 and (e) 0,029 ppm of copper - showed the feasibility of systematic uses of behavioral criteria of toxicity and also proved capable of detecting toxic effects of the product under concentrations

much lower than those obtained from conventional lethality determinations. Data showed also an effect/log dose linear relationship for parameters (b), (c), (d) and (e) and revealed changes in snail activity as a consequence of the daily light cycle. In conclusion, it was emphasized that, although the clarification of the ethological aspects involved in the vector control problem depends on the analysis of the relationships between the snail and its natural environment, laboratory studies, however, carried out with accurate measurements of the parameters related to protective behaviors can be of great value as well.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	viii
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xiii

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Comportamento como meio de proteção	
1.1.1. - Retração na concha	1
1.1.2. - Afastamento de locais des- secados	3
1.1.3. - Saída da água	5
1.1.4. - Enterramento	7
1.1.5. - Afastamento de agentes tó- xicos	9
1.2 - Comportamento como critério de toxi- dez	
1.2.1. - Ensaio biológico com mo- luscidas	11
1.2.2. - Critérios comportamentais	14
1.3 - Abordagem etológica do comportamento	
1.3.1. - Categorização e descrição..	16
1.3.2. - Mensuração e registro	19
1.3.3. - Análise causal	23

1.3.4. - Análise funcional	25
2. MATERIAL E MÉTODOS	
2.1 - Sujeitos	
2.1.1. - Condições de criação	28
2.1.2. - Características da amostra	29
2.2 - Equipamento	
2.2.1. - Câmara de observação	29
2.2.2. - Unidade de registro cinematográfico	30
2.2.3. - Aquário	30
2.2.4. - Soluções	31
2.3 - Procedimento	
2.3.1. - Composição dos grupos ...	32
2.3.2. - Manipulações efetuadas ..	32
2.3.3. - Mensurações comportamentais	34
2.3.4. - Determinações de toxidez.	36
3. RESULTADOS	
3.1 - Relações entre os níveis de concentração e os parâmetros comportamentais	
3.1.1. - Subida à superfície	37
3.1.2. - Saída da água	39

3.1.3. - Distribuição espacial dos indivíduos	40
3.2 - Observações gerais	
3.2.1. - Subida à superfície	41
3.2.2. - Saída da água	43
3.2.3. - Distribuição espacial dos indivíduos	44
4. DISCUSSÃO	
4.1 - Aspectos metodológicos	46
4.2 - Efeitos de dose e determinações de toxidez	51
4.3 - Aspectos gerais	54
5. CONCLUSÕES	62
ANEXO 1 - Papel de probabilidade lognormal empregado na determinação do índice de toxidez de moluscidas pelo método LITCHFIELD-WILCOXON	64
ANEXO 2 - Tabela de correção para os valores obtidos de 0% a 100% com base nos valores esperados na determinação do índice de toxidez de moluscidas pelo método LITCHFIELD-WILCOXON	65
ANEXO 3 - Escala nomográfica para cálculo do χ^2 na determinação do índice de toxidez de moluscidas pelo método LITCHFIELD-WILCOXON	66

ANEXO 4 - Exemplo ilustrativo da aplicação do método LITCHFIELD-WILCOXON pa ra determinação do índice de to- xidez de um moluscicida com base em parâmetros comportamentais ..	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1 - Representação esquemática da câmara de observação e da unidade de registro cinematográfico 73
- FIGURA 2 - Representação esquemática do aquário de teste (visão frontal), tal como registrada cinematograficamente 74
- FIGURA 3 - Gráficos de frequência de subida à superfície, por indivíduo, sob diferentes concentrações de cobre como CuSO_4 , a cada 3 horas dos períodos de exposição e recuperação 75
- FIGURA 4 - Gráficos de frequência de saída da água, por indivíduo, sob diferentes concentrações de cobre como CuSO_4 , a cada 3 horas dos períodos exposição e recuperação 76
- FIGURA 5 - Gráficos de tempo de permanência fora da água, por indivíduo, sob diferentes concentrações de cobre como CuSO_4 , a cada 3 horas dos períodos de exposição e recuperação 77
- FIGURA 6 - Gráficos de percentagem de indivíduos no terço superior do aquário, sob diferentes concentrações de cobre como CuSO_4 , a cada 3 horas dos períodos de exposição e recuperação 78

- FIGURA 7 - Gráficos de atividade diurna e noturna, sob diferentes concentrações de cobre como CuSO_4 : A - total de respostas de subida à superfície, por indivíduo; B - total de respostas de saída da água, por indivíduo; C - tempo total (min) de permanência fora da água; por indivíduo; D - percentagem de indivíduos no terço superior do aquário 79
- FIGURA 8 - Gráfico de determinação do índice de toxidez do moluscicida CuSO_4 , em relação ao tempo decorrido até a primeira subida à superfície, segundo o método LITCHFIELD-WILCOXON. 80
- FIGURA 9 - Gráfico de determinação do índice de toxidez do moluscicida CuSO_4 , em relação à frequência de subidas à superfície, segundo o método LITCHFIELD-WILCOXON 81
- FIGURA 10- Gráfico de determinação do índice de toxidez do moluscicida CuSO_4 , em relação à frequência de saídas da água, segundo o método LITCHFIELD-WILCOXON 82
- FIGURA 11- Gráfico de determinação do índice de toxidez do moluscicida CuSO_4 , em relação ao tempo de permanência fora da água, segundo o método

	LITCHFIELD-WILCOXON	83
FIGURA 12 -	Gráfico de determinação do índice de toxidez do moluscicida CuSO_4 , em relação à proporção de indivíduos no terço superior do aquário, segundo o método LITCHFIELD-WILCOXON	84
FIGURA 13 -	Gráfico comparativo dos índices de toxidez do moluscicidas CuSO_4 , em relação a diferentes parâmetros comportamentais, segundo o método LITCHFIELD-WILCOXON	85

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Arranjo dos grupos testados nos <u>com</u> partimentos esquerdo e direito do aquário, nas sucessivas sessões ex- perimentais	86
TABELA 2 - Tempo decorrido (min) até a primei- ra subida à superfície, nas diferen- tes concentrações de cobre como CuSO_4	87
TABELA 3 - Frequência de respostas de subida à superfície, por indivíduo, a cada 3 horas dos períodos de exposição e recuperação, nas diferentes concen- trações de cobre como CuSO_4	88
TABELA 4 - Frequência de respostas de saída da água, por indivíduo, a cada 3 horas dos períodos de exposição e recupe- ração, nas diferentes concentrações de cobre como CuSO_4	89
TABELA 5 - Tempo (min) de permanência fora da água, por indivíduo, a cada 3 horas dos períodos de exposição e recupe- ração, nas diferentes concentrações de cobre como CuSO_4	90
TABELA 6 - Distribuição espacial dos indivídu- os nas diferentes concentrações de	

	cobre como CuSO_4 : média das proporções (%) registradas de 30 em 30 minutos, a cada 6 horas dos períodos de exposição e recuperação, em faixas horizontais de 3cm de altura	91
TABELA 7 -	Determinação dos índices comportamentais de toxidez do moluscicida CuSO_4 em relação à categoria subida à superfície, através dos parâmetros a) tempo decorrido até a primeira resposta e b) frequência de respostas	92
TABELA 8 -	Determinação dos índices comportamentais de toxidez do moluscicida CuSO_4 em relação à categoria saída da água, através dos parâmetros (a) frequência de respostas e (b) tempo de permanência fora da água	93
TABELA 9 -	Determinação do índice comportamental de toxidez do moluscicida CuSO_4 em relação à categoria posição do indivíduo no espaço vertical, através do parâmetro de distribuição espacial	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADD	- água destilada desionizada
ae	- abertura para entrada de ar
an	- anteparo de luz
aq	- aquários
as	- abertura para saída de ar
cd	- compartimento direito
ce	- compartimento esquerdo
CEC ₅₀	- concentração de efeito comportamental de 50%
CON	- nível de controle
CuSO ₄	- sulfato de cobre
CuSO ₄ ·5H ₂ O	- sulfato de cobre penta-hidratado
CV	- coeficiente de variação
em prep.	- em preparação
ex	- exaustor
F	- índice de variância
f/	- abertura focal
f _A	- faixa horizontal de 3 cm acima do nível da água
f _B	- faixa horizontal de 0 a 3 cm de profundidade

- f_C - faixa horizontal de 3 a 6 cm de profundidade
 f_D - faixa horizontal de 6 a 9 cm de profundidade
 f_E - faixa horizontal de 9 a 12 cm de profundidade
 f_F - faixa horizontal de 12 a 15 cm de profundidade.
 f_i - filmadora
 f_l - flash eletrônico
 i_c - indicador de concentração
 i_n - intervalômetro
 i_r - indicador de período de recuperação
 i_s - indicador de sessão
 LC - concentração letal
 LC_{50} - concentração de letalidade de 50%
 LC_{90} - concentração de letalidade de 90%
 l_a - lâmpada
 MG - Minas Gerais
 n - número de valores de uma variável
 n_a - nível da água
 $NaPCP$ - pentaclorofenato de sódio
 $|OBT - ESP|$ - diferença absoluta entre os valores obtidos e os esperados

O.M.S.	-	Organização Mundial da Saúde
P	-	probabilidade
P.A.	-	para análise
pa	-	parede de isolamento da câmara
PB	-	Paraíba
pd	-	placa despolida
pe	-	porta externa
pv	-	porta de vidro
ppm	-	partes por milhão
q	-	quadrícula
re	-	relógio
s	-	desvio-padrão
SE	-	Sergipe
sf	-	suporte de filmadora
ssp	-	espécies
ss	-	sujeitos
su	-	suporte de flash
TxC	-	relação tempo-concentração
v.	-	veja
v	-	número de graus de liberdade
χ^2	-	qui-quadrado
\bar{x}_A	-	média aritmética
\bar{x}_G	-	média geométrica
W.H.O	-	World Health Organization

1. INTRODUÇÃO

1.1 - COMPORTAMENTO COMO MEIO DE PROTEÇÃO

A relevância dos dados comportamentais em estudos que visam o controle dos moluscos vetores da xistosomose através da aplicação de produtos tóxicos / nos criadouros tem sido reiteradamente reconhecida pelos órgãos internacionais de saúde pública (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1965; RITCHIE, 1973).

Ênfase especial é dada à possibilidade de os caramujos escaparem aos moluscidas graças a comportamentos de proteção: os sobreviventes, ainda que poucos, bastariam para promover o repovoamento das coleções de água quando o efeito do produto cessasse (PARAENSE , 1972).

Comportamentos de proteção compreendem todos aqueles que possam contribuir, de alguma forma, para o menor contato do organismo com o moluscida (RITCHIE 1973). Assim, são considerados como tendo função presumivelmente protetora os padrões que diminuem a probabilidade de o indivíduo ser atingido quando da aplicação do produto, ou que proporcionem uma redução dos efeitos tóxicos no indivíduo já atingido.

1.1.1. - RETRAÇÃO NA CONCHA

A retração da massa cefalopodal na concha constitui uma resposta reflexa generalizada nos moluscos gastrópodos, diante de alterações bruscas e intensas no ambiente (PELSENEER, 1935). Esse comportamento pode ocorrer na presença de substâncias tóxicas, dependendo de sua natureza e concentração. HARRY & ALDRICH (1963) verificaram em Biomphalaria glabrata /

(Pulmonata: Basommatophora: Planorbidae), importante hospedeiro intermediário do Schistosoma mansoni em nosso país, que os indivíduos se mantinham retraídos na concha quando expostos por 24 horas a concentrações dos íons cobre, prata e cádmio iguais ou superiores a 1 ppm (parte por milhão), ao passo que, em contato com os íons zinco, alumínio e chumbo, essa reação só era observada a 5 ou 10 ppm; para os íons manganês e cobalto, nem a 300 ppm se constatava essa reação.

Há óbvias razões para atribuir certo valor de proteção a esse comportamento, principalmente tendo-se em conta que o moluscicida sulfato de cobre (CuSO_4), largamente empregado, exerce sua ação letal através do epitélio do molusco (SULLIVAN & CHENG, 1976). O indivíduo retraído na concha, portanto, ofereceria menor superfície de exposição ao produto, diminuindo seus efeitos.

Outra situação em que ocorre retração na concha é quando o ambiente seca. OLIVIER & BARBOSA (1956) observaram, em B. glabrata e B. straminea, que indivíduos submetidos à dessecação cessavam a atividade locomotora e retraíam-se na concha com o esgotamento da água no solo; esses caramujos eram capazes de permanecer em estado de dormência por vários meses, retornando à atividade quando colocados de volta à água. Comparando a resistência à dessecação entre populações provenientes de regiões sujeitas a secas prolongadas e oriundas de coleções de água permanentes, OLIVIER (1956) verificou que aquelas sobreviviam por períodos muito maiores que estas.

Embora ocorra certa redução no metabolismo dos caramujos quando submetidos a essa condição (VON BRAND, McMAHON & NOLAN, 1957), indicação segura de maior economia no consumo das reservas acumuladas, há dúvidas de que esse fator sozinho seja responsável pela longa sobre-

vivência dos animais. HEEG (1976) argumenta que o principal fator determinante da resistência ao ressecamento é o conteúdo aquoso. Nesse caso, a retração prolongada na concha reveste-se de especial importância para a sobrevivência do indivíduo, por reduzir ao mínimo a perda de água para o meio externo.

A sobrevivência dos caramujos durante os períodos de seca tem sido apontada como uma das principais causas da ineficácia dos tratamentos com moluscicidas. Sabe-se, de longa data (BARLOW, 1935), que o repovoamento de criadouros temporários, como valas e canais de irrigação, pode ocorrer, com o retorno da água, a partir de indivíduos que se conservam sobre a lama, em vida latente. REY (1956), analisando as razões do fracasso dos métodos de combate, considerou a importância desse fator, ao lado de outros como a elevada capacidade / de reprodução, a ação efêmera dos produtos tóxicos até então disponíveis e a dispersão dos caramujos transportados passivamente pelas correntezas, ou em decorrência de transbordamentos e inundações. Recentemente, TOLEDO et al (1976), trabalhando com formulações e técnicas modernas de aplicação de moluscicidas, atribuíram o malogro na erradicação de B. tenagophila em áreas urbanas do Rio de Janeiro, em grande parte, à contínua re-invasão a partir de criadouros vizinhos que escapavam ao tratamento por estarem secos.

1.1.2 - AFASTAMENTO DE LOCAIS DESSECADOS

A retração na concha em resposta ao ressecamento do meio parece não ser suficiente para a sobrevivência dos caramujos. BARBOSA (1970), descrevendo a dinâmica populacional de B. glabrata e B. straminea em Pernambuco, assinalou que, com a estação seca, os indi-

víduos expostos à luz solar direta morriam, sobrevivem apenas os que ficavam protegidos sob folhas, troncos de árvores ou na vegetação rasteira. Deve-se levar em conta, portanto, a possibilidade de os moluscos vetores exibirem comportamentos de orientação em relação a estímulos que lhes permitam atingir locais com microclima mais favorável, antes de se retraírem na concha.

Não há evidências experimentais de que esses moluscos sejam capazes de se orientar, direcionalmente (por taxia) ou não (por cinesia), segundo um gradiente de luminosidade, temperatura ou umidade, quando do esgotamento da água nos criadouros naturais. Em laboratório, com respeito à estimulação luminosa, verificou-se em B. glabrata que, apagando-se uma fonte de baixa intensidade, os sujeitos respondiam com uma pausa / temporária na atividade locomotora (SODEMAN, 1973); além disso, constatou-se, nessa espécie, uma relativa preferência por áreas de sombra (SODEMAN & DOWDA, 1974). Em relação à estimulação térmica, demonstrou-se em B. glabrata que os caramujos tendiam a se concentrar em zonas distantes dos extremos de um gradiente de 12 a 38° C (CHERNIN, 1967).

Com respeito às reações de B. glabrata ao abaixamento da água propriamente dito, PIMENTEL E WHITE (1959) verificaram que a maioria dos indivíduos (92 %) era capaz de acompanhar uma queda no nível da água de 0,32 cm em cada 15 min; no entanto, a uma razão 15 vezes maior, apenas 29% o faziam, o que foi interpretado como consequência da inabilidade de os animais detectarem e reagirem rapidamente a essas mudanças. Esses mesmos autores observaram também uma tendência de os caramujos movimentarem-se, à noite, sobre a lama ainda úmida, mas sem uma direção definida, parecendo alcançar / os locais com água apenas por acaso. JURBERG, PIERI &

RAYMUNDO (em prep.) verificaram, no comportamento de *B. glabrata* em dias imediatamente subsequentes à retirada de água em uma poça de lama, um aumento significativo da atividade locomotora e uma tendência à penetração em buracos.

Apesar de esses resultados sugerirem mais a existência de um mecanismo cinésio de orientação, através do qual o efeito imediato da estimulação ambiental seria alterar apenas a magnitude da resposta locomotora, e não sua direção, ainda não há dados que desautorizem uma explicação do fenômeno em termos de taxias. De qualquer forma, a simples habilidade de os animais aumentarem a taxa de locomoção ao atingirem zonas mais secas, mais quentes ou mais intensamente iluminadas e, por outro lado, movimentaram-se menos nas áreas mais úmidas, mais frias ou menos ensoradas bastaria para explicar probabilisticamente sua permanência nos locais mais protegidos do habitat (FRAENKEL & GUNN, 1940).

1.1.3 - SAÍDA DA ÁGUA

A ida para fora da água em resposta a condições desfavoráveis do meio, como superpopulação, falta de alimento, temperaturas elevadas ou apodrecimento da água é considerada um fenômeno comum nos planorbídeos / (PARAENSE, 1957), embora haja evidências de que, se os indivíduos não estão pre-adaptados à sobrevivência fora d'água, acabam morrendo no primeiro dia (RICHARDS, 1967). A ocorrência desse comportamento também foi assinalada como reação à presença de certos agentes químicos testados como moluscicidas, notadamente os compostos fenólicos (NOLAN, BON & MANN, 1953), sendo que uma das restrições ao uso do pentaclofenato de sódio (NaPCP) em campanhas está na sua ação "irritativa" sobre os caramujos.

jos vetores, fazendo-os abandonarem a água quando aplicado em altas doses (REY, 1973).

PARAENSE (1957) verificou, em populações / de B. glabrata, que os indivíduos jovens sofriam modificações na estrutura da concha (engrossamentos calosos / na face interna do perístoma denominados lamelas), exibindo uma marcada tendência para saírem da água, retraírem-se na concha e passarem longos períodos em estado de dormência (diapausa); observou também que esse comportamento ocorria independentemente de fatores desfavoráveis do meio. O mesmo autor verificou, ainda, que, nessa condição, os indivíduos geralmente abandonavam a água quando colocados de volta e que, quando acontecia de um caramujo permanecer na água, seu crescimento era acelerado. RICHARDS (1967) fez constatações semelhantes em populações de B. glabrata de Porto Rico.

Há evidências de que essa predisposição para a diapausa seja determinada por herança multifatorial (RICHARDS, 1968), ocorrendo mais acentuadamente em populações submetidas a severas modificações climáticas / no ciclo sazonal. As observações acima referidas de PARAENSE (1957), realizadas num período correspondente à estação seca no Nordeste, revelaram a ocorrência maciça de saídas de água seguidas de diapausa nas amostras provenientes daquela região; os espécimes de Minas Gerais por outro lado, raramente exibiam esse padrão.

Além do valor adaptativo que esse comportamento possa representar nas regiões sujeitas a secas prolongadas, seu papel na sobrevivência dos indivíduos aos moluscicidas, mesmo em habitats permanentes, não pode ser minimizado. ETGES & GILBERTSON (1966) comentaram, a respeito de uma linhagem de B. glabrata, do Suriname, que a tendência de os indivíduos permanecerem emersos por longos períodos, durante os quais estariam vir-

tualmente fora do alcance de produtos tóxicos dissolvidos na água, tornaria improvável ser toda a população atingida.

1.1.4 - ENTERRAMENTO

Outro comportamento tido como de proteção é o enterramento mas, a esse respeito, as evidências / são cõntrovertidas. VELLOSO (1953) verificou em Caratinga, MG, a tendência de B. glabrata enterrar-se na lama dos brejos, e desenvolveu um método de aplicação de sulfato de cobre a altas pressões, de modo a revolver o solo submerso e agitar a vegetação aquática marginal. PARAENSE, PEREIRA & PINTO (1955) coletaram em Tarumirim, MG, exemplares vivos de B. glabrata enterrados até 40 cm de profundidade, na lama, dentro e fora do ambiente aquático. CAMARGO (1977) encontrou na localidade de Lagoa de Dentro, PB, exemplares vivos de B. glabrata enterrados até 10 cm dentro da lama. CRIDLAND (1967) testou a resistência de B. pfeifferi ao ressecamento, e constatou a sobrevivência por até 90 dias de exemplares enterrados a alguns centímetros de profundidade na lama. PIERI, RAYMUNDO E JURBERG (1977), submetendo exemplares de B. glabrata a 20 dias de ressecamento em laboratório, verificaram ser significativamente mais rápida a recuperação dos que penetravam / alguns centímetros no solo, em comparação com os que permaneciam com a abertura da concha exposta.

Por outro lado, PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ & DIAS (1955), trabalhando com B. tenagophila do Rio de Janeiro, constataram experimentalmente que os caramujos cobertos com uma camada de lama não sobreviviam / enterrados mais do que 48 horas, independentemente da aplicação dos moluscicidas pentaclorofenato de sódio ou sulfato de cobre. Aqueles autores também não regis-

traram um só caso de penetração na lama em resposta à presença de tais produtos na água. OLIVIER & BARBOSA / (1956) submeteram exemplares de B. glabrata e B. straminea, coletados em Pernambuco, à dessecação gradual na lama e observaram que, embora sobrevivessem por várias semanas, os caramujos não penetravam no solo em resposta às condições adversas; quando o faziam era de forma parcial e apenas uma consequência circunstancial da atividade locomotora, como a afundamento em lama macia. PIMENTEL & WHITE (1959) realizaram experimentos com B. glabrata e Porto Rico para verificar se os caramujos eram capazes de se enterrar na lama, seguindo o nível d'água durante a evaporação, ou em resposta à exposição solar; os resultados indicaram que, em nenhum dos casos, houve enterramento ativo por parte dos indivíduos.

Provavelmente, as razões dessa controvérsia devem-se tanto ao aspecto metodológico das pesquisas realizadas quanto à própria natureza do fenômeno. Em primeiro lugar, o comportamento de enterramento pode não pertencer ao repertório de todas as espécies de Biomphalaria, e ser restrito a apenas algumas linhagens de uma mesma espécie. Além disso, como sugeriram PARAENSE PEREIRA & PINTO (1955), esse padrão pode depender de estímulos específicos do ambiente (disponibilidade de alimento, variações de temperatura, pH, nível de água, etc) para sua ocorrência. Também o estado interno dos organismos (maturação, periodismo, motivação) podem ser fatores importantes na determinação desse comportamento.

Seja como for, o potencial epidemiológico que o enterramento no solo representa não pode ser subestimado. Para ETGES (1963a), mesmo uma pequena habilidade de cobrir-se no substrato por pouco tempo seria

de valor considerável para a sobrevivência dos caramujos a aplicações breves e esporádicas de moluscicidas.

1.1.5 - AFASTAMENTO DE AGENTES TÓXICOS

Além da possibilidade de os caramujos vetores reagirem à presença de um moluscicida saindo da água, outro aspecto comportamental relevante é a capacidade de os indivíduos escaparem à ação letal de certos produtos evitando zonas de maior toxidez. ETGES (1963,1965) e ETGES & GILBERTSON (1966) constataram em Bulinus truncatus e Biomphalaria glabrata a habilidade de detectarem concentrações extremamente baixas de CuSO_4 e NaPCP, mesmo em preparações contendo "iscas" de germe de trigo: os caramujos não progrediam além de certo nível de concentração, permanecendo imóveis naquele ponto por longo tempo, ou movimentando-se ativamente mas sem chegar mais perto da fonte; em nenhum desses casos os animais apresentaram sinais de distúrbio.

Esses dados, que sugerem um mecanismo / quimiocinésico de orientação (isto é, não-direcional em relação à fonte de estimulação), têm grande importância para o combate químico aos caramujos vetores. Como não é possível garantir que, nos criadouros naturais, todas as áreas sejam atingidas por concentrações letais, um moluscicida com tal efeito de "repelência" poderia não funcionar, mesmo que se mostre eficaz sob outros aspectos, como o de estabilidade / química.

Em suma, a ocorrência de comportamentos cujas conseqüências permitem evitar doses letais dos moluscicidas parece plenamente possível no repertório dos vetores da xistosomose, mesmo quando não constitu

em uma reação aos efeitos tóxicos do produto. Nesse contexto, há a tendência de os jovens de certas linhagens saírem da água e passaram por um período de diapausa, independentemente de condições adversas do meio; assim, até nos habitats permanentes sempre permaneceria a possibilidade de alguns não serem atingidos e repovoarem os criadouros. Em coleções de água temporárias, também a reação dos caramujos ao dessecação, movimentado-se no solo até encontrarem locais mais protegidos, e ali permanecendo retraídos na concha, tem valor adaptativo: esses locais passariam despercebidos quando da aplicação de moluscidas e, com o retorno das águas, funcionariam como foco de repopulação.

Quanto aos comportamentos adaptativos em resposta à presença de agentes tóxicos, há evidências de reações quimiocinésicas de afastamento diante de pequenas doses de certos produtos e saída da água ou retração prolongada na concha frente a concentrações mais elevadas. Nessas circunstâncias, o indivíduo poderia escapar detectando doses sub-letais e evitando maior exposição ao produto. O enterramento no substrato, por sua vez, parece depender de condições particulares tanto do organismo quanto do meio, e não há provas de sua ocorrência como reação a moluscidas.

Fica evidente, portanto, que, na elaboração de programas de controle da xistosomose através / do combate químico ao vetor, tanto os critérios para escolha dos moluscidas mais eficazes quanto as estratégias para sua aplicação devem levar em conta os comportamentos de proteção dos caramujos. A O.M.S. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1965), padronizando as técnicas para caracterização da atividade moluscida, recomendou a realização de testes específicos com o objetivo

de verificar a ocorrência de padrões comportamentais capazes de contribuir para a sobrevivência dos caramujos ou torná-los mais vulneráveis aos produtos tóxicos. RITCHIE (1973), analisando os aspectos práticos do controle com moluscidas, situou o levantamento de dados sobre o comportamento dos caramujos em resposta aos fatores ecológicos como essencial para o planejamento de campanhas.

1.2 - COMPORTAMENTO COMO CRITÉRIO DE TOXIDEZ

1.2.1 - ENSAIOS BIOLÓGICOS COM MOLUSCICIDAS

A escolha de compostos químicos para uso como moluscidas depende de critérios múltiplos, em que são levados em conta fatores como toxidez, estabilidade, facilidade de aplicação e preço (PAULINI, 1965). No que se refere à caracterização da atividade tóxica dos produtos, padronizou-se uma técnica para realização de ensaios biológicos em laboratório (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1965) de modo a permitir a comparação dos resultados obtidos por diferentes / pesquisadores, nas várias partes do mundo e com as diversas espécies vetoras.

O ensaio consiste em determinar o nível de toxidez de um novo produto (ou de um já conhecido, mas em novas condições) submetendo-se grupos de caramujos a diferentes concentrações do composto e verificando-se as respectivas taxas de mortalidade. Os sujeitos são colocados em recipientes contendo as soluções de teste, ali permanecendo por certo tempo (período de exposição); ao final, são levados e transferidos para recipientes com água pura onde permanecem por mais algum tempo (período de recuperação). Os caramujos são então examinados, registrando-se o

número de mortos em cada concentração.

O índice de toxidez do moluscicida é calculado estatisticamente com base nessas determinações de mortalidade, sendo expresso em termos de uma concentração letal (LC) de referência: em geral, aquela correspondente à taxa de 50% (LC_{50}) ou 90 % (LC_{90}) de mortes. Assim, um produto que mata 50% dos sujeitos a uma concentração de 0,1 ppm ($LC_{50}=0,1$) é classificado como mais tóxico que outro, que apresenta a mesma taxa de mortalidade a 1,0 ppm ($LC_{50}=1,0$), por exemplo.

Os seguintes pontos são recomendados para a realização dos ensaios biológicos:

a. Sujeitos: adultos não infectados, de origem local, com idade e tamanho uniformes, em número de 80, no mínimo.

b) Recipiente de teste: vasilhas de vidro com 1 litro de capacidade (para 10 sujeitos) ou com 500 ml (para 5 sujeitos), com uma cobertura / de tela abaixo do nível da água.

c. Soluções: diluições sucessivas à 10^a parte (10, 1 e 0,1 ppm) em água desionizada.

d. Luz: iluminação convencional do laboratório com alternância dia/noite.

e. Temperatura: $25 \pm 1^{\circ}$ C.

f. Aeração: não necessária.

g. Alimentação: não necessária.

h. Período de exposição: 24 horas de contato com a solução.

i. Lavagem: três passagens em recipientes com água desionizada.

j. Período de recuperação: 24 horas ou mais em água desionizada.

l. Réplicas: duas para cada concentração com 10 sujeitos ou quatro, com 5 sujeitos.

m. Grupo de controle: recipientes com / 100 ml/indivíduo em água desionizada para a verificação da taxa normal de mortalidade.

n. Critério de morte: descoloração, ausência de contrações musculares ou de movimentos ciliares no epitélio.

o. Índices de toxidez: valores de LC₅₀ ou LC₉₀ calculados através do método de LITCHFIELD & WILCOXON (1949).

Recentemente, outros critérios para avaliar a toxidez de um composto, além da letalidade têm sido desenvolvidos, visando a obtenção de medidas mais rigorosas e abrangentes. CHENG & SULLIVAN (1973a) compararam o efeito de dois compostos de cobre em B. glabrata, utilizando dados respirométricos ao lado das determinações de mortalidade. Esses mesmos autores (CHENG & SULLIVAN, 1973b) analisando a influência de CuSO₄ sobre a taxa de batimentos cardíacos de B. glabrata, verificaram ser essa uma medida muito sensível às diferentes concentrações daquele moluscicida, e sugeriram sua utilização em ensaios biológicos.

MALEK & CHENG (1974) propuseram o emprego sistemático das determinações respirométricas e de batimentos cardíacos para testar a ação dos moluscicidas numa base mais rápida e quantitativa. O método, sugerido como uma complementação aos testes de letalidade para Biomphalaria spp., consistia numa combinação dos procedimentos empregados por CHENG & SULLIVAN (1973a;b) e observações concomitantes no comportamento dos sujeitos.

1.2.2 - CRITÉRIOS COMPORTAMENTAIS

Até o presente, há apenas referências qualitativas aos aspectos comportamentais, em ensaios com moluscicidas. NOLAN, BOND & MANN (1953), fazendo triagem de uma variedade de compostos, relataram as seguintes reações de B. glabrata durante e imediatamente depois da exposição: (1) retração do corpo na concha, (2) extensão do corpo além da margem paralela da concha, (3) saída da água e (4) imobilidade. Não foram feitas, entretanto, considerações sobre a ocorrência desses padrões em função da toxidez dos produtos, sendo esta determinada em termos de mortalidade.

HARRY & ALDRICH (1963), por sua vez, descreveram em B. glabrata um conjunto de reações agônicas ("distress syndrome") a íons metálicos, identificando os seguintes elementos comportamentais: (1) o animal permanecia no fundo do aquário com a massa cefalopodal distendida, incapaz de fixar-se / com o pé no substrato, embora ficasse constantemente de ponta-cabeça, numa aparente tentativa para fazê-lo; (2) os movimentos do pé tornavam-se gradualmente mais fracos e menos frequentes; (3) ocorriam, às vezes, contrações espasmódicas ao corpo; (4) o animal ficava incapaz de ir à superfície para respirar. A ocorrência desse síndrome variava de acordo com a natureza do íon e da concentração a que os indivíduos eram submetidos. Por exemplo, para prata, cádmio e cobre as reações agônicas se davam entre 0,05 e 0,1 ppm; acima desses níveis o animal mantinha-se retraído na concha e, abaixo, exibia padrões normais de conduta (sola pedal estendida e aplicada ao substrato, geralmente em reptação). Para íons como manganês e cobalto, o referido síndrome /

só era observado a concentrações maiores que 20 e 30 ppm, respectivamente. Com base nessas categorias (e em elementos não comportamentais, como inchação na base dos tentáculos), determinou-se a maior ou menor toxidez dos íons: aqueles em que se observavam reações agônicas a menores concentrações eram classificados como mais tóxicos.

CHENG & SULLIVAN (1973b), identificaram diferenças comportamentais em B. glabrata de acordo com a concentração do CuSO_4 . A 2,5 ppm de cobre ou mais, os caramujos retraíam-se totalmente na concha 1 minuto depois de imersos na solução, havendo, às vezes, liberação de bolhas de gás provenientes da cavidade paleal; depois de duas horas, a região pedal dos animais ficava coberta por muco. A 1,0 ppm, os indivíduos retraíam-se gradualmente na concha / após um período inicial (de dois minutos, geralmente) em que realizavam tentativas de reptação. A 0,01 ppm, os caramujos exibiam reações características do síndrome agônico, havendo, porém, variações individuais: em alguns casos ocorria retração na concha; em outros, extensão do corpo e tentativas / de fixação no substrato; e ainda outros, subidas pelas paredes laterais do recipiente.

Embora, nos estudos acima referidos, não se tenha caracterizado quantitativamente os padrões comportamentais identificados, as evidências obtidas sugerem claramente a possibilidade de se determinar a toxidez dos produtos testados em termos de diferenças mensuráveis no comportamento. Tanto HARRY & ALDRICH (1963) quanto CHENG & SULLIVAN (1973b) consideraram apenas a presença ou ausência de um dado conjunto de reações como indicador de toxidez e, talvez por isso os critérios comportamentais não

tenham alcançado do grau de precisão desejado. O que se faz necessário aqui é o emprego de parâmetros quantitativos capazes de detectar diferenças de comportamento / entre níveis de concentrações relativamente próximas e que forneçam índices fidedignos de toxicidade.

Para uma abordagem sistemática do comportamento dos caramujos vetores da xistosomose em relação aos moluscicidas, faz-se necessário um enfoque global que ofereça uma base metodológica segura para a caracterização rigorosa dos padrões relevantes e para a análise objetiva das relações e causa e efeito envolvidas. Nesse contexto, os modelos de investigação proporcionados pela moderna Etologia abrem amplas perspectivas (BERMANT & ALCOCK, 1973).

1.3 - ABORDAGEM ETOLÓGICA DO COMPORTAMENTO

1.3.1 - CATEGORIZAÇÃO E DESCRIÇÃO

Uma das características da abordagem / etológica é a ênfase na observação e descrição do comportamento como pré-requisito para a análise das relações de causa e efeito. Partindo da observação do animal nas condições mais naturais possíveis, o etólogo procede, em primeiro lugar, à identificação de categorias comportamentais e à sua definição em termos descritivos (ADES, 1976).

Segundo CUNHA (1975), essa etapa começa com a divisão do comportamento em categorias, tomando-se como limites naturais os pontos de transição normalmente verificados no fluxo comportamental, e distinguindo-se / os fenômenos por sua forma ou por seus resultados. Cada categoria é então definida, descrevendo-se suas caracte-

rísticas essenciais (forma e ordem ou padrão em que os eventos ocorrem).

A descrição de uma categoria comportamental pode ser não só física (morfológica), em termos dos padrões espaço-temporais dos órgãos efetores — músculos e glândulas — mas também por consequência (funcional), em termos de seus resultados imediatos no meio ambiente (HINDE, 1970; HUTT & HUTT, 1970). Por exemplo, "retração na concha" refere-se a movimentos de partes do corpo e, em última análise, à contração de músculos; "subida à superfície", por sua vez, refere-se não a cordenações motoras específicas mas às suas consequências. Hinde (1970) assinala as seguintes vantagens da descrição por consequência: (1) abrange, numa mesma categoria, padrões morfológicamente diferentes mas que têm um resultado comum (em B. glabrata, a subida à superfície pode se dar não só em consequência do deslizamento da sola pedal no substrato, como também, algumas vezes, da flutuação do animal quando seu pé se solta do solo; (2) permite a caracterização da categoria em termos de alterações definidas no ambiente, reduzindo os erros de observação (quando o caramujo desova ou defeca, por exemplo, seus efeitos podem ser facilmente verificados, embora os padrões motores envolvidos sejam de difícil reconhecimento); (3) chama atenção para aspectos importantes da interação organismo-meio que podem não aparecer na descrição física (em B. glabrata, as categorias "subida à superfície" e "descida ao fundo" podem ser indistinguíveis morfológicamente; no entanto, correspondem a orientações diferentes do organismo em relação ao meio).

Para CUNHA (1976) a descrição do comportamento deve ser realizada com base em referenciais naturais, de modo a permitir um estudo adequado das interações entre o organismo e o ambiente. Por esse critério,

a divisão das categorias em suas fases componentes é levada a efeito através da identificação de posturas (disposições espaciais estacionárias de partes do corpo umas em relação às outras), movimentos (mudanças de posição espacial de uma ou de mais partes do organismo em relação a outras, tomadas como referência) e estados (revelados por aspectos funcionais tais como temperatura, cor, rigidez, etc. de uma estrutura orgânica ou suas partes) (CUNHA, 1975). A descrição de movimentos ativamente determinados deve ter sempre como referencial pontos, eixos ou regiões por onde se transmitem forças reais dentro do organismo; a definição de categorias com base em pontos de referência externos, arbitrários, seria inadequada para o estudo das relações causais, por não levar em conta os referenciais fixados / no processo de evolução biológica (CUNHA, 1976). Dentro dessa abordagem estaria, por exemplo, a definição, em B. glabrata, de categorias posturais da concha em relação à massa cefalopodal em termos de inclinações angulares longitudinais (entre o plano mediano da concha e o da massa cefalopodal, considerados num plano horizontal) e verticais (entre os mesmos planos medianos acima referidos, porém, considerados num plano frontal) (PIMENTEL-SOUZA et al, 1976a).

A atribuição de nomes às categorias, por sua vez, permite fazer-se referência aos eventos / comportamentais identificados sem necessidade de repetir, ao mesmo tempo, sua descrição (CUNHA, 1976). Embora se trate de uma questão de convenção, a denominação da categoria deve ser tal que evoque prontamente, e sem ambiguidade terminológica, sua definição apenas em termos de observáveis (CUNHA, 1976). Os nomes escolhidos devem evitar implicações de causa ou função (SLATER 1978). Assim, denominações como "saída da água", por

evocarem apenas dados observacionais, devem ser preferidas àquelas que, como "fuga para fora da água", contêm elementos inferenciais cuja comprovação depende de experimentos.

1.3.2 - MENSURAÇÃO E REGISTRO

Uma vez identificadas as categorias comportamentais relevantes, sua ocorrência deve ser quantitativamente determinada para que se possa estabelecer relações de causa e efeito entre os eventos. Dentre os vários parâmetros empregados na mensuração do comportamento animal (DENEMBERG & BANKS, 1969), alguns têm-se mostrado particularmente úteis na caracterização de diferentes aspectos comportamentais dos caramujos vetores da xistosomose:

- Frequência (número de vezes em que determinado padrão ocorre durante um período de tempo especificado): são exemplos desse parâmetro as medidas de subida à superfície efetuadas por TOWNSEND (1974) e por PIERI, JURBERG & RAYMUNDO (1977), em B. glabrata.

- Magnitude ou amplitude (nível de intensidade do comportamento): em B. glabrata, podem ser citados como exemplo a quantidade de alimento ingerido / (TOWNSEND, 1974), a espessura da camada de muco secretado em meio tóxico (CHENG & SULLIVAN, 1973), o ângulo de inclinação da concha em relação à massa cefalopodal (PIMENTEL-SOUZA et al, 1973a), o tamanho da massa cefalopodal exposta (PIMENTEL-SOUZA et al, 1973b), o grau de retração na massa cefalopodal dentro da concha (PIERI, RAYMUNDO & JURBERG, 1977).

- Duração (tempo de ocorrência do comportamento): como exemplo em B. glabrata citam-se o tempo de permanência na superfície (PIERI, JURBERG & RAYMUNDO ,

1977), o tempo de permanência abaixo do nível de água (TOWNSEND, 1974) e o tempo de contato entre indivíduos (SIMPSON, THOMAS & TOWNSEND, 1973).

- Velocidade (distância percorrida por unidade de tempo): em B. glabrata há determinações dessa natureza efetuadas por PIMENTEL & WHITE (1959), SIMPSON THOMAS & TOWNSEND (1973), SODEMAN (1973) e PIERI, JURBERG & RAIMUNDO (1977).

Quanto ao registro comportamental propriamente dito, várias técnicas são empregadas em estudos etológicos, dependendo não só da natureza das categorias escolhidas como do tipo de informações que se deseja obter (DENEMBERG & BANKS, 1969; HUTT & HUTT, 1970 e SLATER, 1978). São comumente utilizados para levantamento quantitativo do comportamento: gravador de fita, lista para assinalar, registrador de evento (polígrafo), filme e video-tape.

O gravador de fita permite ao observador registrar um ou mais eventos relatando sua ocorrência ao microfone e, posteriormente, transcrevendo as informações obtidas. Com auxílio desse instrumento, obtêm-se facilmente registros de frequência, duração (convencionando-se um sinal verbal para indicar o início e o término do evento) e ordem de ocorrência.

O uso de protocolos contendo lacunas para o observador assinalar a ocorrência de categorias pré-selecionadas também proporciona o registro de eventos em termos de frequência e duração, e permite rápida análise dos resultados. As categorias são listadas em colunas, lado a lado, e o tempo decorrido é dividido em intervalos especificados nas sucessivas linhas horizontais. Quando um evento se inicia, marca-se a lacuna correspondente com um sinal previamente convencionado; caso se prolongue por um tempo maior que o intervalo /

estabelecido, as lacunas imediatamente abaixo são consecutivamente assinaladas até que o evento termine.

O registrador de eventos é um aparelho em que a ocorrência de cada categoria é registrada graficamente, através de uma linha traçada continuamente por uma pena sobre um papel que se desloca em velocidade constante. Quando um evento se inicia, há um desvio na posição da pena (operado automaticamente ou manualmente) resultando numa mudança de trajetória da linha; quando o evento termina, a pena retorna à sua posição inicial, fazendo com que a linha traçada volte à trajetória anterior: informações sobre a frequência e a duração dos eventos são obtidos medindo-se a extensão das linhas na escala de tempo correspondente à velocidade de deslocamento do papel.

Embora o registro comportamental por gravador ou por lista propicie medidas acuradas dos eventos, a exigência da presença do observador durante todo o tempo das sessões limita sua aplicação a períodos não muito longos. O mesmo pode ser dito em relação ao registrador de evento, a menos que se trate de categorias comportamentais passíveis de registro automático. Como nos moluscos, em geral, é regra ocorrerem eventos com relativa baixa frequência e longa duração, as sessões de observação, para serem representativas, tendem a exigir mais tempo do que na maioria dos casos / em que essas técnicas são ordinariamente empregadas. Por sua vez, o registro automático de eventos tem sua utilidade reduzida a alguns aspectos comportamentais, como locomoção, e sob condições muito particulares (SO DEMAN, 1973).

O emprego de filme e vídeo-tape, por outro lado, não só proporciona um registro mais abrangente dos eventos comportamentais (mesmo nos polígrafos mais mo-

dermos o número de categorias registráveis simultaneamente não excede a algumas dezenas), como permite a realização de sessões prolongadas sem a presença do observador. Além disso, a fidedignidade dos dados é assegurada pelo fato de que, quando necessário, as sessões podem ser repassadas e as mensurações conferidas.

Uma vantagem adicional da técnica de filmagem é a possibilidade de o registro ser efetuado com lapso de tempo: em vez de a filmadora operar continuamente, um dispositivo de controle de tempo ("timer") a ela acoplado permite o avanço quadro a quadro da película a intervalos pré-fixados. Com isso, obtêm-se registros ininterruptos de longa duração e de baixo custo operacional.

O uso de cinematografia com lapso de tempo tem sido amplamente difundido no âmbito dos estudos / de comportamento (MICHAELIS, 1955), alcançando crescente aplicação como instrumento de registro de atividade animal (GANS, 1966). Seu emprego na análise de aspectos comportamentais de difícil observação nos moluscos tem-se mostrado elucidativo, como, por exemplo, em estudos sobre o ritmo circadiano de gastrópodos prosobrânquios dulcícolas (BEESTON & MORGAN, 1979) e pulmonados terrestres (NEWELL, 1965; JURBERG, 1977).

No que diz respeito ao comportamento dos moluscos vetores da xistosomose, já se pode citar alguns trabalhos com B. glabrata envolvendo filmagens a intervalos de tempo: TOWNSEND registrou as trajetórias seguidas em resposta a estímulos provenientes de fontes alimentares (1973) ou oriúndos de trilhas de muco produzidas pelos indivíduos da espécie (1974), e realizou medidas temporais da emersão e submersão dos caramujos em função da presença de alimento no fundo

(1975); SIMPSON, THOMAS & TOWNSEND (1973) fizeram mensurações sobre a movimentação dos indivíduos uns em relação aos outros para determinar seu grau de sociabilidade; SODEMAN & DOWDA (1974) compararam o tempo de permanência dos indivíduos em locais que diferiam na temperatura, luminosidade e disponibilidade de alimento.

PIERI, JURBERG & RAIMUNDO (1977) elaboraram uma técnica para o estudo do comportamento dos planorbídeos sob condições controladas em laboratório, fazendo uso de cinematografia com lapso de tempo. Esses autores quantificaram diferentes aspectos comportamentais de B. glabrata, com índice de fidedignidade superior a 98% para as medidas de frequência, duração e velocidade, e sugeriram sua utilização na análise do nível de resposta desses animais aos moluscicidas e dos comportamentos de proteção frente a condições adversas do meio em geral.

1.3.3 - ANÁLISE CAUSAL

A análise etológica das relações causa - e - efeito processa-se através da identificação dos aspectos particulares do ambiente externo envolvidos na deflagração do comportamento (estímulos-signo) e das condições ou estados internos a ele relacionados (CUNHA, 1975). Para tal, é necessário levar em conta as características dos órgãos sensoriais e as potencialidades dos mecanismos neuro-motores do animal: sem se considerar as limitações impostas pelo nível de organização de seus sistemas integrativos (TAVOLGA, 1969), corre-se o risco de formular hipóteses irrelevantes. Assim, analisar os comportamentos de proteção dos caramujos / vetores da xistosomose atribuindo-lhe a capacidade de "evitar o perigo" ou "reagir a ameaças do meio", implica em admitir a existência de processos "mentais" in-

incompatíveis com o grau de complexidade do sistema nervoso dos moluscos.

Fala-se em "análise causal" quando são abordadas as relações entre o comportamento e as condições que o antecedem no tempo: no caso de se verificar a ocorrência de modificações comportamentais sistematicamente correlacionadas com os aspectos imediatamente precedentes, estes são referidos como "causas imediatas", no caso de se constatarem alterações no comportamento / em decorrência do desenvolvimento do organismo, estas são referidas como "causas ontogenéticas", no caso de diferenças comportamentais estabelecidas filogeneticamente, as causas são ditas "evolutivas" (HINDE, 1970).

O procedimento pelo qual o etólogo investiga as causas de um comportamento consiste essencialmente em identificar as circunstâncias do meio ambiente externo e do próprio organismo regularmente associadas à sua ocorrência: as circunstâncias externas etologicamente importantes são, em geral, as mudanças correlatas ao comportamento verificadas no ambiente imediato do organismo; entre as internas, estão as que caracterizam taxonomicamente sua espécie, seu estado de desenvolvimento, a condição presente em seus vários órgãos e as mudanças que ocorreram ou estão ocorrendo no seu interior como consequência de ter sido submetido a determinadas / circunstâncias ambientais anteriormente (CUNHA, 1976).

Na prática, compara-se a resposta do animal em diferentes situações em que se varia apenas um fator de cada vez: as diferenças comportamentais porventura encontradas constituem indicação da influência do fator em questão. Caso se queira, por exemplo, verificar os efeitos de um produto moluscicida sobre a atividade locomotora de B. glabrata, submetem-se grupos de indivíduos a várias concentrações sub-letais do produto e registra-se

o comportamento sob o maior número possível de aspectos (forma e sequência de movimentos, posturas, etc) caracterizando-os quantitativamente (frequência, duração, velocidade, etc): se forem estatisticamente constatadas diferenças entre as medidas de uma mesma dimensão nos vários grupos, estas são atribuídas à ação do moluscicida.

A análise causal do comportamento geralmente revela uma rede de múltiplas circunstâncias implicadas em sua determinação, não havendo sentido em limitar-se à investigação de fatores isolados ou à consideração apenas de um nível de causação. Quanto às respostas de saída da água em B. glabrata, por exemplo, as evidências apontam causas de diferentes naturezas para sua ocorrência (PARAENSE, 1957): certas circunstâncias / no meio externo, como inadequação de alimento (causas imediatas) ou modificações internas verificadas em certa fase do desenvolvimento (causas ontogenéticas) ou mesmo diferenças entre raças geográficas (causas evolutivas).

1.3.4 - ANÁLISE FUNCIONAL

A investigação das relações entre o comportamento e suas conseqüências em termos da adaptação biológica da espécie representa um outro nível de análise cujo objetivo não é propriamente elucidar os mecanismos responsáveis pela ocorrência de dado evento comportamental, mas avaliar seu papel no processo de seleção natural. Fala-se, então, em "análise funcional" do comportamento, e procura-se identificar os aspectos em que ele contribui para a sobrevivência da espécie.

TINBERGEN (1965) aponta dois procedimentos básicos através dos quais essa análise pode ser levada a efeito: (1) isolar uma pressão ambiental específica / (ressecamento do meio, por exemplo), e investigar como o animal a enfrenta, e (2) partindo de uma carater com-

portamental cuja função seja desconhecida, examinar em que aspectos ele contribui para a sobrevivência, a que imposições do ambiente ele atende e como o faz.

Uma das implicações dessa abordagem é a exigência de considerar as vantagens adaptativas aparentes como meras hipóteses, até a obtenção de evidências experimentais que as confirmem. Esse critério tem especial aplicação no caso dos comportamentos de proteção dos caramujos vetores: por exemplo, o fato de a retração na concha em B. glabrata oferecer menor superfície relativa de contato com produtos tóxicos não significa necessariamente que esse comportamento tenha valor de sobrevivência; a menos que se realizem testes específicos em que, por exemplo, seja constatada maior taxa de mortalidade entre os indivíduos que não exibam o comportamento, essa vantagem adaptativa deve ser considerada apenas suposição.

Embora, à primeira vista, esse rigor metodológico pareça dispensável frente à "obviedade" de certas consequências comportamentais (como no caso da saída da água, permitindo ao indivíduo escapar da aplicação do moluscicida), os experimentos, quando postos em prática, podem revelar aspectos não evidentes numa análise puramente causal. Segundo TINBERGEN (1965), os estudos funcionais do comportamento permitem esclarecer / não só a questão de se um determinado padrão é adaptativo ou não: em primeiro lugar, podem fornecer provas inequívocas sobre como o comportamento contribui para a sobrevivência; podem também demonstrar experimentalmente as pressões de seleção que impedem a espécie de se desviar da atual norma comportamental; em terceiro lugar, podem sugerir as pressões de seleção que modelaram a espécie no passado.

O estado atual do conhecimento sobre os

mecanismos de proteção dos caramujos vetores da xistosomose em relação às condições adversas do meio, em geral e aos moluscicidas, em particular, ainda está longe de permitir o estabelecimento de estratégias seguras de combate. A importância do comportamento nesse contexto, por conseguinte, não pode ser subestimada.

No entanto, o número de pesquisas causais sistemáticas a esse respeito é surpreendentemente limitado. Essa carência parece não ser exclusiva dos trabalhos com planorbídeos: PIMENTEL-SOUZA (1977) assinalou que, em contraste com a volumosa literatura existente sobre o sistema nervoso dos moluscos, há poucos dados comportamentais disponíveis; estudos sobre a ação de fatores químicos no comportamento dos gastrópodos dizem mais respeito à estrutura e à fisiologia dos órgãos sensoriais envolvidos do que ao comportamento (CHARLES, 1966; WILLOWS, 1973). A análise dos aspectos funcionais dos comportamentos de proteção, por seu lado, parece inexistir em termos experimentais, havendo apenas sugestões acerca de possíveis mecanismos.

A parte experimental do presente trabalho trata de um aspecto particular do problema do controle do vetor, qual seja, o da utilização de parâmetros comportamentais como critério de toxidez nos ensaios biológicos com moluscicidas. Através da aplicação das técnicas etológicas de categorização, mensuração e registro, pretendeu-se desenvolver uma metodologia que permitisse o emprego sistemático dos dados comportamentais como indicadores fidedignos e abrangentes da ação dos produtos químicos empregados no combate aos vetores.

O procedimento obedeceu basicamente ao paradigma recomendado pela O.M.S. para a realização de ensaios biológicos com moluscicidas (v. seção 1.2.1). As modificações introduzidas visaram tão somente permitir

o registro comportamental por cinematografia com lapso de tempo, segundo técnica desenvolvida pelo autor e colaboradores (PIERI, JURBERG & RAYMUNDO, 1977), e cuja descrição é aqui resumida nas seções 2.2.1, 2.2.2 e 2.2.3.

A escolha do sulfato de cobre como meio / tóxico para os testes deveu-se não só à sua ampla utilização no controle da xistosomose (DUNCAN, 1974) como também ao seu emprego como moluscicida de referência nos testes com novos produtos (BRAUX & GILLET, 1961). Além disso, é em relação a esse composto que se registra na literatura maior número de observações comportamentais, tanto em estudos de laboratório como de campo (v. seções 1.1 e 1.2).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - SUJEITOS

2.1.1 - CONDIÇÕES DE CRIAÇÃO

Foram utilizados caramujos da espécie B. glabrata provenientes de uma criação mantida pelo Dr. Rostan de Rohan L. Soares no Laboratório de Xistosomose do Instituto Oswaldo Cruz.

Seis meses antes do início dos testes, cápsulas ovíferas de um único adulto foram transferidos para um tanque de amianto (dimensões internas: 62 x 62 x 25 cm) contendo água previamente mantida no escuro por 1 mês. Na mesma ocasião, foram colocados alguns ramos de Elodea canadense e exemplares de Lebistes reticulatus ("guppy"). A criação era alimentada com alface fervida e, mensalmente, adicionavam-se cerca de 10 g de carbonato de cálcio (precipitado leve) à água. O tanque de criação era mantido no interior do laborató-

rio, em local sob incidência de luz solar, mas ao abrigo de variações extremas de temperatura. Semanalmente, o nível da água era completado com água destilada.

2.1.2 - CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA

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

2.2 - EQUIPAMENTO

2.2.1 - CÂMARA DE OBSERVAÇÃO

Uma caixa de madeira com paredes duplas, medindo internamente 70 x 50 x 50 cm, foi construída para oferecer iluminação com ciclo dia-noite e temperatura controlada, além de permitir a realização de registros cinematográficos (figura 1).

A iluminação da câmara era provida por duas lâmpadas fluorescentes de 15 W tipo "luz do dia" (1a, na fig.1), situadas no teto e com os reatores instalados do lado de fora. Abaixo delas, havia uma placa de acrílico fosca (pd) para difundir a luz. Um programador de tempo marca SERMAR modelo "Cronomat" (se) externo à câmara era regulado para acender as lâmpadas às 6h00 e apagá-las às 18h00, reproduzindo o ciclo dia-noite.

A temperatura no interior da câmara era mantido entre os limites requeridos (25 ± 1 °C) com o funcionamento, na sala, de um aparelho condicionador de ar, acionado por um segundo programador de tempo, de modo

a mantê-lo em operação enquanto as luzes da câmara estivessem acesas. Além disso, um pequeno exaustor (ex), dotado de motor de alta rotação e dirigido para uma abertura praticada no teto (as), promovia a circulação interna de ar durante o dia, sob comando de programador de tempo da câmara.

2.2.2. - UNIDADE DE REGISTRO CINEMATOGRAFICO

Uma filmadora super-8 marca CANON modelo "Auto-Zoom 814 E" (fi, na fig.1), era colocada fora da câmara de observação, havendo, numa das paredes laterais uma abertura por onde se introduzia a objetiva. Esta era ajustada para a menor distância focal (7,5mm) e o menor valor na escala de distância (1,2 m).

As filmagens eram realizadas quadro a quadro, e um dispositivo de controle de intervalo ("timer") marca CANON modelo "E" (in, na fig.1) acionava o mecanismo de exposição e avanço do filme, com lapsos de 30 segundo. Sincronizado a ele havia um flash eletrônico (fl) marca MECABLITZ modelo "Metz 181" com disparos de duração entre 1/1000 a 1/1150s. Para evitar reflexos indesejáveis, o flash era inclinado para cima, havendo ainda, à sua frente, um pequeno anteparo opaco (an).

Nessas condições, e com as paredes internas / da câmara pintadas de tinta alumínio, obtinham-se imagens de brilho e nitidez satisfatórios com abertura de diafragma f/8, usando-se película KODAK " Ektachrome - 160-G".

A análise dos registros era feita com auxílio de um editor convencional de filmes super-8 marca HANIMEX modelo "E 300".

2.2.3 - AQUÁRIO

Os ensaios eram realizados em um aquário de vidro (aq, na fig.1; figura 2) medindo 18 x 30 x 2,5cm, com uma divisória vertical no meio, separando dois com

partimentos com capacidade superior a 500 ml cada (cd e ce, na fig. 2). As peças componentes tinham 0,2 cm de espessura, e foram coladas com borracha de silicone transparente marca DOW CORNING. Na face de trás era afixado externamente um cartão plastificado com quadrículas de 3 x 3 cm (q, na fig. 2), de modo a permitir a determinação da posição dos indivíduos no espaço vertical.

O aquário situava-se sobre uma plataforma de elevação marca CENCO modelo "Lab Jack" (pl, na fig. 1) o que permitia ajustar a altura de enquadramento sem movimentos bruscos. Abaixo e à frente do aquário havia um relógio (re, nas figs. 1 e 2) para registro simultâneo do tempo decorrido.

2.2.4 - SOLUÇÕES

As soluções de teste foram preparadas com sulfato de cobre penta-hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) P.A. (procedência: J.T. BAKER CHEMICAL CO., Phillipsburg, N.J. EUA), em água destilada desionizada (ADD). Esta era obtida por repetidas passagens de água destilada em desionizador marca PERMUTION modelo 1800 até se alcançar uma condutividade inferior a 1,0 micromho/cm.

Inicialmente, foram dissolvidos 16 mg do produto em 4 litros de ADD, obtendo-se, assim, uma solução de 1 ppm de cobre (1 ppm de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ equivale a 0,25 ppm de cobre). Em seguida, por diluições sucessivas à quarta parte, foram obtidas as soluções de 0,25, 0,062, 0,016, 0,004 e 0,001 ppm de cobre. Um sétimo nível de tratamento, o de controle, foi constituído apenas por ADD (0,000 ppm)*.

* Com a condutividade da ADD sendo abaixo de 1,0 micromho/cm, admitiu-se, para o nível de controle, uma concentração de cobre não superior a 10^{-3} ppm.

2.3 - PROCEDIMENTO

2.3.1 - Composição dos grupos

Os ensaios consistiam em submeter grupos de 5 indivíduos a 500 ml das diferentes soluções de sulfato de cobre, durante 24 horas (período de exposição), ao final das quais eram enxaguados e transferidos para igual volume de ADD onde permaneciam um mínimo de 24 horas (período de recuperação).

Em cada nível do moluscicida foi testado um total de 20 sujeitos, havendo quatro réplicas para uma mesma concentração. Como o aquário permitia o registro simultâneo de dois grupos, foram realizadas 14 sessões com os grupos distribuídos de acordo com o arranjo apresentado na tabela 1.

Em primeiro lugar, levou-se em conta a localização dos compartimentos, planejando-se duas réplicas / de cada concentração do lado direito, e duas do lado esquerdo. Também foi levada em consideração a diferença de tempo entre as primeiras sessões e as últimas: como a duração mínima de cada sessão era de 48 horas, ainda que as mesmas fossem realizadas ininterruptamente, a 14a. só começaria 28 dias depois da primeira. Para contrabalançar o efeito dessa variável, os grupos foram arranjados de forma que cada concentração do moluscicida fosse testada tanto nas sessões iniciais, quanto nas finais.

2.3.2 - MANIPULAÇÕES EFETUADAS

Um dia antes de cada sessão, eram retirados / 15 caramujos e 1500 ml de água do tanque de criação e colocados em um recipiente no interior da câmara para aclimação, com alimento (alface fervida) ad libitum. Também as soluções a serem testadas e a água de recupe-

ração eram deixadas de véspera na câmara.

As sessões começavam sempre às 12h00, de modo que os grupos sofriam um regime de luz-escuro-luz, durante 6, 12 e 6 horas, respectivamente. Tal esquema foi escolhido por proporcionar uma forma de controle / balanceado da sequência dia-noite. Como o início das sessões ao meio-dia, o efeito da precedência da fase diurna sobre a noturna seria minimizado.

Pouco antes do início da sessão, o aquário / era lavado em detergente comercial neutro e enxaguado repetidas vezes com ADD. De acordo com o esquema pre-estabelecido (tab.1) os compartimentos do aquário eram encheidos com as respectivas soluções até a altura de 15 cm, isto é, a 3 cm da borda, e coincidindo com a penúltima linha horizontal do cartão quadriculado afixado atrás do aquário (na, na figura 2). Essa altura / correspondia a 500 ml da solução.

Uma pequena etiqueta com indicação da concentração testada era colada na face frontal de cada compartimento, acima do nível da água (ic, na fig.2). Ao lado do relógio, era colocada uma tira de papel com indicação do número da sessão (is, na fig.2).

Cinco dos caramujos aclimatados eram, então, aleatoriamente colocados em cada compartimento (100ml por indivíduo), dando-se início imediato à filmagem. Os restantes permaneciam no recipiente de aclimação ao longo de toda a sessão, sendo que, nem a estes nem aos testados era fornecido alimento.

Ao final das 24 horas de exposição, os grupos passavam por três enxaguaduras sucessivas em recipientes com 500 ml de ADD, numa operação que durava cerca de 3 minutos. O aquário, por sua vez, era lavado da mesma maneira que antes da sessão, enchendo-se, depois,

ambos os compartimentos com ADD até a altura determinada. Em seguida, os sujeitos eram recolocados nos respectivos compartimentos, sendo uma segunda tira de papel / afixada ao lado do relógio, indicando tratar-se do período de recuperação (ir, na fig.2).

Caso, ao término das 24 horas seguintes, algum dos indivíduos ainda não tivesse alcançado a superfície, a sessão prosseguia até que tal se verificasse, ou que se constatasse sua morte.

Em todas as sessões, tinha-se o cuidado de efetuar as manipulações de forma padronizada, para garantir uma igualdade de tratamento em todos os grupos. No caso de qualquer suspeita de contaminação experimental, a sessão era anulada.

2.3.3 - MENSURAÇÕES COMPORTAMENTAIS

As seguintes categorias de comportamento foram identificadas e submetidas a quantificação e análise, com base nos registros cinematográficos:

A. Subida à superfície - Essa categoria abrangia os deslocamentos em que a massa cefalopodal do sujeito atingisse o nível da água, proveniente de profundidade maiores que 3 cm, sendo considerados dois parâmetros para mensuração, a saber:

- tempo decorrido até a primeira ocorrência dessa resposta no indivíduo: acompanhava-se, através do editor, a atividade de cada sujeito separadamente; no fotograma que mostrasse pela primeira vez a massa cefalopodal em contato com a interface ar/água, era feita a leitura da hora marcada no relógio, calculando-se, então, o tempo decorrido desde o início do período de exposição.

- frequência da resposta: computava-se, pelo

editor, o número de subidas verificadas a cada intervalo de 3 horas.

B. Saída da água - Nessa categoria eram incluídos os deslocamentos que resultassem na total emergência do indivíduo, sendo também efetuadas medidas em dois parâmetros:

- tempo de permanência fora da água: eram lidas, no editor, (a) a hora indicada no fotograma que primeiro mostrasse o sujeito saído da água e (b) aquela que, na seqüência, correspondesse ao último fotograma com o sujeito emerso; o tempo decorrido entre (a) e (b) era então tabulado de acordo com uma distribuição de frequências com valores agrupados em intervalos de 15 minutos*

- frequência da resposta: juntamente com as determinações de tempo, computava-se o número de saídas da água a cada intervalo de 3 horas.

C. Posição do indivíduo no espaço vertical-
Nessa categoria era feita referência ao local em que o sujeito se encontrava num dado momento, através da identificação, na face de trás do aquário, da quadrícula correspondente à área por ele ocupada naquele instante. Quando um indivíduo não estava no centro da

* Por exemplo: caso fossem determinados, em quatro saídas da água, os tempos de 1,0, 12,5, 19,5 e 32,0 min, estes não seriam computados diretamente mas incluídos, respectivamente, nos intervalos de 0 a 15, 15 a 30 e 30 a 45 minutos. Em decorrência, o tempo total de permanência fora da água com base / neles seria calculado pela fórmula $\sum fx'$ (f representando o número de observações em cada intervalo, e x' o ponto médio do intervalo): $\sum fx' = 2 \times 7,5 + 1 \times 17,5 + 1 \times 37,5 = 70$.

quadrícula, sua posição era determinada pela localização da abertura da concha (menos no caso da faixa acima do nível da água, onde só se considerava o sujeito totalmente emerso). Foi tomado apenas um parâmetro para a categoria:

- distância em relação à superfície: nos sucessivos fotogramas com indicação de hora e meia hora, eram contados quantos indivíduos havia em cada faixa horizontal de 3 cm. de altura (v. figura 2) , desde a borda até o fundo de aquário*.

2.3.4 - DETERMINAÇÕES DE TOXIDEZ

As determinações comportamentais de toxidez eram levadas a efeito em cada parâmetro das diferentes categorias, seguindo um procedimento análogo ao descrito por MALEK & CHENG (1974) para o cálculo dos valores de LC_{50} pelo método gráfico LITCHFIELD-WILCOXON:

a) Na abscissa do papel de probabilidade lognormal (v. anexo 1), eram locadas as concentrações / do moluscicida; na ordenada, eram locadas as medidas obtidas de um dado parâmetro, expressas como percentagens em relação aos valores do grupo de controle, ao final do período de recuperação.

b) Com os pontos assim marcados, uma linha era traçada por interpolação gráfica, representando / medidas percentuais esperadas do parâmetro, dentro da amplitude das concentrações testadas. Percentagens / obtidas de 0% ou 100% eram corrigidas com base nos

* Tomando-se a figura 2 como exemplo, no com partimento esquerdo, 1 sujeito ocupava a faixa acima da água, 3 estavam na faixa de 0 a 3 cm. de profundidade e 1 na faixa de 12 a 15 cm; no direito, havia 1 na faixa de 0 a 3 cm, 1 na faixa de 3 a 6 cm e 3 na de 12 a 15 cm. de profundidade.

valores esperados correspondentes, empregando-se uma tabela apropriada (v. anexo 2); nesse caso, nova reta era traçada, levando-se em conta os valores corrigidos (no máximo dois 0% e dois 100%).

c) Em seguida, verificava-se a adequação da reta pelo teste qui-quadrado (X^2) utilizando-se uma escala nomográfica (v. anexo 3): se o X^2 calculado fosse menor que o tabulado para ν graus de liberdade ($\nu = n^\circ$ de concentrações locadas menos 2), os dados eram tidos como não significativamente heterogêneos, considerando-se a reta, então, como uma estimativa adequada das medidas.

d) Nesse caso, o ponto da abscissa correspondente a 50 na escala de percentagens era tomado como valor de referência para caracterizar o efeito comportamental do produto no parâmetro considerado: a concentração na qual o moluscicida afetaria em 50% o comportamento dos sujeitos naquele parâmetro. Essas concentrações de efeito comportamental de 50% (CEC_{50}), calculadas para as diferentes categorias em questão, constituíam os índices de toxidez do produto testado.

e) Caso a reta não se mostrasse adequada em um dado parâmetro, este não era considerado como um indicador satisfatório da toxidez do produto.

O anexo 4 apresenta um exemplo ilustrativo do procedimento acima descrito.

3 - RESULTADOS

3.1 - RELAÇÕES ENTRE OS NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO E OS PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS,

3.1.1. - SUBIDA À SUPERFÍCIE

Quanto ao tempo decorrido até a primeira subida à superfície (tabela 2), as médias aritméticas obtidas nas diferentes concentrações indicaram grande variabilidade intra-grupos, haja visto a magnitude / dos respectivos desvios-padrão; por isso, os valores foram computados em termos de média geométrica*. Uma relação linear entre os logaritmos dos níveis de concentração (variável x) e os logaritmos das médias geométricas do tempo decorrido (variável y) foi constatada pelo método do coeficiente de determinação (DANIEL, 1974): comparando-se a variância devida à regressão linear (desvios dos valores dados pela equação da reta em relação à média dos valores obtidos da variável y) com a variância residual (desvios dos valores obtidos da variável y em relação aos valores dados pela equação da reta), a hipótese nula foi rejeitada: (F (1,3) = 18,56; P < 0,05). Na determinação do índice / de toxidez para esse parâmetro (tabela 7, parte superior, e figura 8), a reta traçada com base nas recíprocas das médias geométricas mostrou-se adequada (P > 0,05), e a concentração de efeito comportamental de 50% (CEC₅₀) foi de 0,0016 ppm.

Em relação à frequência de subidas à superfície (tabela 3), não foram efetuadas mensurações identificando-se individualmente os sujeitos, mas computou-se, de 3 em 3 horas, o número de respostas observadas nas diferentes réplicas de cada nível de concentração, dividido pelo número de sujeitos presentes. Para avaliar a ação do moluscicida sobre esse parâmetro,

* A média geométrica (\bar{x}_G), geralmente calculada pela fórmula $\bar{x}_G = \text{Antilog} \left(\frac{\sum \log x \cdot l}{n} \right)$, onde $\sum \log x$ é o somatório dos logaritmos de cada valor de x, e n é o número de valores de x, permite o tratamento estatístico de amostras com distribuição lognormal (UEMURA, 1974).

verificou-se a hipótese de haver relação linear entre os logaritmos dos níveis de concentração (variável x) e os totais acumulados de respostas por indivíduo, ao final do período de recuperação (variável y). Analisando-se a variância encontrada, pelo método do coeficiente de determinação, a hipótese nula foi rejeitada: $F(1,4) = 21,96$; $P < 0,05$. Considerou-se, portanto, que as duas variáveis estavam linearmente relacionadas. Para a determinação de toxidez, tomaram-se essas medidas do parâmetro (tabela 7, parte inferior, e figura 9), obtendo-se uma reta adequada ($P > 0,05$); o índice de toxidez (CEC_{50}) foi de 0,0105 ppm.

3.1.2 - SAÍDA DA ÁGUA

No que diz respeito à frequência de saídas / da água (tabela 4), as mensurações foram análogas às de subida à superfície, verificando-se a existência / de relação linear entre os logaritmos dos níveis de concentração (variável x) e os totais acumulados de respostas por indivíduo (variável y), também através do método do coeficiente de determinação. A hipótese de não haver relação linear entre essas variáveis (hipótese nula) foi rejeitada: $F(1,4) = 22,40$; $P < 0,05$. Considerando-se, então, essas medidas do parâmetro para a determinação de toxidez (tabela 8, parte superior, e figura 10), a reta traçada mostrou ser um estimativa adequada ($P > 0,05$), e o valor CEC_{50} foi de 0,006 ppm.

Com respeito ao tempo de permanência fora da água, (tabela 5) também não houve mensurações individuais, computando-se o tempo total, no conjunto das respostas de saídas observadas a cada 3 horas, dividido pelo número de indivíduos presentes. Verificou-se

a relação linear entre os logaritmos dos níveis de concentração (variável x) e os tempos totais acumulados de permanência fora da água, por indivíduo, ao final do período de recuperação (variável y), pelo método do coeficiente de determinação, sendo rejeitada a hipótese nula: $F(1,4) = 34,05$; $P < 0,05$. O índice de toxidez foi determinado a partir dessas medidas do parâmetro (tabela 8, parte inferior, e figura 11), tendo a reta se mostrado adequada ($P > 0,05$) ; o valor CEC_{50} foi de 0,007 ppm.

3.1.3 - DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DOS INDIVÍDUOS

Nessa categoria, computou-se o número de indivíduos registrados ao fim de cada 30 minutos nas diferentes faixas horizontais do aquário, calculando-se as respectivas proporções médias (%) em sucessivos intervalos de 6 horas (tabela 6). Para verificar se os diferentes níveis do moluscicida afetavam significativamente a distribuição dos indivíduos no espaço vertical, compararam-se as proporções médias obtidas no terço superior (faixas A e B) e no terço inferior (faixas E e F) do aquário, no total das 48 horas de ensaio: como o χ^2 calculado foi de 208,35 , para 5 graus de liberdade, rejeitou-se a hipótese nula ($P < 0,05$)*. A existência de uma relação linear entre os logaritmos dos níveis de concentração (variável x) e as proporções médias totais de indivíduos no terço superior do aquário (variável y) foi confirmada pelo método do coeficiente de determinação: $F(1,4) =$

* O terço médio do aquário (faixas C e D) foi desconsiderado porque as proporções aí esperadas resultaram menores que 5, não se recomendando, portanto, sua análise pelo teste χ^2 (RODRIGUES, 1976).

97,85; $P < 0,05$. Com base nessas medidas do parâmetro, o índice de toxidez foi determinado: a reta mostrou-se adequada ($P > 0,05$) e o valor de CEC₅₀ foi de 0,029 ppm (tabela 9 e figura 12).

3.2 - OBSERVAÇÕES GERAIS

3.2.1 - SUBIDA À SUPERFÍCIE

Os registros do tempo decorrido por cada indivíduo até a primeira subida à superfície (tabela 2), que revelaram uma grande amplitude de variação * nas diferentes concentrações do moluscicida, permitiram, antes de mais nada, as seguintes observações gerais: no nível de controle (0,000 ppm), o menor tempo foi de 2 minutos e o maior, de 51 minutos; nos níveis de 0,001 a 0,004 ppm, todos atingiram a superfície ainda no período de exposição, ao passo que, a 0,016 ppm, apenas 3 dos 20 sujeitos o fizeram; a 0,062 ppm, o primeiro indivíduo só chegou à superfície no final da segunda hora do período de recuperação; na concentração mais alta em que se verificaram subidas à superfície (0,25 ppm), o último a alcançar a tona só o fez depois de 53 horas de recuperação (ou seja, decorridos 4650 minutos desde o início do ensaio). Para verificar estatisticamente se as diferenças entre as médias geométricas podiam ser atribuídas à ação do moluscicida, o teste de análise de variância foi aplicado aos logaritmos dos valores obtidos, cons-

* Os coeficientes de variação (CV) para cada nível do moluscicida, calculados pela fórmula $CV = 100 \cdot s / \bar{x}_A$ % (onde \bar{x}_A é a média aritmética e s é o desvio padrão dessa média) foram os seguintes: a 0,000 ppm (controle), 82,2%; a 0,001 ppm, 63,3%; a 0,004 ppm, 74,3%; a 0,016 ppm, 23,4%; a 0,062 ppm, 14,7% e a 0,25 ppm, 42,5%.

tatando-se ser significativo o efeito de dose em relação ao parâmetro considerado: $F(15, 114) = 302,44$ $P < 0,05$. Empregando-se o teste TUKEY de comparação múltipla (MEYERS & GROSSEN, 1974) para avaliar, duas a duas, as diferenças entre as médias, verificou-se não serem significativas apenas as obtidas entre os níveis de 0,000 (controle) e 0,001 ppm e entre os níveis de 0,016, 0,062 e 0,25 ppm.

Pelos registros das frequências de subida à superfície obtidos a cada 3 horas, por indivíduo, nas diferentes concentrações, observaram-se os seguintes resultados (v. figura 3, representando graficamente os dados da tabela 3): em primeiro lugar, notou-se uma diminuição nas respostas durante as fases noturnas tanto no grupo de controle (A), como nos níveis de concentração mais baixa (B e C), desde as primeiras horas que se seguiam ao apagar das luzes (às 18h00) até o dia seguinte, ao voltarem a se acender (6h00); no nível de 0,016 ppm tal parece ter-se verificado no período de recuperação; a 0,062 ppm e a 0,25 ppm não foi possível detectar diferenças entre as fases diurna e noturna. Quanto ao efeito de dose, não houve discrepâncias aparentes entre o nível de controle (A) e o de 0,001 ppm (B): a frequência de respostas era alta no início do ensaio, decrescia durante a noite e voltava a aumentar de manhã, no período de recuperação, o mesmo padrão se repetia. A 0,004 ppm (C), já se notava uma menor frequência de subidas no início da exposição, só aumentando com o acender das luzes; no período de recuperação, o ritmo das respostas mostrava-se semelhante ao padrão normal (cf. nível de controle). A 0,016 ppm (D), a frequência era praticamente nula no período de exposição e, mesmo na recuperação, não atingia os valores encontrados a 0,004 ppm. A 0,062

ppm (E) e a 0,25 ppm (F), não havia subidas à superfície durante a exposição e, na recuperação, sua frequência era baixa.

3.2.2 - SAÍDA DA ÁGUA

Os registros das frequências de saída da água, por indivíduo, a cada 3 horas, sob as diferentes concentrações do moluscicida (v. figura 4, com a representação gráfica dos dados da tabela 4), permitiram a observação dos seguintes resultados: primeiramente, não se notaram alterações no ritmo das respostas em decorrência ao apagamento das luzes; quer no nível de controle (A) quer nos de baixa concentração (B e C) parece não ter ocorrido diminuição durante as fases noturnas dos períodos. O efeito de dose, por sua vez, foi notado a partir de 0,004 ppm (C), onde a frequência nas horas iniciais de exposição era quase nula; a 0,016 ppm (D) e a 0,062 ppm (E), não se registraram saídas da água no período de exposição, sendo que, na recuperação, a frequência nesse último nível pareceu menor que no de 0,016 onde, por sua vez, não se atingiram os mesmos valores que a 0,004 ppm. A 0,25 ppm (F) nenhum sujeito saiu da água.

Quanto ao tempo de permanência fora da água (v. figura 5, contendo os dados da tabela 5), verificou-se um aumento durante as fases noturnas dos períodos de exposição e recuperação nos níveis de controle (A), de 0,001 ppm (B) e de 0,004 ppm (C), parecendo mais acentuada, nos dois primeiros, durante o período de recuperação do que no de exposição; no nível de 0,016 ppm (D), onde só houve saídas da água na recuperação, também foram notados maiores tempos

de permanência nas fases noturnas. Com relação ao efeito de dose, não se observaram diferenças entre o controle (A) e o de 0,001 ppm (B); no nível de 0,004 (C), entretanto, os tempos pareceram menores / durante a recuperação, principalmente à noite. A 0,016 ppm (D), as permanências fora da água no período de recuperação mostraram um padrão temporal semelhante ao observado a níveis menores; a 0,062 (E), os tempos foram mínimos.

3.2.3 - DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DOS INDIVÍDUOS

Com base nos dados obtidos sobre a distribuição dos indivíduos no espaço vertical do aquário (tabela 6), as proporções médias de indivíduos nos terços superior (faixas A e B), médio (faixas C e D) e inferior (faixas E e F), a cada 6 horas, sob os diferentes níveis de concentração, foram comparadas estatisticamente pelo teste X^2 . No de controle (0,000 ppm), a proporção de indivíduos no terço superior mostrou-se / significativamente ($P < 0,05$) maior em todos os intervalos de 6 horas, tanto no período de exposição quanto no de recuperação; o mesmo verificou-se a 0,001 ppm, com exceção das primeiras 6 horas de exposição, em que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os terços superior e inferior. Na concentração de 0,004 ppm, constatou-se uma proporção significativamente / ($P < 0,05$) maior de indivíduos no terço inferior, na média das primeiras 6 horas de exposição; no entanto, em todos os outros níveis, as proporções médias no terço superior é que se mostraram significativamente ($P < 0,05$) maiores. A 0,016 ppm, as proporções obtidas no terço inferior do aquário foram significativamente ($P < 0,05$) mai

ores em todos os intervalos de 6 horas do período de exposição; na recuperação, por sua vez, constatou-se o oposto, com as proporções no terço superior sendo significativamente ($P < 0,05$) maiores. A 0,062 ppm, 100% dos indivíduos permaneceram no fundo do aquário durante todo o período de exposição; a partir do segundo intervalo de seis horas de recuperação, isto é, entre 30 e 36 horas decorridos do início do ensaio, a proporção média no terço superior passou a ser significativamente ($P < 0,05$) maior. A 0,25 ppm, os indivíduos também não saíram do fundo no período de exposição; no entanto, somente nas seis horas finais de recuperação é que se verificou uma proporção significativamente ($P < 0,05$) maior de indivíduos no terço superior do aquário.

No que se refere especificamente aos registros das proporções médias de indivíduos no terço superior do aquário (v. figura 6, com dados derivados da tabela 6), observou-se um pequeno aumento no número de indivíduos naquela região durante as fases noturnas de ambos os períodos, não só no nível de controle (A) como nos de 0,001 ppm (B) e 0,004 ppm (C), o mesmo parecendo ter ocorrido na recuperação a 0,016 ppm. Quanto ao efeito de dose, não se observaram diferenças entre os níveis de controle (A), de 0,001 ppm (B) e de 0,004 ppm (C); a 0,016 ppm (D), no entanto, a proporção de indivíduos nas faixas superiores do aquário mostrou-se pequena durante o período de exposição, embora na recuperação atingisse um padrão semelhante ao verificado a 0,004 ppm (C). Nem a 0,062 ppm (E), nem a 0,25 ppm (F), observaram-se indivíduos naquela área durante a exposição; no primeiro, entretanto, a proporção atingiu quase 100% na recuperação e, no segundo, chegou a ultrapassar 50% nas horas finais do mesmo período.

4 - DISCUSSÃO

4.1 - ASPECTOS METODOLÓGICOS

Os resultados referidos na seção 3.1 mostram que a metodologia empregada para a obtenção de parâmetros comportamentais fidedignos de toxidez é plenamente executável. O próprio paradigma recomendado pela O.M.S. para caracterização da atividade moluscicida pôde ser obedecido em suas linhas gerais, e as modificações introduzidas para efeito de registro cinematográfico resultaram satisfatórias. Quanto ao material, o uso de um aquário com dimensões especiais, ao invés dos recipientes convencionais, permitiu o levantamento de categorias comportamentais normalmente inobserváveis; além disso, a não colocação de tela na superfície da água, permitindo a saída dos caramujos, revelou aspectos importantes desse comportamento, sem prejuízo para as determinações de toxidez.

Quanto ao procedimento, alguns problemas foram encontrados, mas sem representarem obstáculos intransponíveis. Por exemplo, a impossibilidade de se testar todos os grupos ao mesmo tempo, tal como é feito usualmente, levou à elaboração do arranjo das sessões conforme a tabela 1, já que se dispunha de apenas uma unidade de registro cinematográfico. Os resultados, no entanto, não revelaram eventuais efeitos temporais intervenientes: comparando-se, para um mesmo parâmetro, os dados obtidos entre réplicas realizadas em sessões distantes em mais de 20 dias uma da outra (ou seja, entre as sessões de 1 a 3 e as de 12 a 14) com os obtidos entre réplicas realizadas em sessões com menos de uma semana de diferença, o teste χ^2 não revelou nenhuma discrepância significativa /

($P > 0,05$).* Isso significa que, pelos menos em relação às categorias aqui consideradas, um intervalo de vários dias entre as sessões não interfere nos resultados.

Outra impossibilidade foi a identificação individual dos sujeitos, já que, nos pré-testes realizados, não se encontrou uma forma adequada de marcação dos caramujos que permitisse seu reconhecimento nos filmes. Por causa disso, a análise das alterações comportamentais no indivíduo, ao longo do ensaio, ficou prejudicada: como, à exceção do tempo decorrido até a primeira subida à superfície, nenhum outro parâmetro pôde ser medido individualmente, os dados obtidos foram computados em termos de proporções, e não de médias estatísticas.

Embora, no que diz respeito às determinações de toxidez, as medidas efetuadas a partir desses dados tenham se mostrado satisfatórias, (inclusive / dando mais facilidade à elaboração dos cálculos), alguns aspectos ficaram sem esclarecimentos. Em primeiro

* Tome-se, como exemplo, o tempo de permanência fora da água, parâmetro que mais mostrou variabilidade, e cujos totais acumulados, por indivíduo, obtidos nas 4 réplicas do grupo de controle (CON, na tabela 1) foram, respectivamente, 275,5 min (sessão 3), 248,5 min (sessão 6), 141,5 min (sessão 8) e 191,6 min (sessão 14): entre as sessões 3 e 14 (distantes 26 dias) houve 18,0% de diferença $[(275,5 - 191,6)/467,1 \times 100\%]$; por sua vez, entre as sessões 6 e 8 (distantes 5 dias) a diferença foi de 27,4% $[(248,5 - 141,5)/390 \times 100\%]$. Como o χ^2 calculado para a diferença entre esses percentuais foi de 1,95 (1 grau de liberdade), confirmou-se a hipótese nula, excluindo, portanto, a influência de fatores temporais na discrepância verificada entre as sessões 3 e 14 para esse parâmetro.

lugar, a própria variabilidade entre os indivíduos de um mesmo grupo ou entre momentos diferentes de um mesmo indivíduo, que parece ser considerável, não pôde em si, ser avaliada: exceção feita aos dados referentes ao tempo decorrido até a primeira subida à superfície (tabela 2), não foi possível se fazerem estimativas sobre a magnitude das variâncias, por faltarem medidas individuais*. Essa variabilidade, no entanto, parece ser um problema comum em estudos comportamentais com B. glabrata, e uma possível solução pode estar na escolha de medidas nas quais tal fator não se reflita acentuadamente: ETGES (1963b), referindo-se às variações encontradas por PIMENTEL & WHITE (1959) na taxa de atividade locomotora, procurou desenvolver uma forma de mensuração que minimizasse essa variabilidade; no presente trabalho, a escolha das medidas dos parâmetros também se pautou por essa orientação.

Em segundo lugar, nem o efeito temporal de

*

Quando, em relação aos resultados, há referência, por exemplo, ao número de respostas por indivíduo, esse não deve ser entendido como uma medida do desempenho individual de cada sujeito, mas simplesmente como um valor de referência para comparação. Assim, quando se encontra, na tabela 3, que, nas primeiras 3 horas de exposição, a frequência de subidas à superfície por indivíduo no nível de controle (0,000 ppm), foi de 5,1, tal não deve ser interpretado como se cada indivíduo, em média, no intervalo, tivesse obtido / aquele valor (caso em que deveria ser fornecido o desvio-padrão ou o erro-padrão da média); a informação ali contida é apenas que, no intervalo em questão, registraram-se, tantas (no caso, 102), subidas à superfície, e que, como eram tantos (no caso, 20) os sujeitos presentes, a frequência de respostas por indivíduo foi de 5,1 (em comparação com o grupo de 0,001 ppm, por exemplo, onde a mesma medida do parâmetro deu 4,4).

dose sobre o indivíduo nem a influência do ciclo dia-noite sobre sua atividade puderam ser especificamente analisados: as observações a esse respeito (v. seção 3.2) resultaram tão somente da inspeção / visual dos gráficos correspondentes, já que uma verificação estatística adequada para avaliar as alterações ocorridas durante os ensaios exigiria o reconhecimento de cada sujeito. Seja como for, mesmo efetuando-se medidas individuais, uma análise específica desses aspectos não poderia ser levada a efeito nas bases estritas da metodologia aqui empregada, a qual, diga-se de passagem, foi desenvolvida visando essencialmente a obtenção de índices comportamentais de toxidez. A razão desse impedimento está no fato de o procedimento seguido não permitir isolar o efeito temporal de dose ou a influência do ciclo dia-noite: pelas curvas obtidas para os diferentes parâmetros (v. figuras de 3 a 6) observou-se claramente a ação de ambos os fatores ao longo dos ensaios, embora não se tenha podido caracterizar o papel de cada um*.

* Caso se desejasse analisar os efeitos comportamentais do moluscicida no tempo, anulando-se a influência do ciclo dia-noite, poder-se-ia estabelecer, para cada nível de concentração, dois sub-grupos, diferindo apenas no regime de iluminação: um seria submetido à sequência luz-escuro-luz, tal como no presente trabalho, e o outro, à sequência inversa escuro-luz-escuro (ambas iniciando-se à 12h00, e com as condições durando 6, 12 e 6 horas, respectivamente). Assim, para comparar o desempenho dos sujeitos nas 6 primeiras horas de exposição, com o nas 6 últimas, por exemplo, os dados relativos aos dois subgrupos / seriam tomados em conjunto, contrabalançando-se os efeitos devidos à mudanças de iluminação.

Para superar as dificuldades aqui apontadas, em pregaram-se, como medidas de parâmetro, os totais acumulados ao final do período de recuperação (frequências totais de subida à superfície e saída da água ; tempo total de permanência fora da água). Essa forma de computação dos dados comportamentais, análoga à usada para os cálculos de letalidade (em que é levantado o total de mortes ocorridas ao longo dos ensaios) permitiu não só o estabelecimento de relações funcionais entre os níveis do moluscicida e os parâmetros escolhidos, como também a determinação de índices de toxicidade, mesmo sem identificação dos indivíduos nas mensurações. Além disso, como os valores obtidos incluíram os dados tanto nas fases diurnas quanto noturnas, a influência das sucessivas mudanças de luz durante os ensaios pôde ser contrabalançada ao se compararem os parâmetros nas diferentes concentrações.

Em linhas gerais, a metodologia aqui empregada pode ter aplicação igualmente na análise das relações de tempo-concentração (TxC), de grande importância para o planejamento de ensaios biológicos de campo (RITCHIE, 1973). Os testes TxC consistem basicamente em se determinar a concentração letal de referência (LC_{50} ou LC_{90}) depois de um tempo determinado de exposição: os grupos são submetidos a cada concentração do moluscicida) por um período variável (geralmente 1, 2, 6 ou 24 horas), após o que, passam por 24 horas de recuperação; ao final / desse período, são feitas as verificações de mortalidade, com base nas quais são calculados os índices de toxicidade pelo método LITCHFIELD-WILCOXON (GILLET E BRUAUX, 1961). Da mesma forma, o efeito temporal de dose em relação aos parâmetros comportamentais poderia ser analisado trans-seccionalmente, acrescentando-se à programação das sessões os novos grupos com 1, 2 e 6 horas de expo-

sição*.

4.2 - EFEITOS DE DOSE E DETERMINAÇÕES DE TOXICIDADE

A linearidade verificada entre os logaritmos dos níveis de concentração de CuSO_4 e as medidas dos parâmetros escolhidos para as três categorias comportamentais consideradas (v. seção 3.1) permitiu evidenciar, no geral, uma relação típica dos efeitos das substâncias ativas sobre o organismo, qual seja, a relação efeito/log dose: para a maioria das atividades biológicas, o efeito aumenta aproximadamente em proporção aritmética quando a substância é administrada em proporções geomêtricamente crescentes (LISON 1976). De fato, tanto as medidas de frequência de subida à superfície e saída da água como as de tempo de permanência fora da água e de distribuição espacial dos indivíduos mostraram-se inversamente proporcionais aos logaritmos das concentrações do moluscicida, pelos menos na faixa de 0,001 a 1,00 ppm de cobre. A única exceção deu-se com o tempo decorrido até a primeira subida, em que o efeito se mostrou exponencialmente relacionado com o logaritmo da dose (evidenciado pela linearidade encontrada entre os logaritmos das medidas desse parâmetro e os logaritmos das con-

* Nesse caso, um cuidado especial deveria ser tomado, no que se refere à interferência do ciclo dia-noite: se, por um lado, o efeito desta variável possa ser desprezado quando se trata de medidas de letalidade, o mesmo não poderia ser feito em relação às de comportamento. Portanto, tornar-se-ia necessária a formação de dois sub-grupos para cada tempo de exposição, um com regime de iluminação inverso do outro, com-putando-se os dados em conjunto (v. nota de rodapé na pag. 49).

concentrações.*

Seja como for, essas relações verificadas no nível comportamental permitiram a determinação de índices de toxidez análogos aos obtidos com base no critério de letalidade. Em geral, as concentrações de um moluscicida e as respectivas medidas de mortalidade, quando locadas graficamente em papel de probabilidade lognormal, tendem a produzir uma linha reta (UEMURA, 1974), da qual podem ser obtidos os valores de referência LC_{50} e LC_{90} . Pelos presentes resultados, o mesmo se revelou possível em relação às medidas comportamentais aqui consideradas: para todos os parâmetros (inclusive o tempo decorrido até a primeira subida à superfície) a concentração de $CuSO_4$ na faixa de 0,001 a 1,00 ppm de cobre, obedeceu à distribuição / lognormal, permitindo, com base na reta resultante, a obtenção de valores de referência análogos aos de mortalidade. Determinaram-se, assim, vários índices de toxidez para o moluscicida em questão, cada qual correspondendo à concentração de efeito comportamental / de 50% (CEC_{50}) em relação a um dado parâmetro.

A figura 13 apresenta um gráfico comparativo / dos valores de CEC_{50} obtidos para os diferentes parâmetros, dando ensejo à constatação de que os índices comportamentais de toxidez aqui determinados atingiram valores extremamente baixos, em comparação com os

* Uma explicação para esse resultado pode estar no fato de, aos níveis de 0,016, 0,062 e 0,25 ppm, os indivíduos não terem atingido a superfície nas primeiras 24 horas de ensaio (período de exposição) (v. tabela 2): diferentemente dos caramujos submetidos aos três níveis mais baixos de concentração, aqueles sujeitos passaram pelas operações de lavagem e substituição do meio tóxico por ADD antes de subirem à superfície pela primeira vez. Assim, a relação verificada pode não trazer apenas o efeito de dose, mas refletir também esse fator interveniente.

obtidos com base no critério de letalidade: enquanto que as medidas de mortalidade proporcionam valores / na ordem de grandeza de 10^0 ppm para o CuSO_4 * as de comportamento permitiram detectar efeitos tóxicos / desse produto a níveis na ordem de 10^{-2} ppm (para os parâmetros frequência de subida à superfície e / proporção de indivíduos no terço superior do aquário) e de 10^{-3} ppm (para os parâmetros tempo decorrido até a primeira subida, frequência de saída da água e tempo de permanência fora da água). Além disso, de ve-se ressaltar que o tempo decorrido até a primeira subida se revelou um indicador especialmente sensível da toxidez do produto testado, pois, o efeito comportamental de 50% em relação ao grupo de controle foi verificado à concentração de 0,0016 ppm.

Em suma, as determinações aqui efetuadas constituem evidência segura da possibilidade da utilização de critérios comportamentais para caracterizar a ação tóxica dos moluscicidas. Em primeiro lugar, o fato de os parâmetros considerados terem permitido a obtenção de índices fidedignos de toxidez para o CuSO_4 abre perspectivas para uma análise comparativa mais abrangente das propriedades dos moluscicidas em uso, bem como dos novos compostos; assim, para decidir sobre a superioridade de um produto em relação a outro, os efeitos comportamentais também poderiam ser sistematicamente levados em conta, considerando-se / tanto maior a eficácia quanto menor fosse o CEC_{50} obti

*HOPF & MULLER (1962), empregando, em linhas gerais, a mesma metodologia recomendada pela OMS (1965), descrita sumariamente na seção 1.2.1 deste trabalho, e utilizando exemplares adultos de B. glabrata (diâmetro da concha medindo de 10 a 12 mm), obteve, como índice de toxidez: $\text{LC}_{50} = 2$ ppm.

do com referência a um mesmo parâmetro. Em segundo lugar, a constatação de que o efeito do CuSO_4 sobre o comportamento dos indivíduos se fez sentir em doses relativamente muito mais baixas que as detectadas pelo critério de letalidade demonstra a grande sensibilidade das determinações comportamentais: fazendo uso deste critério, a avaliação da toxidez de um moluscicida poderia ser levada a termo mesmo numa faixa de concentrações sub-letais.

4.3 - ASPECTOS GERAIS

Embora os resultados aqui obtidos digam respeito mais diretamente aos aspectos metodológicos da relação entre os moluscicidas e seus efeitos no comportamento do caramujo vetor, algumas evidências sobre o aspecto causal e funcional da questão não podem deixar de ser consideradas. Antes de mais nada, parece não haver dúvidas de que, pelo menos na faixa de 0,001 a 1,00 ppm, o efeito comportamental do CuSO_4 é significativo: a subida do indivíduo à superfície, por exemplo, parece ser profundamente afetada não só no tempo que o animal demora para atingir a tona pela primeira vez, quando colocado em meio tóxico (v. tabela 2), mas também na frequência das respostas (v. tabela 3); outro padrão comportamental, a saída da água, também parece ser altamente afetado pela ação do CuSO_4 , tal como evidenciado pela diminuição verificada, com o aumento do nível de concentração, nos parâmetros de frequência de saída da água (v. tabela 4) e de tempo de permanência fora da água (v. tabela 5); o mesmo efeito parece ter-se verificado na distribuição dos indivíduos no espaço vertical (v.

tabela 6*.

Com referência à subida à superfície, a ação CuSO_4 ficou aparente a partir de 0,004 ppm, pois, no nível de 0,001 ppm, o tempo decorrido até a primeira subida não se mostrou significativamente diferente do de controle (v. seção 3.1.1); a níveis maiores (0,016, 0,062 e 0,25 ppm) quase não houve / respostas no período de exposição, embora todos os sujeitos tenham sobrevivido e chegado à tona pelo menos uma vez até o final do ensaio; só a 1,00 ppm é que nenhum indivíduo chegou a superfície, verificando-se 100% de mortes. Embora esse comportamento possa ter importante valor de sobrevivência para os caramujos vetores, pois, nos gastrópodos pulmonados as trocas respiratórias se processam geralmente no meio atmosférico (GUIRETTI & GUIRETTI-MAGALDI, 1974), parece improvável que apenas o efeito da substância sobre a coordenação motora dos indivíduos, impedindo a fixação da sola pedal no substrato e, conseqüentemente, a subida à superfície (v. "distress syndrome" na seção 1.2.2), tenha causado a morte dos caramujos a 1,00 ppm; na verdade, houve

* Apesar de as evidências sugerirem fortemente tais efeitos comportamentais por parte do moluscicida testado, a própria maneira com que os dados foram obtidos não permite generalizações seguras a esse respeito: primeiramente, conforme antes ressaltado (v. nota de rodapé na pg. 48), as medidas escolhidas para os parâmetros considerados visaram tão somente as determinações de toxidez e por isso, não podem ser interpretadas como expressão direta das relações causais porventura existentes; em segundo lugar, as condições particularíssimas em que foram feitas as observações, embora tendo-se mostrado satisfatórias para o cálculo de índices comparativos de toxidez, pouca informação podem proporcionar sobre o efeito comportamental dos moluscicidas sob condições naturais. Para uma análise adequada desses aspectos, seria necessário um tratamento global das variáveis envolvidas, evitando-se os esquemas artificiais de laboratório, que subtraem aos animais a dinâmica do ecossistema (PARAENSE, 1972).

indícios de sangramento em alguns sujeitos ainda no período de exposição e, via de regra, ao final do ensaio, a água já mostrava sinais de apodrecimento. De fato, as evidências a respeito (SULLIVAN & CHENG, 1976) apontam, como causa da morte por CuSO_4 , disfunções na osmorregulação ou respiração devidas à ação dos íons de cobre sobre o epitélio do organismo.

Quanto à saída da água, os resultados indicam que, pelo menos nas condições observadas, sua ocorrência não depende da presença de agentes tóxicos / no meio líquido: a frequência de respostas ao nível de controle (0,000 ppm) apresentou valores surpreendentemente altos, sendo registradas 246 saídas pelos 20 sujeitos, ou seja, uma proporção de 12,3 respostas por indivíduo, no total das 48 horas de ensaio (v.tabela4); a permanência fora da água, a esse nível, foi relativamente elevada, visto ter atingido aproximadamente 7,5% do tempo total dos ensaios (v. tabela 5). Além disso, as evidências aqui obtidas não permitem atribuir qualquer efeito causal de "repelência": não só se verificaram menores frequências de saída sob crescentes concentrações*

* Convém esclarecer aqui não ser possível se fazer a mesma afirmação a respeito do tempo de permanência dos indivíduos fora da água, embora as medidas escolhidas / para o parâmetro assim o sugiram, devido à forma com que os dados foram computados para as determinações de toxidez (v. seção 3.1.2). Na verdade, os protocolos não revelaram tempos individuais cada vez menores com o aumento da concentração: comparando-se a média de permanência fora da água (e respectivo desvio-padrão) no nível de controle, calculada com base nas 246 saídas verificadas no total (18,4 + 28,6 min) com a no nível de 0,016 ppm, onde houve um total de 48 saídas (24,1 + 34,9 min), fica evidente a falta de fundamento para qualquer suposição nesse sentido. A linearidade encontrada, quando se procurou relacionar os níveis de concentração com o parâmetro de tempo decorrido fora da água, deveu-se /

como também, na imensa maioria das vezes, os caramujos não iam além da borda do aquário, retornando à água no máximo algumas horas depois*, até mesmo quando esta continha 0,004 ppm de cobre, uma concentração suficientemente alta para afetá-los comportamentalmente sob outros aspectos. Embora, no âmbito do presente trabalho não seja possível se avaliar o papel desse comportamento na sobrevivência dos caramujos aos moluscicida, os dados obtidos são suficientes para caracterizar a necessidade de estudos mais detalhados a respeito, de modo a proporcionar melhor conhecimento sobre a questão (v. seção 1.1.3).

A distribuição espacial dos indivíduos, por sua vez, foi o parâmetro cujos resultados (v. se-

tão somente ao fato de as medidas escolhidas terem refletido a relação efetivamente verificada com o parâmetro de frequência de saídas: comparando-se o tempo / total de permanência fora da água, por indivíduo, no nível de controle ($246 \times 18,4 + 20 = 226,3$ min, se estimado a partir da média) com o nível de 0,016 ppm ($48 \times 24,1 + 20 = 57,8$ min, se estimado a partir da média), constata-se uma diferença que, na verdade, é devida apenas no número total de saídas em cada nível.

* Segundo consta nos registros, apenas 3 dos sujeitos abandonaram o aquário durante os ensaios, sendo encontrados retraídos no soalho da câmara de observação: um no nível de 0,001 ppm (sessão 4), quando faltavam 2 horas para o término do período de exposição, e os outros dois no nível de 0,004 ppm, decorridos, respectivamente, 7h42 min (sessão 11) e 16h7min (sessão 12) do período de recuperação. Computando-se todas as saídas da água nas diferentes concentrações, em 71,9% das vezes a permanência fora da água foi inferior a 15 min; apenas 1,8% dos tempos foi superior a 3 horas, sendo o maior / tempo (cerca de 6 horas) registrado no nível de 0,001 ppm (sessão 5) num indivíduo que saiu da água decorridos 6h 13 min do período de recuperação.

ção 3.2.3) melhor evidenciaram a ação do CuSO_4 sobre o comportamento dos indivíduos, não só por apresentar combinadamente os efeitos verificados nos demais parâmetros * como também por proporcionar uma avaliação estatisticamente fundamentada dessas alterações nos diferentes níveis de concentração e nos sucessivos intervalos dos períodos de exposição e recuperação. Em primeiro lugar, fica patente que, pelo menos nas condições observadas, os indivíduos não submetidos ao agente tóxico (nível de controle) tenderam a ocupar / mais as áreas superficiais da massa líquida do que o fundo ou as faixas intermediárias (note-se ainda, na tabela 6, que durante todo o ensaio, a taxa de indivíduos observados fora da água nunca foi inferior a 10%; em segundo lugar, o fato de, nas primeiras 6 horas de exposição a 0,004 ppm, a maior parte dos sujeitos ter sido encontrada no fundo do aquário (ao contrário do obtido a 0,001 ppm, onde a distribuição dos indivíduos não se mostrou significativamente diferente em comparação com o nível de controle) confirma ser essa a menor concentração em que o comportamento se mostrou afetado pelo moluscicida; nos níveis de concentração sub-letal mais elevados, por sua vez, o que se observou tipicamente foi o retorno dos indivíduos à normalidade (tomando-se como referência os valores obtidos a 0,000 ppm), depois de interrompida a ação do moluscicida ao final de 24 horas de contato. De um modo geral, essas evidências apontam para a mesma hipótese su

* De fato, quanto o menor o tempo decorrido até a primeira subida, quanto maiores a frequência de subidas à superfície e de saídas da água, ou ainda, quanto / maior o tempo de permanência fora da água, maior a probabilidade de se encontrarem os sujeitos no terço superior do aquário.

gerida com base nos resultados revelados pelo parâmetro de subida à superfície (v. pag 55), qual seja, a de que o efeito específico do CuSO_4 sobre os mecanismos / neuro-motores do organismo não acarretaria, por si só, conseqüências capazes de determinar a morte dos indivíduos: se a concentração do produto for de tal ordem que não atinja irreversivelmente os processos osmorreguladores ou respiratórios, o animal acabará se recuperando. Nesse contexto, portanto, um composto cujo efeito sobre o sistema nervoso promovesse alterações comportamentais permanentes, mesmo quando administrado em doses insuficientes para atingir letalmente o organismo em outros sistemas vitais, poderia ter eficácia muito maior.

Um aspecto geral dos resultados que ainda deve ser destacado diz respeito às variações noturna e diurna da atividade dos caramujos nos diferentes níveis do moluscicida, mostradas comparativamente na figura 7. Pelos gráficos ali representados, notam-se / os seguintes efeitos sobre os vários parâmetros considerados: a frequência de subidas à superfície, em primeiro lugar (fig.7-A) pareceu sensivelmente maior durante a fase diurna, quer no nível de controle, quer / nos níveis de 0,001 e 0,004 ppm; a frequência de saídas da água (fig.7-B), por outro lado, não exibiu qualquer diferença do dia para a noite; quanto ao tempo de permanência fora da água, no entanto (fig 7-C), parece ter havido uma tendência de os indivíduos demorarem mais / tempo à noite do que de dia, principalmente nos níveis de controle e de 0,001 ppm*; o mesmo teria ocorrido na

* Aqui, trata-se realmente de um efeito direto sobre / esse parâmetro, e não uma decorrência da forma com que foram feitas as medidas (v. nota de rodapé na pag. 56), pois as respostas de saída da água foram tão frequentes no claro quanto no escuro.

proporção de indivíduos no terço superior do aquário (fig. 7-D), embora não tão nitidamente. Apesar de a forma como os dados foram obtidos impedir uma análise rigorosa dos efeitos aqui observados (v. seção 4.1), há suficientes indícios de se tratar de um fenômeno devido mais à simples alteração da quantidade de energia luminosa no ambiente do que a um ritmo circadiano endógeno, corroborando os dados de SCHALL et al (1979): pelas observações feitas com base nos gráficos das figuras 3, 4, 5 e 6 (v. seção 3.2), pareceu evidente que, na ausência de efeitos tóxicos acentuados, a frequência de subidas à superfície tende a diminuir com o escurecimento da câmara, só voltando a aumentar com a claridade; quanto à frequência de saídas da água, nenhum efeito do ciclo dia-noite foi notado, mas os tempos de permanência fora da água pareceram ter uma tendência a aumentar nas primeiras horas sem luz; a proporção de indivíduos no terço superior do aquário (que reflete as modificações verificadas nos outros parâmetros), além de se mostrar mais elevada no escuro, pareceu diminuir sensivelmente com o acender das luzes.

Em linhas gerais, se os resultados aqui / obtidos pouco esclarecimento direto podem trazer aos aspectos causais e funcionais de comportamento dos camarujos vetores em relação aos moluscicidas, isso se deve, em grande parte, ao fato de os experimentos realizados dizerem respeito essencialmente à obtenção de parâmetros adequados para as determinações de toxicidade. Como, para se empreender um estudo propriamente etológico da questão (v. seção 1.3), nenhum enfoque

que exclua a dinâmica das relações entre o indivíduo e seu ambiente natural pode proporcionar respostas / adequadas (ANDRADE, 1959); quaisquer generalizações / nesse sentido, fundamentadas estritamente nos procedimentos aqui empregados, têm valor limitado. Não obstante, pelo fato de terem sido feitas mensurações acuradas e sistemáticas de parâmetros relacionados a padrões comportamentais normalmente referidos como / de proteção (v. seção 1.1), as evidências obtidas / podem fornecer subsídios relevantes para a elaboração de pesquisas especificamente destinadas à elucidação desses aspectos.

CONCLUSÕES

1. Apesar da preocupação das entidades internacionais de Saúde Pública com a possibilidade de os caramujos vetores da xistosomose escaparem à ação dos moluscicidas graças a comportamentos de proteção, os estudos existentes sobre o assunto pouco esclarecimento trazem a respeito da natureza específica dos mecanismos deflagradores envolvidos e seu papel efetivo na sobrevivência dos indivíduos. Nesse contexto, o presente trabalho enfatizou que uma abordagem etológica do problema, com o emprego sistemático das técnicas de categorização, descrição, mensuração e registro do comportamento e dos princípios de análise causal e funcional, é capaz de oferecer bases metodológicas seguras / para a elucidação das questões pertinentes.

2. A aplicação de critérios comportamentais nas determinações de toxidez em ensaios biológicos com moluscicidas, embora recomendada pela O.M.S., só é registrada na bibliografia em termos qualitativos e de forma não sistemática. No entanto, através do registro por cinematografia com lapso-de-tempo da atividade dos caramujos submetidos a diferentes concentrações de CuSO_4 , e da mensuração rigorosa de parâmetros comportamentais adequados, o presente trabalho mostrou ser exequível a obtenção de índices fidedignos da ação tóxica do produto, dentro dos mesmos paradigmas convencionalmente empregados nas determinações com base em medidas de mortalidade.

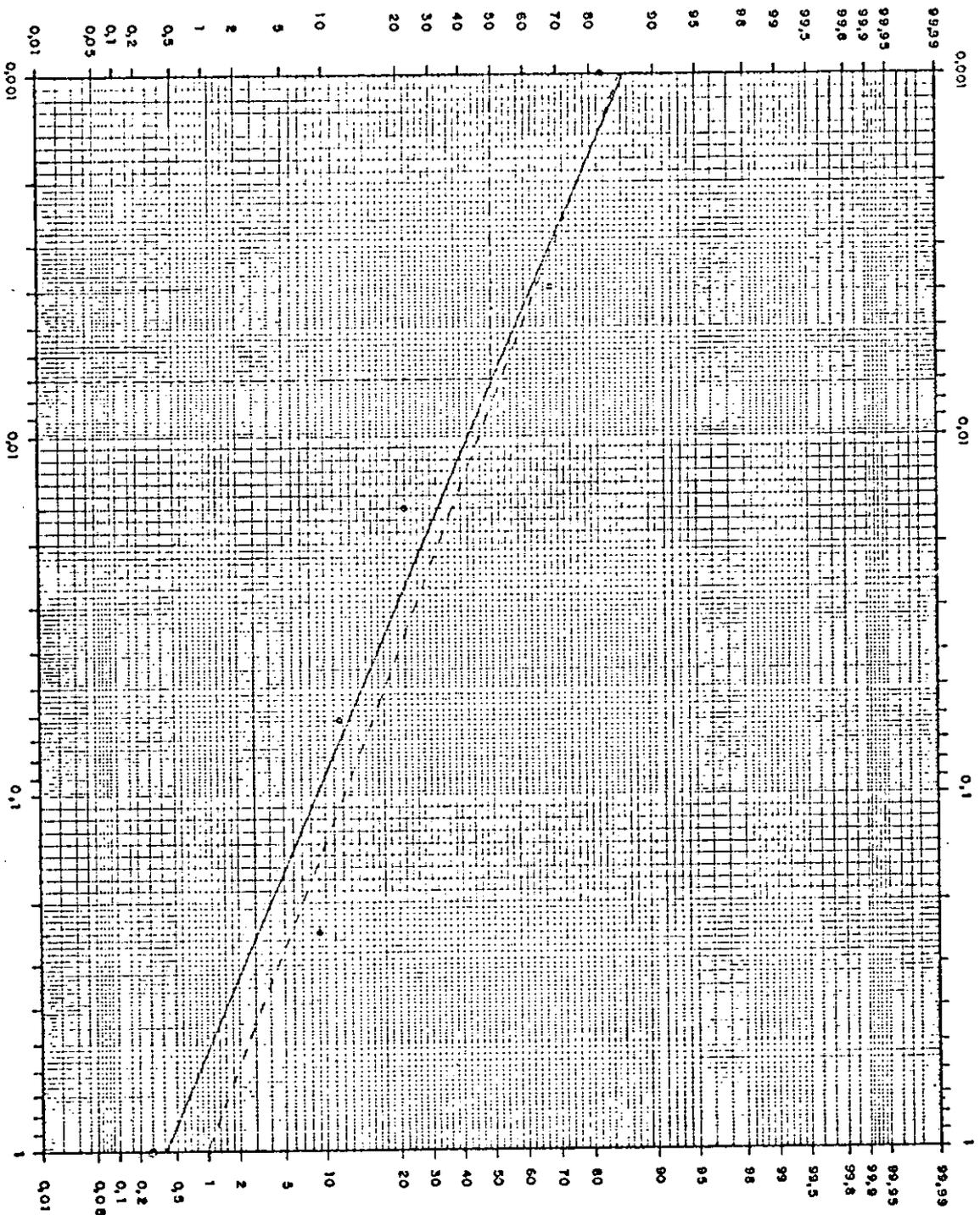
3. Pelos resultados obtidos, além de ser demonstrada a extrema sensibilidade dos índices comportamen-

tais de toxidez (capazes de detectar diferenças na ordem de 10^{-3} ppm de cobre), ficou evidenciada a linearidade de relação entre os parâmetros comportamentais e o logaritmo das concentrações do moluscicida (relação efeito/log dose). Também com base nos dados, foi apontada uma influência da estimulação luminosa sobre a frequência de subidas à superfície (menor no escuro), tempo de permanência fora da água (maior no escuro) e proporção dos indivíduos no terço superior do aquário de teste (maior no escuro).

ANEXO I

Papel de probabilidade lognormal empregado na determinação do índice de toxidez de moluscicidas pelo método LITCHFIELD-WILCOXON. Abscissa: escala logarítmica; ordenada; escala correspondente às frequências acumuladas da distribuição normal*

(*) V. exemplo de sua utilização no anexo 4.



ANEXO 2

Tabela de correção para os valores obtidos de 0% e 100% com base nos valores esperados na determinação do índice de toxidez de moluscicidas pelo método LITCHFIELD-WILCOXON. Margens: percentagens esperadas; corpo: percentagens obtidas corrigidas*

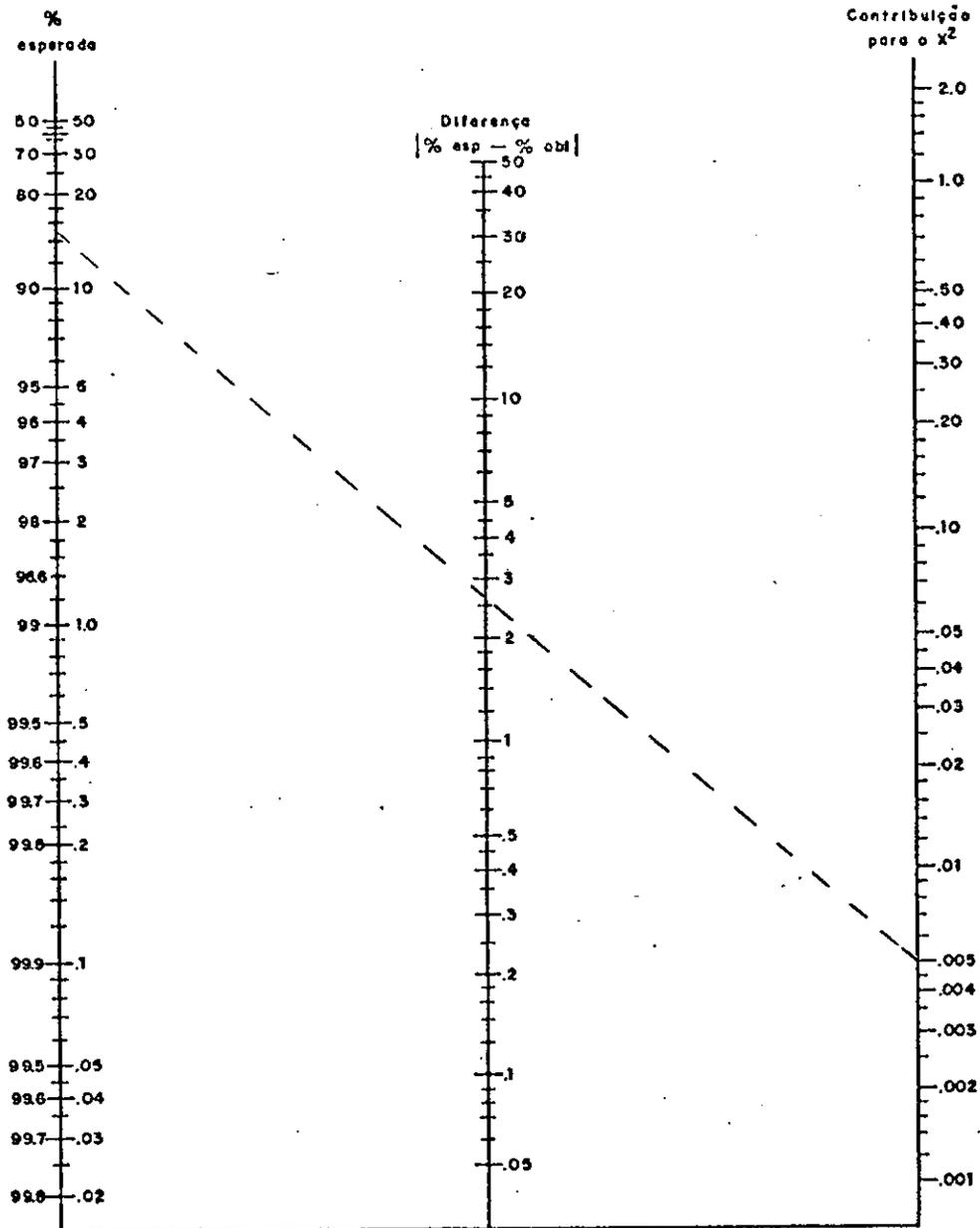
* V. exemplo de sua utilização no anexo 4

ESPERADA	%									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	0,3	0,7	1,1	1,3	1,6	2,0	2,3	2,6	2,9
10	3,2	3,5	3,8	4,1	4,4	4,7	4,9	5,2	5,5	5,7
20	6,0	6,2	6,5	6,7	7,0	7,2	7,4	7,6	7,8	8,1
30	8,3	8,4	8,6	8,8	9,0	9,2	9,3	9,4	9,6	9,8
40	9,9	10,0	10,1	10,2	10,3	10,3	10,4	10,4	10,4	10,5
50	-	89,5	89,6	89,6	89,6	89,7	89,7	89,8	89,9	90,0
60	90,1	90,2	90,3	90,5	90,7	90,8	91,0	91,2	91,4	91,6
70	91,7	91,9	92,2	92,4	92,6	92,8	93,0	93,3	93,5	93,8
80	94,0	94,3	94,5	94,8	95,1	95,3	95,6	95,9	96,2	96,5
90	96,8	97,1	97,4	97,7	98,0	98,4	98,7	99,0	99,3	99,7

ANEXO 3

Escala nomográfica para cálculo do χ^2 na determinação do índice de toxidez de moluscicidas pelo método LITCHFIELD-WILCOXON*

* V. exemplo de sua utilização no anexo 4.



ANEXO 4

Exemplo ilustrativo da aplicação do método LITCHFIELD-WILCOXON para determinação do índice de toxidez de um moluscicida com base em parâmetros comportamentais*

Suponha-se que, numa dada categoria comportamental, o parâmetro escolhido seja a frequência das respostas, tomando-se como medida o total acumulado de respostas por indivíduo, obtido ao final de 48 horas de teste (24 h de exposição e 24 h de recuperação), em cada concentração do moluscicidas. Para determinar o índice de toxidez do produto em relação a essa categoria (CEC_{50}), procede-se da seguinte maneira:

1	2	3	4	5	6	7	8
CONCENTRAÇÃO DO MOLUSCICIDA (ppm)	MEDIDAS DO PARÂMETRO	% OBTIDA	% ESPERADA	DIFERENÇA OBT - ESP	CONTRIBUIÇÃO PARA O χ^2	ADEQUAÇÃO DA RETA	CEC_{50} (ppm)
0 (controle)	50,1	-	-	-	-		
0,001	41,3	62,4	85	2,6	0,005	$\chi^2 = 3,48$ $v = 4$ $P > 0,05$	0,0072
0,004	34,0	67,9	62	5,9	0,016		
0,016	11,2	22,2	33	10,8	0,07		
0,062	7,8	11,6	13	1,4	0,001		
0,25	4,4	8,8	3	5,8	0,08		
1,00	0,0	0,12	0,4	0,3	0,002		

* V. seção 2.3, onde são descritos os procedimentos gerais para essa determinação.

A- Locação gráfica dos dados obtidos

No quadro acima, a coluna 1 apresenta as concentrações testadas do moluscicida, e a coluna 2, as medidas efetuadas do parâmetro. Para obter os valores da coluna 3, as medidas em cada concentração são comparadas com a do grupo de controle e expressas em termos de percentagens; faz-se exceção àquelas de valor 100% ou 0% (no exemplo, a correspondente à concentração de 1,00 ppm), cujo cálculo será visto mais adiante.

As concentrações testadas e as percentagens obtidas são locadas, respectivamente, na abscissa e na ordenada do papel de probabilidade lognormal, assinalando-se graficamente os pontos correspondentes (v. anexo 1).

B- Traçado da reta

Com base nesses pontos (círculos cheios, no gráfico do anexo 11), uma linha reta provisória é traçada por interpolação gráfica: toma-se o ponto médio da distância entre os dois primeiros pontos assinalados e determina-se, entre este e o terceiro ponto assinalado, um novo ponto médio; entre este agora e o quarto ponto assinalado, marca-se outro ponto médio, e, assim, sucessivamente, até o último ponto assinalado (que, no exemplo, corresponde à concentração de 0,25 ppm). O primeiro e o último pontos médios determinados por esse procedimento são aqueles por onde passa a reta provisória (linha de traço interrompido, no gráfico do anexo 1).

C - Correção das percentagens obtidas de 100%

e 0%

A reta assim traçada representa uma primeira estimativa dos valores esperados e serve para a correção das percentagens obtidas de 100% e 0% (permitindo-se, no máximo, duas de cada), que não podem ser locadas na ordenada: os pontos da reta provisória correspondentes às concentrações nas quais se obtiveram / essas percentagens extremas representam os valores esperados para aquelas concentrações e são corrigidos de acordo com a tabela apresentada no anexo 2*. No exemplo dado, o valor obtido de 0% a 1,00 ppm é corrigido, determinando-se, em primeiro lugar, o ponto da reta / provisória correspondente àquela concentração: 1, na escala de percentagens; em seguida, consultando-se a tabela de correção, lê-se, para a percentagem esperada a 1%, o valor corrigido da percentagem obtida: 0,3%.

D- Determinação das percentagens esperadas

Com a correção dos valores de 100% e 0% obtidos, novos pontos são assinalados no gráfico, e a reta definitiva pode então ser traçada, permitindo-se determinar as percentagens esperadas para as diferentes concentrações, e recorreger as percentagens extremas obtidas, com base nos novos valores esperados. No exemplo em questão, apenas um novo ponto é assinalado

* o valor percentual do grupo de controle (que é sempre 100) é desconsiderado nessas determinações, porque corresponde à concentração zero do moluscicida e, portanto, não pode ser locado na escala logarítmica da abscissa.

(círculo vazio no gráfico do anexo 1), e a reta definitiva (linha inteira grossa, no gráfico) determina os valores expressos na coluna 4 do quadro; a percentagem obtida a 1,00 ppm, por sua vez, é recorrigida a partir do valor esperado de 0,4%, o qual, na tabela de correção, corresponde a 0,12%*..

E - Cálculo das contribuições para o X^2

Para análise da adequação da reta, começa-se calculando a diferença absoluta entre as percentagens obtida e esperada em cada concentração locada, e, através da escala nomográfica apresentada no anexo 3, determina-se a contribuição de cada diferença para o X^2 . Tomando-se, pelo exemplo, a concentração de 0,001 ppm, marca-se, no local apropriado da escala, o ponto correspondente à percentagem esperada de 85% (coluna 4, no quadro), fazendo-se o mesmo com a diferença $85 - 82,4 = 2,6\%$ (coluna 5, no quadro); a seguir, unem-se por uma reta (linha de traço interrompido na escala do anexo 3) os pontos assim determinados: o ponto de interseção desta reta com a escala de X^2 representa o valor de contribuição verificado naquela concentração, qual seja, 0,005. As diferentes contribuições determinadas por esse processo estão na coluna 6 do quadro.

F - Adequação da reta

Obtidas as contribuições de cada diferença

* Se, para o intervalo de 0 a 1%, o valor corrigido equivale a 0,3%, para o intervalo de 0 a 0,4% a equivalência é de $0,4 \times 0,3 = 0,12\%$.

para o X^2 , estas são somadas, e o resultado é multiplicado pelo número de sujeitos empregados por concentração. O X^2 assim calculado é comparado com o X^2 tabulado * para y graus de liberdade ($v = n^\circ$ de concentrações locadas - 2): caso o X^2 calculado seja menor que o tabulado, a diferença entre os dados obtidos e os esperados não é considerada significativa. No exemplo dado, a soma das contribuições para o X^2 é 0,0174; portanto, como foram 20 os sujeitos empregados por concentração, o X^2 calculado é $0,0174 \times 20 = 3,48$. Esse valor é menor que o tabulado para $6 - 2 = 4$ graus de liberdade (9,49) e, por conseguinte, pode-se estimar que os dados esperados não são diferentes dos esperados ao nível de 5% de significância (coluna 7, no quadro).

G - Determinação da CEC_{50}

Caso a reta represente uma estimativa adequada das medidas ($P > 0,05$), procede-se à determinação do índice de toxidez do moluscicida para o parâmetro considerado, tomando-se como valor de referência a concentração de efeito comportamental de 50% (CEC_{50}), isto é, o nível de moluscicida no qual se espera a percentagem de 50% em relação ao grupo de controle: o ponto da abscissa do papel de probabilidade lognormal que corresponde, pela reta, ao valor 50 na escala da ordenada. No exemplo, uma linha paralela à abscissa é traçada do ponto correspondente a 50% até sua interseção

* Ao nível de 5% de significância ($P = 0,05$), os valores tabulados de X^2 para 1, 2, 3 e 4 graus de liberdade são, respectivamente, 3,84, 5,99, 7,82 e 9,49 (uma tabela com os valores para graus de liberdade maiores e a outros níveis de significância pode ser encontrada nos livros-texto de estatística).

com a reta definitiva e, desse ponto, desce-se uma paralela à ordenada (linhas de ponto e traço, no gráfico); o ponto assim determinado na escala de concentrações constitui o índice procurado: $CEC_{50} = 0,0072$ ppm (coluna 8, no quadro).

FIGURA 1

Representação esquemática da câmara de observação e da unidade de registro cinematográfico.

A, visão de topo; B, visão lateral; ae, abertura para a entrada de ar; an, anteparo de luz; aq, aquários; as, abertura para a saída de ar; ex, exaustor; fi, filmadora; fl, flash eletrônico; in, intervalômetro; la, lâmpada; pa, parede de isolamento da câmara; pd, placa despolida; pe, porta externa; pl, porta de vidro; re, relógio; sf, suporte da filmadora; su, suporte de flash.

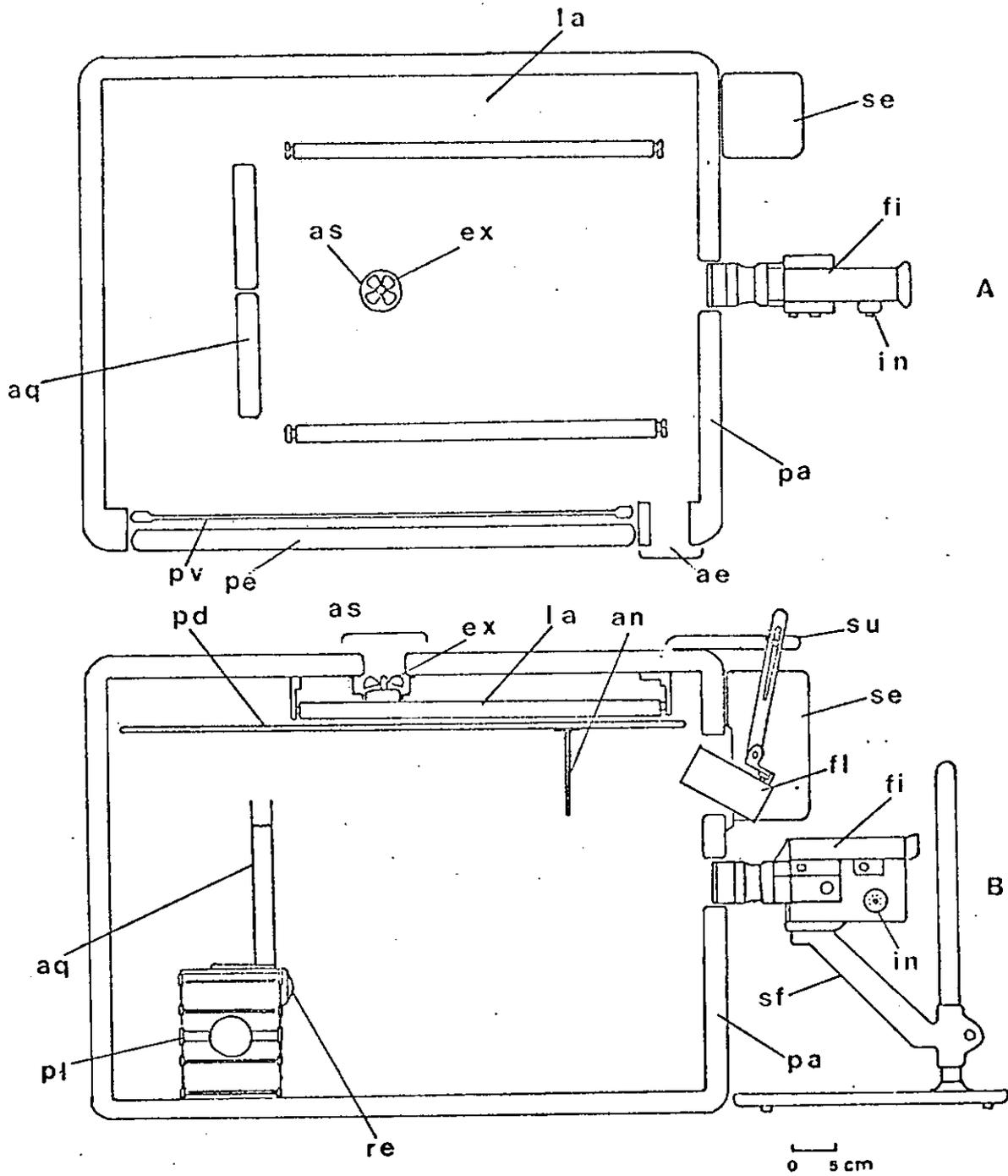


FIGURA 2

Representação esquemática do aquário de teste (visão frontal), tal como registrada cinematograficamente.

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

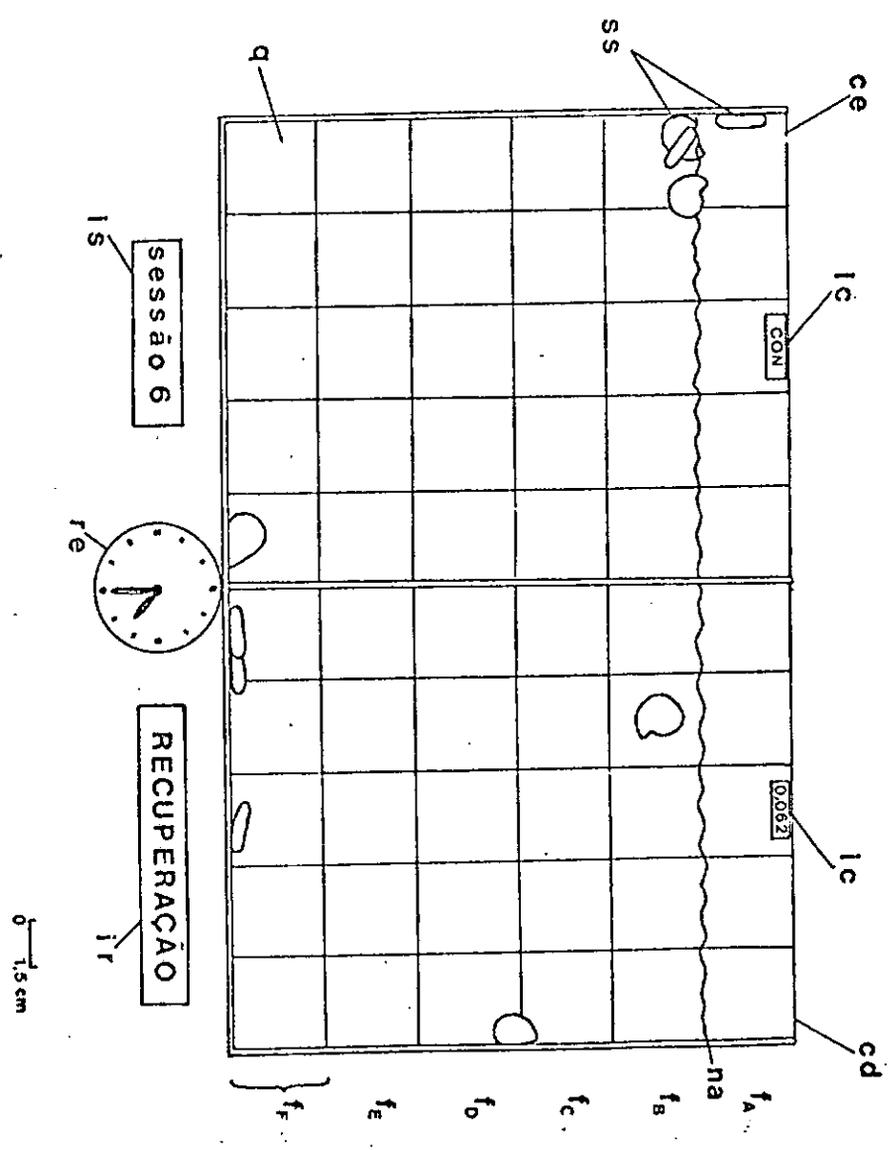


FIGURA 3

Gráficos de frequência de subida à superfície, por indivíduo, sob diferentes concentrações de cobre como CuSO_4 , a cada 3 horas dos períodos de exposição e recuperação

A, 0,000 ppm; B, 0,001 ppm; C, 0,004 ppm; D, 0,016 ppm; E, 0,062 ppm; F, 0,25 ppm. As barras hachuradas nas escalas de tempo indicam as fases noturnas dos períodos. As linhas verticais interrompidas indicam o término dos períodos de exposição.

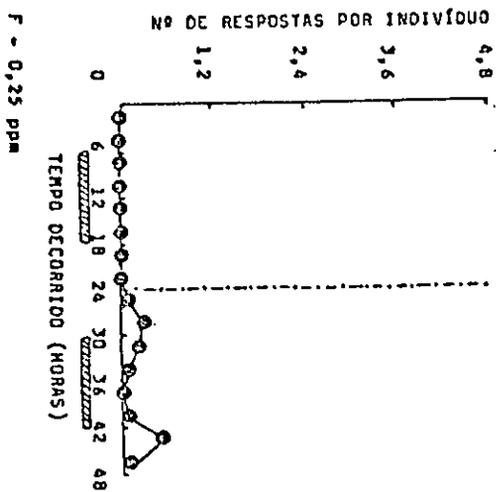
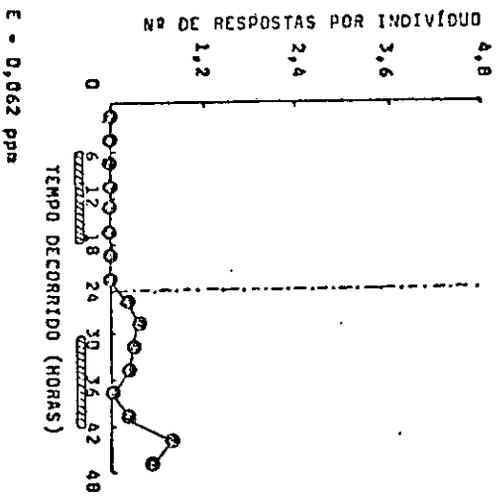
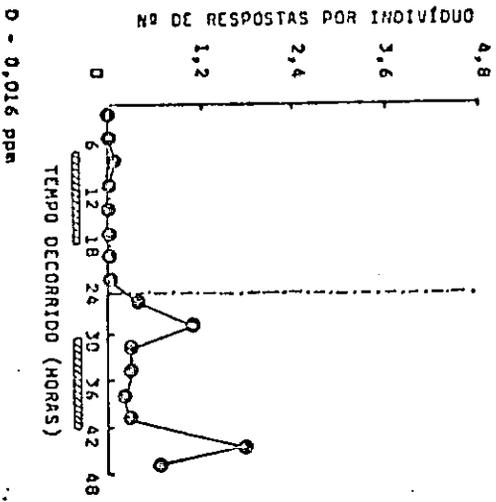
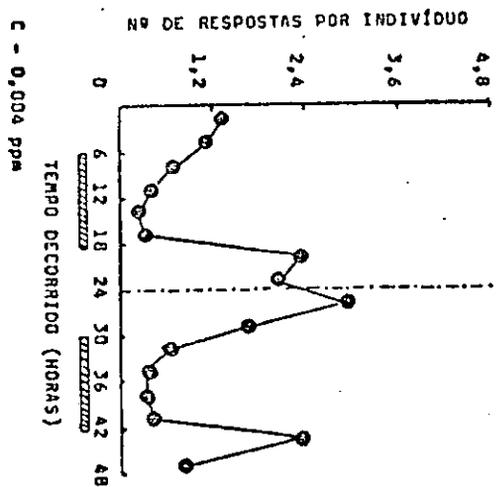
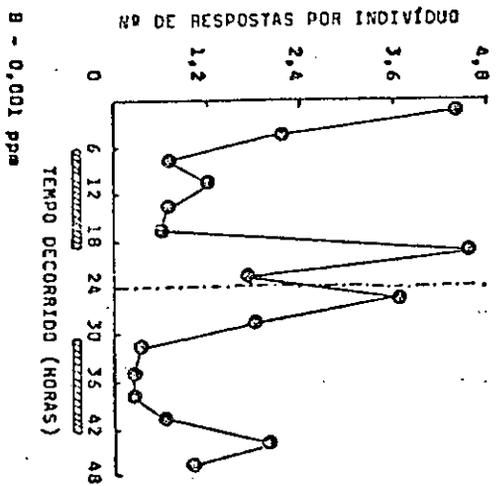
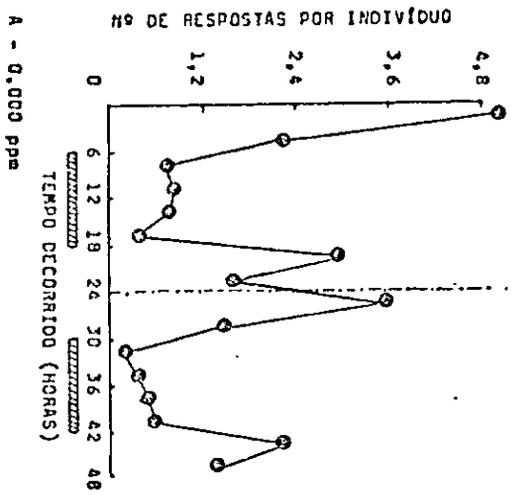


FIGURA 4

Gráficos de frequência de saída da água, por indivíduo, sob diferentes concentrações de cobre como CuSO_4 , a cada 3 horas do período de exposição e recuperação.

A, 0,000 ppm; B, 0,001 ppm; C, 0,004 ppm; D, 0,016 ppm; E, 0,062 ppm; F. 0,25 ppm. As barras hachuradas nas escalas de tempo indicam as fases noturnas dos períodos. As linhas verticais interrompidas indicam o término do período de exposição.

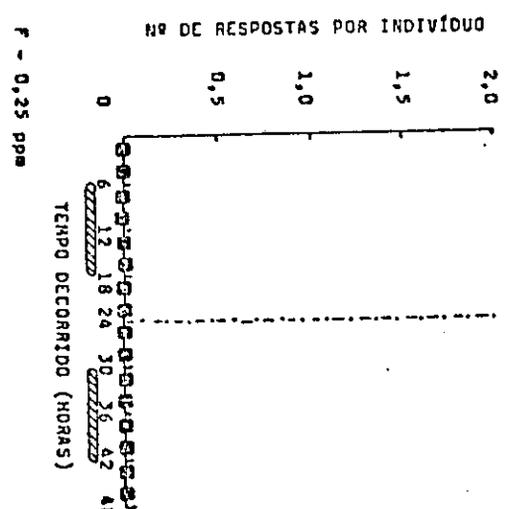
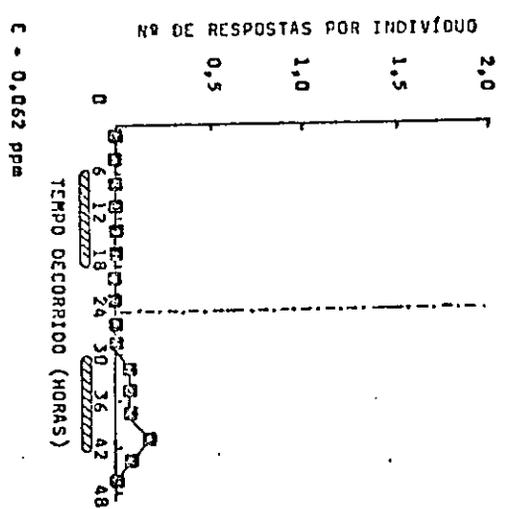
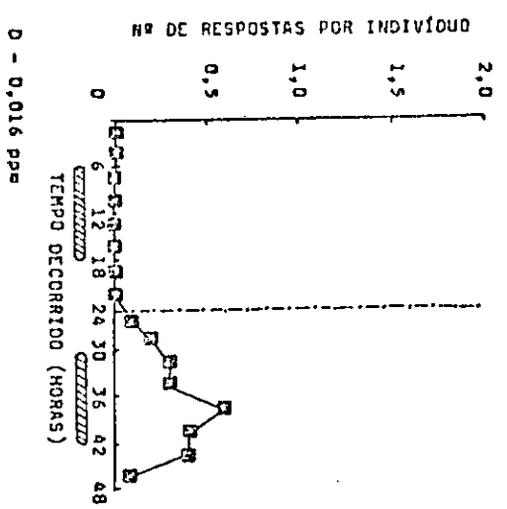
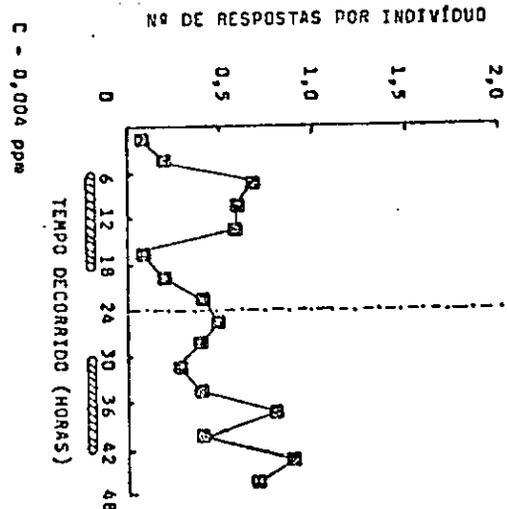
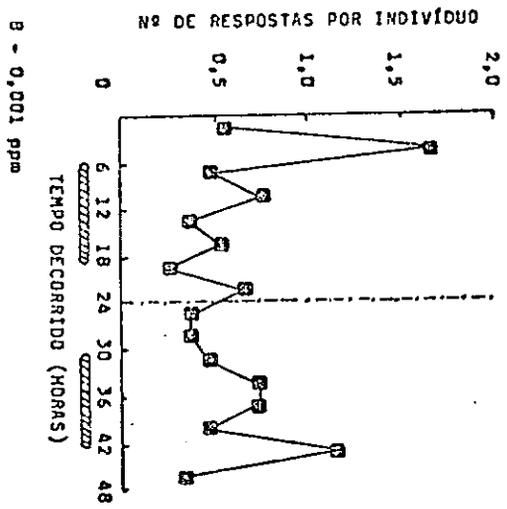
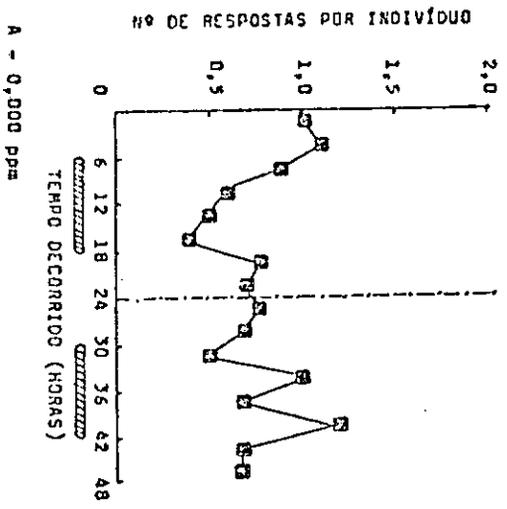


FIGURA 5

Gráficos de tempo de permanência fora da água, por indivíduo, sob diferentes concentrações de cobre como CuSO_4 , a cada 3 horas dos períodos de exposição e recuperação.

A, 0,000 ppm; B, 0,001 ppm; C, 0,004 ppm; D, 0,016 ppm; E, 0,062 ppm; F, 0,25 ppm. As barras hachuradas nas escalas de tempo indicam as fases noturnas dos períodos. As linhas verticais interrompidas indicam o término do período de exposição.

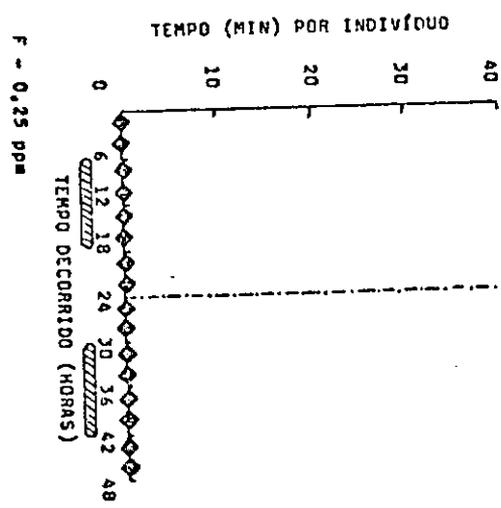
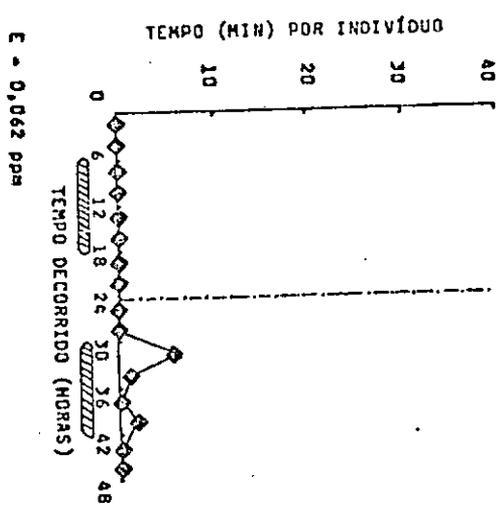
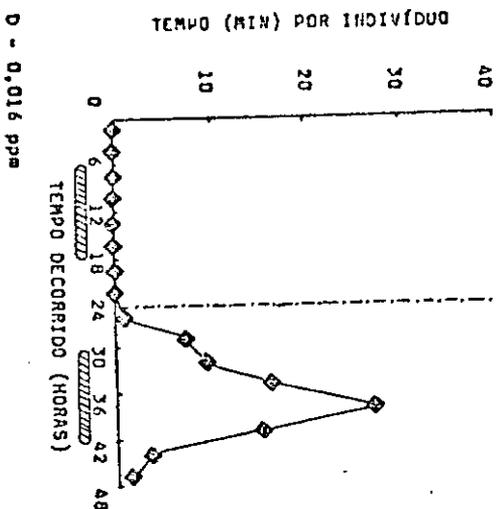
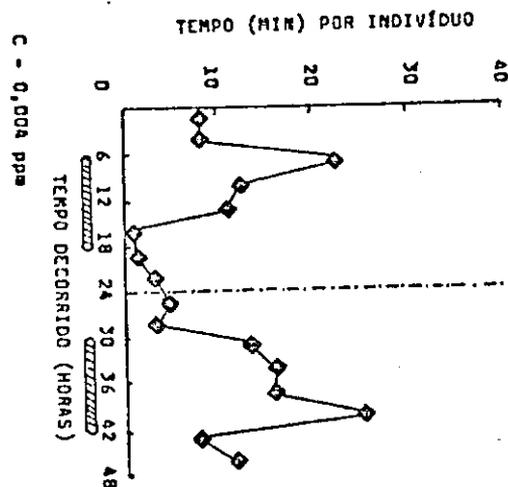
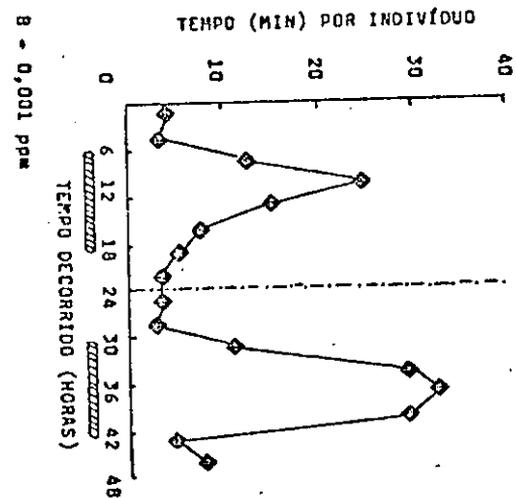
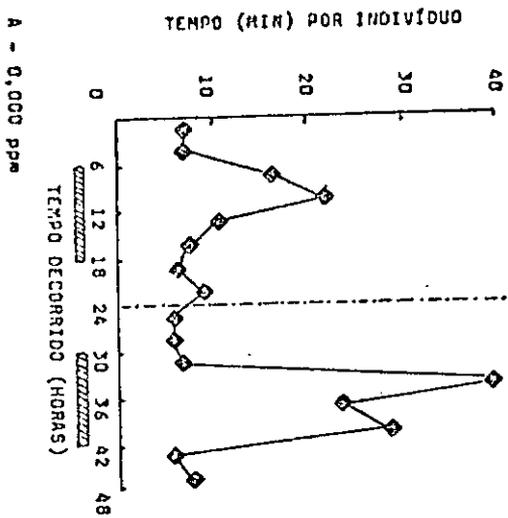


FIGURA 6

Gráficos de percentagem de indivíduos no terço superior do aquário, sob diferentes concentrações de cobre como CuSO_4 , a cada 3 horas dos períodos de exposição e recuperação.

A, 0,000 ppm; B, 0,001 ppm; c; 0,004 ppm; D, 0,016 ppm; E, 0,062 ppm; F, 025 ppm. As barras hachuradas nas escalas de tempo indicam as fases noturnas dos períodos. As linhas verticais interrompidas indicam o término do período de exposição.

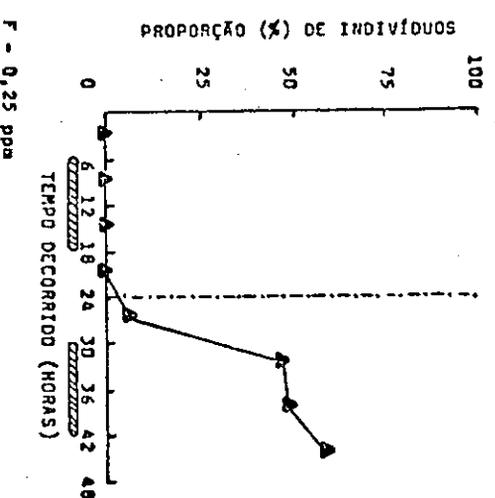
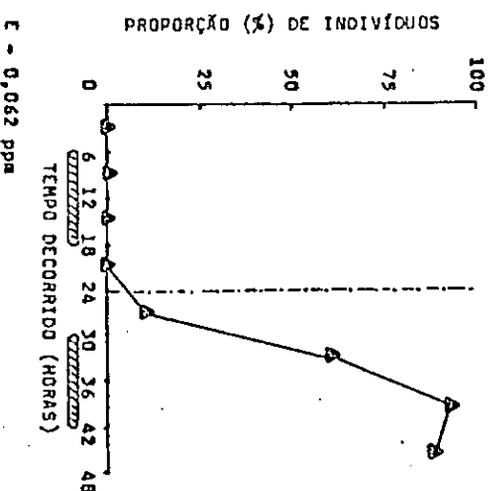
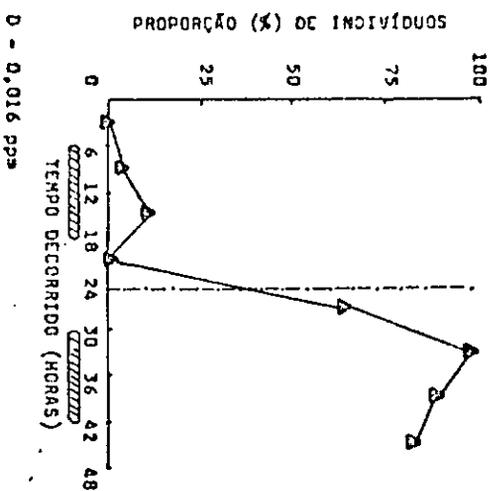
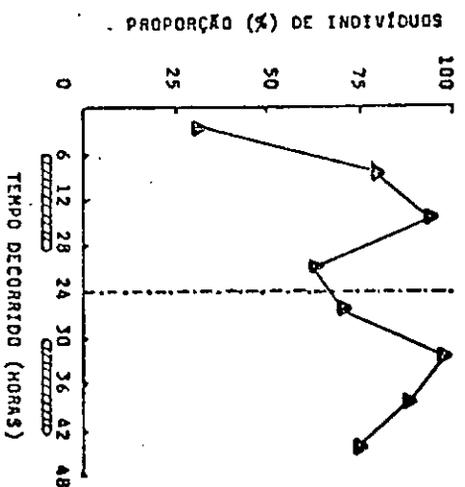
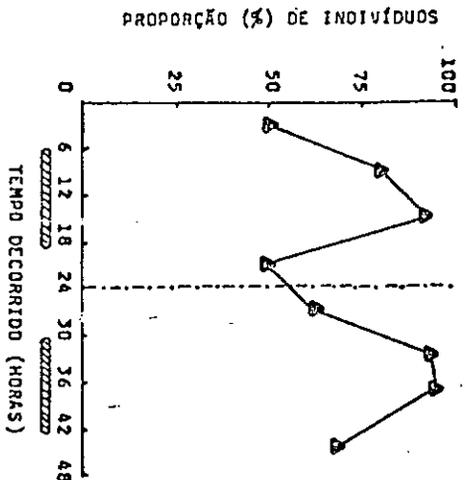
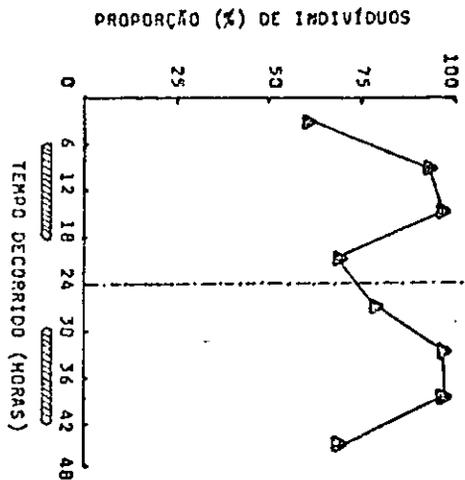


FIGURA 7

Gráficos de atividade diurna e noturna, sob diferentes concentrações de cobre como CuSO_4 :
A - total de respostas de subida à superfície, por indivíduo; B - total de respostas de saída da água, por indivíduo; C - tempo total (min) de permanência fora da água, por indivíduo; D - percentagem de indivíduos no terço superior do aquário.

Os símbolos hachurados correspondem à fase noturna e os símbolos vazios, à fase diurna.

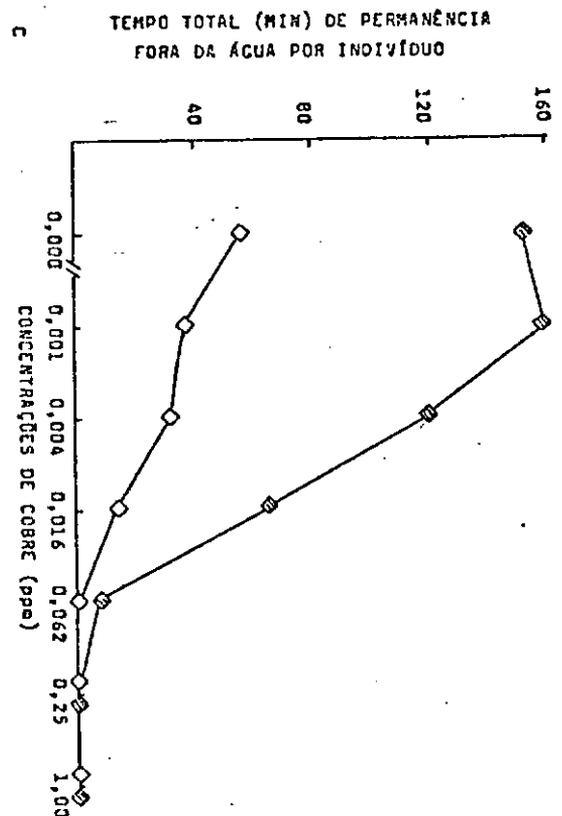
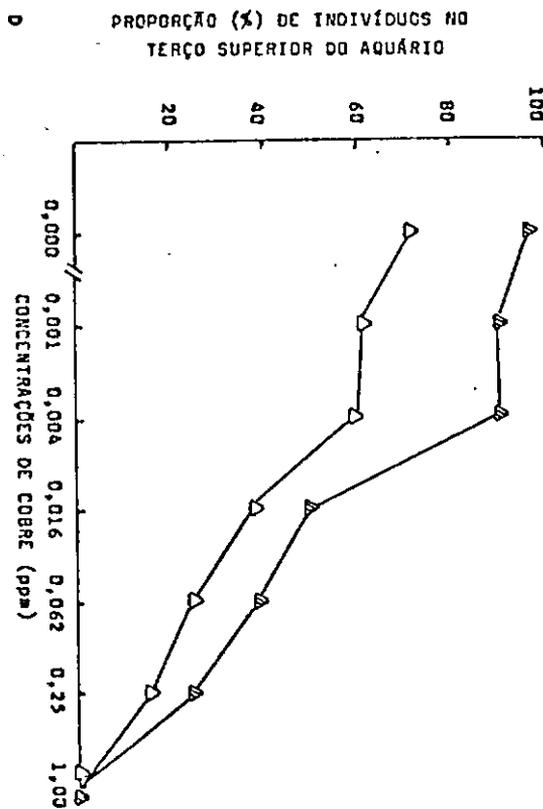
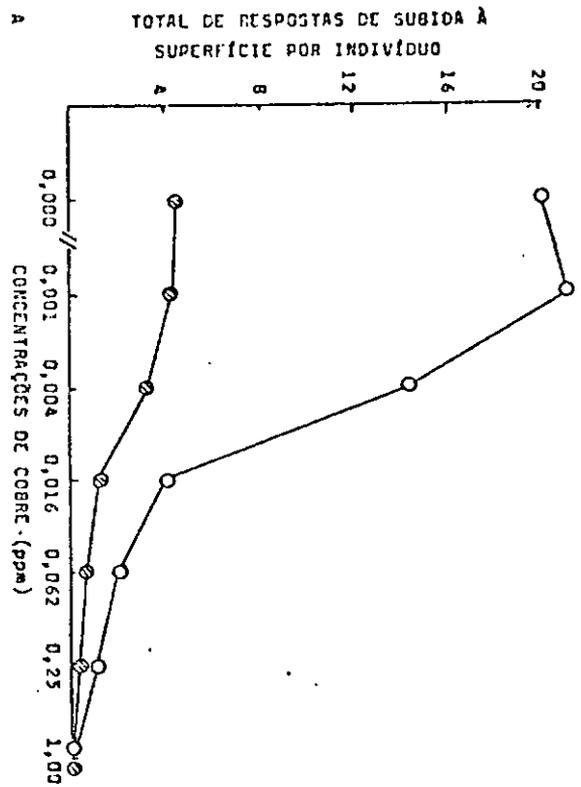
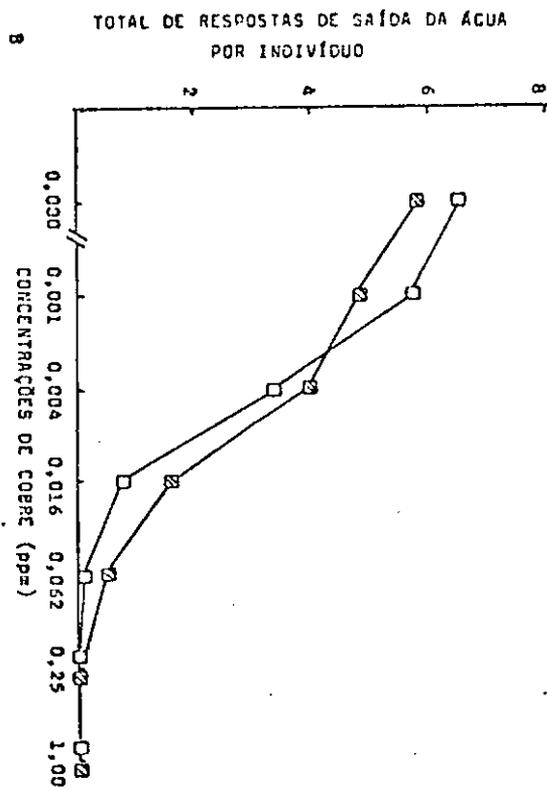


FIGURA 8

Gráfico de determinação do índice de toxidez do moluscicida CuSO_4 , em relação ao tempo de corrido até a primeira subida à superfície, segundo o método LITCHFIELD-WILCOXON.

Os símbolos  indicam os valores obtidos; a reta de linha grossa representa os valores esperados; as retas verticais de linha fina correspondem às concentrações testadas do moluscicida; as retas de ponto e traço interrompido determinam a concentração de efeito comportamental de 50% (CEC_{50}).

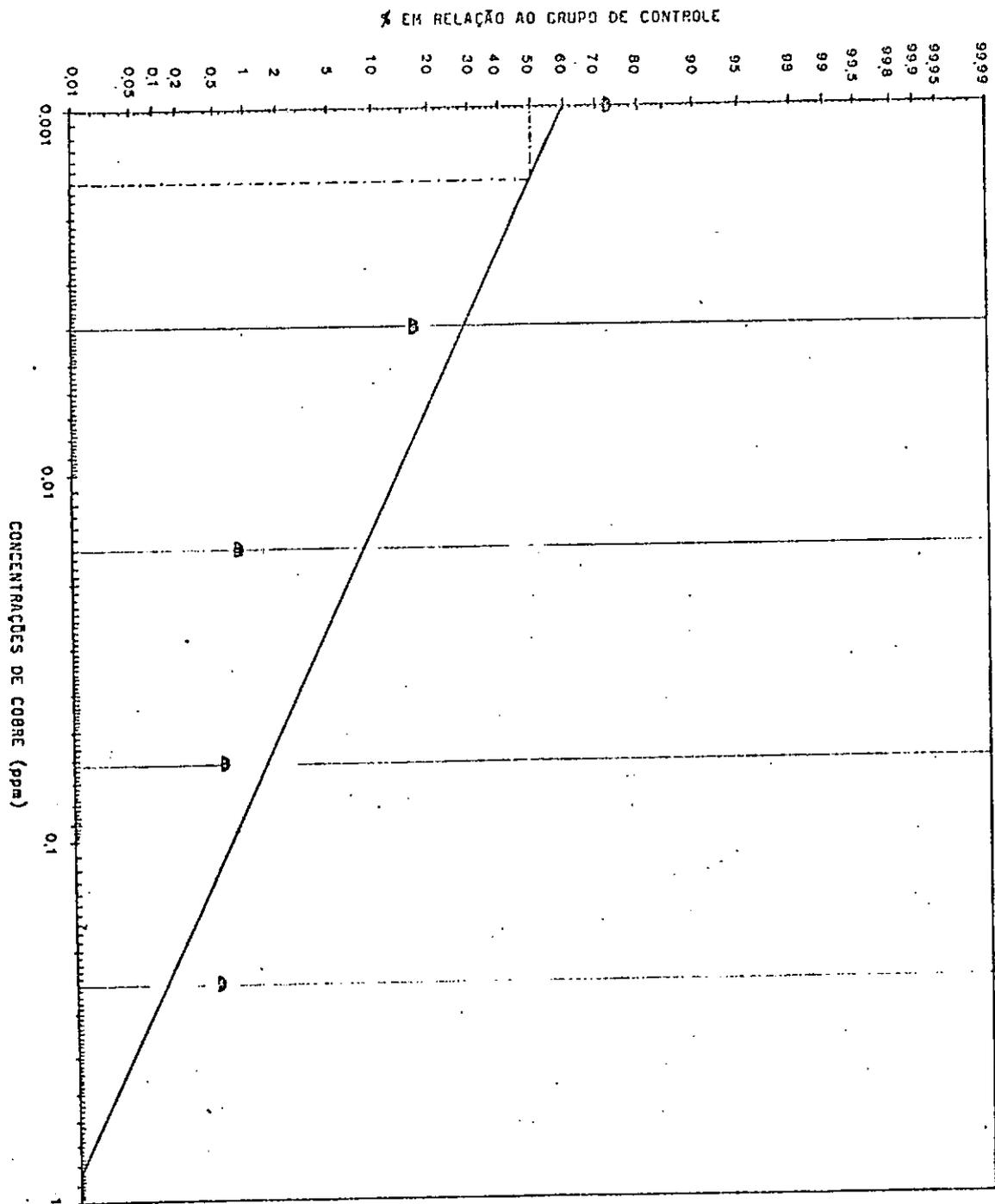


FIGURA 9

Gráfico de determinação do índice de toxidez do moluscicida CuSO_4 , em relação à frequência de subidas à superfície, segundo o método LITCHFIELD-WILCOXON.

Os símbolos \odot indicam os valores obtidos, os símbolos \circ indicam os valores corrigidos; a reta de linha grossa representa os valores esperados; as retas verticais de linha fina correspondem às concentrações testadas do moluscicida; as retas de ponto e traço interrompido determinam a concentração de efeito comportamental de 50% (CEC_{50}).

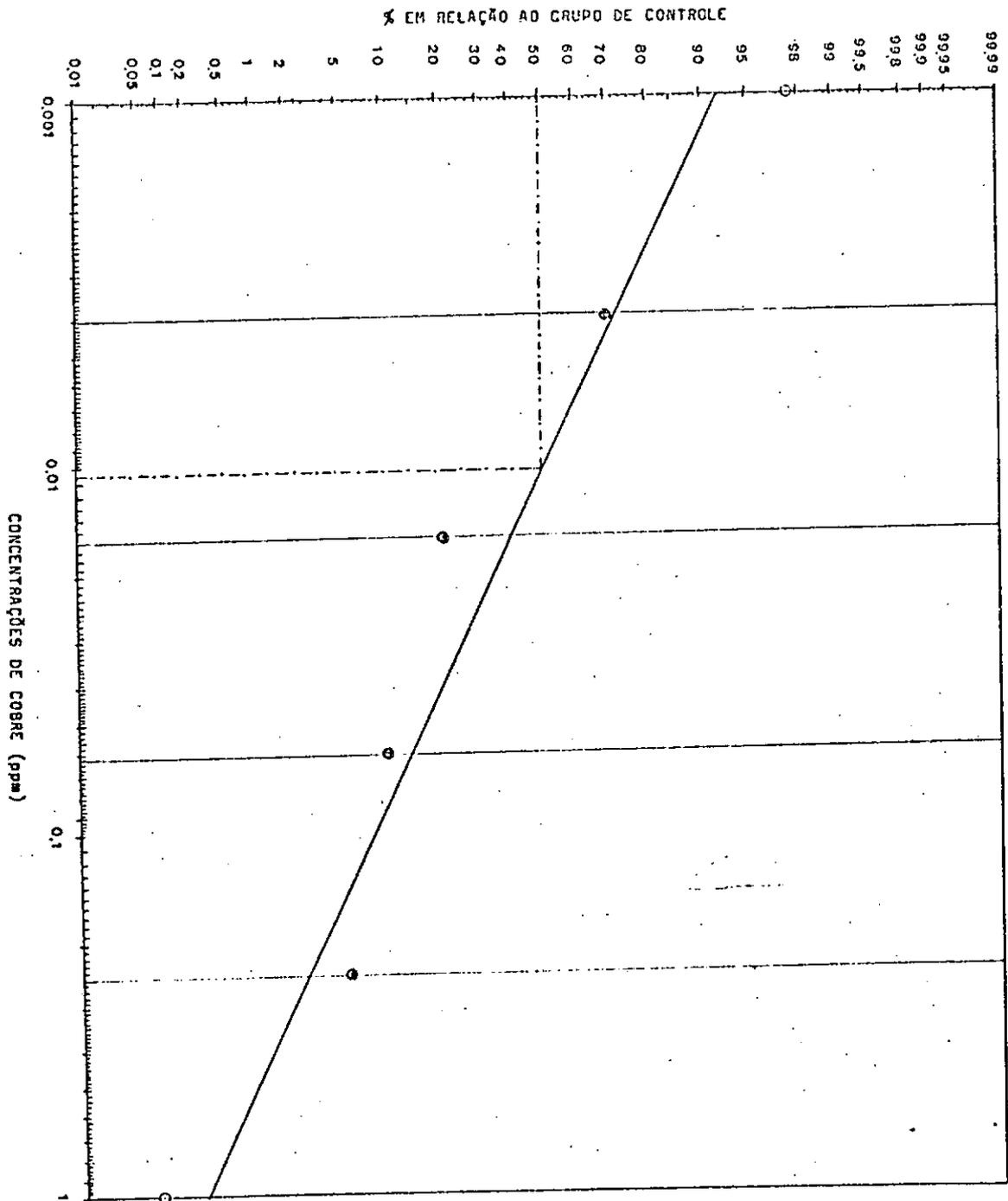


FIGURA 10

Gráfico de determinação do índice de toxidez do moluscicida CuSO_4 , em relação à frequência de saídas de água, segundo o método LITCHFIELD-WILCOXON.

Os símbolos \blacksquare indicam os valores obtidos; o símbolo \square indica o valor corrigido; a reta de linha grossa representa os valores esperados; as retas verticais de linha fina correspondem às concentrações testadas do moluscicida; as retas de ponto e traço interrompido determinam a concentração de efeito comportamental de 50% (CEC_{50}).

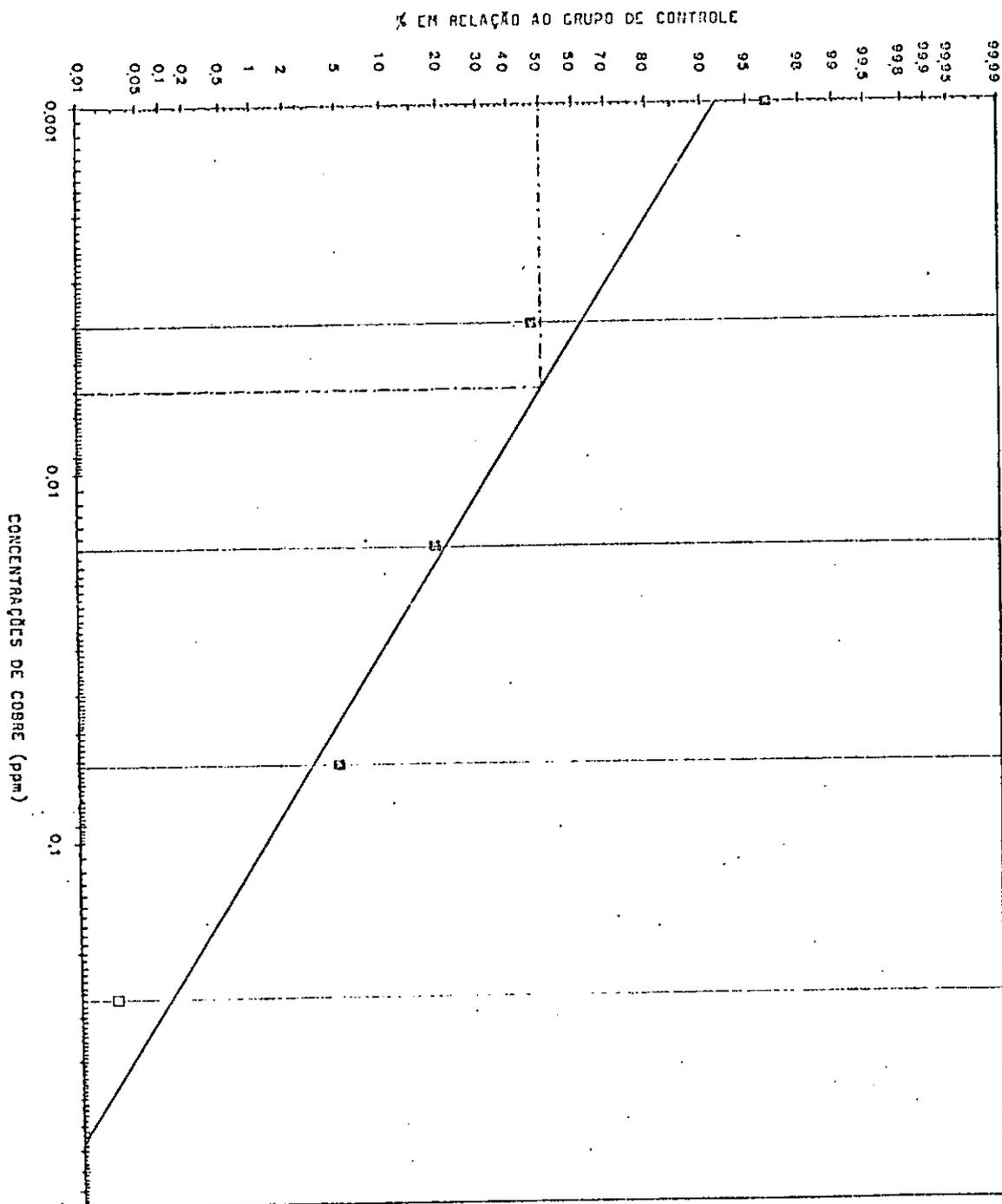


FIGURA 11

Gráfico de determinação do índice de toxidez do moluscicida CuSO_4 , em relação ao tempo de permanência fora da água, segundo o método LITCHFIELD-WILCOXON.

Os símbolos \blacklozenge indicam os valores obtidos; o símbolo \diamond indica o valor corrigido; a reta de linha / grossa representa os valores esperados; as retas verticais de linha fina correspondem às concentrações testadas do moluscicida; as retas de ponto e traço interrompido determinam a concentração de efeito comportamental de 50% (CEC_{50}).

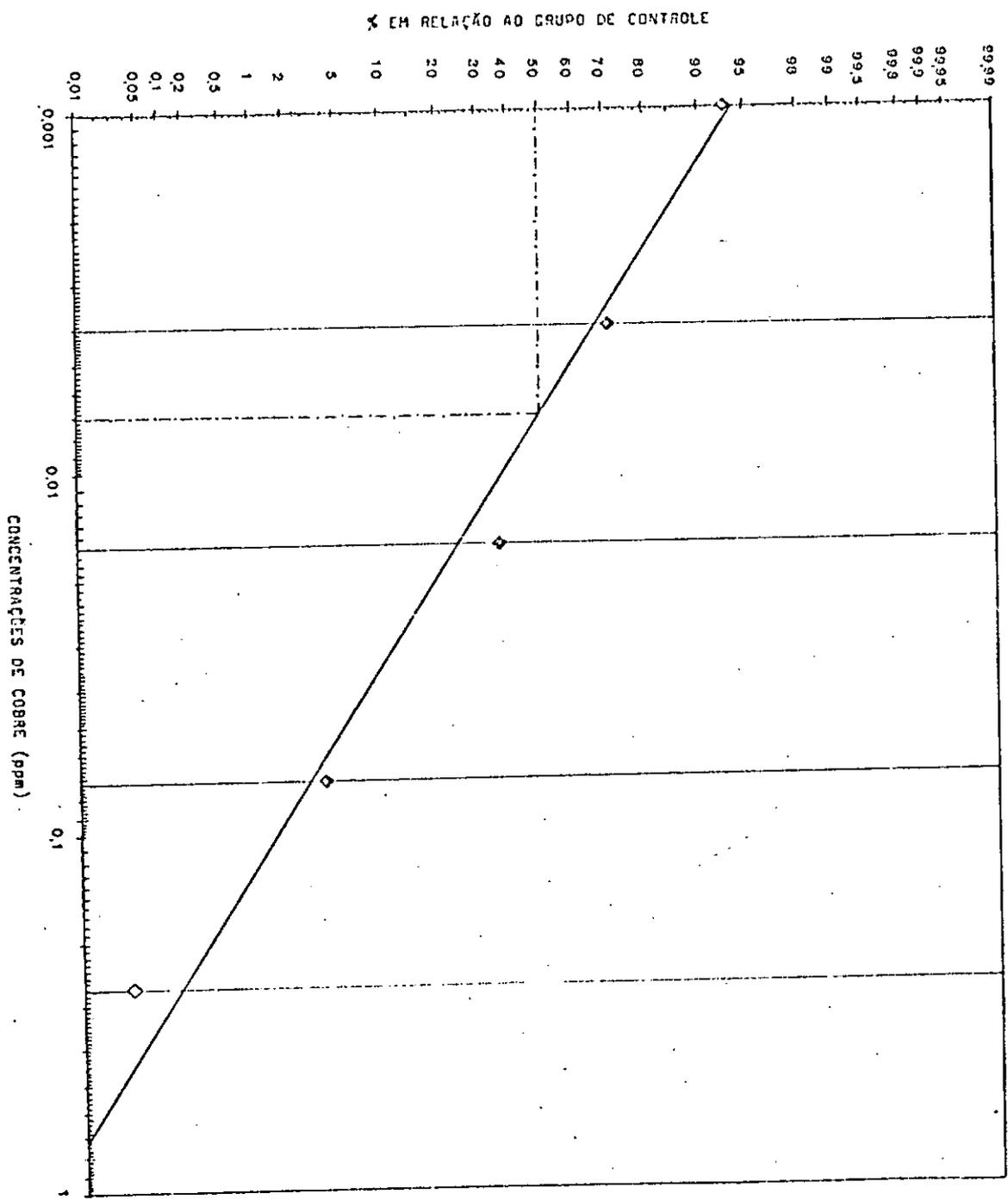


FIGURA 12

Gráfico de determinação do índice de toxidez do moluscicida CuSO_4 , em relação à proporção de indivíduos no terço superior do aquário, segundo o método LITCHFIELD-WILCOXON.

Os símbolos \blacktriangle indicam os valores obtidos, o símbolo \triangle indica o valor corrigido; a reta de linha / grossa representa os valores esperados; as retas verticais de linha fina correspondem às concentrações testadas do moluscicida; as retas de ponto e traço interrompido determinam a concentração de efeito com portamental de 50% (CEC_{50}).

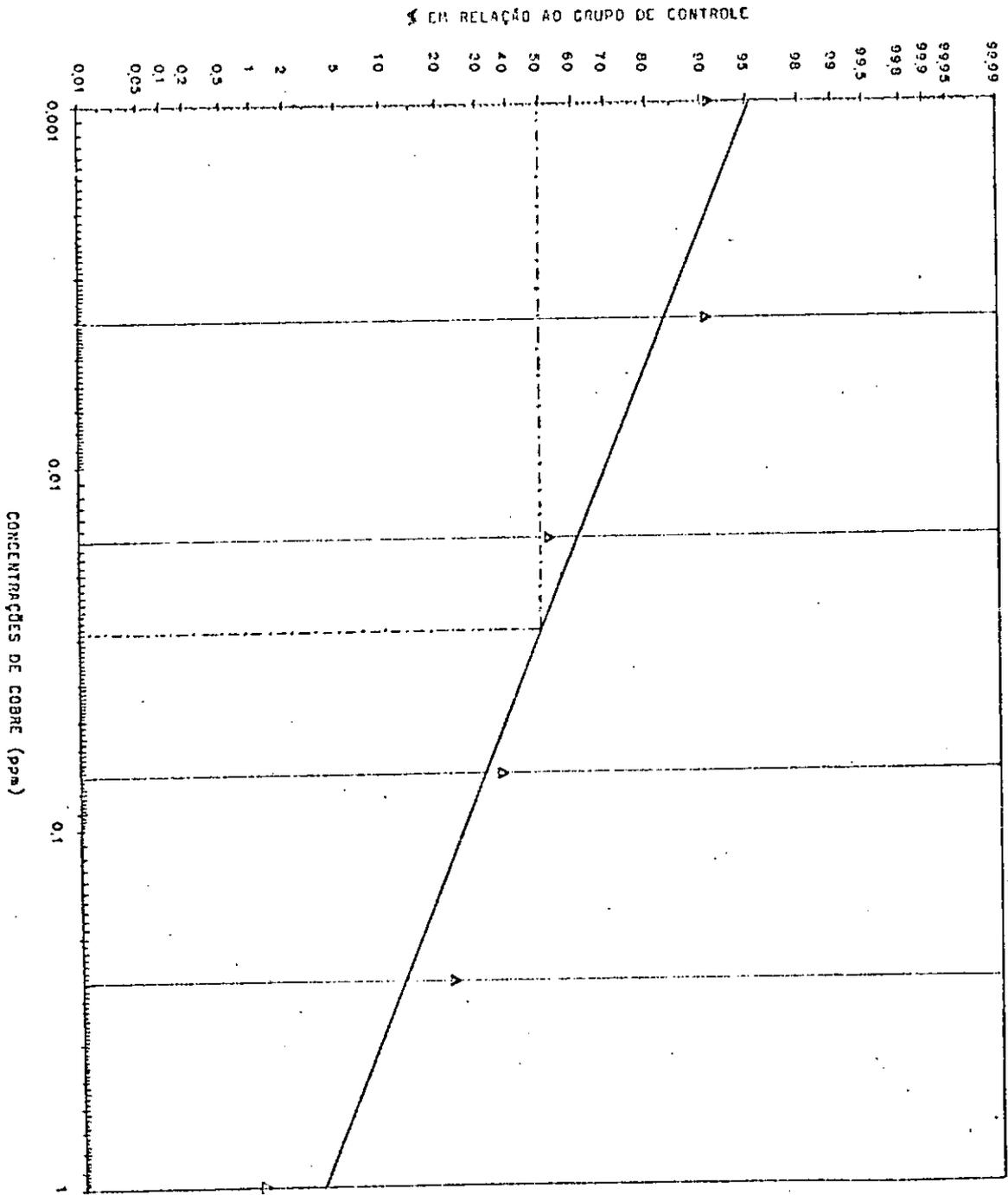


FIGURA 13

Gráfico comparativo dos índices de toxidez do moluscicida CuSO_4 em relação a diferentes parâmetros comportamentais, segundo o método LITCHFIELD-WILCOXON

- ☉-tempo decorrido até a primeira subida à superfície
- ☐-frequência de saídas de água
- ◆-tempo de permanência fora da água
- ⊙-frequência de subidas à superfície
- ▲-proporção de indivíduos no terço superior do aquário

As retas de ponto e traço interrompido determinam as respectivas concentrações de efeito comportamental de 50% (CEC_{50}).

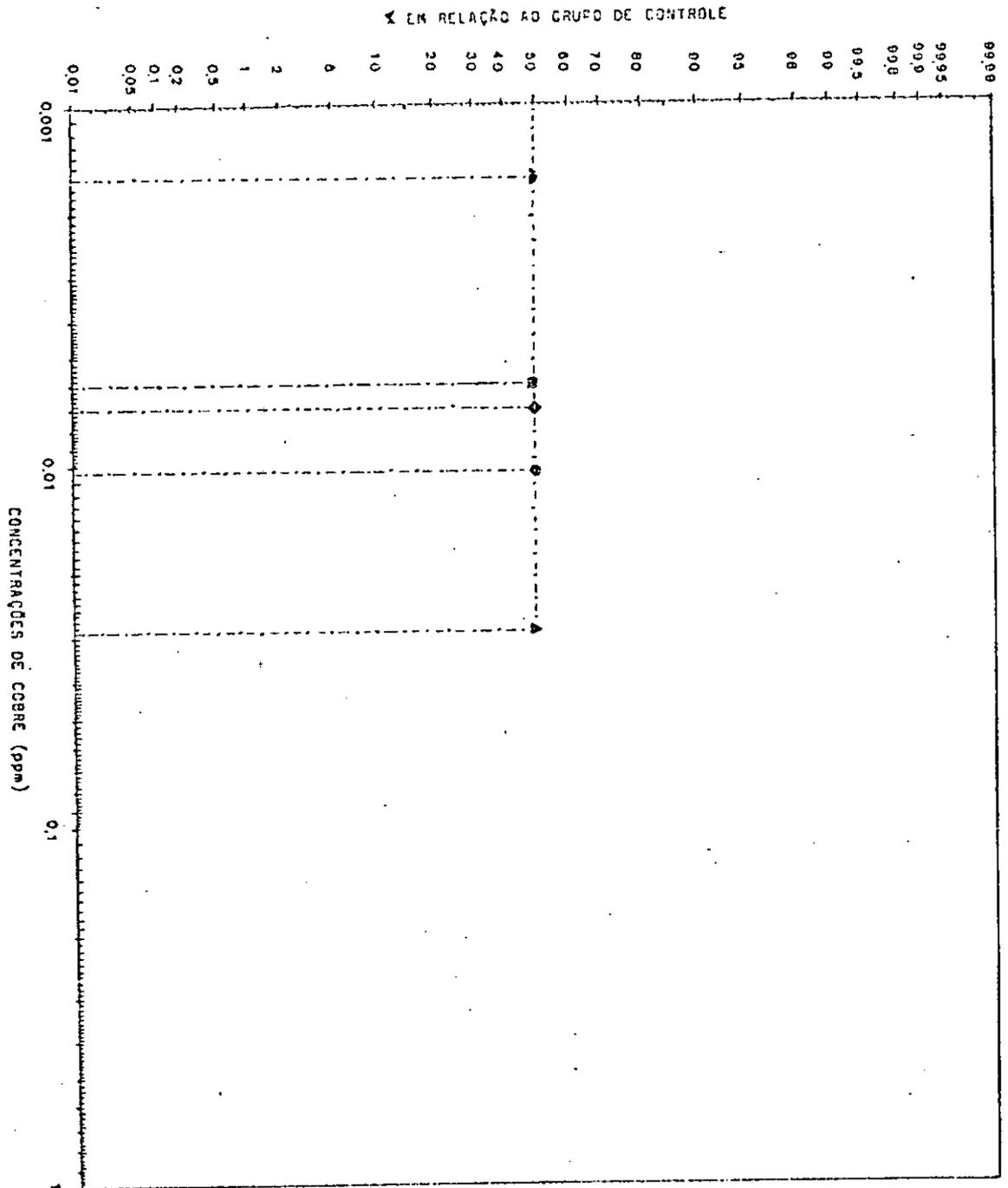


TABELA 1 - Arranjo dos grupos testados nos compartimentos esquerdo e direito do aquário, nas sucessivas sessões experimentais.

SESSÕES Nº	COMPARTIMENTOS	
	ESQUERDO	DI REITO
1	0,004	0,25
2	1,00	0,016
3	0,062	CON
4	0,001	1,00
5	0,25	0,001
6	CON	0,062
7	0,016	0,004
8	0,062	CON
9	1,00	0,25
10	0,001	0,016
11	0,004	1,00
12	0,25	0,004
13	0,016	0,062
14	CON	0,001

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

TABELA 2 - Tempo decorrido (min) até a primeira ebulição superficial, nas diferentes concentrações de cobre como $CuSO_4$. \bar{x}_A , média aritmética e desvio-padrão \bar{x}_G , média geométrica.

SUJEITOS	CONCENTRAÇÕES DE COBRE (ppm)			\bar{x}_A
	0,000	0,001	0,004	
1	2,0	3,5	9,5	631,0
2	6,0	4,5	12,0	799,0
3	6,0	5,0	27,5	802,0
4	6,0	9,5	32,0	1460,0
5	6,0	10,0	46,0	1476,0
6	6,0	12,0	51,0	1569,0
7	8,0	13,0	64,0	1590,0
8	9,0	15,0	65,5	1591,0
9	9,5	18,0	82,0	1612,0
10	11,0	22,0	85,0	1429,5
11	14,0	22,0	87,0	1644,5
12	15,0	26,0	91,0	1651,0
13	16,0	27,0	95,0	1684,0
14	16,0	27,0	104,0	1684,0
15	19,0	31,0	106,0	1709,0
16	29,0	34,0	125,0	1709,0
17	31,0	39,5	129,0	1724,0
18	34,0	39,5	205,0	1824,0
19	45,0	47,0	230,0	1846,0
20	51,0	49,0	287,0	1938,0
\bar{x}_A	16,9 ± 13,90	22,5 ± 14,24	96,9 ± 71,96	1328,6 ± 358,02
\bar{x}_G	12,26	17,39	71,86	1472,6
				1941,1
				2467,5

085.: Ao nível de 1,00 ppm não houve resposas de ebulição à superfície, verificando-se 100% de mortalidade ao final do período de recuperação.

TABELA 3 - Frequência de respostas de eubíde à euparíde, por indivíduo, a cada 3 horas dos períodos de exposição e recuperação, nas diferentes concentrações de cobre como CuSO_4 . As barras hachuradas indicam as fases noturnas dos períodos.

TEMPO DECORRIDO (HORAS)	CONCENTRAÇÕES DE COBRE (ppm)							
	0,000	0,001	0,004	0,016	0,062	0,25	1,00	
PERÍODO DE EXPOSIÇÃO								
0 - 3	5,1	4,4	1,3	0,0	0,0	0,0	0,0	
3 - 6	2,3	2,2	1,1	0,0	0,0	0,0	0,0	
6 - 9	0,8	0,7	0,7	0,1	0,0	0,0	0,0	
9 - 12	0,9	1,2	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	
12 - 15	0,8	0,7	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	
15 - 18	0,4	0,6	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	
18 - 21	3,0	4,6	2,3	0,0	0,0	0,0	0,0	
21 - 24	1,6	1,7	2,0	0,2	0,0	0,0	0,0	
PERÍODO DE RECUPERAÇÃO								
24 - 27	3,6	3,7	2,9	0,4	0,2	0,1	0,0	
27 - 30	1,5	1,8	1,6	1,1	0,4	0,3	0,0	
30 - 33	0,2	0,3	0,6	0,3	0,3	0,2	0,0	
33 - 36	0,4	0,2	0,3	0,3	0,2	0,1	0,0	
36 - 39	0,5	0,2	0,3	0,2	0,0	0,0	0,0	
39 - 42	0,6	0,7	0,6	0,3	0,2	0,1	0,0	
42 - 45	2,2	2,0	2,3	1,8	0,8	0,5	0,0	
45 - 48	1,4	1,0	0,8	0,7	0,5	0,1	0,0	
Total	25,3	26,0	17,5	5,4	2,6	1,4	0,0	

TABLA 4 - Freqüência de respostas de saída de água, por indivíduo, a cada 3 horas dos períodos de exposição e recuperação, nas diferentes concentrações de cobre como CuSO₄. As barras hachuradas indicam as fases naturais dos períodos.

TEMPO DECORRIDO (HORAS)	CONCENTRAÇÕES DE COBRE (ppm)				
	0,000	0,001	0,004	0,016	0,062
0 - 3	1,0	0,6	0,1	0,0	0,0
3 - 6	1,1	1,7	0,2	0,0	0,0
6 - 9	0,9	0,5	0,7	0,0	0,0
9 - 12	0,6	0,7	0,6	0,0	0,0
12 - 15	0,5	0,5	0,6	0,0	0,0
15 - 18	0,4	0,6	0,1	0,0	0,0
18 - 21	0,8	0,3	0,2	0,0	0,0
21 - 24	0,7	0,7	0,4	0,0	0,0
24 - 27	0,8	0,4	0,5	0,1	0,0
27 - 30	0,7	0,4	0,4	0,2	0,0
30 - 33	0,5	0,5	0,3	0,3	0,3
33 - 36	1,0	0,8	0,4	0,3	0,1
36 - 39	0,7	0,8	0,8	0,6	0,1
39 - 42	1,2	0,5	0,4	0,4	0,2
42 - 45	0,7	1,2	0,9	0,4	0,1
45 - 48	0,7	0,4	0,7	0,1	0,0
Total	12,3	10,6	7,3	2,4	0,6

TABELA 5 - Tempo (min) de permanência fora da água, por indivíduo, a cada 3 horas dos períodos de exposição e recuperação, nas diferentes concentrações de cobre como $CuSO_4$. As barras hachuradas indicam as fases noturnas dos períodos.

TEMPO DECORRIDO (HORAS)	CONCENTRAÇÕES DE COBRE (ppm)						
	0,000	0,001	0,004	0,016	0,062	0,25	1,00
PERÍODO DE EXPOSIÇÃO							
0 - 3	7,5	4,5	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0
3 - 6	7,8	3,5	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0
6 - 9	15,5	13,0	22,5	0,0	0,0	0,0	0,0
9 - 12	22,5	24,3	12,4	0,0	0,0	0,0	0,0
12 - 15	11,5	14,3	15,6	0,0	0,0	0,0	0,0
15 - 18	7,8	8,6	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18 - 21	6,4	5,3	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0
21 - 24	8,8	3,3	3,2	0,0	0,0	0,0	0,0
PERÍODO DE RECUPERAÇÃO							
24 - 27	6,4	3,8	4,3	1,1	0,0	0,0	0,0
27 - 30	6,4	3,0	3,2	7,5	0,0	0,0	0,0
30 - 33	7,1	11,0	13,7	9,7	5,3	0,0	0,0
33 - 36	39,0	30,0	16,6	16,7	0,8	0,0	0,0
36 - 39	24,0	32,4	25,7	27,4	0,4	0,0	0,0
39 - 42	29,6	30,0	11,5	13,2	2,0	0,0	0,0
42 - 45	6,4	5,2	7,9	3,7	0,0	0,0	0,0
45 - 48	8,2	9,1	12,1	1,5	0,0	0,0	0,0
Total	214,6	201,3	152,8	80,8	8,9	0,0	0,0

OBS.: No caso de tempos superiores a 3 horas, estes foram computados no intervalo dentro do qual se daram as respostas de saída corrente.

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

	TEMPO (h) DECORRIDO	FAIXAS	CONCENTRAÇÕES DE COBRE (ppm)						
			0,000	0,001	0,004	0,016	0,062	0,25	1,00
PERÍODO DE EXPOSIÇÃO	0 - 6	A	10,4	4,3	3,3	0,0	0,0	0,0	0,0
		B	50,0	46,9	26,7	0,0	0,0	0,0	0,0
		C	2,7	4,0	1,7	0,0	0,0	0,0	0,0
		D	6,0	3,3	3,3	0,0	0,0	0,0	0,0
		E	3,8	5,3	7,1	0,0	0,0	0,0	0,0
		F	27,1	36,8	55,8	100,0	100,0	100,0	100,0
	6 - 12	A	16,2	8,3	14,2	0,0	0,0	0,0	0,0
		B	76,9	73,0	67,0	4,2	0,0	0,0	0,0
		C	0,0	3,3	1,2	0,8	0,0	0,0	0,0
		D	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0
		E	0,2	1,7	2,1	0,0	0,0	0,0	0,0
		F	6,7	13,6	15,1	95,0	100,0	100,0	100,0
	12 - 18	A	15,0	14,2	26,1	0,4	0,0	0,0	0,0
		B	83,0	79,2	68,4	10,8	0,0	0,0	0,0
		C	0,0	0,8	1,7	0,0	0,0	0,0	0,0
		D	0,3	0,8	0,5	0,4	0,0	0,0	0,0
		E	0,3	0,8	0,0	1,2	0,0	0,0	0,0
		F	1,4	4,2	3,2	87,2	100,0	100,0	100,0
18 - 24	A	13,5	10,0	12,2	0,4	0,0	0,0	0,0	
	B	60,4	52,6	51,4	2,0	0,0	0,0	0,0	
	C	3,6	0,8	2,8	0,8	0,0	0,0	0,0	
	D	2,8	2,5	2,8	0,0	0,0	0,0	0,0	
	E	1,1	0,8	5,0	3,3	0,0	0,0	0,0	
	F	18,6	33,3	25,8	93,5	100,0	100,0	100,0	
PERÍODO DE RECUPERAÇÃO	24 - 30	A	12,5	11,7	8,3	5,4	2,5	0,8	0,0
		B	67,5	52,8	64,3	59,6	7,5	5,0	0,0
		C	2,5	7,2	6,7	3,3	2,5	0,0	0,0
		D	3,3	5,6	2,5	3,3	2,0	1,3	0,0
		E	2,5	4,4	5,0	2,9	0,8	0,4	0,0
		F	11,7	18,3	13,3	25,5	84,5	92,5	100,0
	30 - 36	A	25,0	34,0	20,8	22,0	3,3	12,2	0,0
		B	74,2	61,0	77,9	76,7	57,8	36,7	0,0
		C	0,0	1,3	0,4	0,0	1,1	2,8	0,0
		D	0,0	2,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		E	0,4	0,7	0,4	0,0	0,0	2,2	0,0
		F	0,4	0,7	0,4	1,3	37,8	46,1	100,0
	36 - 42	A	27,9	30,9	36,2	20,4	15,0	8,7	0,0
		B	70,8	65,0	60,0	70,0	78,9	40,8	0,0
		C	0,4	1,7	0,0	1,3	0,5	2,4	0,0
		D	0,0	0,7	0,8	0,8	0,5	4,1	0,0
		E	0,0	0,0	0,8	0,8	1,1	0,0	0,0
		F	0,8	1,0	2,0	6,7	3,9	44,0	100,0
42 - 48	A	15,8	15,3	10,7	11,7	5,5	0,0	0,0	
	B	59,6	55,7	56,7	72,0	83,3	60,4	0,0	
	C	2,5	2,7	1,7	5,4	3,9	0,4	0,0	
	D	1,7	0,3	4,2	1,7	2,2	1,7	0,0	
	E	1,7	2,3	2,1	1,3	1,7	0,0	0,0	
	F	18,8	23,7	17,1	7,9	3,5	37,5	100,0	
total	A	17,0	16,1	17,4	7,5	3,3	2,7	0,0	
	B	67,8	60,8	59,3	36,9	28,4	17,8	0,0	
	C	1,5	2,7	2,0	1,5	1,3	0,7	0,0	
	D	1,8	1,9	1,8	0,8	0,5	0,9	0,0	
	E	1,3	2,0	2,8	1,2	0,4	0,3	0,0	
	F	10,6	16,5	16,7	52,1	66,1	77,6	100,0	

OBS.: (1) V. figura 2.

TABELA 7 - Determinação dos índices comportamentais de toxicidade da malucoída CuSO₄ em relação à categoria subida à superfície, através dos parâmetros (a) tempo decorrido até a primeira resposta e (b) frequência de respostas. CEC₅₀, concentração de efeito comportamental de 50%, número de concentrações testadas; n, número de sujeitos por concentração; |OBT. - ESP.|, diferença absoluta entre as percentagens obtidas e esperadas; P, probabilidade; V, graus de liberdade (n-2); X², qui-quadrado. (1)

PARÂMETRO	CONCENTRAÇÃO DE COBRE (ppm)	MEDIDAS DO PARÂMETRO	% OBTIDA	% ESPERADA	DIFERENÇA OBT. - ESP.	CONTRIBUIÇÃO PARA O X ²	ADEQUAÇÃO DA RETA	CEC ₅₀ (ppm)
tempo decorrido até a primeira subida à superfície	0 (controle)	0,0806	-	-	-	-	n = 20	
	0,001	0,0575	71,4	60	11,4	0,05	n = 5	
	0,004	0,0139	17,3	29	11,7	0,06	X ² = 3,62	0,0016 (3)
	0,016	0,0007	0,8	8,5	7,7	0,05	V = 3	
	0,062	0,0005	0,6	1,5	0,9	0,005	V = 3	
	0,25	0,0004	0,5	0,1	0,4	0,016	P > 0,05	
	1,00	-	-	-	-	-		
	0 (controle)	25,3	-	-	-	-	n = 20	
	0,001	26,0	97,4	92	5,4	0,045	n = 6	
	0,004	17,5	69,2	72	2,8	0,002	X ² = 4,40	0,0105 (4)
	0,016	5,4	21,3	40	18,7	0,14	V = 4	
	0,062	2,6	10,3	14	3,7	0,012	V = 4	
	0,25	1,4	3,3	3,3	2,5	0,02	P > 0,05	
	1,00	0,0	0,09	0,3	0,2	0,0012		

OBS.: (1) V. exemplo ilustrativo no anexo 4.
 (2) No parâmetro b, considerou-se o recíproco da média genotóxica do tempo decorrido (min) (V. tab. 2); no parâmetro b, o total acumulado, por indivíduo, ao final de 48 horas de teste (24 h de exposição e 24 h de recuperação).
 (3) V. figura 8.
 (4) V. figura 9.

TABELA 8 - Determinação dos índices comportamentais de toxicidade CuSO₄ em relação à categoria saúde da água, através dos parâmetros (a) frequência de respostas e (b) tempo de permanência fora de água. CEC50, concentração de efeito comportamental da 50% m, número de concentrações testadas; n, número de sujeitos por concentração; |OBT. - ESP.|, diferença absoluta entre as percentagens obtidas e esperadas; p, probabilidade; v, graus de liberdade (n - 2); X², qui-quadrado. (1)

PARÂMETRO	CONCENTRAÇÃO DE COBRE (ppm)	MÉDIAS DO PARÂMETRO (2)	% OBTIDA	% ESPERADA	DIFERENÇA OBT. - ESP.	CONTRIBUIÇÃO PARA O X ²	ADQUAÇÃO DA RETA	CEC50 (ppm)
frequência de respostas	0 (controle)	12,3	-	-	-	-	n = 20	
	0,001	10,6	86,2	92	5,8	0,05	m = 5	
	0,004	7,3	48,0	62	14	0,06	X ² = 2,54	0,006 (3)
	0,016	2,4	19,5	22	2,5	0,003	v = 3	
	0,062	0,6	4,9	3	1,9	0,014	p > 0,05	
	0,25	0,0	0,03	0,1	0,07	0,0		
	1,00	0,0	-	-	-	-		
tempo de permanência fora da água	0 (controle)	214,8	-	-	-	-	n = 20	
	0,001	201,3	93,8	94	1,8	0,005	m = 5	
	0,004	153,8	71,2	68	3,2	0,005	X ² = 1,67	0,007 (4)
	0,016	80,8	37,6	25	12,6	0,07	v = 3	
	0,062	8,9	4,1	3	1,1	0,0035	p > 0,05	
	0,25	0,0	0,04	0,15	0,1	0,0		
	1,00	0,0	-	-	-	-		

OBS.: (1) V. exemplo ilustrativo no anexo A.
 (2) No parâmetro B, considerou-se o total acumulado de respostas por indivíduo, ao final de 48 horas de teste (24 h de exposição e 24 h de recuperação); no parâmetro D, considerou-se o tempo total (min) por indivíduo.
 (3) V. figura 10.
 (4) V. figura 11.

TABCLA 9 - Determinação do índice comportamental de toxidez do molusculicida CuSO₄ em relação à categoria posição do indivíduo no espaço vertical, através do parâmetro de distribuição especial. CEC50, concentração de efeito comportamental de 50%; m, número de concentrações testadas; n, número de sujeitos por concentração; |OBT. - ESP.|, diferença absoluta entre as percentagens obtidas e esperadas; P, probabilidades; v, graus de liberdade (m - 2); χ^2 , qui-quadrado. (1)

PARÂMETRO	CONCENTRAÇÃO DE COBRE (ppm)	MÉDIAS DO(2) PARÂMETRO	% OBTIDA	% ESPERADA	DIFERENÇA OBT. - ESP.	CONTRIBUIÇÃO PARA O χ^2	ADEQUAÇÃO DA RETA	CEC50 (ppm)
Q (controle)		84,8	-	-	-	-		
distribuição	0,001	76,9	90,7	95,5	4,8	0,05	n = 20	
especial	0,004	76,7	90,4	84	6,4	0,03	m = 6	
dos	0,016	44,4	53,4	62	9,6	0,035	$\chi^2 = 4,40$	0,029 (3)
Indivíduos	0,062	31,7	37,4	32	5,4	0,014	v = 4	
	0,25	20,5	24,2	13	11,2	0,09	P > 0,05	
	1,00	0,0	1,2	3,5	2,3	0,001		

Obs.: (1) V. exemplo ilustrativo no anexo 4.
 (2) Proporção (%) do indivíduo no terço superior do equário (faixas A, B e C da tabela 6); média das medidas efetuadas de 30 em 30 minutos no total das 48 horas de teste (24 h de exposição e 24 h de recuperação).
 (3) V. figura 12.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADES, C., 1976 - A Observação do comportamento em situações experimentais. Ci. e Cult., 28 (1) : 25-34.
- ANDRADE, R.M., 1959 - Ecologia. Rev. Bras. Mal. D. Trop., 11 (2-3) : 171-217
- BARBOSA., F.S., 1970 - In: PRATA, A e ABOIM, ed. - II Simpósio sobre Esquistossomose. Ministério da Marinha, Diretoria de Saúde e Universidade Federal da Bahia, Clínica de Doenças Tropicais e Infecciosas. p. 351.
- BARLOW, C.H., 1935 - Further studies of revival, after drying, of the snail hosts of the human schistosomes of Egypt. Am. J. Hyg., 22 (2) : 376-391.
- BEESTON, D.C. & MORGAN, E., 1979 - A crepuscular rhythm of locomotor activity in the freshwater prosobranch, Melanoides tuberculata (Müller). Anim. Behav., 27 (1) : 284-291.
- BERMANT, G. & ALCOCK, J., 1973 - Perspective on animal behavior
In BERMANT, G., ed. - Perspective on Animal Behavior. Scott, Foresman & Co., Nova Iorque. p. 1-47.
- BRUAUX, P. & GILLET, J., 1961 - Comparaison de l'activité de divers molluscicides em lanoratoire. Bull. W. H.O., 25 (5) : 519-523.
- CAMARCO, S. de, 1977 - In VI Conferência Nacional de Saúde, Brasília.
- CHARLES, G.H., 1966 - Sense organs (less cephalopods). In WILBUR, K.M. & YONGE, C.M., eds. - Physiology of Mollusca. Academic Press, Nova Iorque e Londres. vol. 2, p. 455-521.

- CHENG, T. C. & SULLIVAN, J. T., 1973a - A comparative study of the effects of two copper compounds on the respiration and survival of Biomphalaria glabrata (Mollusca : Pulmonata). Comp. Gen. Pharmacol., 4 : 315-320.
- CHENG, T. C. & SULLIVAN, J. T., 1973b - The effect of copper on the heart-rate of Biomphalaria glabrata (Mollusca : Pulmonata). Comp. Gen. Pharmacol., 4 : 37-41.
- CHERNIN, E. - Behavior of Biomphalaria glabrata and other snails in a thermal gradient. J. Parasitol., 53 (6) : 1233-1240.
- CRIDLAND, C. C., 1967 - Resistance of Bulinus (Physopsis) globosus, Bulinus (Ph) africanus, Biomphalaria pfeifferi and Lymnaea natalensis to experimental desiccation. Bull. W.H.O., 36 (3) : 507-513.
- CUNHA, W.H.A., 1975 - O estudo etológico do comportamento animal. Ci. e Cult., 27 (3) : 262-268.
- CUNHA, W.H.A., 1976 - Alguns princípios de categorização, descrição e análise do comportamento. Ci. e Cult., 28 (1) : 15-24.
- DENENBERG, V. H. & BANKS, E.M., 1969 - Techniques of measurement and evaluation. In : HAFEZ, E.S.E., ed. - The Behavior of Domestic Animals. Baillière, Tindall & Cassell, Londres. p. 192-233.
- DANIEL, W.W., 1974 - Biostatistics: A Foundation for Analysis in the Health Sciences. John Wiley & Sons, Nova Iorque.

- DUNCAN, J., 1974 - A review of the development and application of molluscicides in schistosomiasis control. In CHENG, T.C., ed. - Molluscicides in Schistosomiasis Control. Academic Press, Nova Iorque e Londres. P. 9-40.
- ETGES, F.J., 1963a - Effects of some molluscicidal chemicals on chemokinesis in Australorbis glabratus. Am. J. Trop. Med. Hyg., 12 (4) : 701-704.
- ETGES, F.J., 1963b - Experimental studies on chemoreception and klinokinetc responses of Australorbis, Bulinus, and Helisoma to chemical stimulation. Am. J. Trop. Med. Hyg., 12 (4) : 686-695.
- ETGES, F.J. & GILBERTSON, D.E., 1966 - Repellent action of some chemical molluscicides on schistosome vector snails. Am. J. Trop. Med. Hyg., 15 (4) : 618-624.
- FRAENKEL, G.S. & GUNN, D.L., 1940 -- The Orientation of Animals. Clarendon Press, Oxford.
- GANS, C., 1966 - An inexpensive arrangement of movie camera and electronic flash as a tool in the study of animal behaviour. Anim. Behav., 14 (1) : 11-12.
- GILLET, J. & BRUAUX, P., 1961 - Essais en laboratoire des nouveaux molluscicides Bayer 73 et ICI 24223. Bull. W. H.O. 25 (5) - 509-517.
- GUIRETTI, F. & GUIRETTI.MAGALDI, A., 1975 - Respiration. In FRETER, V. & PEAKE, J., eds. - Pulmonates: Volume 1 - Functional Anatomy and Physiology. Academic Press, Nova Iorque e Londres. p. 33-52.
- HARRY, H.W. & ALDRICH, D.V., 1963 - The distress syndrome in Taphius glabratus (Say) as a reaction to toxic

- concentrations of inorganic ions. Malacologia, 1 (2) : 283-289.
- HEEG, J., 1977 - Oxygen consumption and the use of metabolic reserves during starvation and aestivation in Bulinus (Physopsis) africanus (Pulmonata: Planorbidae). Malacologia, 16 (2) : 549-560.
- HINDE, R.A., 1970 - Animal Behaviour, a Synthesis of Ethology and Comparative Psychology McGraw-Hill, Nova Iorque.
- HOPF, H.S & MULLER, 1962 - Laboratory breeding and testing of Australorbis glabratus for molluscicidal screening. Bull. W.H.O., 27 (5) : 783-789.
- HUTT, S.J. & HUTT, C., 1970 - Direct Observation and Measurement of Behavior. Charles Thomas, Nova Iorque.
- JURBERG, P., 1977 - Contribuição ao conhecimento da conchilologia, anatomia, dados biológicos e aspectos comportamentais de Thaumastus (Thaumastus) taunaisii (Férussac, 1822) (mollusca, Gastropoda, Bulimulidae). Tese de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- JURBERG, P., PIERI, O. S. & RAYMUNDO, J.S., em prep. - Estudos sobre o comportamento dos planorbídeos: III. penetração em buracos como meio de proteção contra o ressecamento.
- LISON, L, 1976 - Estatística Aplicada a la Biología Experimental. Editorial Universitaria, Buenos Aires.
- LITCHFIELD, J. T. & WILCOXON, F., 1949 - A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J. Pharmacol. Exp. Ther., 96 (1), 99-113.

- MALEK, E. & CHENG, T.C., 1974 - Medical and Econcmical Malacology. Academic Press, Nova Iorque.
- MEYERS, L.S. & GROSSEN, N.E., 1974 - Behavioral Research : Theory, Procedure and Design. W. H. Freeman, São Francisco.
- MICHAELIS, A.R., 1955 - Research Films in Biology, Anthropology, Psychology and Medicine. Academic Press, Nova Iorque.
- NEWELL, P.F., 1965 - Time lapse ciné recording the soil surface activity of slugs. Anim. Behav., 13 (4) : 583.
- NOLAN, M.O., BOND, H.W. & MANN, E.R., 1953 - Results of laboratory screening tests of chemical compounds for molluscicidal activity: I. phenol and related compounds. Am. J. Trop. Med. Hyg., 2 (4): 716-752.
- OLIVIER, L., 1956 - Observations on vectors of schistosomiasis mansoni kept out of water in the laboratory. I.J. Parasitol., 42 (1) : 137-146.
- OLIVIER, L. & BARBOSA, F.S., 1956 - Observations on vectors of Schistosomiasis mansoni kept out of water in the laboratory. II. J. Parasitol., 42 (2) : 277-286.
- PARAENSE, W.L., 1957 - Apertural Lamellae in Australorbis glabratus. Proc. Malacol. Soc. London, 32 (4) : 157-179.
- PARAENSE, W.L., 1972 - Fauna planorbídica do Brasil. In: IACAZ, C.S. & col., ed. - Introdução à Geografia Médica do Brasil. Eds. Blucher e Universidade de São Paulo, São Paulo. p. 213-239.
- PARAENSE, W.L., PEREIRA, O. e PINTO, D.B., 1955 - Um aspecto da ecologia do Australorbis glabratus que favorece a reinfestação dos criadouros. Rev. Ser. Esp. Saúde Públ., 7 (2) : 573-581.

- PAULINI, E., 1965 - Estado atual dos conhecimentos sobre moluscidas. Rev. Bras. Mal. D. Trop., 17 (2) : 355-362.
- PELSENEER, P., 1935 - Essay d'Éthologie Zoologique d'après l'Étude des Molusques. Palais des Académies, Bruxelles.
- PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A & DIAS, G., 1955 - Experiências de laboratório sobre a possibilidade de os planorbídeos viverem dentro da lama ou nela se enterrarem na ocasião do tratamento com planorbicidas. Rev. Bras. Malarid. D. Trop., 7 (3) : 375-383.
- PIERI, O.S., JURBERG, P. & RAYMUNDO, J.S., 1977 - Estudos sobre o comportamento dos planorbídeos : I. uma técnica de observação e registro comportamental por cinematografia. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, a sair.
- PIERI, O. RAYMUNDO, J.S. & JURBERG, P., 1977 - Estudos sobre o comportamento dos planorbídeos : II. enterramento de Biomphalaria glabrata (Say, 1818) como meio de proteção contra o ressecamento. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, a sair.
- PIMENTEL, D. & WHITE, P.C., 1959 - Biological environment and habits of Australorbis glabratus. Ecology, 40 (4) : 541-550.
- PIMENTEL-SOUZA, F., FERNANDES-SOUZA, N., SHALL, V.T. & COELHO, P.M.Z., 1976a - Comportamento elementar do caramujo Biomphalaria glabrata. I) disposição espacial da concha. Rev. Bras. Pesq. Méd. Biol. , 9 (2-3) : 117-122.
- PIMENTEL-SOUZA, F., SHALL, V.T., FERNANDES-SOUZA, N. & COELHO, P.M.Z., 1976b - Comportamento elementar do caramujo Biomphalaria glabrata. II) localização e tamanho

da massa cefalopodal exposta. Rev. Bras. Pesq. Méd. Biol., 9 (2-3) : 123-127.

- PIMENTEL-SOUZA, F., 1977 - Alguns aspectos do comportamento elementar do caramujo Biomphalaria glabrata (Say). Tese de mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- REY, L., 1956 - Contribuição para o Conhecimento da Morfologia, Biologia e Ecologia dos Planorbídeos Brasileiros Transmissores da Esquistossomose. Serviço Nacional de Educação Sanitária, Rio de Janeiro.
- REY, L., 1973 - Parasitologia. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- RICHARDS, C.S., 1967 - Estivation of Biomphalaria glabrata (Basommatophora: Planorbidae). Am. J. Trop. Med. Hyg., 16 (6) : 797-802.
- RICHARDS, C.S., 1968 - Aestivation of Biomphalaria glabrata (Basommatophora: Planorbidae) - genetic studies. Malacologia, 7 (1) : 109-116.
- RITCHIE, L.S., 1973 - Chemical control of snails. In: ANSARI, N., ed., - Epidemiology and Control of Schistosomiasis (Bilharziasis). S. Karger, Basel. p. 458-532.
- RODRIGUES, A., 1976 - A Pesquisa Experimental em Psicologia e Educação. Vozes, Petrópolis.
- SCHALL, V.T. BARBOSA, N.D.C., SCETTINO-SOUZA, M., LAUTNER-JÚNIOR, R., PAUVA, E.G. & PIMENTEL-SOUZA, F., 1979 - Influência do esquema de iluminação sobre o comportamento do caramujo Biomphalaria glabrata. Suplemento de Ci. e Cult., 31 (7) : 753.
- SIMPSON, A.W., THOMAS, J.D. & TOWNSEND, C.R., 1973 - Social behavior in the freshwater pulmonate snail Biomphalaria glabrata. Behav. Biol., 9 (6) : 713-740.

- SLATER, P.J.B., 1978 - Data collection. In COLGAN, P.W., ed.
- Quantitative Ethology. John Wiley & Sons, Nova
Iorque. p. 7-24.
- SODEMAN, W.A., Jr., 1973 - The influence of light on Biomphala
ria glabrata. Nautilus, 87 (4) : 103-106.
- SODEMAN, W.A., Jr. & DOWDA, M., 1974 - Behavioral responses of
Biomphalaria glabrata. Physiol. Zool., 47 (3): 198-206
- SULLIVAN, J.T. & CHENG, T.C., 1976 - Comparative mortality
studies on Biomphalaria glabrata (Mollusca: Pulmonata)
exposed to copper internally and externally. J. Invert.
Pathol., 28 (2) : 255-257.
- TAVOLGA, W.N., 1969 - Principles of Animal Behavior. Harper &
Row. Nova Iorque.
- TINBERGEN, N., 1965 - Behaviour and natural selection. In
MOORE, J.A., ed. - Ideas in Modern Biology. Nat. Hist.
Press, Nova Iorque, p. 521-542.
- TOLEDO, J.V., MONTEIRO DA SILVA, C.S., BULHÕES, M.S., PAES LEME,
L.A., SILVA NETTO, J.A. da & GILBERT, B., 1976 - Snail
control in urban sites in Brazil with slow-release
hexabutyl-distannoxane and pentachlorophenol. Bull. W.
H.O., 54 (3) : 421-425.
- TOWNSEND, C.R., 1973 - The food-finding orientation mechanism
of Biomphalaria glabrata (Say). Anim. Behav., 21 (3) :
544-548.
- TOWNSEND, C.R., 1974 - Mucus trail following by the snail Biom-
phalaria Glabrata (Say). Anim. Behav., 22 (1): 170-177.
- TOWNSEND, C.R., 1975 - Strategic aspects of time allocation in
the ecology of a freshwater pulmonate snail. Oecologia,
19 (1): 105-115.

- UEMURA, K., 1973 - Statistical methods. In ANSARI, N., ed.,
- Epidemiology and Control of Schistosomiasis
(Bilharziasis). S. Karger, Basel. p. 705-739.
- VELLOSO, H.P., 1953 - Novo método de aplicação de molusquicida
no controle da esquistossomíase. Rev. Assoc. Méd. Bra-
sil., 1 (2) : 151-155.
- VON BRAND, T., McMAHON, P. & NOLAN, M.O., 1957 - Physiological
observations on starvation and desiccation of the snail
Australorbis glabratus. Biol. Bull., 113 (1): 89-102.
- WILLOWS, A.O.D., 1973 - Learning in gastropod mollusks. In
CORNING, W.C. DYAL, J.A. & WILLOWS, A.O.D., eds.
- Invertebrate Learning: Volume 2 - Arthropods and
Gastropod Mollusks. Plenum Press, Nova Iorque. p. 187-
274.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1965 - Molluscicide screening and
evaluation. Bull. W.H.O., 33 (4) : 567-581.