



Rita Sofia Garrido Paulo Gabriel

MONITORIZAÇÃO E CONTROLO DA AMÊIJOA
ASIÁTICA, *Corbicula Fluminea*
(Müller, 1774)

Setembro 2011



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

*Monitorização e Controlo da Amêijoa
asiática, Corbicula fluminea*

Rita Sofia Garrido Paulo Gabriel

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química
Área de especialização em Biosistemas

Júri:

Presidente: Professor Doutor Jorge Rocha

Orientadora: Doutora Raquel Costa

Vogais: Professor Doutor Lino Oliveira

Doutora Joana Pereira

Coimbra

12 de Setembro 2011

Agradecimentos

A elaboração da dissertação é um marco na vida académica e não podia deixar de agradecer a todos os que me acompanharam e impulsionaram neste percurso.

Em primeiro lugar queria agradecer às pessoas que mais me acompanharam desde que sou gente, a minha família. Mãe, Pai, Catarina, Avó Cremilde, Tio Tó, graças a vós cresci num lar onde sempre me senti amada e acarinhada e que sempre foi o meu porto de abrigo.

Quero também agradecer ao meu namorado Bica por tanto que é impossível enumerar mas por principalmente por estar sempre presente e por ter sempre a palavra certa para me animar.

Um agradecimento especial à minha orientadora, Pof. Doutora Raquel Costa, pela excepcional orientação e por ter sido incansável na fase final deste trabalho.

Agradeço ainda à Doutora Joana Pereira pelo apoio, preocupação e orientação no trabalho em Aveiro e pelas conversas informais mas muito importantes durante as viagens. E aos mestrados Inês Rosa e João Gomes também pelas conversas informais que sempre se revelaram úteis nalgum ponto deste trabalho.

Aos investigadores do CESAM da Universidade de Aveiro em especial ao Doutor Fernando Gonçalves e ao Doutor Bruno Nunes.

Resumo

A amêijoia asiática, *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) é um molusco bivalve de água doce e é uma das espécies invasoras de ecossistemas aquáticos mais difundida no mundo. Para além dos efeitos nefastos nos ecossistemas, esta peste é conhecida pela sua acção bioincrustante nas indústrias hidrodependentes. A introdução desta espécie em Portugal data de 1980, no entanto, existe um largo desconhecimento acerca da peste por parte das indústrias nacionais e a monitorização das fontes de água primárias será crucial para a minimização da sua dispersão e impactes.

Esta tese teve dois objectivos. Primeiro, sistematizar informação acerca da monitorização da amêijoia asiática para fins de controlo em ambiente industrial. Depois, contribuir para a criação de soluções de controlo inovadoras através da avaliação e interpretação da toxicidade de misturas de potenciais agentes de controlo químico.

No âmbito da primeira componente do trabalho, foi elaborado um texto que pretende funcionar como um auxiliar para as indústrias nacionais, dando a conhecer as características de *C. fluminea* e ajudando no projecto de um sistema de monitorização de *C. fluminea*.

No âmbito da segunda componente deste trabalho, foi testado o potencial de três combinações binárias de poli(cloreto de dimetildialilamónio) (polyDADMAC) com cloreto de potássio, niclosamida e dimetoato para o controlo da amêijoia asiática, realizando testes de toxicidade à escala laboratorial. O polyDADMAC foi mantido como elemento comum nas misturas de forma a explorar diferentes tipos de interacções e avaliar até que ponto o desempenho do tratamento combinado pode ser melhorado manipulando o modo de acção dos químicos individuais. Destes estudos concluiu-se que a niclosamida e o dimetoato são tóxicos para a amêijoia asiática na gama de concentrações testadas, podendo eventualmente equacionar-se a sua aplicação individual em programas de controlo. No geral, o efeito conjunto dos compostos nas misturas testadas é antagonista e, por isto, não são promissoras para o controlo da amêijoia asiática em ambiente industrial. Com o objectivo de auxiliar a compreensão do carácter antagonista dos químicos foi efectuado um estudo preliminar do modo de actuação do polyDADMAC e do dimetoato em *C. fluminea* bem como da sua potencial interacção. Este estudo indica que o polyDADMAC não afecta nem a capacidade de osmorregulação das células nem interage com a actividade de enzima acetilcolinesterase da amêijoia asiática. Este estudo confirma ainda que o dimetoato inibe a actividade da enzima acetilcolinesterase.

Abstract

The freshwater bivalve *Corbicula fluminea* (Müller, 1774), commonly known as the Asian clam, is one of the most invasive species of aquatic systems around the world. In addition to the adverse effects on ecosystems, this pest is well-known for its biofouling action on freshwater-dependent industries. While the introduction of this species in Portugal dates back to 1980, there is still a lack of knowledge about the species amongst national industries and the monitoring of primary water sources will be crucial to minimize the pest dispersion and impacts.

This thesis has two main objectives: (i) systematize information about the Asian clam monitoring for control purposes in industrial environments; (ii) contribute to the development of innovative control solutions through the evaluation and interpretation of the toxicity of mixtures of chemical control agents.

Regarding the first component of the study, a text was prepared to assist national companies to project monitoring systems for *C. fluminea*.

The second component of this study was to test the potential of three binary mixtures of poly(diallyldimethyl-ammonium chloride) (polyDADMAC) combined with potassium chloride, niclosamide and dimethoate to control the Asian clam, by performing toxicity tests at the laboratory scale. PolyDADMAC was kept as a common ingredient in the three mixtures in order to explore different types of interactions and assess the extent to which the performance of the combined treatment can be improved by manipulating the mode of action of individual chemicals. These studies showed that niclosamide and dimethoate are toxic to the Asian clam, and their individual application in control programs can be considered. The results also showed that, in general, the combined effect of the compounds is antagonist and, therefore, the mixtures are not promising for control of Asian clams in industrial environment. In order to understand the antagonist nature of the chemicals, a preliminary study was conducted to elucidate the modes of action of polyDADMAC and dimethoate and their interactions in *C. fluminea*. This study indicates the polyDADMAC neither affects the ability of osmotic regulation of the cells nor interacts with the activity of the enzyme acetylcholinesterase. This study also indicates that dimethoate inhibits the activity of the enzyme acetylcholinesterase.

Índice

| | |
|---|----|
| Capítulo I– Introdução e enquadramento | 1 |
| Capítulo II – Biologia da amêijoia asiática | 4 |
| 1. Introdução | 4 |
| 2. Morfologia e anatomia | 4 |
| 3. Reprodução e ciclo de vida..... | 6 |
| 3.1. Reprodução | 6 |
| 3.2. Ciclo de Vida..... | 6 |
| 4. Habitat da amêijoia asiática | 7 |
| 5. Distribuição..... | 8 |
| 6. Mecanismos de dispersão | 9 |
| Capítulo III– Monitorização da amêijoia asiática em contexto industrial | 10 |
| 1. Introdução..... | 10 |
| 2. Tipos de monitorização | 10 |
| 3. Monitorização da corrente principal | 11 |
| 3.1. Monitorização de velígeras | 11 |
| 3.2. Monitorização de juvenis e adultos | 18 |
| 4. Monitorização paralela | 20 |
| 5. Registos | 21 |
| 6. Conclusão | 21 |
| Capítulo IV – Avaliação do potencial de misturas binárias de químicos para o controlo da amêijoia asiática | 22 |
| 1. Introdução..... | 22 |
| 2. Materiais e métodos | 24 |
| 2.1. Desenho experimental..... | 24 |
| 2.2. Recolha e manutenção dos organismos de teste..... | 25 |
| 2.3. Compostos químicos..... | 25 |

| | | |
|---|--|----|
| 2.4. | Testes de toxicidade aguda dos compostos químicos individuais | 25 |
| 2.5. | Testes da toxicidade aguda das combinações binárias | 27 |
| 2.6. | Análise dos dados | 28 |
| 3. | Resultados..... | 30 |
| 3.1. | Testes da toxicidade aguda dos compostos químicos individuais | 30 |
| 3.2. | Testes da toxicidade aguda das combinações binárias | 32 |
| 4. | Discussão | 39 |
| 5. | Conclusões e trabalho futuro | 40 |
| Capítulo V – Estudo preliminar da acção conjunta de polyDADMAC e dimetoato na amêijoia asiática | | 41 |
| 1. | Introdução..... | 41 |
| 2. | Materiais e métodos | 42 |
| 2.1. | Recolha e manutenção dos organismos de teste..... | 42 |
| 2.2. | Compostos químicos..... | 42 |
| 2.3. | Exposição dos organismos de teste aos químicos | 42 |
| 2.4. | Determinação de parâmetros bioquímicos..... | 44 |
| 2.5. | Análise estatística | 45 |
| 3. | Resultados..... | 45 |
| 3.1. | Efeitos no modo de actuação do polyDADMAC (hipótese 1): quantificação do teor de água..... | 45 |
| 3.2. | Efeitos no modo de actuação do dimetoato (hipótese 2): quantificação da actividade da acetilcolinesterase..... | 46 |
| 4. | Discussão | 47 |
| 5. | Conclusões e trabalho futuro | 47 |
| Capítulo VI – Conclusões e trabalho futuro | | 49 |
| Bibliografia | | 51 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura I.1 – Mapa da estrutura da tese..... | 3 |
| Figura II.1 – Aspecto exterior da amêijoia asiática (<i>C. fluminea</i>)..... | 5 |
| Figura II.2 – a) Interior da valva direita da amêijoia asiática, <i>C. fluminea</i> . b) Lado direito da <i>C. fluminea</i> com valva direita e manto removido. (Adaptado de: Fox R. , 2006) | 5 |
| Figura II.3 – Ciclo de vida da <i>C. fluminea</i> (Mackie & Claudi, 2010)..... | 7 |
| Figura II.4 – a) Distribuição da <i>C. fluminea</i> na América do Norte (dados de 2009; (Mackie & Claudi, 2010)). b) Distribuição da <i>C. fluminea</i> em Portugal (dados de 2010; (Rosa I., et al., 2011))..... | 9 |
| Figura III.1 – Amostradores de plâncton que podem ser usados na recolha de larvas de <i>C. fluminea</i> : (a) Armadilha Schindler-Patalas, b) Rede de plâncton cónica. | 11 |
| Figura III.2 – Redes de plâncton mais utilizada: a) rede de <i>Student</i> ; b) rede de <i>Wisconsin</i> | 12 |
| Figura III.3 – Recolha de amostras usando uma rede de plâncton arrastada na direcção vertical (Crosier & Molloy, 2002). | 13 |
| Figura III.4 – Recolha de amostras usando uma rede de plâncton arrastada em direcção horizontal (Crosier & Molloy, 2002). | 14 |
| Figura III.5 – Recolha de amostras usando uma rede de plâncton mediante arraste com bomba de água (Crosier & Molloy, 2002). | 15 |
| Figura III.6 – Diagrama de microscópio adaptado com filtros polarizantes (Johnson, 1995). | 16 |
| Figura III.7 – Aspecto de velíferas de <i>Dreissena polymorpha</i> observadas ao microscópio em condições de luz polarizada (Crosier & Molloy, 2002). | 17 |
| Figura III.8 – Dragas para amostragem de sedimento: a) Draga de Ekman (Hoskin Scientific, 2003); b) Draga Ponar (Rickly Hydrological Company, 1997)..... | 18 |
| Figura III.9 – Modo de funcionamento de uma draga de Ekman (Charusombat & Sabalowsky, 1997)..... | 19 |
| Figura IV.1 – Montagem experimental dos testes de toxicidade. | 26 |
| Figura IV.2 – Avaliação da mortalidade: a) amêijoia asiática com concha aberta e sífões estendidos; b) análise da resistência da amêijoia asiática à abertura da concha com uma agulha. | 27 |
| Figura IV.3 – Isobograma clarificando a terminologia usada para descrever a acção conjunta dos químicos..... | 29 |

Figura IV.4 – Curvas dose-resposta para a *C. fluminea* exposta a: a) polyDADMAC, b) Cloreto de potássio, c) Niclosamida e d) Dimetoato. Os pontos representam dados experimentais (média ± desvio padrão) e as linhas modelos dose-resposta obtidos por análise Probit (valores $p < 0.001$ para polyDADMAC, cloreto de potássio e dimetoato e $p = 0.122$ para niclosamida). 31

Figura IV.5 – Dados dose-resposta para as formulações de polyDADMAC com cloreto de potássio. Os pontos referem-se aos dados experimentais (média ± desvio padrão) e as linhas representam modelos dose-resposta obtidos por análise Probit (valores $p < 0.001$). 32

Figura IV.6 – Comparação das respostas produzidas pelas misturas de polyDADMAC e cloreto de potássio com as que seriam esperadas no caso de os químicos serem aplicados individualmente nas concentrações a que estão presentes nas misturas: a) formulação LC10; b) formulação LC50. Para facilitar a comparação, as concentrações são apresentadas em termos de níveis de dosagem de 1 a 12, que, no caso das misturas, correspondem às concentrações 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024 e 2048 mg/L, respectivamente. 33

Figura IV.7 – Isoblograma referente à toxicidade das combinações estudadas para um nível de resposta de 50%. Os pontos referem-se aos dados experimentais e as linhas representam as acções conjuntas 34

Figura IV.8 – Dados dose-resposta para as formulações de polyDADMAC com niclosamida. Os pontos referem-se aos dados experimentais (média ± desvio padrão) e as linhas representam modelos dose-resposta obtidos por análise Probit (valores $p < 0.001$). 35

Figura IV.9 – Comparação das respostas produzidas pelas misturas de polyDADMAC e niclosamida com as que seriam esperadas no caso de os químicos serem aplicados individualmente nas concentrações a que estão presentes nas misturas: a) formulação LC10; b) formulação LC50. Para facilitar a comparação, as concentrações são apresentadas em termos de níveis de dosagem de 1 a 12, que, no caso das misturas, correspondem às concentrações 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024 e 1340 mg/L, respectivamente. 36

Figura IV.10 – Dados dose-resposta para as formulações de polyDADMAC dimetoato. Os pontos referem-se aos dados experimentais (média ± desvio padrão) e as linhas representam modelos dose-resposta obtidos por análise Probit (valores $p < 0.001$). 37

Figura IV.11 – Comparação das respostas produzidas pelas misturas de polyDADMAC e dimetoato com as que seriam esperadas no caso de os químicos serem aplicados individualmente nas concentrações a que estão presentes nas misturas: a) formulação LC10; b) formulação LC50. Para facilitar a comparação, as concentrações são apresentadas em termos de níveis de dosagem de 1 a 12, que, no caso das misturas,

| | |
|--|----|
| correspondem às concentrações 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024 e 2048 mg/L, respectivamente. | 38 |
| Figura V.1 – Montagem experimental no âmbito do estudo dos modos de acção do polyDADMAC e dimetoato e das suas interacções. | 43 |
| Figura V.2 – Valores do teor de água corporal em percentagem (Média ± desvio padrão). | 45 |
| Figura V.3 – Valores da actividade da acetilcolinesterase (Média ± desvio padrão)... | 46 |

Índice de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela IV.1 – Características dos compostos químicos testados. | 25 |
| Tabela IV.2 – Composição das formulações testadas. Para mais detalhes na definição das porporções dos componentes individuais, ver secção 2.1. | 28 |
| Tabela IV.3 – Valores de LC ₁₀ e LC ₅₀ e respectivos intervalos de confiança a 95% (obtidos por análise Probit) para os compostos químicos estudados (valores p < 0.001 para polyDADMAC, cloreto de potássio e dimetoato e p = 0.122 para niclosamida). | 31 |
| Tabela V.1 – Tratamentos efectuados no âmbito do estudo dos modos de acção do polyDADMAC e dimetoato e das suas interacções. | 43 |

Capítulo I – Introdução e enquadramento

A *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) é um molusco bivalve de água doce pertencente à família *Corbiculidae* e é uma das espécies invasoras de ecossistemas aquáticos mais difundida. Esta espécie, muitas vezes denominada por amêijoia asiática, é originária do sudeste asiático e tem vindo a dispersar-se por todo o mundo ao longo do último século (Darrigran, et al., 2002; Sousa, et al., 2008). Actualmente, pode ser encontrada no continente americano (McMahon R., 2000) e em grande parte da Europa (Bij de Vaate & Greijdanus-Klaas, 1990; Araujo, et al., 1993; Bij de Vaate & Hulea, 2000; Aldridge & Müller, 2001), incluindo Portugal, onde está presente em todas as regiões hidrográficas com excepção da dos rios Cávado, Ave e Leça (Rosa I., et al., 2011). O sucesso adaptativo desta espécie deve-se sobretudo à sua resistência a diferentes ambientes, tolerância a diferentes substratos, rápido crescimento e maturidade sexual precoce (Graney, et al., 1980; McMahon R., 1982).

A amêijoia asiática tem uma grande capacidade de filtração, tendo sido sugeridos valores superiores a $1 \text{ L h}^{-1} \text{ indivíduo}^{-1}$ (Way, et al., 1990; Silverman, et al., 1995), e pode atingir densidades de centenas de milhares de indivíduos por metro quadrado, tornando-se num dos principais consumidores de fitoplâncton (McMahon R., 2000) com consequentes alterações da comunidade de zooplâncton do local invadido. Assim sendo, a sua introdução num novo local representa uma séria ameaça tanto à biodiversidade como à função do ecossistema, com consequências para a cadeia alimentar, ciclos biogeoquímicos e diversidade e abundância de bivalves nativos (Araujo, et al., 1993; Williams, et al., 1993; Strayer, 1999).

Para além dos efeitos nefastos nos ecossistemas, esta peste causa também problemas significativos em contexto industrial – as unidades utilizadoras de água proveniente de fontes infestadas tendem a verificar bioincrustação dos seus equipamentos e tubagens. Apesar da fase larvar desta espécie ser muito curta, as pediveligeras ($\sim 200 - 250 \mu\text{m}$) e os juvenis ($< 5 \text{ mm}$) entram nas instalações através dos sistemas de captação de água, passam através de crivos e tendem a acumular-se em zonas com caudais inferiores a $1.2 - 1.5 \text{ m/s}$ (Eng, 1979; Neitzel, et al., 1984; Page, et al., 1986).

A acumulação de conchas de bivalves adultos reduz a velocidade de escoamento, e promove a acumulação de lama e areia onde as amêijoas se enterram (Smithson, 1986).

Os adultos estabelecidos no sistema crescem rapidamente e, ao serem arrastados, tapam aberturas de pequeno diâmetro, como tubos de condensadores, filtros e linhas de protecção contra incêndio (McMahon R. F., 1977; Aldridge & McMahon, 1978; McMahon

R., 1983; Williams & McMahon, 1986; McMahon & Bogan, 2001). O maior impacto económico desta espécie está associado aos tratamentos de controlo e à reparação de equipamentos danificados pela sua acção. Estes custos rondam mil milhões de dólares por ano nos Estados Unidos da América (Pimentel, et al., 2005).

No caso particular de Portugal, apesar dos conselhos da comunidade científica, que tem tentado de forma persistente chamar à atenção para a importância de lidar com a invasão nos seus primeiros estágios (Araujo, et al., 1993; Sousa, et al., 2006; Sousa, et al., 2008), nem as entidades nacionais responsáveis, nem as instalações industriais que já verificaram a presença desta espécie tomaram medidas no sentido de minimizar a sua dispersão e os seus impactos (Rosa I. et al., 2011). Neste contexto, a monitorização de fontes de água primárias permitiria obter informação crucial. Programas de monitorização são ainda essenciais para a aplicação de estratégias de controlo eficientes e ambientalmente seguras em contexto industrial. A informação acerca de métodos de monitorização para esta espécie é bastante mais escassa do que a existente para o caso de outro bivalve invasivo de natureza bioincrustante, o mexilhão zebra *Dreissena polymorpha*. Além disso, durante a procura de informação o leitor é muitas vezes remetido precisamente para os métodos de monitorização do mexilhão zebra, mas as diferenças biológicas e ecológicas entre as duas espécies fazem com que afectem as instalações industriais de forma diferente e com que os métodos de monitorização mais adequados tenham algumas especificidades. Neste contexto, o primeiro objectivo desta tese é sistematizar informação acerca da monitorização da amêijoia asiática para fins de controlo em ambiente industrial. Pretende-se assim que este documento possa constituir um auxiliar para as indústrias dependentes de água nacionais que, como um estudo recente mostrou (Gomes, 2010; Rosa I., et al., 2011), estão em risco de infestação e ainda pouco preparadas para lidar com o problema.

No que toca ao controlo desta peste, não existe nenhum método completamente eficiente e ambientalmente seguro. À escala industrial, têm sido usados filtros e outras formas de barreiras para impedir a entrada de amêijoas asiáticas nas instalações, a remoção física das conchas depositadas nas tubagens, o tratamento químico (Mattice, 1977) e a aspiração do sedimento (Wittmann, et al., 2008). Apesar da limpeza mecânica ser bastante eficiente, os custos associados à paragem e re-arranque da instalação para se proceder à remoção das conchas acarreta custos significativos. Além disso, no caso particular de estações de tratamento de água para consumo, tipicamente o método mecânico envolve a perda de toda a água acumulada nos reservatórios de água bruta, o que também representa uma perda económica considerável (Gomes, 2010). Por estas razões, e sobretudo devido à sua

versatilidade, o tratamento químico com compostos biocidas tende a ser uma abordagem muito atractiva. Apesar das vantagens deste tipo de tratamento, os biocidas disponíveis à data possuem uma relação custo-eficiência desfavorável e/ou causam impactos negativos significativos em espécies não-alvo. Torna-se assim necessária a procura de soluções químicas alternativas. Posto isto, o segundo objectivo desta tese é contribuir para a criação de soluções inovadoras para o controlo da amêijoa asiática através da avaliação e interpretação da toxicidade de misturas de potenciais agentes de controlo químico.

Na Figura I.1, apresenta-se um mapa geral dos restantes capítulos que compõem esta tese. No Capítulo II são expostas as características biológicas da espécie mais relevantes para a compreensão da sua natureza invasora e bioincrustante, nomeadamente a sua morfologia e anatomia, reprodução e ciclo de vida, habitat, distribuição e mecanismos de dispersão. No Capítulo III é apresentada a informação necessária para o projecto de um sistema de monitorização de *C. fluminea* dirigida a indústrias que estão em risco de sofrer infestações e que não sabem como proceder para evitar ou minimizar as bioincrustações. No capítulo IV é avaliado o potencial de várias combinações binárias de químicos para o controlo da *C. fluminea*, nomeadamente por análise da variação da toxicidade das toxinas individuais ao serem incorporadas em misturas. No Capítulo V é apresentado um estudo preliminar acerca do modo de acção de dois dos compostos químicos usados no âmbito do capítulo IV com o objectivo de interpretar os resultados obtidos nos testes de toxicidade das misturas. No Capítulo VI apresentam-se as conclusões finais do trabalho realizado e apresentam-se sugestões de trabalhos futuros.

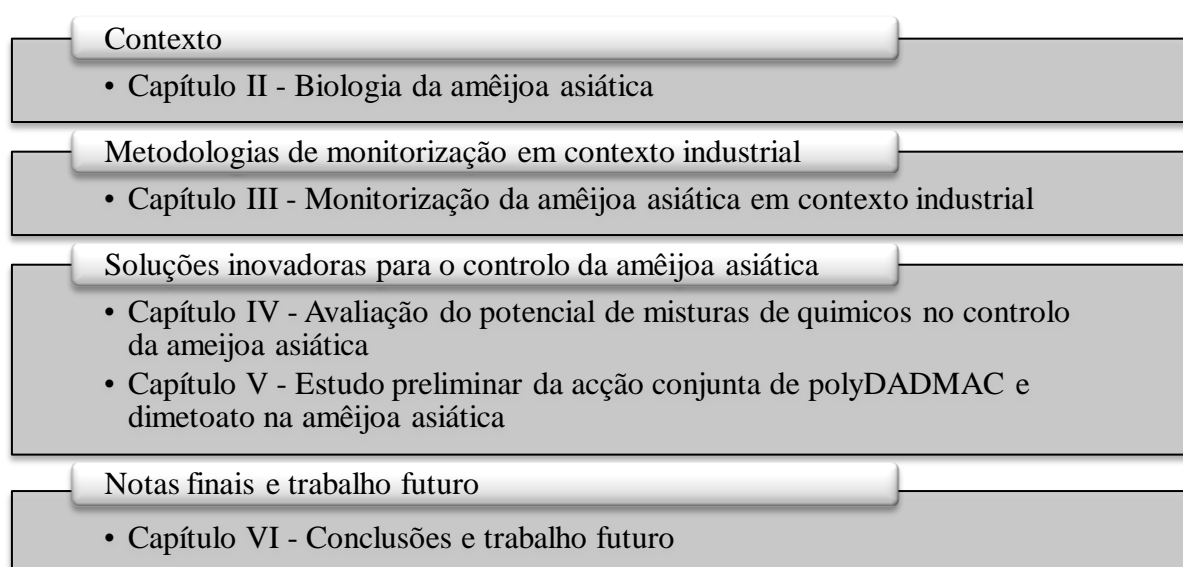


Figura I.1 – Mapa da estrutura da tese.

Capítulo II – Biologia da amêijoia asiática

1. Introdução

Este capítulo tem como objectivo a apresentação das características biológicas da espécie invasora *Corbicula fluminea*, designadamente as mais relevantes para a sua monitorização e controlo.

A descrição da concha e tecidos moles torna-se essencial para clarificar, não só por que motivo(s) esta espécie é tida como uma peste, mas também para a distinguir das espécies nativas. Também irão ser abordados aspectos referentes ao seu modo de vida e ao seu habitat, o que permite ilustrar as razões pelas quais esta espécie pode viver em condutas, canais, aquedutos, lagos e rios. O conhecimento do seu potencial reprodutor ajuda a explicar a sua natureza bioincrustante e a sua maior fecundidade relativamente às espécies nativas. A informação acerca do ciclo de vida e da dinâmica da população é crucial para o sucesso no controlo desta espécie. A eficácia dos mecanismos de dispersão ajudam a compreender a sua rápida propagação em lagos e rios em vários continentes e a possibilidade de invasão de qualquer instalação ou massa de água não protegidos.

2. Morfologia e anatomia

A concha da *C. fluminea* tem, em média, 3 – 4 cm de comprimento, é brilhante e possui estrias salientes e uniformemente espaçadas (Figura II.1). É fabricada pelo próprio animal, de dentro para fora, pela secreção de camadas sucessivas de carbonato de cálcio. É constituída por duas valvas iguais inequilaterais, estando o plano de simetria paralelo à charneira. As valvas unem-se pela charneira, através de um conjunto de três dentes cardinais e de dois dentes laterais e respectivas fossetas, que encaixam na valva oposta. Estas são unidas por ligamentos e músculos aductores, que, quando contraídos, aproximam as duas valvas e fecham a concha rapidamente. O movimento oposto, isto é, de abertura das valvas, é muito lento porque a *C. fluminea*, tal como todos os bivalves, não possui músculos antagónicos. A abertura da concha dá-se quando os músculos aductores relaxam e o ligamento elástico força as valvas a separarem-se. A zona mais antiga da concha (e. g. a primeira a ser formada) é o umbo, uma saliência localizada na zona ântero-dorsal de cada valva, em torno da qual se dispõem as linhas de crescimento radial.

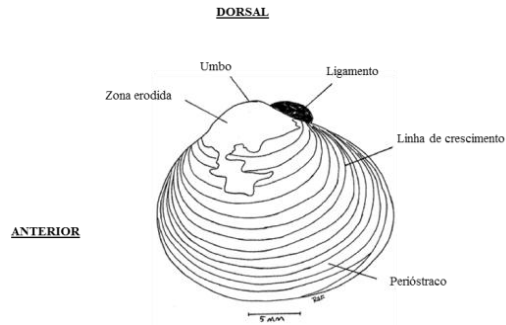


Figura II.1 – Aspecto exterior da amêijoia asiática (*C. fluminea*).

A superfície interna da concha possui marcas mais ou menos circulares onde se foram prendendo os músculos adutores à medida que o animal foi crescendo. A parte interna da concha é revestida pelo manto (ou pálio) que envolve a massa visceral e segrega a concha. A cavidade delimitada pelo manto denomina-se cavidade paleal ou cavidade do manto (Figura II.2).

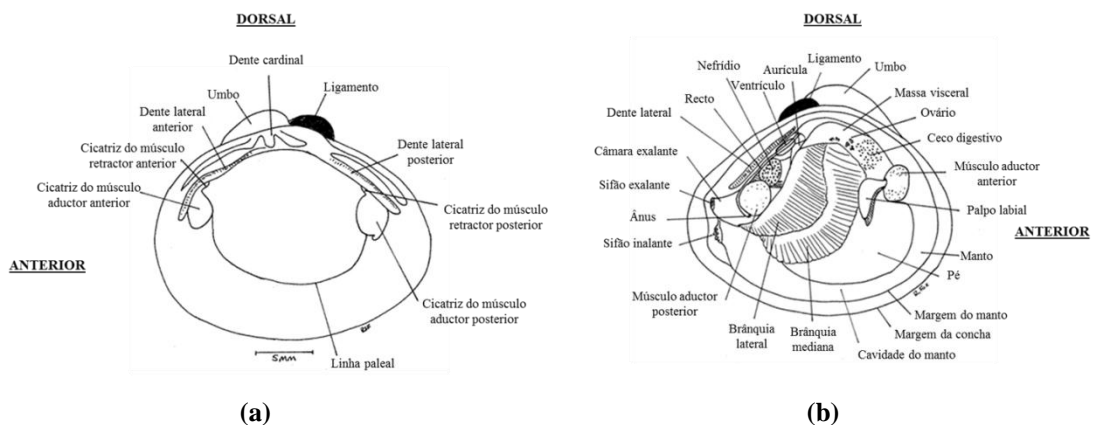


Figura II.2 – a) Interior da valva direita da amêijoia asiática, *C. fluminea*. b) Lado direito da *C. fluminea* com valva direita e manto removido. (Adaptado de: Fox R. , 2006)

O sistema respiratório encontra-se na cavidade do manto e é constituído por dois pares de brânquias delgadas formadas por lamelas. Estas têm como função primordial retirar oxigénio do meio circundante e também estão envolvidas nos processos de alimentação. A região da cabeça é demarcada pela boca que se encontra entre as brânquias e é circundada pelos palpos labiais. Perto da boca situa-se o pé muscular, afilado e em forma de machado, que pode ser estendido para fora da cavidade paleal. O estatocisto, órgão capsular enervado por gânglios cerebrais, situa-se perto dos glânglios do pé e na região do sifão inalante. Possui um osfrádio que controla a qualidade e a pressão interna da água circulante na cavidade paleal. Abaixo do pé situa-se a massa visceral que contém os órgãos de digestão, reprodução e excreção.

O sistema digestivo desta espécie é completo, ou seja, possui duas aberturas, uma boca para a entrada de alimentos e um ânus para eliminação dos resíduos alimentares não absorvidos. Na cavidade do manto possui palpos labiais e um estilete cristalino que contém as enzimas digestivas. O intestino é constituído por uma parte enrolada, que comunica com o recto e termina no ânus e que se abre na região do sifão exalante. A excreção dos restos não aproveitados da digestão é realizada por nefrídios que estão ligados à cavidade pericárdica e que se abrem na cavidade paleal. As substâncias excretadas são retiradas da corrente circulatória, passam à câmara suprabranquial e ao sifão exalante. O sistema circulatório fechado é formado por um coração dorsal que se encontra no interior da cavidade pericárdica. O seu sistema nervoso é composto por 3 pares de gânglios: um cerebral, um visceral e um pedal (Fox R. , 2006; Mackie & Claudi, 2010).

3. Reprodução e ciclo de vida

3.1. Reprodução

C. fluminea é hermafrodita, proto-oogâmica e inicia a oogénese antes da espermatogénese. Durante o ciclo reprodutivo a oogénese é praticamente contínua enquanto a espermatogénese é episódica (Kraemer L., 1983) e estimulada tanto pelo aumento da temperatura na Primavera como pela diminuição da temperatura no Outono (Kraemer & Galloway, 1986). Assim, a espermatogénese marca o início do processo de fertilização e ontogénese. O desenvolvimento embrionário ocorre por autofertilização e alogamia (fertilização cruzada) e os embriões passam pelas fases blástula, trocófora, velígera e pedivelígera.

3.2. Ciclo de Vida

O ciclo de vida desta espécie está representado na Figura II.3. A gametogénese ocorre durante todo o ano, sendo o tecido feminino mais comum do que o tecido masculino (Heinson, 1958; et al., 1985). As amêijoas que transportam gâmetas possuem conchas de comprimento superior a 7-10 mm (Aldridge & McMahon, 1978; Kraemer L. , 1978; Kennedy & van Huekelem, 1985).

Os embriões são incubados no interior das brânquias e libertadas para a coluna de água quando atingem a fase de desenvolvimento velígera D. Nesta fase possuem menos de 195 µm de comprimento, pé e velum, que desaparece pouco depois de serem libertadas (~100 h após a libertação). As larvas umbonadas (> 280 µm de comprimento) já têm o aspecto de uma

amêijoia em miniatura; possuem sífões e o pé é o único meio de locomoção. A concha das pedivelígeras possui comprimento superior a 500 μm , é opaca e estriada. Após esta fase não ocorre mais nenhum desenvolvimento para além da maturação sexual e do crescimento continuado. Os adultos que transportam larvas possuem, no mínimo, entre 13 e 15 mm (comprimento da concha) (Britton, et, al., 1979; Kennedy & van Huekelem, 1985).

Em zonas temperadas, a libertação das larvas dá-se de Maio a Setembro, quando a temperatura da água excede os 15°C. Verificam-se dois picos reprodutivos por ano, um em Maio/Junho e outro em Outubro (Britton & Morton, 1982). O segundo pico é mais curto que o primeiro e a percentagem de indivíduos em desova é muito mais baixa no segundo pico. A frequência de desova está positivamente correlacionada com a temperatura da água (Mackie & Claudi, 2010). A amêijoia asiática possui uma esperança média de vida de 2 a 4 anos, no máximo 7.

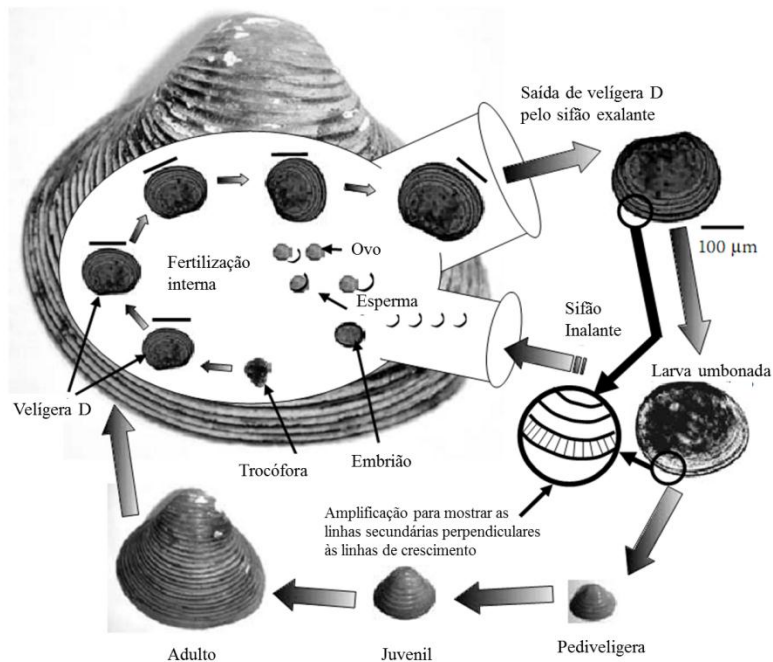


Figura II.3 – Ciclo de vida da *C. fluminea* (Mackie & Claudi, 2010).

4. Habitat da amêijoia asiática

A amêijoia asiática tolera uma grande variedade de condições ambientais. No entanto, requer águas com uma grande quantidade de oxigénio dissolvido (os adultos reprodutivos requerem uma quantidade de oxigénio dissolvido maior do que 70% da concentração de saturação para sobreviverem). São geralmente encontradas em lagos e em cursos de água com lodo, areia e cascalho e toleram salinidades até 13 ppm por curtos períodos de tempo e temperaturas entre 2-30°C (Mackie & Claudi, 2010). O limite mínimo de pH tolerado por *C.*

fluminea é 5.6, se todas as condições bióticas e abióticas forem adequadas (Wittmann, et al., 2008).

A *C. fluminea* passa a maior parte da sua vida em sedimentos e não possui a capacidade de se agarrar às estruturas. Os adultos têm a capacidade de se refugiar no sedimento e sair quando a qualidade da água ou a quantidade de nutrientes é pobre. Esta capacidade, juntamente com a sua tolerância a baixo pH, a capacidade de emergir por longos períodos de tempo e a aptidão para alterar a sua velocidade metabólica quando a disponibilidade de alimento é baixa, contribuem para o seu sucesso como espécie invasora em diversas zonas geográficas.

5. Distribuição

A amêijoia asiática é originária de zonas tropicais do sul da Ásia, leste do Mediterrâneo e Austrália. Invadiu com sucesso o continente americano de leste a oeste entre 1924 e 1975, onde ainda é considerada uma peste em expansão (McMahon R. , 1983; McMahon R. , 2000) (Figura II.4). Atravessou o oceano Atlântico, provavelmente através das águas de lastro de navios, e desde 1980 que se propaga na Europa (Mouthon, 1981). Hoje, a *C. fluminea* pode ser encontrada em toda a Europa meridional e ocidental (Bij de Vaate & Greijdenus-Klaas, 1990; Araujo, et al., 1993), na Grã-Bretanha (Aldridge & Müller, 2001) e na parte romena do Rio Danúbio (Bij de Vaate & Hulea, 2000). Em Portugal, o primeiro registo da presença da amêijoia asiática foi no estuário do Rio Tejo, no início dos anos 80 (Mouthon, 1981), e dez anos mais tarde os estuários do Rio Douro e do Rio Minho também foram invadidos. Desde 2000, a amêijoia asiática tem sido vista noutros estuários e locais navegáveis e, na última década verificou-se um alastramento acelerado significativo desta espécie no território português. Hoje, esta espécie invasora está presente em todas as regiões hidrográficas portuguesas, com excepção das bacias dos rios Cávado, Ave e Leça (Figura II.4; (Rosa I., et al., 2011)).

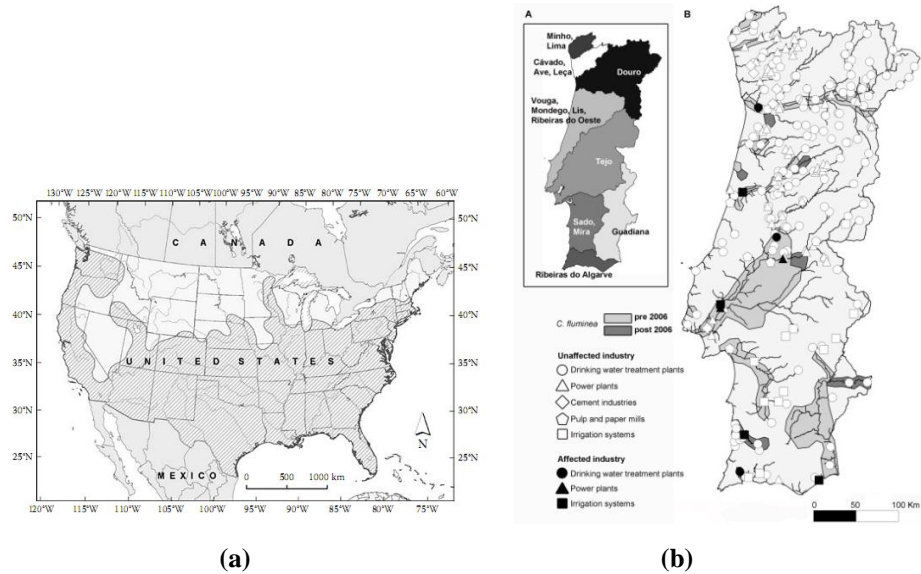


Figura II.4 – a) Distribuição da *C. fluminea* na América do Norte (dados de 2009; (Mackie & Claudi, 2010)). b) Distribuição da *C. fluminea* em Portugal (dados de 2010; (Rosa I., et al., 2011)).

6. Mecanismos de dispersão

A *C. fluminea* é considerada um dos três piores invasores nos Estados Unidos, juntamente com dois outros bivalves de água doce, a *Dreissena polymorpha* e a *Dreissena rostriformis bugensis*. Hanna (1966), Fox R. (1971) e Morton (1973) atribuíram a introdução desta espécie na América do Norte aos imigrantes chineses que a usam na sua alimentação (Miller & McClure, 1931).

Tipicamente, a amêijoia asiática dispersa-se através do transporte passivo nas correntes de água, importação acidental com espécies de aquacultura e através da introdução intencional com o objectivo de venda como produto alimentar (Wittman, et al. 2008). McMahon R. (2000) descreve em detalhe os mecanismos de dispersão dos adultos e pediveligeras e atribui a extraordinária capacidade de dispersão das pedivelígeras e dos juvenis ao seu pequeno tamanho e massa. Apesar de não terem capacidade de nadar, estas características permitem-lhes manter-se em suspensão por longas distâncias, mesmo em águas pouco turbulentas. Os juvenis e os adultos até aos 14 mm produzem uma linha mucosa através do sifão exalante que os suspende em águas turbulentas (Prezant & Chalermwat, 1984). No entanto, apenas as amêijoas com tamanho inferior a 2.0 mm poderão usar esta linha mucosa para se envolverem em objectos que se encontrem na coluna de água como detritos, macrófitas, algas ou cascos de barcos e assim se dispersarem (Williams & McMahon, 1986). As pediveligeras e as amêijoas mais pequenas podem ainda ser transportadas nos pés e penas de aves aquáticas (McMahon R., 2000).

Capítulo III – Monitorização da amêijoia asiática em contexto industrial

1. Introdução

A monitorização adequada das fontes primárias de água é de extrema importância porque permitirá não apenas detectar velíferas na coluna de água e/ou adultos no sedimento como também a sua abundância, estágios de vida presentes e a eficácia dos tratamentos e programas de controlo implementados. Um sistema de monitorização eficiente é, assim, o primeiro passo para o desenvolvimento de estratégias de controlo com boa relação custo/benefício.

Este capítulo tem como objectivo fornecer informação necessária para o projecto de um sistema de monitorização da espécie *Corbicula fluminea* em instalações industriais. Pretendendo, de alguma forma, funcionar como um guia prático, é dirigido especialmente a indústrias que estão em risco de sofrer infestações e que não sabem como proceder para evitar ou minimizar as bioincrustações, como é o caso da maior parte das unidades industriais nacionais (Rosa I., et al., 2011). Através da informação aqui facultada, o responsável da instalação deverá conseguir implementar um programa de monitorização que permita a detecção de velíferas, juvenis e adultos e a monitorização do crescimento de populações já instaladas.

2. Tipos de monitorização

Todos os participantes do programa de monitorização deverão ter conhecimento e estar familiarizados com:

- o modo de vida, biologia e condições ambientais necessárias para a proliferação de todos os estágios de vida da espécie;
- os problemas que podem ocorrer devido a introdução de indivíduos vivos desta espécie em corpos de água naturais a montante.
- os procedimentos para a adequada manipulação de amostras.

A monitorização de espécies aquáticas pode ser feita através de dois tipos de monitorização: monitorização da corrente principal e monitorização paralela. A monitorização da corrente principal corresponde à monitorização directa do corpo de água que alimenta a instalação (rio, lago ou riacho). Se a amêijoia asiática ainda aí não estiver presente, este tipo de

monitorização irá fornecer uma boa indicação acerca do potencial de infestação da unidade. A monitorização paralela é a monitorização de sistemas onde circula água proveniente do corpo de água e onde são simuladas as condições a que estão sujeitas as condutas da instalação. Este tipo de monitorização aplica-se sobretudo a bivalves epifaunais, ou seja, que têm a capacidade de se agarrar a estruturas. Uma vez que a amêijoia asiática não possui esta característica, as técnicas de monitorização paralela não se aplicam a este bivalve.

3. Monitorização da corrente principal

3.1. Monitorização de velígeras

A monitorização de velígeras permite identificar o aparecimento de novos indivíduos.

3.1.1. Recolha de amostras

Tal como referido no Capítulo 2, as velígeras de *C. fluminea* são libertadas na coluna de água quando atingem a fase de desenvolvimento velígera D e possuem menos de 195 µm de comprimento. Para a sua recolha a partir da fonte de água pode-se recorrer (i) a armadilhas de plâncton, como a armadilha Schindler-Patalas, ilustrada na Figura III.1a, ou (ii) a redes de plâncton, como a ilustrada na Figura III.1b.

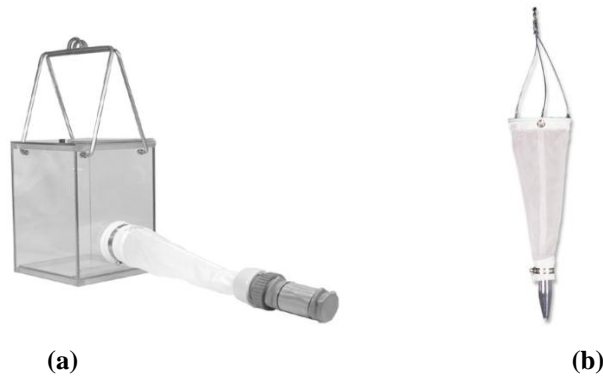


Figura III.1 – Amostradores de plâncton que podem ser usados na recolha de larvas de *C. fluminea*: (a) Armadilha Schindler-Patalas, b) Rede de plâncton cónica.

i. Armadilhas de plâncton

As armadilhas de plâncton devem ser usadas quando a quantidade de velígeras presentes na água é grande ($> 50\,000$ velígeras/m³).

Estes instrumentos de amostragem são constituídos por uma caixa de policarbonato e por uma rede de malha fina com copo colector. A base e o topo da caixa abrem-se quando a

armadilha é baixada para deixar passar a água e fecham-se quando a armadilha é içada para que não haja variação do volume de água amostrado.

O protocolo de utilização destes sistemas compreende os seguintes passos:

1. Baixar a armadilha de plâncton até uma profundidade conhecida. Verificar se a caixa se encontra completamente cheia de água.
2. Içar a armadilha e fazer escorrer a água através da rede.
3. Recolher a amostra do copo colector.

A maioria destes instrumentos está disponível em dois tamanhos (12 L e 30 L). No entanto, deve-se utilizar a armadilha de 12 L sempre que possível uma vez que é mais leve quando cheia de água. Se for necessário um volume de amostra intermédio, por exemplo 20 L, deve-se retirar 3 amostras com a armadilha de 12 L e combiná-las numa só amostra.

ii. Redes de plâncton cónicas

Devem-se usar redes de plâncton quando a quantidade de velíferas presentes na fonte de água é pequena ($< 50\,000$ velíferas/m³).

Existem vários tipos de redes, sendo que as principais variações estão relacionadas com o diâmetro da boca, a forma do cone de filtragem, o tamanho da malha e o tipo de copo colector. Na Figura III.2 estão representadas as duas redes de plâncton mais utilizadas. A maioria das redes possuem um funil com um tubo e uma abraçadeira para descarregar o filtrado para o frasco de recolha ou para um copo colector removível. Estes instrumentos de amostragem permitem filtrar grandes volumes de água (mais de 500 L), que podem ser reduzidos a cerca de 20-50 mL de amostra.

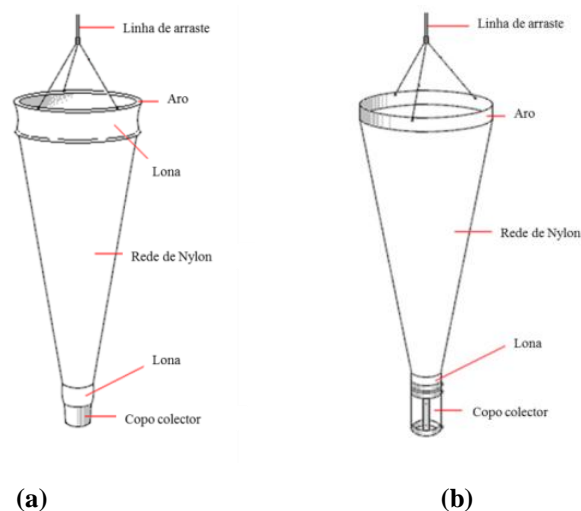


Figura III.2 – Redes de plâncton mais utilizada: a) rede de *Student*; b) rede de *Wisconsin*.

Para a captura de velíferas de *C. fluminea* deve-se usar uma rede de plâncton com diâmetro da boca de rede de 50 cm e com largura máxima de malha inferior a 100 μm .

O volume de filtrado é calculado com base no volume percorrido pela rede, sendo dado por $\pi r^2 h$, sendo r o raio da boca da rede e h a distância percorrida com a rede.

Aquando da recolha de amostras, tipicamente a rede pode ser arrastada pela água na direcção vertical, horizontal ou oblíqua, sendo mais fácil calcular o volume de filtrado no primeiro caso porque a distância vertical é mais fácil de medir. Quando se pretende apenas concluir acerca da presença de velíferas e a determinação exacta do volume amostrado não é crítica, pode-se usar qualquer um destes tipos de arrasto.

No arrasto vertical, recomendado em águas sem corrente, podem-se usar redes de plâncton de Student ou de Wisconsin. Os dados assim obtidos permitem a análise quantitativa e qualitativa da amostra. Neste caso, o protocolo de recolha de amostra envolve os seguintes passos:

1. Usando uma corda graduada, baixar a rede na água ao longo de uma distância conhecida, como ilustrado na Figura III.3. Garantir que a rede está vertical (se necessário, colocar pesos) e mantê-la a 0.5 m do fundo. Se a rede tocar ou estiver muito perto do fundo, os sedimentos podem entupi-la e dificultar a análise.

2. Quando atingir a profundidade desejada, puxar a rede para cima através da coluna de água, escoar a amostra para o vaso colector, esvaziar a rede, registar a distância percorrida por esta e guardar a amostra para análise posterior.

3. Se possível, amostrar 200 L de água por cada réplica.

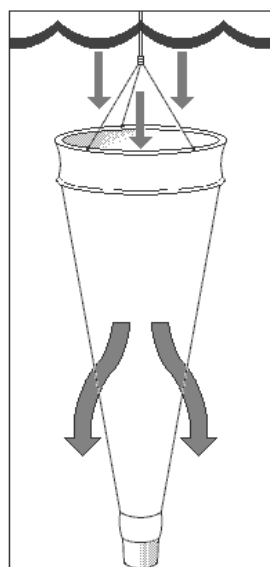


Figura III.3 – Recolha de amostras usando uma rede de plâncton arrastada na direcção vertical (Crosier & Molloy, 2002).

A recolha de velíferas por arrasto horizontal ou oblíquo de redes de plâncton (quer de Student, quer de Wisconsin) é aplicável em águas com ou sem corrente, sendo que os assim obtidos permitem análise quantitativa e qualitativa. Nestes casos, o procedimento a seguir é o seguinte:

1. Usando uma linha, baixar a rede até à água e deixá-la afundar. É necessário usar pesos para manter a rede submersa. Manter a rede a 0.5 m do fundo, caso contrário ele pode entupir com sedimentos, o que dificultará a análise da amostra.

2. Arrastar a rede como ilustrado na Figura III.4 e recolhê-la. Escoar a amostra para o vaso colector, esvaziar a rede, registar a distância percorrida pela rede ou o tempo de recolha e guardar a amostra para análise posterior.

3. Amostrar, pelo menos, 1000 L de água por cada réplica se não houver registo de velíferas nessa água.

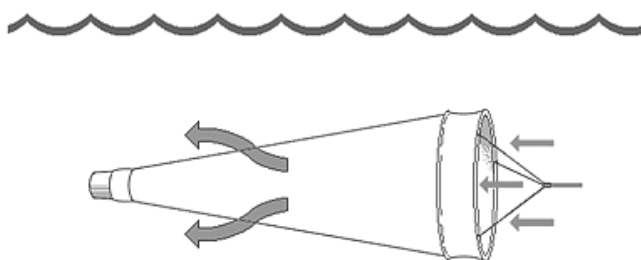


Figura III.4 – Recolha de amostras usando uma rede de plâncton arrastada na direcção horizontal (Crosier & Molloy, 2002).

A utilização de redes de plâncton de poro reduzido resulta geralmente na sua obstrução e conseqüentemente na diminuição da eficiência da filtragem. Para ultrapassar estas dificuldades, pode-se recorrer a arrasto auxiliado por bombas de água. Esta estratégia, aplicável tanto com redes de Student, como com redes de Wisconsin, pode ser usada em riachos, rios e águas pouco profundas. Os dados obtidos desta forma permitem análise quantitativa ou qualitativa, dependendo da maneira como se faz a recolha. O protocolo subjacente ao arraste com bomba de água compreende os seguintes passos:

1. Antes da recolha da amostra, medir o volume de água debitado pela bomba para que se possa calcular o volume de água amostrado através do tempo de recolha. A taxa de bombagem deve ser inferior a 100 L/min para reduzir possíveis danos de velíferas.

2. Mantendo metade da rede submersa (Figura III.5), bombear um determinado volume de água através da rede e registar o tempo de recolha.

3. Escoar a amostra para um vaso colector, esvaziar a rede e guardar a amostra para análise posterior.

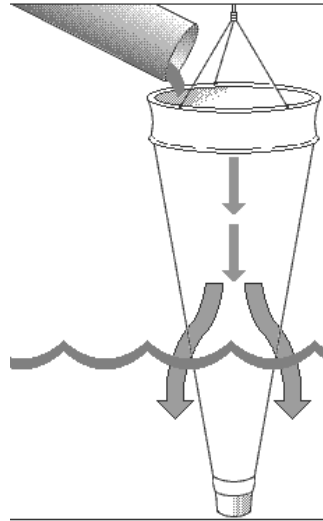


Figura III.5 – Recolha de amostras usando uma rede de plâncton mediante arraste com bomba de água (Crosier & Molloy, 2002).

A amostragem é um aspecto crítico para a efectiva monitorização de velíferas. De facto, apesar de ser dispendiosa, é de extrema importância quando a instalação não pode tolerar de todo a presença da amêijoia asiática.

Devem recolher-se, pelo menos, três amostras em locais distintos, perto da margem, a cerca de 1 km de distância entre si. Devem ser recolhidas pelo menos duas réplicas, de igual volume, em cada local. Sempre que possível, registar os dados acerca do local de recolha, incluindo a profundidade, a temperatura, a velocidade da corrente, a concentração de cálcio, o pH e o teor de oxigénio dissolvido.

As amostras recolhidas devem ser preservadas em formalina açucarada e os tecidos em etanol a 70% (v/v).

3.1.2. Análise qualitativa de amostras

Se se pretender apenas concluir acerca da presença ou ausência de velíferas, basta analisar as amostras recolhidas da fonte de água de forma qualitativa, recorrendo (i) ao dito método de Schaner (Schaner, 1991) ou (ii) à técnica de microscopia de polarização cruzada (Johnson, 1995).

i. Método de Schaner

Schaner (1991) apresentou um método de detecção de velíferas da espécie *Dreissena polymorpha* em amostras de plancton que também é válido para a detecção de velíferas de *C.*

fluminea. Este autor recomenda o uso de uma solução açucarada para aumentar a probabilidade de encontrar velíferas. O açúcar aumenta a massa volúmica da amostra, de maneira que os organismos mais leves, como algas filamentosas, sedimentam a velocidade inferior à dos organismos mais pesados, como as velíferas. Assim, as velíferas e a areia irão depositar-se no fundo.

Segundo este método, o procedimento a seguir é então o seguinte:

1. Dissolver 130 g de açúcar em 400 mL de água destilada.
2. Misturar a amostra e a solução de açúcar. Poderá ser usada uma pipeta ou numa bureta de 25 mL. Se se usar uma pipeta, primeiro colocar 10 mL de amostra na pipeta e depois 15 mL de solução açucarada. Se se usar uma bureta, primeiro verter 15 mL da solução açucarada para a bureta e de seguida adicione 10 mL de amostra.
3. Deixar a mistura repousar durante 20 minutos. Após este tempo, a maioria das velíferas contidas na amostra encontram-se no fundo da bureta/pipeta.
4. Retirar entre 1 a 2 cm³ do fundo e analisar a amostra num estereomicroscópio com ampliação de 60x ou 80x.

ii. Técnica de microscopia polarização cruzada

Um método alternativo para a detecção de velíferas de *C. fluminea* envolve o uso de luz polarizada cruzada. Isto é conseguido utilizando um microscópio equipado com um filtro polarizante e um segundo filtro polarizante colocado por baixo da amostra (a iluminação é feita por baixo), como ilustrado na Figura III.6. Através da rotação de um dos filtros, estes podem ser alinhados de modo a obter um fundo negro.

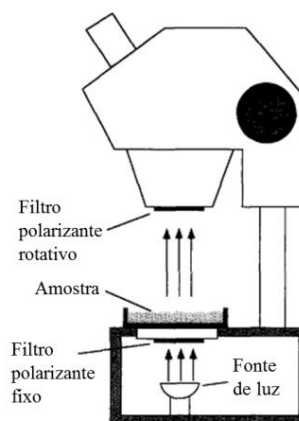


Figura III.6 – Diagrama de microscópio adaptado com filtros polarizantes (Johnson, 1995).

Se existirem velíferas de *C. fluminea* na amostra, estas serão observadas como formas brilhantes com uma cruz negra como ilustrado na Figura III.7 (Johnson, 1995). Uma vez que velíferas de várias espécies de *Dreissena* e os ostracodes também se apresentam como formas brilhantes com uma cruz negra quando vistas em condições de luz polarizada, terá que se proceder a uma análise de tamanho e morfologia para as distinguir.

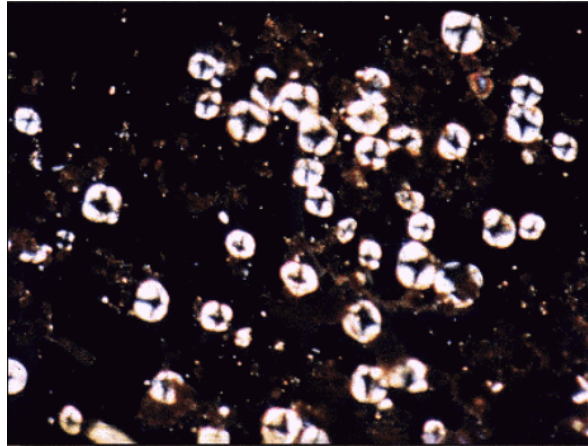


Figura III.7 – Aspecto de velíferas de *Dreissena polymorpha* observadas ao microscópio em condições de luz polarizada (Crosier & Molloy, 2002).

3.1.3. Análise quantitativa de amostras

Após a detecção de velíferas de *C. fluminea* deve-se estabelecer a sua densidade na coluna de água (em número de pedivelíferas/m³ ou número de pedivelíferas/L), dividindo o número de pedivelíferas encontradas na amostra pelo volume amostrado.

Quando se pretende estimar a densidade de pedivelíferas, o volume de água filtrado deve ter em conta a abundância de pedivelíferas. Se estes forem abundantes uma amostra de grande volume irá conter grandes quantidades de organismos e terá que ser diluída. Uma boa regra prática a seguir é tentar analisar uma amostra que contenha cerca de 100 velíferas/L.

Se se usar como instrumento de amostragem uma armadilha Schindler-Patalas, o volume amostrado é igual ao volume da armadilha. Se se usar como instrumento de amostragem uma rede de plâncton, o volume amostrado é calculado a partir do raio da boca da rede e da distância percorrida conforme indicado anteriormente. Se a amostragem for feita por arrasto a partir de um barco, deve-se registar a velocidade deste; se se estiver na margem, pode-se simplesmente medir a distância média de arrasto. Uma vez que a determinação da distância percorrida pela rede está sujeita a erros significativos, deve-se recorrer, sempre que possível, a um caudalímetro ligado à boca da rede. Se se usar uma bomba para bombear a água para a rede de plâncton, pode-se ligar um caudalímetro à bomba e medir o volume de

água filtrado ou pode-se fazer uma estimativa do caudal usando um balde graduado e um cronómetro para determinar o tempo necessário para recolher um dado volume de água.

Após a recolha das amostras, as velíferas podem ser examinadas vivas ou preservadas em 5% de formalina ou 70% de etanol para análise posterior. A contagem de velíferas pode tornar-se difícil se os espécimes estiverem em movimento contínuo. Assim, se não se pretender calcular a mortalidade de velíferas na fonte de água, é preferível optar por conservar a amostra.

Se a amostra estiver concentrada, será necessário diluí-la ou subamostrá-la antes da análise.

3.2. Monitorização de juvenis e adultos

A monitorização de adultos e juvenis fornece informação mais fidedigna acerca da formação incipiente de populações locais.

3.2.1. Recolha de amostras

A *C. fluminea* passa a maior parte da sua vida em sedimentos por isso a monitorização de juvenis e adultos é feita por observação debaixo de água através de mergulhadores ou câmaras de vídeo ou analisando o sedimento da fonte de água.

Para determinar a densidade dos bivalves deve-se usar um instrumento de amostragem quantitativa como (i) a draga de Ekman (Figura III.8a) ou (ii) a draga Ponar (Figura III.8b). Estes instrumentos de amostragem recolhem uma quantidade de sedimento que posteriormente é lavado e analisado.



(a)



(b)

Figura III.8 – Dragas para amostragem de sedimento: a) Draga de Ekman (Hoskin Scientific, 2003); b) Draga Ponar (Rickly Hidrological Company, 1997).

i. Draga de Ekman

A draga de Ekman foi projectada para amostrar sedimentos macios. Na parte superior da draga existem duas tampas que se abrem para deixar passar a água quando a draga é baixada e que se fecham quando a draga é içada para que não haja lavagem da amostra recolhida. Quando a draga atinge o fundo é largado um cilindro de aço através da corda, denominado mensageiro que acciona o mecanismo de fecho das mandíbulas.

O procedimento de amostragem usando uma draga de Ekman, ilustrado na Figura III.9, envolve os seguintes passos:

1. Prender um cabo à draga e fazer passar o mensageiro através deste. Manter o mensageiro na ponta do cabo oposta à da draga.
2. Abrir as mandíbulas da draga e prendê-las ao mecanismo de fecho.
3. Baixar a draga e pousá-la lentamente.
4. Lançar o mensageiro e esperar que as mandíbulas fechem. Efectuar pequenos puxões no cabo para garantir que o mensageiro accionou o mecanismo de fecho.
5. Içar lentamente a draga e remover todo o seu conteúdo.
6. Retirar 5 amostras seguindo o mesmo procedimento.

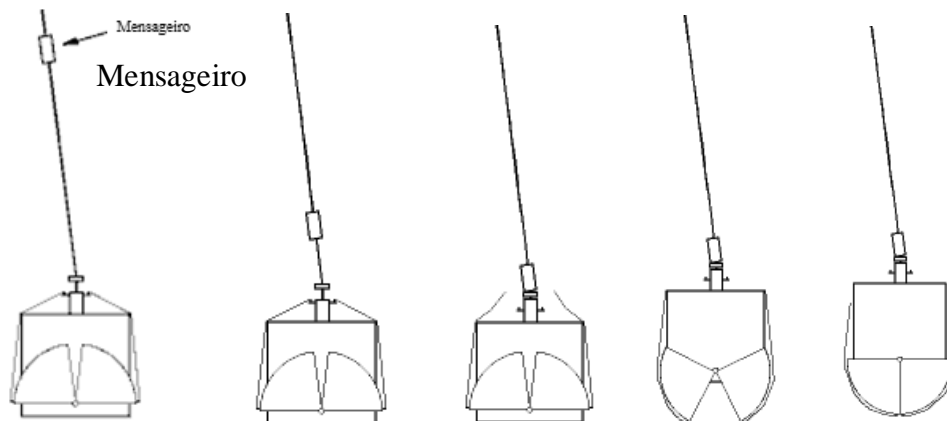


Figura III.9 – Modo de funcionamento de uma draga de Ekman (Charusombat & Sabalowsky, 1997).

ii. Draga Ponar

A draga Ponar é um instrumento de amostragem de sedimento muito versátil. Pode ser usada em todos os tipos de sedimentos duros como areia, gravilha e barro. Esta draga possui duas mandíbulas semicirculares, opostas, que se encontram abertas devido a um mecanismo de gatilho. Quando a draga contacta com o sedimento é accionado o mecanismo de fecho e as mandíbulas são fechadas recolhendo sedimento. A parte de cima das mandíbulas possui uma

tela fina de cobre que permite a passagem livre de água durante a descida da draga e que reduz a onda de choque que precede a amostragem.

O protocolo para amostragem usando uma draga Ponar é o seguinte:

1. Retirar o pino de segurança da draga e colocar o pino com mola no buraco onde os dois braços da draga se interceptam. Para evitar que o pino saía, puxar a corda para cima.
2. Colocar a draga na água e baixá-la. Antes de atingir o sedimento, soltar um pouco a corda para permitir a saída do pino e deixar cair a draga rapidamente.
3. Içar lentamente a draga e remover todo o seu conteúdo.
4. Retirar 5 amostras seguindo o mesmo procedimento.

3.2.2. Determinação da densidade média de juvenis e adultos

O procedimento para determinar a densidade média de juvenis e adultos no local de onde foram recolhidas amostras de sedimento é o seguinte:

1. Para as 5 amostras recolhidas, lavar o sedimento com uma peneira de 0.5 mm e seleccionar as amêijoas com concha de comprimento superior a 5 mm.
2. Registar o número de amêijoas em cada amostra.
4. Calcular o número médio de amêijoas nas 5 amostras e convertê-lo em densidade expressa por unidade de área.

Se se pretender determinar a distribuição de frequência de tamanhos, escolher um número representativo de amêijoas para cada amostra e medir o seu comprimento de concha.

4. Monitorização paralela

Como já referido, na monitorização paralela é utilizado um sistema auxiliar onde circula água proveniente do corpo de água e onde são simuladas as condições a que estão sujeitas as condutas da instalação. As técnicas de monitorização paralela de bivalves mais usadas são as concebidas para a monitorização de Dreissenids e Mitillids e envolvem o uso de biocaixas com substrato onde os organismos se agarram. Uma vez que a amêijoia asiática não possui esta capacidade de se agarrar a estruturas, não é possível adaptar esta forma de monitorização. Para uma monitorização mais efectiva deverá recorrer-se à monitorização da corrente principal de forma regular.

5. Registos

A adequada manutenção de registos é um aspecto crítico de programas de monitorização. Devem manter-se registos precisos sobre os resultados obtidos com o programa implementado, pois estes podem revelar-se bastante importantes no planeamento das estratégias de mitigação futuras. É aconselhável registar a frequência da monitorização, o primeiro aparecimento de velígeras e adultos, as densidades populacionais, os tamanhos de concha, as taxas de crescimento e os períodos de desova.

6. Conclusão

Neste capítulo foi sistematizada informação acerca da monitorização da amêijoia asiática para fins de controlo em ambiente industrial.

A informação acerca de métodos de monitorização para esta espécie é bastante mais escassa do que a existente para outro bivalve invasivo de natureza bioincrustante, o mexilhão zebra *Dreissena polymorpha* e poderá levar à aplicação destes métodos na amêijoia asiática. No entanto, as diferenças biológicas e ecológicas entre as duas espécies fazem com que afectem as instalações industriais de forma diferente e com que os métodos de monitorização mais adequados tenham algumas especificidades. Assim, a informação aqui contida foi criteriosamente avaliada, é específica para esta espécie e pretende auxiliar as indústrias dependentes de água nacionais que possuem grande desconhecimento acerca desta peste e não estão preparadas para lidar com uma possível infestação.

Deste estudo conclui-se que as técnicas de monitorização paralela não são aplicáveis à amêijoia asiática, recomendando-se o recurso à monitorização da corrente principal de forma regular. Conclui-se ainda que para uma efectiva prevenção da infestação da unidade industrial, o tratamento da mesma deve ser iniciado quando se observar a presença dos bivalves na fonte de água e a eficácia desses tratamentos de controlo deverá ser monitorizada.

Capítulo IV – Avaliação do potencial de misturas binárias de químicos para o controlo da amêijoia asiática

1. Introdução

Este capítulo tem como objectivo apresentar o estudo acerca do potencial de misturas binárias de agentes químicos para o controlo da amêijoia asiática.

Existem vários métodos para o controlo de bivalves invasivos em contexto industrial. Entre eles, o tratamento químico, que envolve a aplicação de substâncias que matam ou de alguma forma afectam os bivalves, tende a ser o mais popular, sobretudo porque é o mais versátil e, se convenientemente implementado, o mais económico (Mattice, 1977). Apesar de existir um grande número de químicos potencialmente tóxicos para a amêijoia asiática, o seu uso em programas de controlo está muitas vezes restringido pela relação custo-eficiência, pelo impacto ambiental provocado quando libertados para o meio ambiente e pelo custo do tratamento necessário para a sua desactivação ou remoção do efluente. Torna-se assim necessário encontrar estratégias que permitam otimizar o tratamento químico, minimizando os impactos das toxinas em organismos não-alvo e maximizando a sua eficiência. Estas estratégias podem passar pela descoberta de novos biocidas ou pela concepção de métodos de aplicação de químicos mais adequados.

A possibilidade de misturar compostos tóxicos de forma a tirar partido de efeitos cumulativos e sinérgicos tem vindo a ser proposta como um método de aplicação inovador promissor para o controlo de bivalves invasivos em ambiente industrial. Uma vez que não existem estudos de toxicidade de misturas de compostos químicos em *C. fluminea* mas uma vez que se observaram resultados promissores para outros bivalves, nomeadamente, *Dreissena polymorpha* (van Benschoten et al., 1992; Claudi & Mackie, 1994; Elzinga & Butzlaff, 1994; Wildridge, et al., 1998; Sprecher & Getsinger, 2000; Costa, et al., 2011), neste capítulo pretende-se estudar o efeito de misturas binárias de compostos químicos na amêijoia asiática.

Neste trabalho foi testado o potencial de três combinações binárias para o controlo da amêijoia asiática, realizando testes de toxicidade à escala laboratorial. Poli(cloreto de dimetildialilamónio) (polyDADMAC) foi seleccionado como elemento comum às três combinações. De forma a explorar diferentes tipos de interacções e avaliar até que ponto o

desempenho do tratamento combinado pode ser melhorado manipulando o modo de acção dos químicos individuais, o polyDADMAC foi misturado com cloreto de potássio, niclosamida e dimetoato. A escolha destes quatro compostos teve como base não só o seu modo de acção mais provável (que, na sequência do acima referido, se pretendia tão distinto quanto o possível), mas também a sua aplicabilidade comprovada como biocida e potencial para serem aplicados em unidades industriais.

O polyDADMAC é um polímero catiónico passível de ser usado como floculante no tratamento de água para consumo humano. O seu potencial como agente de controlo para a amêijoa asiática já foi comprovado por Gomes (2010). Apesar de o seu modo de acção em bivalves nunca ter sido especificamente estudado, estudos de toxicidade de surfactantes em organismos aquáticos indicam que estes compostos afectam as brânquias, adsorvendo à membrana plasmática causando a citólise das células (Abel, 1974; Post, et al., 2000).

O ião potássio é um biocida relativamente selectivo para bivalves (Mackie & Claudi, 2010). Em particular, foi já testado em *C. fluminea* sob a forma de cloreto de potássio e revelou-se um agente promissor para o seu controlo (Gomes, 2010). Não havendo estudos sobre a forma como actua na amêijoa asiática, há trabalhos que indicam que o seu modo de acção principal no bivalve invasor *D. polymorpha* é a despolarização das membranas das células do epitélio cnetidial, resultando na diminuição da capacidade de regulação do volume celular, vacuolização e finalmente destruição do tecido (Fisher, Stromberg, Bruner, & Boulet, 1991; Durand-Hoffman, 1995; O'Donnell, Durand, Robitaille, Fisher, & Stromberg, 1996). Para além da mortalidade, observou-se, mediante doses sub-letais, uma acção parálitica do ião potássio na amêijoa asiática que a impede fechar as valvas (Gomes, 2010).

A niclosamida é um agente moluscicida muito tóxico sobre o qual não há informação acerca da sua toxicidade para *C. fluminea*. No entanto, é passível de ser usado para controlar outro bivalve invasivo, a *D. polymorpha* (Waller, et al., 1993; Fisher, et al., 1994; McMahon, et al. 1994; Costa, 2008). Estudos realizados com essa espécie fazem crer que este composto actua interferindo na respiração celular (Andrews, et al., 1983; Mallatt, et al., 1994)

O dimetoato é um composto organofosforado cujo principal uso é como insecticida sistémico, nunca tendo sido testado em *C. fluminea*. Como outros organofosfatos, o dimetoato inibe a actividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), essencial no catabolismo do neurotransmissor acetilcolina.

2. Materiais e métodos

2.1. Desenho experimental

Neste estudo foram testados os químicos individuais, para além das combinações binárias anteriormente referidas em ensaios de toxicidade aguda. Todos os testes foram realizados à escala laboratorial, em condições estáticas e mediante períodos de exposição de 72 h.

Numa primeira fase, foram realizados testes de toxicidade para determinar curvas dose-resposta para o polyDADMAC, cloreto de potássio, niclosamida e dimetoato, aplicados individualmente. Os dados assim obtidos foram usados como referência para a formulação das combinações e análise dos resultados obtidos aquando dos testes das misturas.

Posteriormente, foi avaliada a toxicidade das três combinações: (i) polyDADMAC e cloreto de potássio, (ii) polyDADMAC e niclosamida, e (iii) polyDADMAC e dimetoato. Estudos da área da ecotoxicologia indicam que, no geral, a natureza da acção tóxica conjunta de poluentes pode variar com a composição da mistura (Warne, 2002). Por esta razão, foram testadas duas formulações de cada uma das combinações em estudo. Numa das formulações (Formulação LC10), os dois químicos foram misturados na proporção das respectivas concentrações individuais capazes de produzir uma mortalidade de 10% (LC_{10}), determinados a partir dos resultados dos testes de toxicidade individuais. Nessa formulação:

$$f_i = \frac{LC_{10,i}}{LC_{10,i} + LC_{10,j}} \quad \text{Equação IV.IV.1}$$

onde i e j se referem, genericamente, aos dois compostos na combinação binária, f_i é a fracção do composto i na formulação e $LC_{10,i}$ e $LC_{10,j}$ representam as concentrações dos compostos i e j necessárias para que cada um deles, individualmente, produza uma mortalidade de 10%. Numa segunda formulação (Formulação LC50), os dois compostos foram combinados na proporção das respectivas concentrações letais medianas (LC_{50}), ou seja, as concentrações individuais capazes de originar uma mortalidade de 50%, obtidos a partir dos resultados dos testes de toxicidade individuais. Nessa segunda formulação,

$$f_i = \frac{LC_{50,i}}{LC_{50,i} + LC_{50,j}} \quad \text{Equação IV.IV.2}$$

onde $LC_{50,i}$ e $LC_{50,j}$ são as concentrações letais medianas dos compostos i e j da combinação binária.

Para avaliar o desempenho das combinações, determinaram-se curvas-dose resposta para as seis formulações, testando, em cada caso, uma série de misturas de concentração crescente, definidas mantendo as fracções individuais definidas pelas equações IV.1 e IV.2.

2.2. Recolha e manutenção dos organismos de teste

As amêijoas asiáticas adultas usadas como organismo de teste foram recolhidas em Casal de São Tomé, concelho de Mira, num canal que desagua na Ria de Aveiro. As amêijoas foram recolhidas com o auxílio de uma pá e uma rede e foram seleccionados os indivíduos de dimensões intermédias (20 – 30 mm). Imediatamente após a recolha e selecção, os organismos de teste foram transportadas para o laboratório em baldes de 20 L com cerca de 15 L de água recolhida no local.

As amêijoas foram mantidas no laboratório em baldes de 20 L com água da rede desclorinada e com arejamento contínuo até serem utilizadas nos ensaios. Durante esse período a temperatura ambiente foi mantida a 20 °C e as amêijoas foram alimentadas semanalmente com *Pseudokirchneriella subcapitata*. Todos os animais usados nos testes permaneceram, no mínimo, uma semana em laboratório para garantir a sua aclimação.

2.3. Compostos químicos

Os compostos químicos usados neste estudo estão apresentados na Tabela IV.1. Em todos os testes foi usada água da rede desclorinada.

Tabela IV.1 – Características dos compostos químicos testados.

| Biocida | Nome do produto comercial | Fracção mássica de princípio activo no produto (% w/w) | Fornecedor |
|----------------------------|---|---|-------------------|
| Polydadmac | Floquat FL 4440 | 40 | SNF Lda |
| Cloreto de Potássio | Cloreto de potássio – reagente de laboratório | ~100 | Fisher Scientific |
| Niclosamida | Niclosamide – reagente de laboratório | ~100 | Sigma Aldrich |
| Dimetoato | Dafenil® | 37.7 | Bayer AG |

2.4. Testes de toxicidade aguda dos compostos químicos individuais

A toxicidade dos compostos individuais foi avaliada através de testes de toxicidade de curta duração a uma temperatura de 20 °C. Na sequência do referido na secção 2.1, este estudo preliminar teve como objectivo aferir acerca da toxicidade dos compostos individuais, em particular os que ainda não tinham sido testados em *C. fluminea* (niclosamida e o

dimetoato) e assim obter os valores de LC_{10} e LC_{50} necessários para a formulação das combinações e análise do seu desempenho.

Estes testes foram repetidos até se garantir a reprodutibilidade dos mesmos numa gama de mortalidade alargada. Após a garantia destas condições, as amêijoas foram expostas a 13 concentrações de polyDADMAC (15, 22, 34, 51, 76, 114, 171, 256, 384, 577, 865, 1298 e 1946 mg/L), 13 concentrações de KCl (15, 22, 34, 51, 76, 114, 171, 256, 384, 577, 865, 1298 e 1946 mg/L mg/L), 12 concentrações de niclosamida (0.005, 0.0088, 0.0153, 0.0268, 0.0469, 0.0821, 0.1436, 0.2513, 0.4398, 0.7697, 1.3469 e 2.3572 mg/L) e 10 concentrações de dimetoato (2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 e 1024 mg/L). Em todos os testes as amêijoas possuíam comprimentos de concha na gama 20 a 30 mm. Cada ensaio individual consistiu na exposição de conjuntos de 10 amêijoas a cada uma das concentrações de teste e a um controlo em recipientes de 1 L com 500 mL de água da rede desclorinada, com arejamento contínuo como ilustrado na Figura IV.1. No controlo não foi dosado nenhum composto químico. Cada tratamento foi aplicado em triplicado. As amêijoas foram aclimatizadas nos potes de teste contendo a água arejada durante as 24 horas prévias à dosagem dos químicos. Os químicos foram dosados a partir de uma solução-mãe, preparada através da dissolução dos produtos comerciais (Tabela IV.1) em água destilada.



Figura IV.1 – Montagem experimental dos testes de toxicidade.

A mortalidade nos potes de teste foi monitorizada 24 h, 48 h e 72 h após a dosagem. No caso da amêijoia asiática, comparativamente com outros bivalves invasivos, é particularmente difícil distinguir entre organismos vivos e organismos mortos. Para a

avaliação mortalidade foram usados dois critérios. Quando a concha estava aberta e eram visíveis os sifões (Figura IV.2.a), o critério usado foi a resposta ao toque, tendo sido considerados vivos todos os organismos que recolhiam os sifões. Quando a concha estava fechada ou não era visível a actividade dos sifões, o critério usado foi a resistência oferecida pela amêijoia quando se forçava a abertura da concha com uma agulha. Colocou-se cuidadosamente uma agulha na junção das valvas (com especial atenção à zona onde se encontram os sifões para não causar qualquer dano) e forçou-se a entrada da agulha de modo a abrir ligeiramente a concha como ilustrado na Figura IV.2 b. As amêijoas que se encontravam vivas ofereciam resistência à entrada da agulha e, após a retirada desta fechavam-se. No caso particular da exposição a cloreto de potássio, devido ao seu poder paralisante, foi dado algum tempo às amêijoas para fecharem as valvas. Assim, foram considerados mortos todos os organismos que não ofereceram resistência à abertura da concha e que não a fecharam após a inclusão da agulha. Em cada avaliação de mortalidade, os indivíduos mortos foram retirados dos potes de teste para evitar a contaminação do meio devido à sua biodegradação. A toxicidade individual dos químicos foi analisada com base nas mortalidades produzidas após 72 h de exposição.



Figura IV.2 – Avaliação da mortalidade: a) amêijoia asiática com concha aberta e sifões estendidos; b) análise da resistência da amêijoia asiática à abertura da concha com uma agulha.

2.5. Testes da toxicidade aguda das combinações binárias

As composições das seis formulações testadas, duas de cada uma das combinações em estudo, foram definidas conforme descrito na secção 2.1, sendo apresentadas na Tabela IV.2. Os valores de LC_{10} e LC_{50} dos tóxicos individuais, necessários para a determinação das suas proporções nas misturas (equações IV.1 e IV.2), foram obtidas através dos testes de toxicidade individuais (secções 2.4 e 3.1).

Tabela IV.2 – Composição das formulações testadas. Para mais detalhes na definição das porções dos componentes individuais, ver secção 2.1.

| Combinação | Proporção de polyDADMAC | Proporção do 2º componente |
|----------------------------------|-------------------------|----------------------------|
| Formulação LC10 | | |
| polyDADMAC + cloreto de potássio | 0.42 | 0.58 |
| polyDADMAC + niclosamida | 0.98 | 0.02 |
| polyDADMAC + dimetoato | 0.32 | 0.68 |
| Formulação LC50 | | |
| polyDADMAC + cloreto de potássio | 0.77 | 0.23 |
| polyDADMAC + niclosamida | 0.99 | 0.01 |
| polyDADMAC + dimetoato | 0.90 | 0.10 |

As quatro formulações contendo cloreto de potássio e dimetoato, foram avaliadas testando 12 concentrações de mistura (c_{mix}): 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024 e 2048 mg/L. Para a formulação LC10 da mistura polyDADMAC e niclosamida, foram testadas concentrações c_{mix} de 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, e 729; para a formulação LC50 da mesma combinação binária foram testadas concentrações c_{mix} de 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024 e 1340. Em todos os casos, as concentrações de mistura a testar foram escolhidas para se obter uma gama de mortalidade alargada.

Os testes da toxicidade das misturas foram realizados da mesma forma que os testes de toxicidade individuais (secção 2.4). Todas as concentrações de teste foram aplicadas em triplicado, durante 72 h. A mortalidade foi registada 24 h, 48 h e 72 h após a dosagem. Os resultados dos testes foram analisados com base nas mortalidades obtidas no fim dos tratamentos.

2.6. Análise dos dados

2.6.1. Análise da toxicidade das misturas com base em isobogramas

Os modelos disponíveis para descrever a toxicidade de misturas foram construídos na perspectiva da ecotoxicologia e da toxicologia humana, tendo sido estendidos ao projecto de misturas de biocidas para controlar bivalves aquáticos (Costa, Elliott, Aldridge, & Moggridge, 2011). Neste estudo é empregue uma abordagem de análise semelhante à destes autores.

Se o modelo de adição de concentração for válido, a toxicidade da mistura pode ser descrita por:

$$\frac{c_{x,1}}{LC_{x,1}} + \frac{c_{x,2}}{LC_{x,2}} = TU_{x,1} + TU_{x,2} = TU_{x,mix} = 1$$

onde $c_{x,1}$ e $c_{x,2}$ são as concentrações dos químicos individuais na mistura que provocam um efeito de magnitude x , $LC_{x,1}$ e $LC_{x,2}$ são as concentrações que produzem a resposta da mesma magnitude x quando as substâncias são aplicadas individualmente, os quocientes $TU_{x,1} = c_{x,1}/LC_{x,1}$ e $TU_{x,2} = c_{x,2}/LC_{x,2}$ representam o número de unidades tóxicas dos componentes na mistura e $TU_{x,mix}$ é o número total de unidades tóxicas na mistura.

Este sistema está representado na Figura IV.3. No primeiro nível de classificação a acção conjunta de químicos é representada em termos de variação de toxicidade de um dado composto como resultado da sua inclusão na mistura recorrendo aos conceitos de antagonismos, sinergismo ou inexistência de efeito combinado. Do ponto vista do controlo esta abordagem permite aferir acerca da susceptibilidade da peste a um biocida específico. Quando ocorre antagonismo, o número de unidades tóxicas de pelo menos um dos químicos é superior a um, o que significa que a sensibilidade do organismo a esse químico diminui na presença do outro. Quando não existe efeito combinado, a toxicidade de um composto não é promovida nem reduzida pela combinação e para se obter uma resposta de magnitude x é necessário que a concentração individual de um dos compostos cause o mesmo efeito. Assim, as misturas sinérgicas permitem obter a resposta considerada pela dosagem de químicos a concentrações inferiores à concentração individual que causa o mesmo efeito. Nestes casos, a susceptibilidade dos organismos a cada químico aumenta na presença do outro.

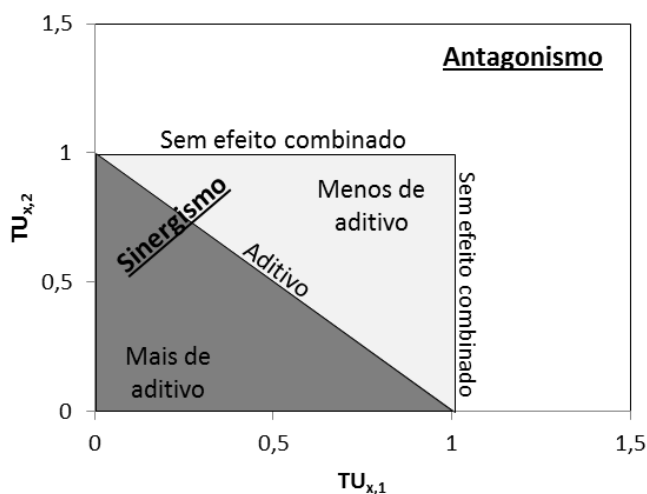


Figura IV.3 – Isobograma clarificando a terminologia usada para descrever a acção conjunta dos químicos.

Foram consideradas as respostas e as concentrações médias letais dos compostos individuais e de mistura. Os valores de LC₅₀ dos compostos individuais foram determinados a partir dos resultados da toxicidade individual dos compostos testados através da análise Probit. A composição dos tratamentos combinados foi convertida em unidades tóxicas dividindo a concentração de cada biocida presente na mistura pela respectiva concentração de efeito equivalente. O número de unidades tóxicas da mistura capaz de provocar 50% de mortalidade (TU_{50,mix}) foi determinado pela soma das unidades tóxicas individuais e as correspondentes misturas representadas num isoblograma.

2.6.2. Análise estatística

Os métodos estatísticos para a análise dos dados foram usados como descrito por Guimarães e Cabral (1997) e implementados no programa Minitab® Statistical Software¹.

3. Resultados

3.1. Testes da toxicidade aguda dos compostos químicos individuais

Os dados dose-resposta referentes a cada um dos compostos químicos testados individualmente encontram-se na Figura IV.4. Na Tabela IV.3 encontram-se os valores de LC₁₀ e LC₅₀, e respectivos intervalos de confiança 95%, referentes aos compostos em estudo. Dos compostos testados verifica-se que o mais tóxico para a *C. fluminea* é a niclosamida, enquanto que o menos tóxico é o polyDADMAC, sendo necessário menos de 1.5 mg/L e 1103 mg/L, respectivamente, destas substâncias para matar metade dos organismos após 72 h de exposição. Tal como evidenciado pela figura abaixo, a concentração dos compostos influencia significativamente a mortalidade das amêijoas. (PolyDADMAC: ANOVA um factor, F = 6.90; g. l. = 13; p < 0.001; Cloreto de potássio: ANOVA um factor, F = 27.63; g. l. = 13; p < 0.001; niclosamida: ANOVA um factor, F = 157.47; g. l. = 12; p < 0.001; e dimetoato: ANOVA com um factor, F = 123.94; g. l. = 10; p < 0.001;)

Conforme esperado, no geral, à medida que a concentração dos químicos aumenta, aumenta a mortalidade. No entanto, no caso do cloreto de potássio, os dados experimentais evidenciam um pico de mortalidade para concentrações da ordem dos 130 mg/L, o que também foi verificado por Gomes (2010), sendo ainda desconhecida a razão deste comportamento.

¹ "MINITAB® and all other trademarks and logos for the Company's products and services are the exclusive property of Minitab Inc. All other marks referenced remain the property of their respective owners. See minitab.com for more information."

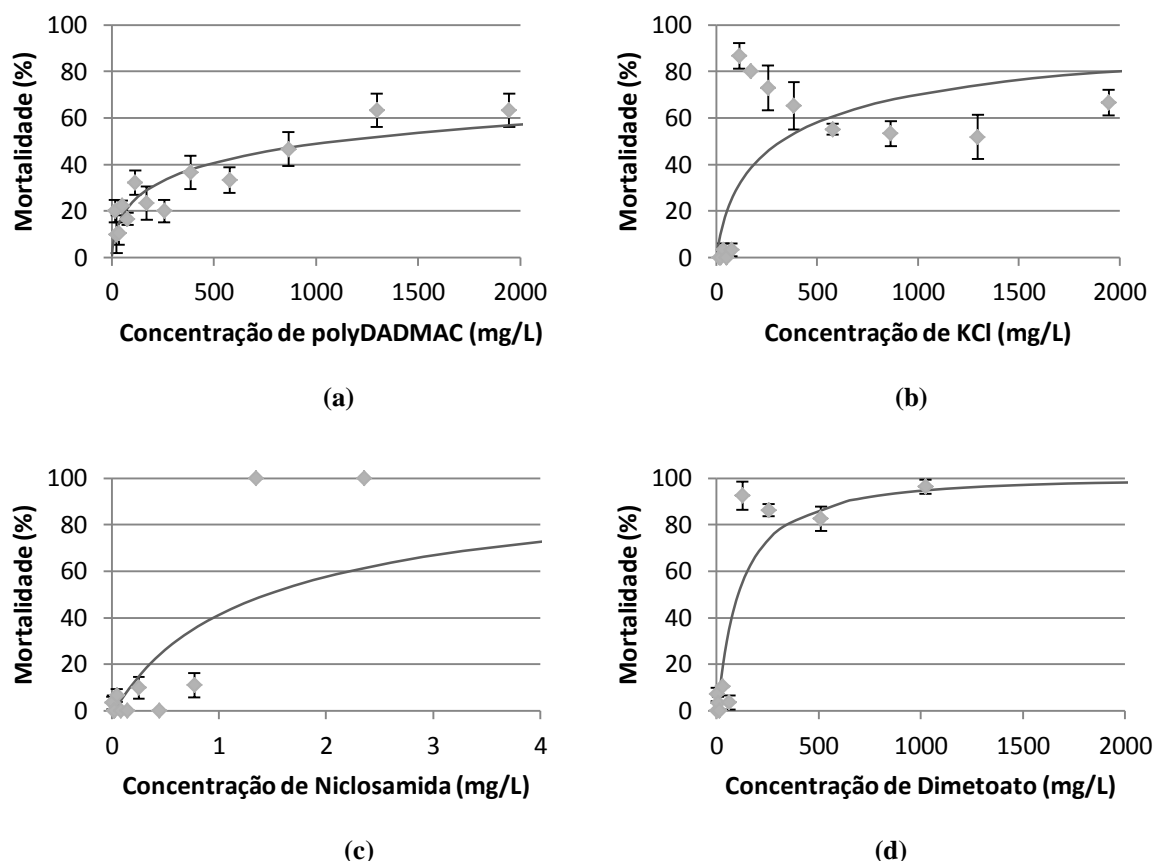


Figura IV.4 – Curvas dose-resposta para a *C. fluminea* exposta a: a) polyDADMAC, b) Cloreto de potássio, c) Niclosamida e d) Dimetoato. Os pontos representam dados experimentais (média \pm desvio padrão) e as linhas modelos dose-resposta obtidos por análise Probit (valores $p < 0.001$ para polyDADMAC, cloreto de potássio e dimetoato e $p = 0.122$ para niclosamida).

Tabela IV.3 – Valores de LC_{10} e LC_{50} e respectivos intervalos de confiança a 95% (obtidos por análise Probit) para os compostos químicos estudados (valores $p < 0.001$ para polyDADMAC, cloreto de potássio e dimetoato e $p = 0.122$ para niclosamida).

| Biocida | LC_{10} (mg/L) | 95% intervalo de confiança | LC_{50} (mg/L) | 95% intervalo de confiança |
|---------------------|------------------|----------------------------|------------------|----------------------------|
| Polydadmac | 14.94 | 3.967-31.75 | 1103 | 629.3-2722 |
| Cloreto de Potássio | 20.24 | 9.510-33.83 | 322.2 | 239.2-448.3 |
| Niclosamida | 0.1678 | 0.1023-0.2437 | 1.449 | 0.9187-2.923 |
| Dimetoato | 17.84 | 11.04-25.66 | 106.3 | 80.51-141.8 |

Deve notar-se que a qualidade do ajuste da curva Probit aos dados experimentais da niclosamida é limitada (Figura IV.4). No entanto, deve sublinhar-se que esta limitação no

ajuste não põe em causa os objectivos principais desta análise que, como já referido, são, por um lado, concluir acerca da toxicidade dos compostos e, por outro, obter valores específicos de concentrações letais, LC_{10} e LC_{50} , simplesmente para a formulação das misturas a testar. De facto, os dados experimentais, mais que os modelos, dão uma indicação do potencial tóxico dos compostos individuais. Além disso, pela observação da Figura IV.4 c), pode verificar-se que, apesar do modelo não representar razoavelmente o conjunto dos dados no seu todo, representa satisfatoriamente os dados na vizinhança dos pontos correspondentes ao LC_{10} e ao LC_{50} . Por esta razão, e porque a mistura dos compostos com base nas suas razões LC_{10} e LC_{50} é apenas um critério de formulação, o ajuste desta curva não é crítico.

3.2. Testes da toxicidade aguda das combinações binárias

3.2.1. Combinação polyDADMAC e cloreto de potássio

Os dados dose-resposta referentes às formulações binárias de polyDADMAC e cloreto de potássio encontram-se na Figura IV.5. Quer no caso da formulação LC_{10} , quer no caso da formulação LC_{50} , verificou-se que a concentração da mistura tem um efeito significativo na mortalidade (ANOVA um factor, $F = 12.66$, g. l. = 12, $p < 0.001$ para formulação LC_{10} e ANOVA, um factor, $F = 6.00$; g. l. = 12, $p < 0.001$), sendo que a resposta aumenta à medida que a concentração da mistura aumenta (Figura IV.5).

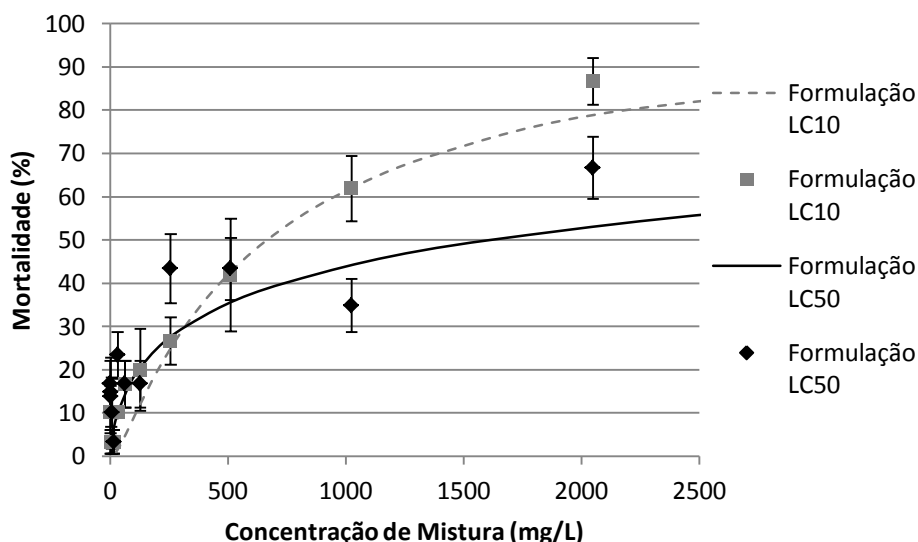
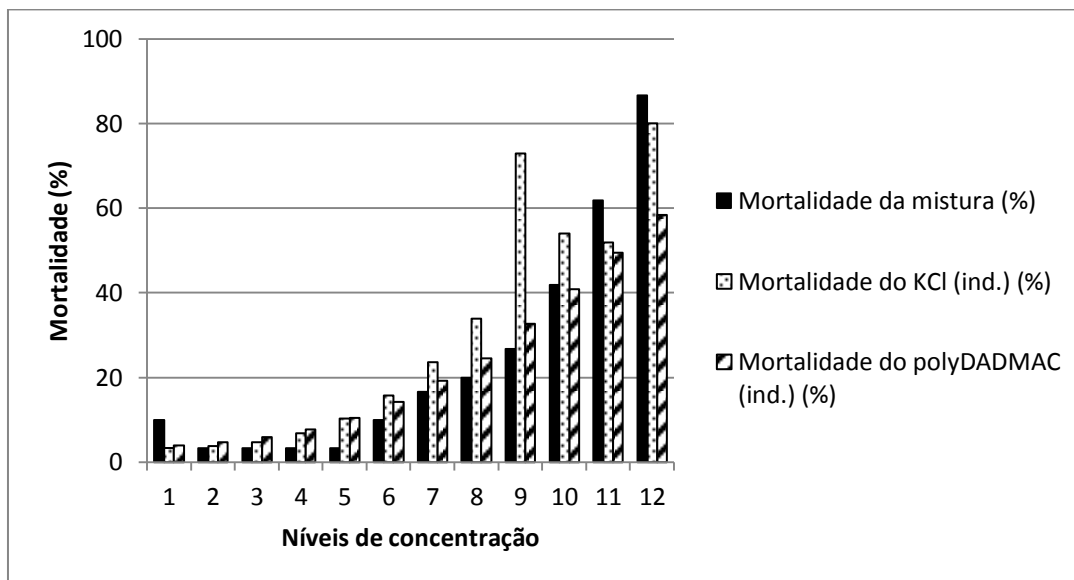


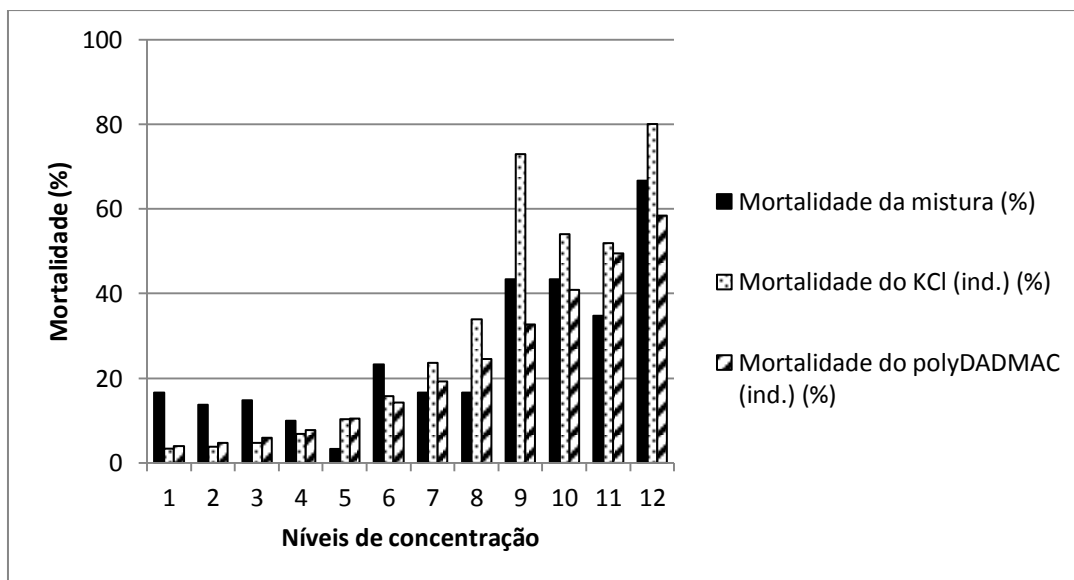
Figura IV.5 – Dados dose-resposta para as formulações de polyDADMAC com cloreto de potássio. Os pontos referem-se aos dados experimentais (média \pm desvio padrão) e as linhas representam modelos dose-resposta obtidos por análise Probit (valores $p < 0.001$).

O desempenho das formulações pode ser analisado comparando a mortalidade que produzem com as respostas que se obteriam se os químicos fossem dosados individualmente,

conforme ilustrado pela Figura IV.6. Nesta perspectiva, o desempenho das formulações foi francamente insatisfatório, sendo que no geral as misturas produziram mortalidades na mesma ordem de grandeza ou mesmo inferiores às que seriam verificadas mediante a aplicação de polyDADMAC ou cloreto de potássio individualmente.



(a)



(b)

Figura IV.6 – Comparação das respostas produzidas pelas misturas de polyDADMAC e cloreto de potássio com as que seriam esperadas no caso de os químicos serem aplicados individualmente nas concentrações a que estão presentes nas misturas: a) formulação LC10; b) formulação LC50. Para facilitar a comparação, as concentrações são apresentadas em termos de níveis de dosagem de 1 a 12, que, no caso das misturas, correspondem às concentrações 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024 e 2048 mg/L, respectivamente.

Os valores da concentração letal mediana das formulações, combinados com os conceitos de unidades tóxicas e isoblograma apresentados na secção 2.6, podem ser usados como referência para uma avaliação mais sistemática da acção conjunta dos dois compostos químicos. Após 72 h de exposição à formulação LC10, obteve-se um valor de LC₅₀ igual a 665.3 (intervalo de confiança a 95% entre 470.3 e 989.0 mg/L), o que em termos de concentração dos componentes da mistura corresponde a concentrações de 279.4 mg/L de polyDADMAC e 385.9 mg/L de cloreto de potássio. Para a formulação LC50, e também após 72 h de exposição, obteve-se um valor de LC₅₀ igual a 1612 (intervalo de confiança a 95% entre 757.9 e 9397 mg/L), que corresponde a uma concentração de 1241 mg/L de polyDADMAC e 370.7 mg/L de cloreto de potássio na mistura capaz de produzir uma mortalidade de 50%. O isoblograma apresentado na Figura IV.7 foi construído com base na comparação da composição das misturas acima com os LC₅₀ dos químicos individuais (Tabela IV.3). No geral, para este nível de resposta, os biocidas são antagonistas, tendo sido obtidos valores de unidades tóxicas de 1.2 para o cloreto de potássio no caso da formulação LC10 e de cerca de 1.1 para ambos os químicos no caso da formulação LC50. Note-se que apenas se observou um aumento da actividade do polyDADMAC face à que teria individualmente no caso da formulação LC10 (com um valor de unidades tóxicas de 0.2), ainda que, tal como se acaba de referir, esse efeito tenha sido conseguido à custa de uma diminuição significativa do poder tóxico do cloreto de potássio.

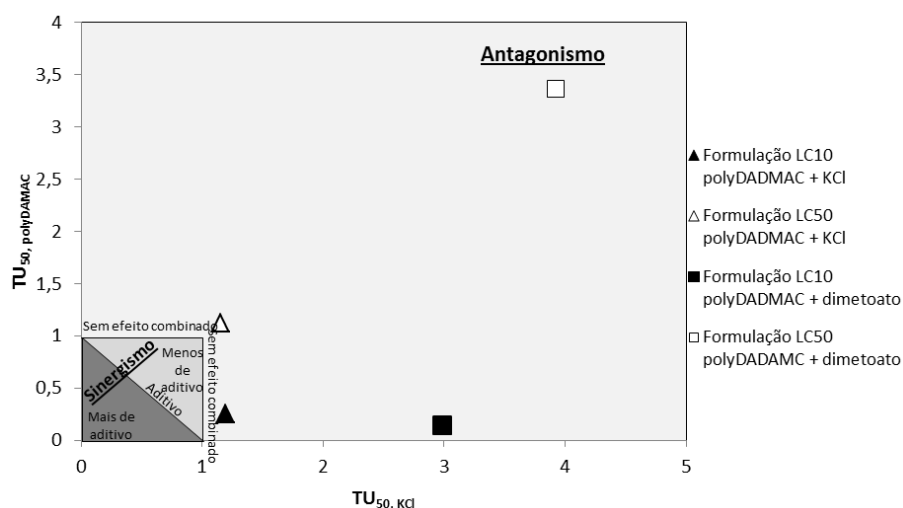


Figura IV.7 – Isoblograma referente à toxicidade das combinações estudadas para um nível de resposta de 50%. Os pontos referem-se aos dados experimentais e as linhas representam as acções conjuntas

3.2.2. Combinação polyDADMAC e niclosamida

Os dados dose-resposta referentes à combinação binária de polyDADMAC e niclosamida encontram-se na Figura IV.8. Após as 72 h de exposição, as duas formulações LC10 e LC50 produziram mortalidades baixas (não superiores a 30 %), não tendo sido possível uma descrição completa da curva dose-resposta.

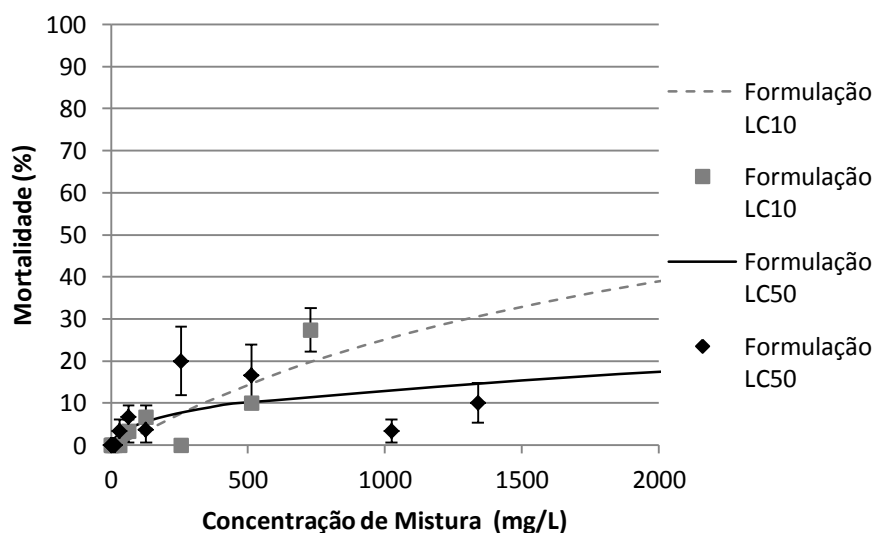
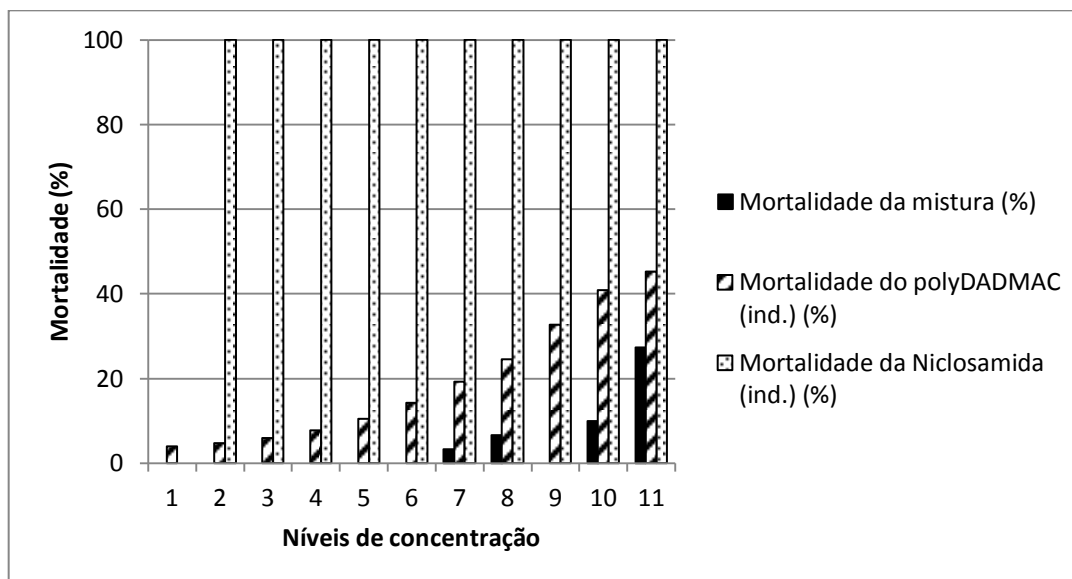
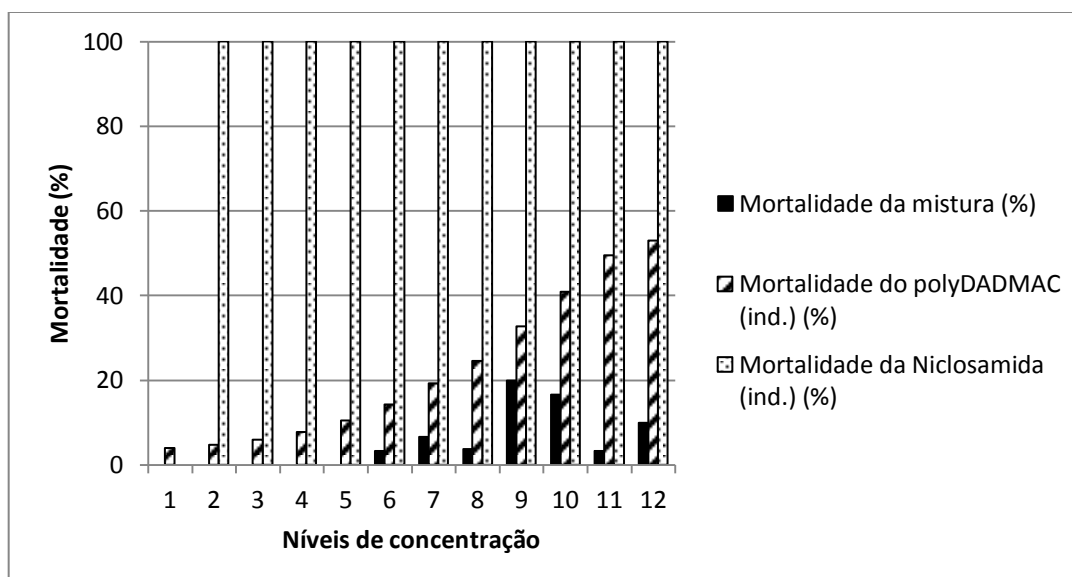


Figura IV.8 – Dados dose-resposta para as formulações de polyDADMAC com niclosamida. Os pontos referem-se aos dados experimentais (média \pm desvio padrão) e as linhas representam modelos dose-resposta obtidos por análise Probit (valores $p < 0.001$).

Tal como ilustrado na Figura IV.9, ambas as formulações são consideravelmente menos tóxicas do que os compostos individuais, observando-se uma diferença muito significativa entre a toxicidade das misturas e a da niclosamida, que, como já referido, dos quatro químicos considerados é o mais tóxico (Tabela IV.3).



(a)



(b)

Figura IV.9 – Comparação das respostas produzidas pelas misturas de polyDADMAC e niclosamida com as que seriam esperadas no caso de os químicos serem aplicados individualmente nas concentrações a que estão presentes nas misturas: a) formulação LC10; b) formulação LC50. Para facilitar a comparação, as concentrações são apresentadas em termos de níveis de dosagem de 1 a 12, que, no caso das misturas, correspondem às concentrações 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024 e 1340 mg/L, respectivamente.

Uma vez que nenhuma das misturas, no fim do tratamento, produziu mortalidades acima dos 50%, não foi possível fazer uma análise sistemática suportada por um isoblograma do tipo da apresentada para as restantes combinações (Figura IV.7).

3.2.3. Combinação polyDADMAC e dimetoato

Os dados dose-resposta referentes às formulações binárias de polyDADMAC e dimetoato encontram-se na Figura IV.10. Quer no caso da formulação LC10, quer no caso da formulação LC50, verificou-se que a concentração da mistura tem um efeito significativo na mortalidade (ANOVA um factor, $F = 136.79$, g. l. = 1, $p < 0.001$ para formulação LC10 e ANOVA, um factor, $F = 157.78$; g. l. = 1, $p < 0.001$), sendo que a resposta aumenta à medida que a concentração da mistura aumenta (Figura IV.10).

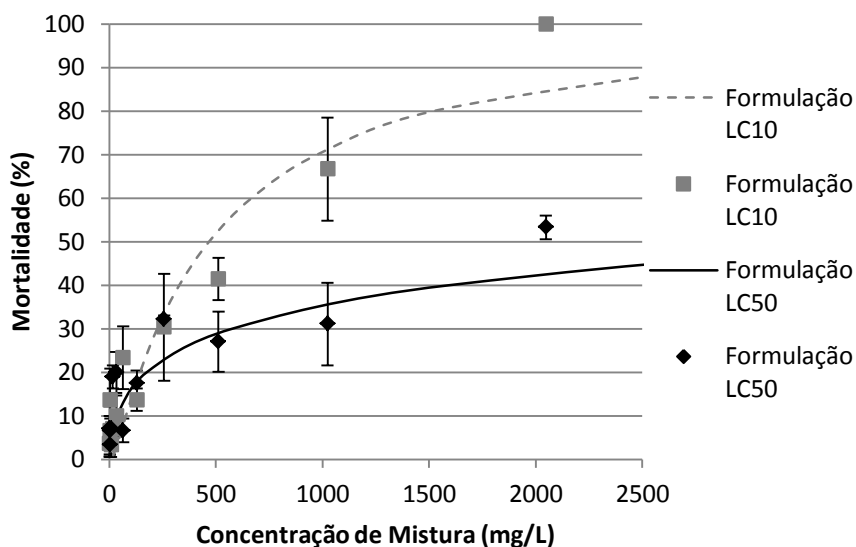
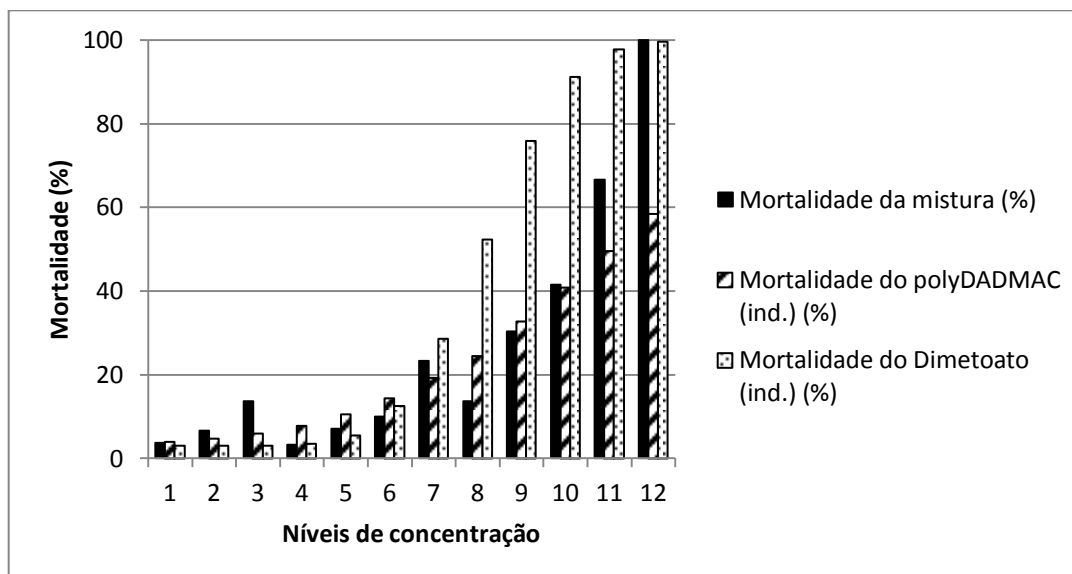
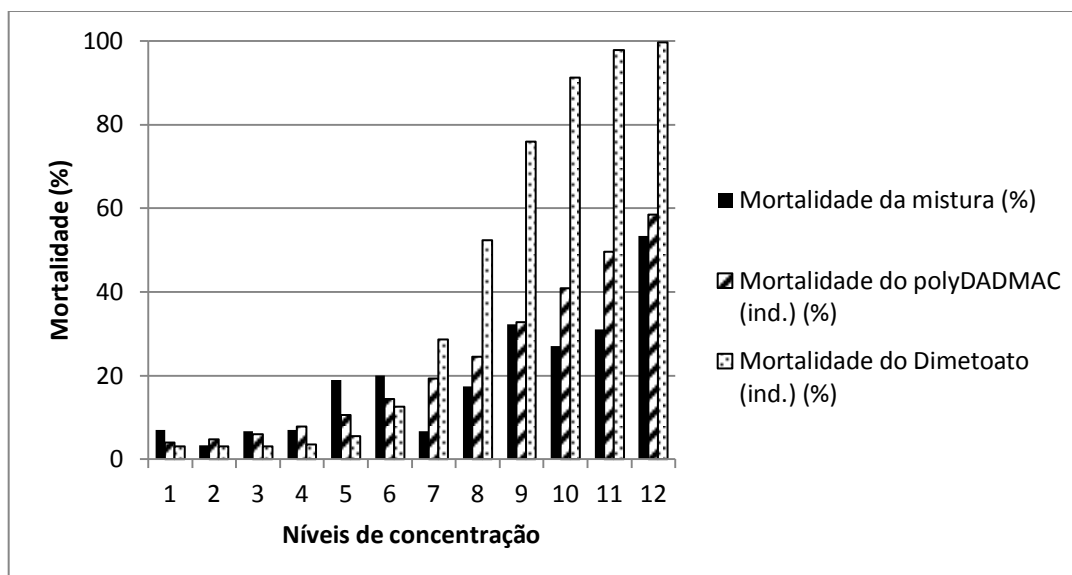


Figura IV.10 – Dados dose-resposta para as formulações de polyDADMAC dimetoato. Os pontos referem-se aos dados experimentais (média \pm desvio padrão) e as linhas representam modelos dose-resposta obtidos por análise Probit (valores $p < 0.001$).

Na Figura IV.11 compara-se a mortalidade originada pelos tratamentos combinados com as respostas que seriam de esperar caso os químicos estivessem presentes individualmente em concentrações equivalentes àquelas em que se encontram nas misturas. No geral, o dimetoato por si só produziria mortalidades bastante mais elevadas do que as resultantes da aplicação das misturas.



(a)



(b)

Figura IV.11 – Comparação das respostas produzidas pelas misturas de polyDADMAC e dimetoato com as que seriam esperadas no caso de os químicos serem aplicados individualmente nas concentrações a que estão presentes nas misturas: a) formulação LC10; b) formulação LC50. Para facilitar a comparação, as concentrações são apresentadas em termos de níveis de dosagem de 1 a 12, que, no caso das misturas, correspondem às concentrações 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024 e 2048 mg/L, respectivamente.

Após 72 h de exposição à formulação LC10, obteve-se um valor de LC_{50} de 467.5 mg/L (intervalo de confiança 95% entre 334.3 e 657.0 mg/L), que corresponde a uma concentração de 149.6 mg/L de polyDADMAC e 317.9 mg/L de dimetoato na mistura. Para a formulação LC50, após 72 h de exposição, obteve-se um LC_{50} de 4125 mg/L (intervalo de

confiança a 95% entre 1440.6 e 37205 mg/L), que corresponde a uma concentração de 3713 mg/L de polyDADMAC e 412.6 mg/L de dimetoato na mistura. Comparando estes valores com os LC₅₀ dos compostos individuais (Tabela IV.3), é possível determinar as unidades tóxicas dos compostos nas misturas de concentração mediana letal e assim representá-las num isoblograma conforme se apresenta na Figura IV.7. Essa figura mostra que, para a mortalidade de referência (50%), o nível de antagonismo entre os químicos é bastante significativo, observando-se valores de unidades tóxicas acima dos 3. Apenas o polyDADMAC viu a sua acção aumentada na presença do dimetoato no caso da formulação LC10 (com um valor de unidades tóxicas de cerca de 0.1). Porém isso foi conseguido à custa de uma diminuição significativa do poder tóxico do dimetoato (com um valor de unidades tóxicas de cerca de 3).

4. Discussão

Neste estudo foi avaliado o potencial para o controlo de amêijoia asiática de misturas binárias de polyDADMAC com outros três biocidas caracterizados por modos de actuação distintos (cloreto de potássio, niclosamida e dimetoato).

Numa primeira fase do estudo, determinaram-se as relações dose-resposta dos compostos individuais. Os compostos polyDADMAC e cloreto de potássio foram estudados por Gomes (2010). Este autor não obteve valores LC₅₀ destes compostos mas obteve 43% de mortalidade dos indivíduos expostos a 1500 mg/L de polyDADMAC e 55% de mortalidade dos indivíduos expostos a 150 mg/L de cloreto de potássio após 72 h de exposição. Estes valores são próximos dos aqui verificados. Os compostos niclosamida e dimetoato nunca foram testados na amêijoia asiática, no entanto, a niclosamida foi testada em *D.polymorpha* e Costa (2008) obteve valor LC₅₀ de 0.177 mg/L, mais baixo do que o verificado para a amêijoia asiática.

Numa segunda fase do estudo, foram testadas duas formulações, de composição distinta, de cada uma das combinações binárias. Não existe registo na literatura de testes da toxicidade de nenhuma das misturas para *C. fluminea*, por isso não existe uma referência para comparação dos resultados obtidos neste estudo. A mistura polyDADMAC e cloreto de potássio já havia sido testada no bivalve invasor *Dreissena polymorpha*, tendo-se a acção conjunta destes químicos revelado mais do que aditiva (Costa, 2008) e assim muito atractiva do ponto de vista do controlo dessa peste.

Os dados obtidos no presente estudo mostram claramente que nenhuma das combinações testadas se apresenta como promissora para o controlo da amêijoia asiática, na gama de concentrações testada, devido a um significativo antagonismo entre os químicos. Intuitivamente, este resultado pode parecer inesperado, até porque é provável que os quatro compostos actuem em locais-alvo do organismo diferentes, o que deveria contribuir para taxas de mortalidade mais elevadas do que as observadas. Note-se, porém, que a actuação conjunta de químicos é um fenómeno extremamente complexo e vários estudos da área da ecotoxicologia esforçam-se por reforçar a ideia de que a previsão, *a priori*, da toxicidade de misturas é extremamente difícil. As razões específicas para redução da toxicidade dos compostos ao serem misturados não podem ser elucidadas a partir dos testes apresentado neste capítulo, sendo necessários estudos mais detalhados, nomeadamente do modo de actuação dos químicos individuais na amêijoia asiática. No capítulo seguinte apresenta-se algum trabalho preliminar neste sentido.

5. Conclusões e trabalho futuro

Este estudo incluiu a avaliação da toxicidade de dois compostos químicos nunca antes testados em *C. fluminea*: a niclosamida e o dimetoato. Destes testes preliminares pode concluir-se que ambos os compostos são tóxicos, na gama de concentrações testada, podendo eventualmente equacionar-se a sua aplicação individual em programas de controlo.

Quanto aos estudos de toxicidade das combinações binárias de polyDADMAC com cloreto de potássio, niclosamida ou dimetoato, conclui-se que o efeito conjunto dos compostos nestas misturas, na gama de concentrações testada, é antagonista e, desconhecendo-se o modo de acção destes compostos não é possível avançar com uma justificação para tal. Devido a esse antagonismo, as misturas não são promissoras para o controlo da amêijoia asiática em ambiente industrial.

Apesar deste estudo não ter permitido a descoberta de uma estratégia de controlo inovadora, a informação aqui contida abre caminho para a procura de outras combinações de químicos que se poderão revelar de grande interesse.

Capítulo V – Estudo preliminar da acção conjunta de polyDADMAC e dimetoato na amêijoa asiática

1. Introdução

Neste capítulo apresenta-se um estudo preliminar do modo de actuação do polyDADMAC e do dimetoato em *C. fluminea* bem como da sua potencial interacção com o objectivo de auxiliar a compreensão do carácter antagonista dos químicos verificado no âmbito do Capítulo IV.

Uma vez que o modo de actuação do polyDADMAC na amêijoa asiática nunca foi estudado, não havendo nada publicado nessa área, o ponto de partida deste estudo foi o conhecimento do modo de actuação de surfactantes em organismos aquáticos em geral, e o estudo de Bidwell, Farris, & Cherry (1995) acerca do modo de actuação de um surfactante catiónico em *C. fluminea* em particular. Crê-se que o modo de actuação desta família de compostos químicos seja a adsorção das moléculas às membranas biológica, reduzindo a capacidade de osmorregulação e consequente lise celular (Abel, 1974; Gloxhuber, 1974; Post et al., 2000; Strupp, 2000). Bidwell, Farris, & Cherry (1995) estudaram a variação do teor de água corporal de amêijoas asiáticas expostas a estes compostos para verificar este modo de actuação após a exposição a concentrações sub-letais do surfactante catiónico DGH/QUAT (cloridrato de dodecilguanidina/ cloreto de n-alquildimetilbenzilamónia). Os resultados obtidos por estes autores indicam que o modo de actuação dos compostos em causa é semelhante ao já verificado para outras substâncias do mesmo tipo noutros organismos aquáticos. Neste contexto, uma primeira hipótese colocada e testada neste estudo (hipótese 1) foi a de que a actuação do polyDADMAC na amêijoa asiática passa por um efeito semelhante ao observado por Bidwell, Farris, & Cherry (1995) e em determinadas condições esse efeito pode ser diminuído na presença do dimetoato.

O dimetoato é um composto organofosforado e o seu modo de actuação em insectos e mamíferos e em organismos aquáticos é conhecido. Tal como todos os compostos organofosforados, o dimetoato actua sobre a enzima acetilcolinesterase (AChE), responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina em colina e ácido acético (Fukuto, 1990). O dimetoato liga-se ao centro activo desta enzima impedindo a reacção de hidrólise, resultando na sobre estimulação do receptor e contínua produção do sinal nervoso. A acção deste tipo de

pesticidas em *C. fluminea* tem sido estudada do ponto de vista da ecologia, nomeadamente, na tentativa de usar a espécie como indicador de poluição aquática (Moulton et al., 1996; Basack et al., 1998; Mora et al., 1999; Beltran et al., 2010). Destes estudos pode concluir-se que os compostos organofosforados também inibem a actividade da AChE da amêijoia asiática. A segunda hipótese colocada neste estudo (hipótese 2) passou por considerar que o dimetoato actua na amêijoia asiática a nível da enzima AChE, sendo essa acção diminuída na presença do polyDADMAC. Para testar esta hipótese, procedeu-se à quantificação da actividade da enzima AChE em bivalves expostos a misturas representativas das formulações LC10 e LC50 testadas no capítulo anterior.

2. Materiais e métodos

2.1. Recolha e manutenção dos organismos de teste

As amêijoas asiáticas adultas usadas como organismos de teste neste estudo foram recolhidas, preparadas e mantidas conforme descrito na secção 2.2 do Capítulo IV.

2.2. Compostos químicos

O polyDADMAC e dimetoato usados neste estudo foram dosados a partir dos respectivos produtos comerciais apresentados na Tabela V.1.

2.3. Exposição dos organismos de teste aos químicos

Em conformidade com as hipóteses colocadas (secção 1), foram realizadas duas séries de exposições, no sentido de avaliar o modo de actuação de cada um dos químicos e a forma como ele é afectado pela presença do segundo. Assim sendo, amêijoas asiáticas adultas foram expostas aos compostos individuais e a duas misturas binárias de polyDADMAC e dimetoato, a Mistura_50 e a Mistura_10. Na Mistura_50, ambos os químicos estavam presentes nas concentrações correspondentes aos seus LC50, mantendo-se assim a composição da formulação LC50 testada no âmbito do Capítulo IV. A Mistura_10 continha o dimetoato na concentração LC50 e o polyDADMAC na concentração que permite manter a relação de concentrações aplicadas na formulação LC10 referido no Capítulo IV.

Na Tabela V.1 encontram-se os tratamentos envolvidos no teste das duas hipóteses em estudo.

Tabela V.1 – Tratamentos efectuados no âmbito do estudo dos modos de acção do polyDADMAC e dimetoato e das suas interacções.

| | Efeitos do modo de actuação do polyDADMAC (hipótese 1) | | Efeitos do modo de actuação do dimetoato (hipótese 2) | |
|-------------------|--|---|---|------------|
| | Concentrações individuais testadas (mg/L) | Concentrações individuais testadas (mg/L) | Concentrações nas misturas testadas (mg/L) | |
| | | | Mistura_10 | Mistura_50 |
| PolyDADMAC | 1102 e 58 | 1102 e 58 | 58 | 1102 |
| Dimetoato | 106 | 106 | 106 | 106 |

A exposição das amêijoas, com comprimentos de concha na gama 20 a 30 mm, foi efectuada em condições agudas (72 h), a uma temperatura de 20 °C. Os ensaios consistiram na exposição de conjuntos de 20 amêijoas às concentrações referidas acima e a um controlo (sem dosagem de químicos), em recipientes de 200 mL com 100 mL de água da rede desclorinada e com arejamento contínuo como ilustrado na Figura V.1. Os organismos de teste foram aclimatizadas nos potes individuais contendo a água arejada durante as 24 horas prévias à dosagem dos químicos. Os químicos foram dosados a partir de uma solução-mãe, preparada através da dissolução dos produtos comerciais (Tabela IV.1) em água destilada.



Figura V.1 – Montagem experimental no âmbito do estudo dos modos de acção do polyDADMAC e dimetoato e das suas interacções.

2.4. Determinação de parâmetros bioquímicos

2.4.1. Efeitos no modo de actuação do polyDADMAC (hipótese 1): quantificação do teor de água

Após a exposição das amêijoas durante 24 h como referido na secção 2.3, 10 amêijoas foram imediatamente excisadas e foram determinados os seus pesos húmidos. Às restantes foi mudado o meio de teste para água desclorinada onde permaneceram 24 h. Findas as 24 h procedeu-se à determinação dos seus pesos húmidos. Este período de recuperação teve como objectivo verificar a capacidade de recuperação das amêijoas após o contacto com o químico.

Os pesos húmidos foram determinados numa balança electrónica KERN ABJ, (com precisão 0.0001g) e após as pesagens as massas viscerais foram colocadas numa estufa a 60 °C. Foram feitas pesagens diárias até não se verificarem alterações de peso da ordem dos 0.001g.

O teor de água corporal foi calculado como:

$$\text{Teor de água (\%)} = \frac{\text{peso húmido} - \text{peso seco}}{\text{peso húmido}} \times 100 \quad \text{Equação V.1}$$

2.4.2. Efeitos no modo de actuação do dimetoato (hipótese 2): quantificação da actividade da acetilcolinesterase

Após exposição das amêijoas durante 72 h como referido na secção 2.3, a actividade da enzima AChE foi determinada pelo método de Ellman et al. (1961) adaptado para microplacas por Guilhermino et al. (1996) e modificado por Ramos et al. (in press). Foram excisadas 10 amêijoas sobreviventes à exposição e os seus tecidos moles foram homogeneizados a 4 °C em 3 mL de solução tampão fosfato 0.1 M, pH 7.2. O homogeneizado foi imediatamente centrifugado a 6000 rpm durante 3 minutos a 4 °C. A actividade da AChE do sobrenadante foi determinada usando iodeto de acetiltiocolina (ASChI) como substrato. A tiocolina resultante da hidrólise da ASChI por acção da AChE é feita reagir com o ácido 5,5-ditio-bis(2-nitrobenzóico) (DTNB) formando-se um complexo amarelo, o ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) cuja formação pode ser monitorizada a um comprimento de onda de 412 nm.

Neste estudo fez-se reagir 50 µL de sobrenadante com uma solução de reacção constituída por 240 µL de tampão fosfato (0.1 M, pH 7.2), 8 µL de 10 mM DTNB e 2 µL de 0.075 M ASChI para iniciar a reacção enzimática. A absorvância foi medida 10 e 15 minutos após o início da reacção usando espectrofotómetro com filtro de 405 nm. A actividade de AChE foi expressa em $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}_{\text{proteína}}^{-1}$. A quantidade de proteína presente no

sobrenadante foi determinada usando o Método de Bradford (Bradford, 1976) com Coomassie® Brilliant Blue G-250 como reagente e γ -globulina bovina como proteína-padrão.

2.5. Análise estatística

Os métodos estatísticos para a análise dos dados foram usados como descrito por Guimarães e Cabral (1997) e implementados no programa Minitab® Statistical Software¹.

3. Resultados

3.1. Efeitos no modo de actuação do polyDADMAC (hipótese 1): quantificação do teor de água

Os dados referentes à variação do teor de água corporal das amêijoas expostas a polyDADMAC, com e sem período de recuperação em água não tratada, encontram-se na Figura V.2. Não se verificaram variações significativas do parâmetro em estudo nem com o tipo de tratamento (com ou sem recuperação), nem com a concentração de polyDADMAC dosada (ANOVA, 2 factores; $F = 0.345$; g. l. = 2; $p = 0.7101$ e ANOVA; 2 factores; $F = 0.052$; g. l. = 5; $p = 0.8206$). Uma tal independência do teor de água corporal das amêijoas face à dosagem do polímero é indicação de que, pelo menos na gama de concentrações em estudo, o polyDADMAC não actua de acordo com a hipótese colocada. Assim sendo, não se procederam a medições do teor de água de amêijoas expostas a misturas de polyDADMAC com dimetoato, o que permitiria uma primeira análise da interacção entre os dois compostos.

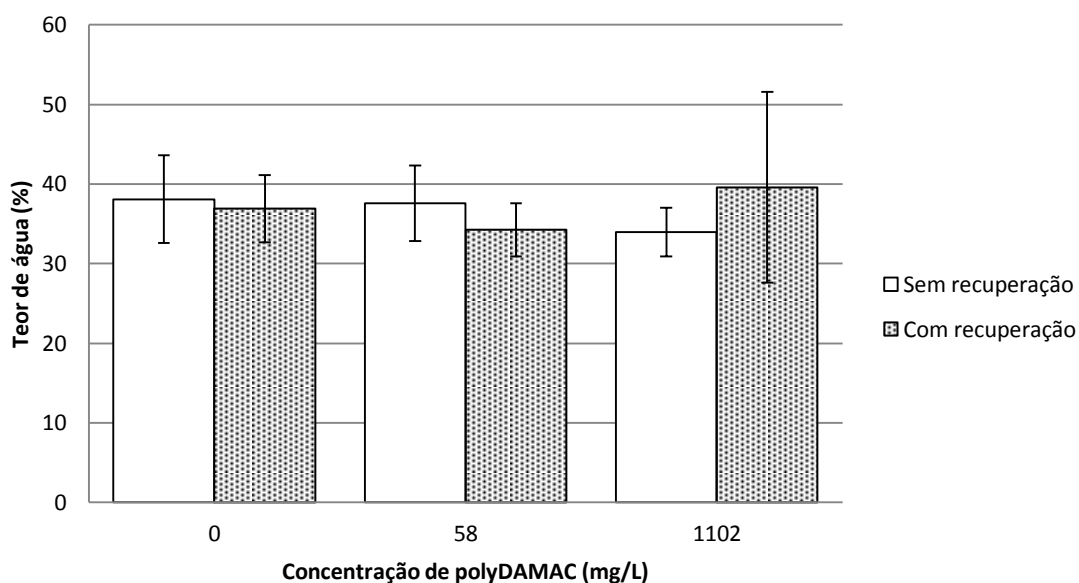


Figura V.2 – Valores do teor de água corporal em percentagem (Média \pm desvio padrão).

3.2. Efeitos no modo de actuação do dimetoato (hipótese 2): quantificação da actividade da acetilcolinesterase

Os dados referentes à actividade da acetilcolinesterase após 72 h de exposição às concentrações de teste (Tabela V.1) encontram-se na Figura V.3.

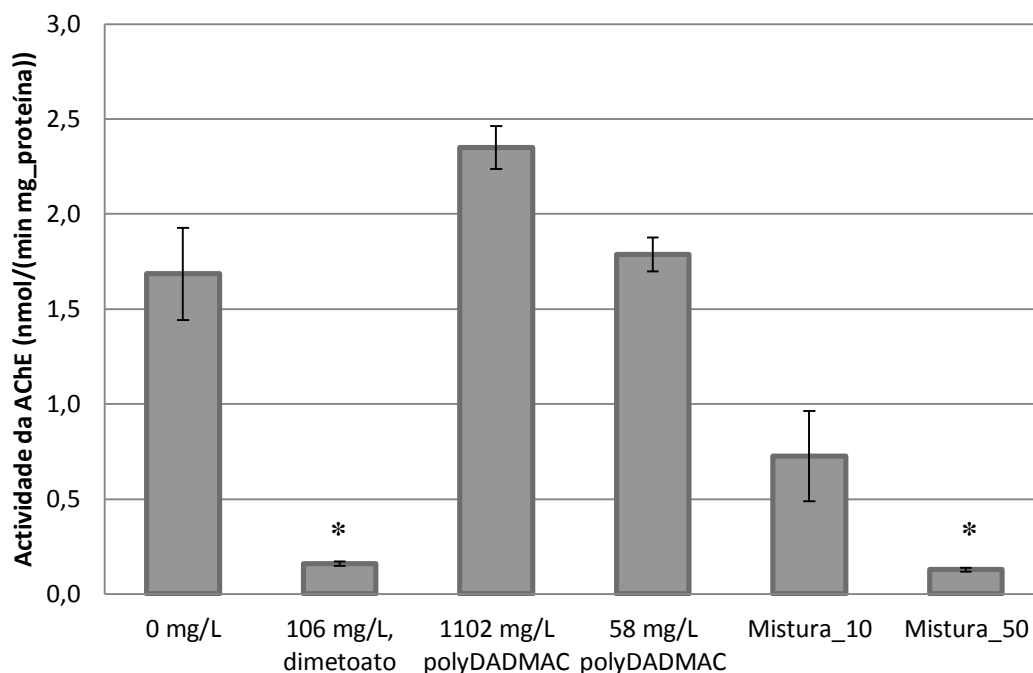


Figura V.3 – Valores da actividade da acetilcolinesterase (Média ± desvio padrão).

Verificou-se que a concentração de dimetoato tem efeito significativo na actividade da AChE (ANOVA, um factor, $F = 409.9207$; g.l. = 1; $p < 0.0001$), o que suporta a hipótese deste químico actuar a nível do sistema nervoso à semelhança do que se passa nos insectos. A concentração de polyDADMAC também afecta significativamente a actividade da AChE (ANOVA, um factor, $F = 757.0537$; g. l. = 2; $p < 0.001$); apesar de no caso dos tratamentos com o polímero se terem verificado valores de actividade da enzima ligeiramente superiores aos obtidos no controlo, as diferenças não são estatisticamente relevantes ($p = 1$). Os tratamentos com as misturas também afectaram significativamente a actividade da AChE (ANOVA; 1 factor; $F = 19.2186$; g. l. = 5; $p < 0.001$), no entanto, apesar de se verificar uma diminuição da actividade enzimática após a exposição à Mistura_10, o valor de actividade observado não é estatisticamente diferente do do controlo (ANOVA, um factor, $F = 19.2186$ g.l. = 5; $p = 0.106704$). A actividade enzimática após exposição à Mistura_50 é estatisticamente diferente da actividade observada no controlo ($p < 0.001$) mas não da observada no caso da exposição ao dimetoato ($p = 1$) nem da registada no caso da Mistura_10

($p = 0.0877$), o que é uma indicação de que, pelo menos na gama de concentrações em estudo, a interacção entre os químicos não parece envolver este modo de actuação específico.

4. Discussão

Neste estudo tentou-se avaliar o modo de actuação e a interacção entre dois dos compostos químicos testados nas misturas binárias referidas no Capítulo IV, o polyDADMAC e o dimetoato, com o objectivo de explicar o carácter antagonista dos químicos. Reforça-se aqui novamente que este era um estudo preliminar.

Em relação ao estudo de modo de actuação do polyDADMAC na amêijoa asiática, verificou-se que não existem variações significativas dos valores de teor de água corporal após a exposição a este composto. Ao contrário do observado para o surfactante DGH/QUAT (Bidwell et. al, 1995), o estudo aqui apresentado indica que o modo de actuação do polyDADMAC não parece afectar a capacidade de osmorregulação das células do bivalve.

O estudo do modo de actuação do dimetoato indica que, como esperado, este composto inibe a actividade da AChE da amêijoa asiática, tendo sido verificada uma inibição de cerca de 90% da actividade da enzima após 72 h de exposição a 106 mg/L do composto. Neste estudo também se pretendeu avaliar a interacção entre o polyDADMAC e o dimetoato na actividade da enzima. Os resultados da exposição individual ao polyDADMAC indicam que este composto, individualmente, não afecta a actividade da enzima, assim como não parece interferir com a acção do dimetoato quando aplicado em misturas. Assim sendo, os resultados deste estudo preliminar não permitem concluir quanto às razões do antagonismo entre o polyDADMAC e o dimetoato observados no capítulo IV.

5. Conclusões e trabalho futuro

Destes testes preliminares pode concluir-se que o modo de actuação de polyDADMAC não é semelhante ao verificado em surfactantes catiónicos (Bidwell, Farris, & Cherry, 1995), provavelmente, este composto não afectará a capacidade de osmorregulação das células da amêijoa asiática. No entanto, nesta fase, este resultado é ainda preliminar e deverá ser feita uma análise mais alargada, nomeadamente considerando uma gama de concentrações maior.

A partir do estudo do modo de actuação do dimetoato, pode concluir-se que este composto inibe a actividade da AChE e que o polyDADMAC não promove a actuação do

dimetoato a nível. Assim sendo, são necessários estudos mais detalhados para perceber a interacção destes dois compostos. Este tipo de informação será uma ferramenta crucial para o projecto de misturas mais eficientes.

Capítulo VI – Conclusões e trabalho futuro

A amêijoia asiática é um bivalve invasor de água doce conhecido pela sua acção bioincrustante nas indústrias hidrodependentes. Apesar da introdução desta espécie em Portugal datar de 1980, as indústrias nacionais em geral desconhecem esta espécie e a necessidade da monitorização das fontes de água primárias para a minimização da sua dispersão e dos seus impactes.

Os programas de monitorização, para além de fornecerem informação crucial acerca da sua dispersão são ainda essenciais para a aplicação de estratégias de controlo eficientes e ambientalmente seguras em contexto industrial. Assim, o Capítulo III desta tese reúne informação específica que poderá permitir às instalações industriais projectar um programa de monitorização que permita a detecção de velígeras, juvenis e adultos e a monitorização do crescimento de populações já instaladas.

Deste estudo conclui-se que as técnicas de monitorização paralela não são aplicáveis à amêijoia asiática e que um programa de monitorização trará benefícios às instalações industriais não só porque lhes permite tomar conhecimento da presença da espécie nas suas fontes de água primárias mas também porque lhes permite planear o programa de controlo de modo a aumentar a sua eficácia e reduzir custos associados.

A avaliação do potencial de misturas binárias de químicos para o controlo da amêijoia asiática (Capítulo IV) incluiu o estudo preliminar da toxicidade de dois compostos que ainda não haviam sido testados em *C. fluminea*: a niclosamida e o dimetoato. Deste concluiu-se que ambos os compostos são tóxicos, podendo considerar-se a sua possível aplicação em programas de controlo. Para a confirmação desta possibilidade aconselham-se testes de toxicidade de longa duração e testes de toxicidade a organismos não-alvo.

As misturas binárias testadas neste estudo eram constituídas por polyDADMAC e um dos três compostos: cloreto de potássio, niclosamida e dimetoato. Estas misturas foram combinadas de duas formas diferentes tendo como base os valores de LC₁₀ e LC₅₀ dos compostos individuais. Todos as misturas se revelaram menos tóxicas do que os compostos individuais. Ainda que o polyDADMAC tenha visto o seu efeito aumentado nas formulações 10 das misturas com cloreto de potássio e com dimetoato, este aumento foi conseguido à custa da diminuição de toxicidade do outro componente da mistura. A diminuição de toxicidade da formulação LC₁₀ da mistura polyDADMAC e dimetoato foi observável através de um estudo preliminar sobre o modo de actuação deste último que revelou uma diminuição da actividade

da enzima acetilcolinesterase, que se provou ser afectada por este composto neste mesmo estudo.

Conclui-se assim que nenhuma destas misturas é promissora para o controlo da amêijoa asiática em ambiente industrial. Os estudos sobre modos de actuação indicam que o modo de actuação do dimetoato passa pela inibição da acetilcolinesterase e que o modo de actuação do polyDADMAC não tem influência nem sobre o teor de água corporal das amêijoas nem sobre a enzima acetilcolinesterase.

Bibliografia

- Abel, P. (1974). Toxicity of synthetic detergents to fish and aquatic invertebrates. *Journal of Fish Biology*, 6, pp. 279-298.
- Aldridge, D., & McMahon, R. (1978). Growth, fecundity and bioenergetics in a natural population of the Asiatic clam, *corbicula manilensis* Philippi, from north central Texas. *Journal of Molluscan Studies* 44, 49-70.
- Aldridge, D., & Müller, S. (2001). The Asiatic clam, *Corbicula fluminea*, in Britain: Current status and potential impacts. *J. Conchol*, 37, pp. 177-183.
- Andrews, P., Thyssen, J., & Lorke, D. (1983). The biology and toxicology of molluscicides, Bayluscide. *Pharmacology & Therapeutics*, 19, 245-295.
- Araujo, R., Moreno, D., & Ramos, M. (1993). The Asiatic clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774), (Bivalvia: Corbiculidae) in Europe. *American Malacological Bulletin*. 10(1), pp. 39-49. Spain: Museo Nacional de Ciencias Naturales.
- Basack, S., Oneto, M., Fuchs, J., Wood, E., & Kesten, E. (1998). Esterases of *Corbicula fluminea* as Biomarkers os Exposure to Organophosphorus Pesticides. *Environmental Contamination and Toxicology*, 61, pp. 569-576.
- Beltran, K., & Pocsidio, G. (2010). Acetylcholinesterase activity in *Corbicula fluminea* Müller, as a biomarker of organophosphate pesticide pollution in Pinacanauan River, Philippines. *Environmental Monitoring Assess*, 165, pp. 331-340.
- Bidwell, J., Farris, J., & Cherry, D. (1995). Comparative response of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, and the Asian clam, *Corbicula fluminea*, to DGH/QUAT, a nonoxidizing molluscicide. *Aquatic Toxicology*, 33, pp. 183-200.
- Bij de Vaate, A., & Greijdanus-Klaas, M. (1990). The Asiatic clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) (Pelecypoda, Corbiculidae), a new immigrant in the Netherlands. *Bull. Zool. Mus. Amsterdam*, 12, pp. 173-177.
- Bij de Vaate, A., & Hulea, O. (2000). Range extension of the Asiatic clam, *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) in the River Danube: first record from Rumania. *Lauterbornia*, 38, pp. 23-26.
- Bradford, M. (1976). A rapid an sensitive method for the quantification os microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, pp. 254-258.

- Britton, J., Coldiron, D., Evans, L., Golightly, C., O'Kane, K., & Teneyck, J. (1979). Reevaluation of the growth pattern in *Corbicula fluminea* (Müller). *Proceedings of the First International Corbicula Symposium*, J. C. Britton ed. (pp. 177-192). Fort Worth, TX: Texas Christian University Research Foundation.
- Charusombat, U., & Sabalowsky, A. (1997). *Environmental Sampling & Monitoring Primer*. Consultado em 17 de Agosto de 2011, de <http://www.cee.vt.edu/ewr/environmental/teach/smprimer/dredges/dredges.html>
- Claudie, R., & Mackie, G. (1994). *Practical Manual for Zebra Mussel Monitoring and Control*. Boca Raton: Lewis Publishers.
- Costa, R. (2008). *Improved solutions for zebra mussel Dreissena polymorpha control*, PhD thesis. University of Cambridge.
- Costa, R., Elliott, P., Aldridge, D., & Moggridge, G. (2011). Enhanced mortality of the biofouling zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, through the application of combined control agents. *Journal of Great Lakes Research*, pp. 272-278.
- Crosier, D., & Molloy, D. (2002, Março 14). *Zebra Mussel Information System*. Consultado em 17 de Agosto de 2011, de Zebra Mussel Information System: <http://el.erdc.usace.army.mil/zebra/zmis/>
- Darrigran, G. (2002). Potential impac of filter-feeding invaders on temperate inland freshwater environments. *Biological Invasions*, 4, pp. 145-156. Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Durand-Hoffman, M. (1995). *Analysis of physiological and toxicological effects of potassium on Dreissena polymorpha and toxicological effects on fish*. Ohio State University, Columbus: MS thesis.
- Ellman, G., Courtney, K., Anders, V., Jr, & Featherstone, R. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, pp. 88-95.
- Elzinga, W., & Butzlaff, T. (1994). Carbon dioxide as a narcotizing pre-treatment for chemical control of *Dreissena polymorpha*. *The Fourth International Zebra Mussel Conference*. Madison.
- Eng, L. (1979). Population dynamics of the Asiatic clam, *Corbicula fluminea* (Müller), in the concrete lined Delta-Mendota Canla of Central California. *First International Corbicula Symposium*, pp. 36-68.

- Fisher, S., Dabrowska, H., Waller, D., Babcock-Jackson, L., & Zhang, X. (1994). Sensitivity of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) life stages to candidate molluscicides. *13*, 373-377.
- Fisher, S., Stromberg, P., Bruner, K., & Boulet, L. (1991). Molluscidal activity of potassium to the zebra mussel, *Dreissena polymorpha* - toxicity and mode of action. *Aquatic Toxicology*, *20*, pp. 219-234.
- Fox, R. (1971). The Corbicula Story: Chapter 3. *Fourth Annual Meeting, Western Society of Malacologists*.
- Fox, R. (2006, March 13). *Invertebrate Anatomy OnLine*. Consultado em 17 de Agosto de 2011, de *Corbicula fluminea*, Asian Clam: <http://webs.lander.edu/rsfox/invertebrates/corbicula.html>
- Fukuto, T. (1990). Mechanism of Action of Organophosphorus and Carbamate Insecticides. *Environmental Health Perspectives*, *87*, pp. 245-254.
- Gloxhuber, C. (1974). Toxicological properties of surfactants. *Archives of Toxicology*, *32*, pp. 245-269.
- Gomes, J. (2010). *A amêijoia asiática Corbicula fluminea na indústria de tratamento de água em Portugal: impactos e controlo*. Coimbra: Universidade de Coimbra.
- Graney, R., Cherry, D., Rodgers Jr, J., & Cairns Jr, J. (1980). The influence of thermal discharges and substrate composition of the asiatic clam *Corbicula fluminea*, in the New River, Virginia. *The Nautilus*, *94(4)*, pp. 130-135.
- Guilhermino, L., Lopes, M., Carvalho, A., & Soares, A. (1996). Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute test with Juvenile *Daphnia magna*. *Chemosphere*, *32*, pp. 727-738.
- Guimarães, R., & Cabral, J. (1997). *Estatística*. Lisboa: McGraw-Hill.
- Hanna, G. (1966). Introduced mollusks of western North America. *Occasional Papers, California Academy of Sciences* *48*, pp. 1-108.
- Heinson, G. (1958). *Life history and ecology of the freshwater clam, Corbicula fluminea*, MSc thesis. Berkeley: University of California.
- Hoskin Scientific. (2003). Consultado em 17 de Agosto de 2011, de http://www.hoskin.ca/catalog/images/Wildlife%20Supply_Ekman%20Grab%20Kit_196%20B12.jpg
- Johnson, L. (1995). *Enhanced early detection and enumeration of zebra mussel (Dreissena spp.) veligers using cross-polarized light microscopy*. Belgium: Kluwer Academic Publishers.

- Kennedy, V., & van Huekelem, L. (1985). Gametogenesis and larval production in a population of the introduced Asiatic clam, *Corbicula sp.* (Bivalvia: Corbiculidae). *Maryland, Biological Bulletin* 168, 50-60.
- Kraemer, L. (1978). *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Sphaeriacea): The functional morphology of its hermaphroditism. *Bulletin American Malacological Union*, pp. 40-49.
- Kraemer, L. (1983). Proto-oogamy, embryogenesis and heterochrony in *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Corbiculacea). *American Zoologist* 23 (4), p. 1005.
- Kraemer, L., & Galloway, M. (1986). Larval development of *Corbicula fluminea* (Müller) (bivalvia: corbiculacea): An appraisal of its heterochrony. *American Malacological Bulletin*, pp. 61-79.
- Kraemer, L., & Lott, D. (1977). Microscopy anatomy of the visceral mass of *Corbicula* (Bivalvia: Sphaeriacea). *Bulletin American Malacological Union*, (pp. 48-55).
- Mackie, G. L., & Claudi, R. (2010). *Monitoring and Control of Macrofouling Mollusks in Fresh Water Systems* (Second Edition ed.). United States of America: CRC Press.
- Mallatt, J., McCall, R., Bailey, J., & Seelye, J. (1994). Effects of lampricides on gill ultrastructure of larval sea lampreys and rainbow trout fry. *72*, 1653-1664.
- Mattice, J. (1977). *Interactions of Corbicula sp. with poewr plants*. United States: Environmental Sciences Division.
- McMahon, R. (1982). The occurrence and spread of the introduced Asiatic freshwater clam, *Corbicula fluminea* (Müller) in North America. *The Nautilus*, 96(4), pp. 134-141.
- McMahon, R. (1983). Ecology of an invasive pest bivalve, *Corbicula*. *The Mollusca: Ecology* (pp. 505-561). New York: Academic Press Inc.: W. D. Russel-Hunter.
- McMahon, R. (2000). Invasive characteristics of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea*. *Non-indigenous Freshwater Organisms: Vectors, Biology and Impacts*, R. Claudi and J. Leach eds, pp. 315-343.
- McMahon, R. (2000). Invasive characteristics of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea*. *Nonindigenous Freshwater Organisms. Vectors Biology and Impacts* (pp. 315-343). Boca Raton: Lewis Publishers.
- McMahon, R. F. (2002). Evolutionary and physiological adaptations of aquatic invasive animals: selection versus resistance. *Can J Fish Aquat Sci*, (pp. 1235-1244).
- McMahon, R., & Bogan, A. (2001). Ecology and classification of North American freshwater invertebrates. *Mollusca: Bivalvia*, (pp. 331-429).
- McMahon, R., Ussery, T., & Clarke, M. (1994). Review of zebra mussel control methods (Technical Note ZMR-2-14).

- Miller, G., & McClure, F. (1931). The freshwater clam industry of the Peral River. *Lingnam Science Journal* 10, 307-322.
- Mora, P., Michel, X., & Narbonne, J.-F. (1999). Cholinesterase activity as potential biomarker in two bivalves. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 7, pp. 253-260.
- Morton, B. (1973). Some aspects of the biology and functional morphology of the organs of feeding and digestion of *Limnoperna fortunei* (Bivalvia: Mytilacea). *Malacologia* 12, 265-281.
- Moulton, C., Fleming, W., & Purnell, C. (1996). Effects of two cholinesterase-inhibiting pesticides on freshwater mussels. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15, pp. 131-137.
- Mouthon, J. (1981). Sur la presence en France et au Portugal de *Corbicula* (Bivalvia, Corbiculidae) originaire d'Asie. *Basteria*, 45, pp. 109-116.
- Neitzel, D., Johnson, K., Page, T., Young, J., & Dalling, P. (1984). *Bivalve fouling of nuclear power plant service-water systems. Volume 1. Correlation of bivalve biological characteristics and raw-water system design*. Pacific Northwest Lab., Richland, WA (USA).
- O'Donnell, J., Durand, M., Robitaille, P., Fisher, S., & Stromberg, P. (1996). P-31-NMR analysis of lethal and sublethal lesions produced by KCl - intoxication in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. 276, 53-62.
- Page, T., Neitzel, A., Simmons, M., & Hayes, P. (1986). Biofouling of power plant service systems by *Corbicula*. *Second International Corbicula Symposium*, pp. 41-45.
- Pimentel, D., Zuniga, R., & Morrison, D. (2005). Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. *Ecological Economics*, pp. 273-288.
- Post, R., Petrille, J., & Lyons, L. (2000). A review of freshwater macrobiological control methods for the power industry. *20th Annual Electric Utility Chemistry Workshop*.
- Prezant, R., & Chalermwat, K. (1984). Flotation of the bivalve *Corbicula fluminea* as a means of dispersal. *Science* 225, pp. 1491-1493.
- Ramos, A., Nunes, B., Antunes, S., & Gonçalves, F. (in press). Cholinesterase characterization in *Corbicula fluminea* and effects of relevant environmental contaminants: a pesticide (chlorfenvinphos) and a detergent (SDS). *Journal of Environmental Science and Health B*.
- Rickly Hidrological Company. (1997). *Rickly Hidrological Company*. Retrieved Agosto 17, 2011, from <http://www.rickly.com/devwww/as/images/PETITEPO.JPG>

- Rosa, I., Pereira, J., Gomes, J., Saraiva, P., Gonçalves, F., & Costa, R. (2011). The Asian Clam *Corbicula fluminea* in the European freshwater-dependent industry: A latent threat or a friendly enemy? *Ecological Economics*, 70(10), pp. 1805-1813.
- Schaner, T. (1991). *Detection of zebra mussel veligers in plankton samples using sugar solution*. Lake Ontario Fisheries Unit Annual Report, LOA 91.1.
- Silverman, H., Achberger, E., Lynn, J., & Deitz, T. (1995). Filtration and utilization of laboratory-cultured bacteria by *Dreissena polymorpha*, *Corbicula fluminea* and *Carunculina texasensis*. *Biological Bulletin* 189, 3, pp. 308-319.
- Smithson, J. A. (1986). Development of a *Corbicula* control treatment at the Baldwin power station. *American Malacological Bulletin, Special Edition No. 2*, pp. 63-67.
- Sousa, R., Dias, S., & Antunes, C. (2006). Spatial subtidal macrobenthic distribution in relation to abiotic conditions in the Lima estuary, NW of Portugal. *Hydrobiologia*, pp. 135-148.
- Sousa, R., Dias, S., Guilhermino, L., & et al. (2008). Minho River tidal freshwater wetlands: threats to faunal biodiversity. *Aquatic Biol*, 3, pp. 237-250.
- Sprecher, S., & Getsinger, K. (2000). Zebra mussel chemical control guide (ERDC/EL TR-00-1). *US Army Corps of Engineers*.
- Strayer, D. L. (1999). Effects of alien species on freshwater molluscs in North America. *Journal of the North American Benthological Society*, 18, pp. 74-98.
- Strupp, W., Weidinger, G., Scheller, C., Ehret, R., Ohnimus, H., Girschick, P., et al. (2000). Treatment of Cells with Detergent Activates Caspases and Induces Apoptotic Cell Death. *The Journal of Membrane Biology*, 175, pp. 181-189.
- Van Benschoten, J., Jensen, J., Brady, T., Harrington, D., Lewis, D., & Sferrazza, J. (1992). *Optimizing the use of chemical oxidants for control of the zebra mussel (Dreissena polymorpha)*. Niagara Mohawk Power Coporation, Syracuse: Final Report.
- van der Geest, H., Greve, G., Boivin, M., Kraak, M., & Gestel, C. (2000). Mixture toxicity of copper and diazinon to larvae of the mayfly (*Ephoron virgo*) judging additivity at different effect levels. *Environmental Toxicology Chemistry*, pp. 2900-2905.
- Waller, D., Rach, J., Cope, W., Marking, L., Fisher, S., & Dabrowska, H. (1993). Toxicity of candidate molluscicides to zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and selected nontarget organisms. *19*, 695-702.
- Warne, M. (2002). A review of the ecotoxicity of mixtures, approaches to, and recommendations for their management. *Fifth National Workshop on the Assessment of Site Contamination*. Adelaide.

- Way, C., Hornbach, D., Payne, B., & Miller-Way, A. (1990). Dynamics of filter feeding in *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Corbiculidae). *68*, pp. 2248-2261. *Canadian Journal of Zoology*.
- Wildridge, P., Werner, R., Doherty, F., & Neuhauser, E. (1998). Acute toxicity of potassium on filtration rates of adult zebra mussels, *Dreissena polymorpha*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *34*, pp. 265-270.
- Williams, A., Warren, M., Cummings, K., Harris, J., & Neves, R. (1993). Conservation status of freshwater mussels of the United States and Canada. *Fisheries*, *18*, pp. 6-22.
- Williams, C., & McMahon, R. (1986). Power station entrainment of *Corbicula fluminea* (Muller) in relation to population dynamics, reproductive cycle and biotic and abiotic variables. *Proceedings of the Second International Corbicula Symposium*, J.C. Britton, ed. (pp. 99-111). *American Malacological Bulletin Special Edition*, No. 2.
- Wittman, M., Reuter, J., Schladow, G., Hackley, S., Allen, B., & Chandra, S. (2008). *Asian Clam (Corbicula fluminea) of Lake Tahoe: Preliminary scientific findings in support of a management plan*. U.S.A.: UC Davis - Tahoe Environmental Research Center.