

Toxicidade aguda do sulfato de cobre e do extrato aquoso de folhas secas de nim para o caramujo (*Pomacea canaliculata*)

Francine Perri Venturini, Claudinei da Cruz* e Robinson Antonio Pitelli

Laboratório de Impacto Ambiental do Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia, Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de São Paulo, Via de Acesso Paulo Donato Castellane, s/n, 14884-900, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: cruzcl@yahoo.com

RESUMO. Os caramujos podem se tornar um problema ambiental e econômico, podendo causar muitos prejuízos. O trabalho teve como objetivo estimar a toxicidade aguda do sulfato de cobre pentaidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e do extrato aquoso de folhas secas de nim para o *P. canaliculata*, em condição de laboratório. Para determinação da CL ($I_{(50;96h)}$), o caramujo foi exposto a seis concentrações crescentes de sulfato de cobre (0,0; 0,01; 0,03; 0,05; 0,07 e 0,1 mg L^{-1}) e a seis concentrações crescentes de extrato aquoso de folhas secas de nim (0,0; 100; 125; 150; 175 e 200 mL de extrato aquoso de folhas secas de nim L^{-1} de água), equivalente a 0,0; 1,18; 1,47; 1,77; 2,06; e 2,36 mg de azadiractina L^{-1} , com três repetições e um tratamento-controle em um experimento no delineamento inteiramente casualizado (DIC). A CL ($I_{(50;96h)}$) estimada para o caramujo foi de 0,07 mg de sulfato de cobre L^{-1} , com limite inferior de 0,05 mg L^{-1} e limite superior de 0,1 mg L^{-1} . A concentração letal 50% (CL ($I_{50;96h}$)) estimada do extrato aquoso de folhas secas de nim (EAFSN) para o caramujo foi de 142,75 mL L^{-1} , equivalente a 1,68 mg L^{-1} de azadiractina, com limite inferior de 130,89 mL L^{-1} (1,54 mg L^{-1}) e limite superior de 155,69 mL L^{-1} (1,83 mg L^{-1}).

Palavras-chave: concentração letal, molusco, pesticida natural, cobre.

ABSTRACT. Acute toxicity of copper sulfate and aqueous extract of dried neem leaves on snails (*Pomacea canaliculata*). Snails can become an environmental and economic problem, causing substantial losses. The objective of this work was to estimate the acute toxicity of copper sulfate pentahydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) and the aqueous extract of dried neem leaves on snails (*P. canaliculata*) under laboratory conditions. In order to estimate the lethal concentration 50% (LC ($I_{50;96h}$)), snails were exposed to six increasing copper sulfate concentrations (0.0; 0.01; 0.03; 0.05; 0.07 and 0.1 mg L^{-1}) and six increasing concentrations of aqueous extract of dried neem leaves 0.0; 100; 125; 150; 175 and 200 mL aqueous extract of dried neem leaves L^{-1} water, equivalent to (0.0; 1.18; 1.47; 1.77; 2.06; and 2.36 mg azadirachtin L^{-1}), in triplicate and one control treatment in an entirely random delineation. Estimated LC ($I_{(50;96h)}$) of copper sulfate was 0.02 mg copper sulfate L^{-1} , with a 0.01 mg L^{-1} lower limit and a 0.03 mg L^{-1} upper limit. Estimated lethal concentration 50% of the aqueous extract of dried neem leaves was 142.75 mL L^{-1} , equivalent to 1.68 mg L^{-1} of azadirachtine, with a 130.89 mL L^{-1} (1.54 mg L^{-1}) low limit and 155.69 mL L^{-1} (1.83 mg L^{-1}) as the upper limit.

Key words: lethal concentration, mollusk, natural pesticide, copper.

Introdução

Os caramujos terrestres e aquáticos podem se tornar um problema para a saúde pública e ambiental e também econômico, quando suas populações entram em desequilíbrio, especialmente por causa da ação antrópica, com o rápido crescimento e reprodução dos organismos, podendo transmitir doenças, predação plantas ornamentais, macrófitas e culturas agrícolas.

No ambiente aquático, o caramujo (*Pomacea canaliculata*) é um molusco nativo das regiões tropicais da América do Sul, com alta variação

interpopulacional em relação ao tamanho, forma e espessura da concha. Esses moluscos habitam ampla gama de ecossistemas, desde pântanos e lagoas até lagos e rios (Martin, 2002).

O controle de caramujos de água doce é amplamente estudado, pois muitas espécies são hospedeiras de parasitos humanos, especialmente, *Schistosoma mansoni* (Favre *et al.*, 2001; Fenwick *et al.*, 2006) ou são prejudiciais a culturas agrícolas de regiões alagadas (Ben-Ami e Heller, 2001).

Para o controle químico de gastrópodes terrestres ou aquáticos, são utilizados vários compostos, tais

como: os metais com ligantes orgânicos apropriados; as iscas contendo quelados de ferro e alumínio; as iscas contendo metaldeído e carbamatos (Henderson et al., 1990); os inseticidas isoprocarb e a niclosamina (Ebenso, 2003); e compostos derivados do cobre (Hernández et al., 2006).

O cobre e seus derivados podem funcionar como repelente de superfície e como agente de controle (Moran et al., 2004). De acordo com Schüder et al. (2003), o sucesso do controle de caramujos por produtos derivados de cobre está baseado na não necessidade de ingestão do íon cobre, sendo que apenas o contato com o cobre seria suficiente para ocorrer a morte do animal. O cobre é um moluscida interessante por causa do baixo custo, por ser altamente tóxico aos moluscos e por apresentar baixa toxicidade para os mamíferos, incluindo o homem (Ishan et al., 1993).

Atualmente, os moluscidas derivados de plantas ganharam muito espaço, pois acredita-se que produtos naturais são ecologicamente menos prejudiciais e socialmente mais aceitáveis do que os sintéticos (Singh et al., 1996). Entre os produtos que podem apresentar excelente eficácia no controle de caramujos e resultar em menor impacto negativo ao meio ambiente está o pesticida natural azadiractina, isolado da planta Neem (*Azadirachta indica*, Meliaceae) (Schaaf et al., 2000) que exibe baixa toxicidade aos organismos não-alvo, baixa persistência no meio ambiente e ação sistêmica (Gill e Lewis, 1971).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1993), extratos de plantas com CL_{50} menores que 40 mg L^{-1} podem ser empregados diretamente no controle de populações de moluscos, enquanto que extratos menos ativos podem ser fontes de novos compostos com atividades moluscidas.

O uso de produtos derivados de nim contra caramujos pode apresentar menor custo e ser menos prejudicial ao meio ambiente do que os moluscidas sintéticos (Singh et al., 1996). Assim, os objetivos deste trabalho foram estimar a toxicidade aguda ($CL (I)_{50;96h}$) do sulfato de cobre pentaidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e do extrato aquoso de folhas secas de nim para o caramujo (*P. canaliculata*), produtos que podem ser empregados como moluscidas.

Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Impacto Ambiental do Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia (Nepeam), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Jaboticabal, Estado de São Paulo. Os exemplares de caramujos (*P. canaliculata*),

utilizados nos experimentos, foram provenientes do setor de cultivo do próprio laboratório, onde se realiza a reprodução e a manutenção desta espécie para ser empregada em testes de toxicidade.

Para a determinação da toxicidade aguda do sulfato de cobre e do extrato aquoso de nim, os caramujos foram previamente aclimatados por um período de dez dias, de acordo com as recomendações do Ibama (1987). A aclimação foi realizada em sala de bioensaio, em aquários de 30 litros, com sistema de aeração contínuo, promovido por bombas de ar. Nesse período, os animais foram alimentados *ad libitum*, uma vez ao dia, com macrófita (*Hydrilla verticillata*). Segundo Venturini et al. (2006), tal macrófita foi a preferida por esta espécie de caramujo durante estudos de consumo e preferência alimentar de macrófitas.

As condições ambientais foram mantidas, segundo a metodologia recomendada pelo Ibama (1987) para peixes, exceto a temperatura da sala de ensaio que foi mantida em $26 \pm 2^\circ\text{C}$ para melhor conforto térmico dos moluscos durante os testes de toxicidade aguda.

Os testes foram conduzidos no sistema estático, sem substituição e sifonagem de água, durante o período de exposição dos caramujos. O período de exposição foi de 96h e os animais foram mantidos sem alimentação. A água utilizada, nos testes, foi da rede de abastecimento do Nepeam, proveniente de poço semi-artesiano. As variáveis de qualidade de água, no início dos experimentos, foram: pH entre 7,0 e 7,5; oxigênio dissolvido de 7,2 a 7,9 mg L^{-1} ; condutividade elétrica em torno de $170 \mu\text{S cm}^{-1}$ e dureza entre 40 a 58 mg L^{-1} de CaCO_3 , conforme recomendações do Ibama (1987) e Usepa (2002). A avaliação da mortalidade foi diária, com a retirada dos caramujos mortos (imóveis e com os opérculos abertos) dos recipientes.

Os testes preliminares de toxicidade aguda, com sulfato de cobre pentaidratado e com extrato aquoso de nim, foram realizados com quatro concentrações crescentes e um tratamento-controle com três repetições. Nesses testes, foram determinados os intervalos de concentração que causaram zero e 100% de mortalidade, e os intervalos obtidos foram utilizados para a montagem dos testes definitivos (Ibama, 1987).

Para a estimativa da concentração letal 50% ($CL (I)_{50;96h}$) do sulfato de cobre, os animais, com peso médio de $4,06 \pm 0,89 \text{ g}$, foram expostos a seis concentrações crescentes (0,0; 0,01; 0,03; 0,05; 0,07 e 0,1 mg L^{-1}), em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com três repetições, com três animais em cada uma delas, na densidade de 2,14 g L^{-1} .

Para a estimativa da concentração letal 50% do

extrato aquoso de folhas secas de nim (EAFSN), os animais, com peso médio de $7,90 \pm 4,55$ g, foram expostos a seis concentrações crescentes (0,0; 100; 125; 150; 175 e 200 mL L⁻¹), equivalente a (0,0; 1,18; 1,47; 1,77; 2,06 e 2,36 mg de azadiractina L⁻¹), em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com três repetições, com três animais em cada uma delas. Neste experimento, a densidade máxima de organismos por litro de água foi de 2,63 g L⁻¹, de acordo com as recomendações da Usepa (1975) para testes de toxicidade para macroinvertebrados.

As concentrações equivalentes de azadiractina foram determinadas por Menezes *et al.* (2004) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Segundo esses autores, a concentração total de azadiractina foi de 11,8 mg L⁻¹ de extrato aquoso de folhas secas de nim.

Os resultados da relação concentração resposta (mortalidade) foram submetidos à análise regressão linear, e os valores de (CL (I)_{50;96h}) foram estimados pelo método Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton *et al.* 1977).

Resultados e discussão

A concentração letal 50% (CL (I)_{50;96h}), estimada para o caramujo (*P. canaliculata*), foi de 0,07 mg L⁻¹ de sulfato de cobre, com limite inferior de 0,05 mg L⁻¹ e limite superior de 0,10 mg L⁻¹. A equação que representa a relação linear da concentração-resposta foi $y = 960,54x - 11,99$, com $R^2 = 0,89$.

Não ocorreram mortalidades nas concentrações de 0,0 e 0,01 mg L⁻¹. Na concentração de 0,03 mg L⁻¹, a mortalidade foi de 11,11%; em 0,05 mg L⁻¹ foi de 22,22%; em 0,07 mg L⁻¹ foi de 44,44%; e na concentração de 0,1 mg L⁻¹, a mortalidade foi de 100% (Figura 1).

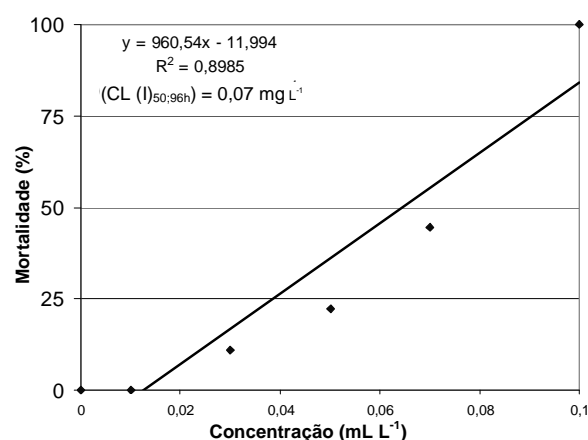


Figura 1. Relação concentração mortalidade do caramujo (*P. canaliculata*), durante o teste de toxicidade aguda para o sulfato de cobre.

O sulfato de cobre foi mais tóxico para o caramujo que o oxicleto de cobre com CL_{50;48h} de 0,20 mg L⁻¹ e que o óxido de cobre com CL_{50;48h} de 0,47 mg L⁻¹ também para o *P. canaliculata* (Piyatiratitivorakul *et al.*, 2006); para o oxicleto de cobre para o *Biomphalaria glabrata*, com a CL_{50;48h} de 1,43 mg L⁻¹ (Oliveira-Filho *et al.*, 2004). A niclosamida, um moluscida amplamente utilizado com CL_{50;48h} de 0,76 mg L⁻¹ para espécies do gênero *Pomacea* sp. (Oliveira-Filho e Paumgarten, 2000), porém aproximadamente dez vezes menos tóxica que o sulfato de cobre para a espécie utilizada neste estudo.

A literatura ainda destaca que o sulfato de cobre foi mais tóxico para o adulto de *P. canaliculata* que para os jovens com CL_{50;48h} de 0,08 e 0,17 mg L⁻¹, respectivamente (Piyatiratitivorakul *et al.*, 2006), porém a concentração letal 50%, obtida para as formas jovens do caramujo, neste estudo, foi menor, indicando maior toxicidade aguda do sulfato de cobre. Segundo estes autores, espécies de *Pomacea* sp. podem ser utilizadas como bioindicadores de contaminação de metais pesados em cursos d'água, pela sua alta sensibilidade, assim, o cobre também pode ser testado como moluscida.

Para a utilização do caramujo (*Pomacea lineata*) como organismo para teste de toxicidade do herbicida paraquat, a CL_{50;96h} foi de 0,35 mg L⁻¹ (Melo *et al.*, 2000). Estes autores obtiveram menor sensibilidade desta espécie ao herbicida do que do *P. canaliculata* para o sulfato de cobre, indicando que os caramujos, de forma geral, podem ser utilizados como modelo de bioindicador para os íons metálicos.

A concentração letal 50% (CL (I)_{50;96h}), estimada do extrato aquoso de folhas secas de nim (EAFSN) para o caramujo, foi de 142,75 mL L⁻¹, equivalente a 1,68 mg L⁻¹ de azadiractina, com limite inferior de 130,89 mL L⁻¹ (1,54 mg L⁻¹) e limite superior de 155,69 mL L⁻¹ (1,83 mg L⁻¹). A equação que representa a relação linear da concentração-resposta foi $y = 0,97x - 93,33$, com $R^2 = 0,88$.

Nas concentrações de 0,0 e 100 mL L⁻¹ não ocorreram mortalidades. Na concentração de 125 mL L⁻¹, a mortalidade foi de 22,22%; na de 150 mL L⁻¹, foi de 77,78%; na de 175 mL L⁻¹, foi de 66,67%; e na concentração de 200 mL L⁻¹, a mortalidade foi de 100% (Figura 2).

Os extratos aquosos de plantas têm sido avaliados para o controle de caramujos de água doce. Os extratos aquosos do látex de três espécies de plantas nativas da Índia (*Thevetia peruviana*, *Alstonia scholaris* e *Euphorbia pulcherrima*) foram testados para o controle de duas espécies prejudiciais de caramujos (*Lymanea*

acuminata e *Indoplanorbis exustus*). Para o caramujo (*L. acuminata*), a CL (I)_{50;96h} foi de 0,17 mg L⁻¹ para a (*T. peruviana*), de 1,76 mg L⁻¹ para (*A. scholaris*) e de 0,02 mg L⁻¹ para (*E. pulcherrima*). Para o caramujo (*I. exustus*), a CL (I)_{50;96h} foi de 0,16 mg L⁻¹ para a (*T. peruviana*), de 0,98 mg L⁻¹ para (*A. scholaris*) e de 0,02 mg L⁻¹ para (*E. pulcherrima*). Esses valores são menores que os descritos para os moluscidas sintéticos (carbamatos, organofosforados e piretroides) e similares ao obtido com o extrato aquoso de folhas secas de nim para o caramujo (*P. canaliculata*), indicando que estas plantas podem ser utilizadas no controle de caramujos aquáticos prejudiciais e outros moluscos (Singh et al., 2005).

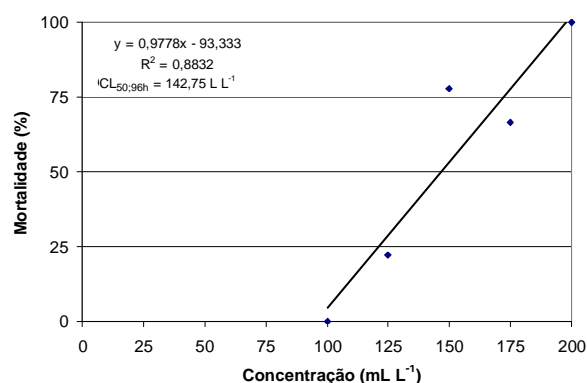


Figura 2. Relação concentração mortalidade do caramujo (*P. canaliculata*), durante o teste de toxicidade aguda para do extrato aquoso de folhas secas de nim.

Para Huang et al. (2003), o extrato de *Sapindus mukorossi* Gaertn. (Sapindaceae) possui efeito moluscida para o caramujo (*P. canaliculata*), sendo que os valores de CL₅₀ foram de 85, 22 e 17 mg L⁻¹ do extrato, após tratamento de 24, 48 e 72 h, respectivamente. O produto causou taxa de mortalidade de 70 a 100% em uma concentração de 10 mg L⁻¹, indicando que o extrato desta planta é mais tóxico ao caramujo do que o extrato aquoso de folhas secas de nim.

Para duas espécies de caramujos terrestres, *Archachatina marginata* e *Limnicolaria aurora*, Ebenso (2003) verificou que o extrato cru dos galhos, folhas e raízes de nim, nas concentrações de 500 e 700 mg L⁻¹, produziu mortalidade após 48 h de exposição para *L. aurora* e após 72h para *A. marginata* Singh et al. (1996) verificaram que o efeito tóxico da azadiractina pura, em duas espécies de caramujos de água doce (*Lymnaea acuminata* e *Indoplanorbis exustus*), é maior que o efeito dos moluscidas sintéticos.

Os resultados obtidos por estes autores são similares ao observado neste estudo, ao indicar que

produtos derivados de nim, utilizados no controle de caramujos, podem obter excelente eficácia, menores custos e impacto para o meio ambiente, quando comparado aos moluscidas sintéticos.

Outra vantagem para a utilização do extrato aquoso de folhas secas de nim seria que, segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1993), extratos de plantas com concentração letal 50% menores que 40 mg L⁻¹ podem ser empregados diretamente no controle de populações de moluscos, porém a concentração letal obtida para o caramujo foi similar à descrita para alevinos e jovens de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) com (CL (I)_{50;96h}) de 1,30 e 1,18 mg azadiractina L⁻¹, respectivamente (Cruz et al., 2004), indicando que o extrato aquoso de folhas secas de nim pode também causar mortalidade em peixes. Para Winkaler et al. (2007), a presença de extrato de nim, na água, pode interferir no sistema de defesa antioxidante de curumbatá (*P. lineatus*), diminuindo as enzimas catalase e a glutathione-S-transferase no fígado.

Conclusão

De acordo com a classificação de Zucker (1985), o sulfato de cobre pode ser considerado extremamente tóxico para o caramujo (CL₅₀ < 0,1 mg L⁻¹), o que possibilita sua utilização como moluscida. Segundo essa mesma classificação, a azadiractina pode ser considerada moderadamente tóxica (CL₅₀ > 1 < 10) para o caramujo, visto que a concentração letal 50% estimada foi de 1,68 mg L⁻¹, equivalente a 142,75 mL L⁻¹ de extrato aquoso.

Referências

- BEM-AMI, F.; HELLER, J. Biological control of aquatic pest snails by the black carp *Mylopharyngodon piceus*. *Biol. Control*, Orlando, n. 22, p. 131-138, 2001.
- EBENSO, I.E. Molluscicidal effects of neem (*Azadirachta indica*) extracts on edible tropical land snails. *Pest Manag. Sci.*, Sussex, v. 60, n. 2, p. 178-182, 2003.
- CRUZ, C. et al. Toxicidade aguda do inseticida paration metílico e do biopesticida azadiractina de folhas de neem (*Azadirachta indica*) para alevino e juvenil de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, Curitiba, v. 14, p. 93-102, 2004.
- FAVRE, T.C. et al. Avaliação das ações de controle da esquistossomose implementadas entre 1977 e 1996 na área endêmica de Pernambuco, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Rio de Janeiro, v. 34, n. 6, p. 596-576, 2001.
- FENWICK, A. et al. Implementation of human Schistosomiasis control: challenges and prospects. *Adv. Parasitol.*, London, v. 61, p. 567-622, 2006.
- GILL, J.S.; LEWIS, C.T. Systemic action of an insect feeding deterrent. *Nature*, London, v. 232, p. 402-403, 1971.

- HAMILTON, M.A. *et al.* Trimmed spearman-karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.*, Iowa, v. 7, p. 714-719, 1977.
- HENDERSON, I.F.; MARTIN, A.P. Control of slugs with contact-action molluscicides. *Ann. Appl. Biol.*, Warwick, n. 116, p. 273-278, 1990.
- HERNÁNDEZ, P.P. *et al.* Sub-lethal concentrations of waterborne copper are toxic to lateral line neuromasts in zebrafish (*Danio rerio*). *Hear. Res.*, Amsterdam, v. 213, n. 1-2, p. 1-10, 2006.
- HUANG, H.C. *et al.* Molluscicidal Saponins from *Sapindus mukorossi*, Inhibitory Agents of Golden Apple Snails, *Pomacea canaliculata*. *J. Agric. Food Chem.*, Easton, v. 51, n. 17, p. 4916-4919, 2003.
- IBAMA-Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Avaliação da toxicidade aguda para peixes. In: IBAMA-Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. *Manual de testes para avaliação de ecotoxicidade de agentes químicos*. Brasília, 1987. Parte D.3.1.
- IHSAN, Y.N. *et al.* Copper molluscicides for control of Schistosomiasis. 3. Adsorption by clay suspensions. *Environ. Sci. Technol.*, Easton, v. 27, p. 299-303, 1993.
- MARTIN, P.R., ESTEBENET, A.L. Interpopulation variation in life-history traits of *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae) in southwestern Buenos Aires Province, Argentina. *Malacol.*, Philadelphia, v. 44, p. 153-163, 2002.
- MELO, L.E.L. *et al.* Developing the gastropod *Pomacea lineata* (Spix, 1827) as a toxicity test organism. *Hidrobiol.*, Bucuresti, n. 429, p. 73-78, 2000.
- MENEZES, M.L. *et al.* Determination of biopesticide azadirachtin in samples of fish and in samples of water of fish ponds, using chromatography liquid of high performance. *Salusvita*, Bauru, v. 23, p. 401-414, 2004.
- MORAN, S. *et al.* Management of land snails in cut green ornamentals by copper hydroxide formulations. *Crop Prot.*, Guilford, v. 23, n. 7, p. 647-650, 2004.
- OLIVEIRA-FILHO, E.C.; PAUMGARTTEN, J.R. Toxicity of *Euphorbia milii* latex and niclosamide to snails and nontarget aquatic species. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, New York, n. 46, p. 342-350, 2000.
- OLIVEIRA-FILHO, E.C. *et al.* Comparative study on the susceptibility of freshwater species to copper-based pesticides. *Chemosphere*, Oxford, v. 56, n. 4, p. 369-374, 2004.
- PIYATIRATITIVORAKUL, P. *et al.* Comparative toxicity of heavy metal compounds of the juvenile golden apple snail, *Pomacea* sp. *Fresenius. Environ. Bull.*, Paris, v. 15, n. 5, p. 379-384, 2006.
- SCHAAF, O. *et al.* Rapid and sensitive analysis of azadirachtin and related triterpenoids from Neem (*Azadirachta indica*) by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 886, p. 89-97, 2000.
- SCHÜDER, I. *et al.* Barriers, repellents and antifeedants for slug and snail control. *Crop Prot.*, Guilford, v. 22, n. 8, p. 1033-1038, 2003.
- SINGH, K. *et al.* Molluscicidal activity of neem (*Azadirachta indica* A.Juss.). *J. Ethnopharmacol.*, Lausanne, v. 52, n. 1, p. 35-40, 1996.
- SINGH, A., SINGH, S.K. Molluscicidal evaluation of three common plants from India. *Fitoterapia*, Milano, v. 76, n. 7-8, p. 747-751, 2005.
- USEPA-United States Environmental Protection Agency. *Method for acute toxicity tests with fish macroinvertebrates and amphibians*. Washington, D.C., 1975.
- USEPA-United States Environmental Protection Agency. *Guidelines for health: risk assessment guidance for superfund (RAGS)*. Washington, D.C., 2002. Disponível em: <www.epa.gov/superfund/programs/risk/rags/ch.7>. Acesso em: 10 fev. 2004.
- VENTURINI, F.P. *et al.* Consumo e preferência alimentar de macrófitas submersas pelo caramujo *Pomacea canaliculata*, potencial agente de biocontrole In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 25., 2006, Brasília. *Anais...* Brasília: [s.n.], 2006. p. 171.
- WINKALER, E.U. *et al.* Acute lethal and sublethal effects of neem leaf extract on the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem Physiol. C*, New York, v. 145, p. 236-244, 2007.
- WHO-World Health Organization. *The control of schistosomiasis: second report of the WHO Expert Committee*. Geneva, 1993. (WHO Technical Report Series, 830).
- ZUCKER, E. *Hazard evaluation division: standard evaluation procedure: acute toxicity test for freshwater fish*. Washington, D.C., 1985. (USEPA publication 540/9-85-006). Disponível em: <www.epa.gov>. Acesso em: 18 mar. 2005.

Received on May 04, 2007.

Accepted on February 15, 2007.