



Alyson Rogério Ribeiro

**POTENCIAL DO USO DE PLANÁRIAS NA AVALIAÇÃO
DE CONTAMINANTES AMBIENTAIS**

**POTENTIAL USE OF PLANARIANS FOR
ENVIRONMENTAL CONTAMINANTS EVALUATION**

Área de concentração: Tecnologia e Inovação

**LIMEIRA
2012**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE TECNOLOGIA**

ALYSON ROGÉRIO RIBEIRO

**POTENCIAL DO USO DE PLANÁRIAS NA AVALIAÇÃO DE
CONTAMINANTES AMBIENTAIS**

Orientadora: Profa. Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro

Potential use of planarians for environmental contaminants evaluation

Dissertação de Mestrado apresenta ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia da Faculdade de Tecnologia da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia.

Master thesis presented to the Technology Postgraduation Programme of the School of Technology of the University of Campinas to obtain the Master grade in Technology.

Área de concentração: Tecnologia e Inovação

LIMEIRA

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SILVANA MOREIRA DA SILVA SOARES –
CRB-8/3965

BIBLIOTECA UNIFICADA FT/CTL
UNICAMP

Ribeiro, Alyson Rogério, 1986-
R354p Potencial do uso de planárias na avaliação de
contaminantes ambientais / Alyson Rogério
Ribeiro. – Limeira, SP : [s.n.],
2012.

Orientador: Gisela de Aragão Umbuzeiro.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Tecnologia.

1. Contaminantes. 2. Ecotoxicologia. 3. Meio ambiente.
4. Regeneração. 5. Toxicidade. I. Umbuzeiro, Gisela de Aragão.
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Tecnologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Titulo em inglês: Potential use of planarians for environmental contaminants
evaluation

Palavras-chave em inglês (Keywords):

- 1- Contaminants
- 2- Ecotoxicology
- 3- Environment
- 4- Regeneration
- 5- Toxicity

Área de concentração: Tecnologia e Inovação

Titulação: Mestre em Tecnologia

Banca examinadora: Gisela de Aragão Umbuzeiro, Paula Suares Rocha, Cassiana
Maria Reganhan Coneglian

Data da Defesa: 13-08-2012

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia

FOLHA DE APROVAÇÃO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM TECNOLOGIA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: TECNOLOGIA E INOVAÇÃO

Potencial do uso de planárias na avaliação de contaminantes ambientais

Autor: Alyson Rogério Ribeiro

A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Dissertação:



Presidenta Profa. Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro
FT/UNICAMP



Profa. Dra. Paula Soares Rocha
IB/UNESP Rio Claro



Profa. Dra. Cassiana Maria Reganhan Coneglian
FT/UNICAMP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu Professor de Toxicologia Ambiental Dr. Abílio Lopes de Oliveira Neto “*in memoriam*” pelo interesse na utilização de planárias em ensaios ecotoxicológicos.

Dedico este trabalho a meus sobrinhos Leticia, Lucas, Luiza e Henrique, pelos momentos da infância deles que eu não pude acompanhar devido minha jornada acadêmica.

AGRADECIMENTOS

À minha amada família Ribeiro: meu pai Alcides, minha mãe Eunice e meus irmãos Elizandra, Mirian e Alcir.

À Profª. Drª. Gisela de Aragão Umbuzeiro pelos ensinamentos, orientação, compreensão e paciência.

Aos amigos e companheiros da pós-graduação em Tecnologia da FT-UNICAMP, em especial Pedro Ivo Garcia Nunes, Francine Vacchi, Jaqueline Honório, Mariana Artal, Jefferson Silveira, Luis Visani, Erika Moretti e Daniel Morales.

Aos amigos Vivian Zanchetta, Francieli Kaiser, Daniel Agostinho e Bruno Carvalho, pela compreensão, admiração, carinho e companheirismo.

À república das Frajolas: Francieli Kaiser, Francielle Fernandes, Iolene Magalhães, Carina Giorgetti, Manuela Mascheroni, Jéssica Pedrina e Erika Moretti pelo acolhimento e amizade.

À equipe de alunos e técnicos do LEAL, especialmente a todos os bolsistas e voluntários que me auxiliaram no cultivo das planárias.

À Drª. Renata Batistoni (Facoltà di Scienze - Università di Pisa - Itália), ao Dr. Alain Devaux e à Drª. Sylvie Bony (Ecole Nationale des Travaux Publics de l'État - França), à Drª Marlene Tiduko Ueta (IB – Unicamp), à Drª. Marta Siviero Guilherme Pires (FT – Unicamp) e à Drª. Regina Sawaia Sáfyadi pelas críticas a esta pesquisa.

À FAPESP, pela bolsa de mestrado concedida.

...
**A luz do sol não sabe o que faz
Por isso não erra é comum e boa**

O guardador de rebanhos – Poema V
Fernando Pessoa (Alberto Caeiro)

RESUMO

As planárias de água doce possuem vasta distribuição geográfica, plasticidade biológica, facilidade de cultivo em laboratório, sensibilidade a contaminantes diversos e capacidade regenerativa, por isso vem sendo utilizadas como organismos-teste em ensaios ecotoxicológicos. Porém, ainda não há normatização internacional ou nacional que padronize esses ensaios. O objetivo deste trabalho foi verificar o potencial do uso de planárias de água doce (*Girardia tigrina*) na avaliação de alguns contaminantes e amostras ambientais utilizando protocolos padronizados avaliando-se mortalidade e atraso na regeneração encefálica. Foram empregados 15 organismos por concentração-teste nos ensaios de mortalidade de filhotes (96h) e 20 planárias adultas regenerantes por concentração-teste nos ensaios de regeneração encefálica (120h). Avaliou-se cromo e zinco como substâncias de referência e empregou-se cobre, azo corante têxtil Disperse Red 1, herbicida atrazina, nanotubos de carbono de parede múltipla, além de amostras da ETE Carioba e do Ribeirão dos Cristais. Carta controle com substância de referência foi realizada, sendo estabelecido um protocolo para o monitoramento da sensibilidade das culturas de *G. tigrina*. O zinco foi a substância mais apropriada que o cromo, com a vantagem do ensaio de sensibilidade poder ser finalizado em 24h. Os métodos utilizados para realização do ensaio de regeneração encefálica e de mortalidade de filhotes foram eficazes para a observação de efeitos adversos das substâncias analisadas. Todas as amostras testadas apresentaram toxicidade às planárias, exceto os nanotubos de carbono. Atraso na regeneração encefálica foi o *endpoint* mais sensível para os contaminantes avaliados. Os protocolos utilizados neste estudo podem ser utilizados como subsídios na elaboração futura de normas técnicas de testes ecotoxicológicos com planárias de água doce.

Palavras chaves: *Contaminantes, Ecotoxicologia, Meio ambiente, Regeneração, Toxicidade*

ABSTRACT

Freshwater planarians are worldwide distributed, have biological plasticity and a unique body regenerative capacity. They are easily maintained under laboratorial conditions and are sensitive for several compounds. For these reasons they have been used in ecotoxicological testing although the lack of national or international guidelines. This research aimed to verify the potential use of freshwater planarians (*Girardia tigrina*) in mortality and regeneration delay endpoints to assess the toxicity of environmental contaminants using standardized protocols. The culture sensitivity of *G. tigrina* was monitored with zinc, which was the most suitable substance for this purpose, providing responses in only 24h. The adopted protocols for regeneration and mortality tests were efficient to assess the adverse effects of the chemical agents (copper, an azo textile dye, atrazine), carbon nanotubes and wastewater and water samples from Carioba WWTP and Cristais River. The regeneration test was the most sensitive endpoint and all analyzed substances showed toxicity for planarians, except carbon nanotubes. The methods adopted in this research can be used as basis for the development of a testing guideline using freshwater planarians.

Keywords: *Contaminants, Ecotoxicology, Environment, Regeneration, Toxicity*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E FIGURAS

FIGURA 1 – Esquema representativo da dinâmica de regeneração encefálica em planárias.	8
FIGURA 2 – Planária de água doce <i>Girardia tigrina</i>	9
FIGURA 3 – Estrutura química do corante principal C.I. Disperse Red 1	16
FIGURA 4 – Localização dos pontos de coletas do Ribeirão dos Cristais (Cajamar- SP).	18
FIGURA 5 - Carta-controle da sensibilidade de filhotes de <i>G. tigrina</i> expostos a Zinco, CL50 (24h) expressas em mg.L ⁻¹ de Zn ²⁺	29
FIGURA 6 – Mudanças morfológicas observadas em filhotes de <i>G. tigrina</i> após 24 horas de exposição à atrazina.....	40
FIGURA 7 – Curvas concentração-resposta referente à mortalidade das planárias filhotes expostas a atrazina comercial e padrão, após 96 horas de exposição. As concentrações foram expressas em atrazina.	41
FIGURA 8 – Dinâmica da fecundidade média das planárias durante as etapas do ensaio de performance reprodutiva com o corante comercial C.I. Disperse Red 1.....	50
FIGURA 9 – Alterações morfológicas e observações nos ensaios de regeneração encefálica e de mortalidade com <i>G. tigrina</i> expostas a cobre a ao corante Disperse Red 1.....	71

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Levantamento bibliográfico sobre o uso de planárias de água doce em avaliações ecotoxicológicas	3
TABELA 1 – Levantamento bibliográfico sobre uso de planárias de água doce em avaliações ecotoxicológicas – Continuação	4
TABELA 1 – Levantamento bibliográfico sobre uso de planárias de água doce em avaliações ecotoxicológicas – Continuação	5
TABELA 2 – Condições adotadas para o cultivo de <i>Girardia tigrina</i> em laboratório	13
TABELA 2 – Condições adotadas para o cultivo de <i>Girardia tigrina</i> em laboratório - Continuação	14
TABELA 3 – Descrição resumida dos contaminantes e amostras ambientais analisados neste estudo.....	19
TABELA 4 - Simbologia empregada para registro das observações realizadas nos ensaios de regeneração encefálica.....	21
TABELA 5 – CL50, em mg.L ⁻¹ de Cr ⁶⁺ , obtidas em diferentes tempos de exposição com filhotes de <i>G. tigrina</i>	24
TABELA 6 – CL50, em mg.L ⁻¹ de Zn ²⁺ , obtidas em diferentes tempos de exposição com filhotes de <i>G. tigrina</i>	25
TABELA 7 – CL50, em mg.L ⁻¹ de Zn ²⁺ , obtidas em diferentes tempos de exposição com adultos de <i>G. tigrina</i> em testes preliminares aos ensaios de regeneração encefálica	26
TABELA 8 – CL50, em mg.L ⁻¹ de Cr ⁶⁺ , obtidas em diferentes tempos de exposição com adultos de <i>G. tigrina</i> em testes preliminares aos ensaios de regeneração encefálica	27
TABELA 9 – Número de planárias <i>G. tigrina</i> que apresentaram atraso regenerativo após 120 horas de exposição às concentrações de Zinco.....	27
TABELA 10 – Número de planárias <i>G. tigrina</i> que apresentaram atraso regenerativo após 120 horas de exposição às concentrações de cromo.....	28
TABELA 11 – CL50, em mg.L ⁻¹ de Cu ²⁺ , obtidas em diferentes tempos de exposição com filhotes de <i>G. tigrina</i> expostos a sulfato de cobre	30

TABELA 12 – CL50, em mg.L ⁻¹ de Cu ²⁺ , obtidas em diferentes tempos de exposição com adultos de <i>G. tigrina</i> expostos a sulfato de cobre.....	31
TABELA 13 – Número de planárias <i>G. tigrina</i> que apresentaram atraso regenerativo após 120 horas de exposição às concentrações de cobre.....	31
TABELA 14 – Comparação dos dados obtidos em ensaios de toxicidade aguda e crônica com diferentes organismos aquáticos expostos a cobre.....	32
TABELA 14 – Comparação dos dados obtidos em ensaios de toxicidade aguda e crônica com diferentes organismos aquáticos expostos a cobre – Continuação.....	33
TABELA 14 – Comparação dos dados obtidos em ensaios de toxicidade aguda e crônica com diferentes organismos aquáticos expostos a cobre – Continuação.....	34
TABELA 15 – CL50, em mg.L ⁻¹ , obtidas em diferentes tempos de exposição com filhotes de <i>G. tigrina</i> expostos ao corante têxtil C.I. Disperse Red 1.....	35
TABELA 16 – CL50, em mg.L ⁻¹ , obtidas em diferentes tempos de exposição com adultos de <i>G. tigrina</i> expostos ao corante têxtil C.I. Disperse Red 1.....	36
TABELA 17 – Número de planárias <i>G. tigrina</i> que apresentaram atraso regenerativo após 120 horas de exposição ao corante têxtil C.I. Disperse Red 1.....	36
TABELA 18 – Comparação dos dados obtidos em ensaios de toxicidade aguda e crônica com diferentes organismos aquáticos expostos ao corante comercial têxtil Disperse Red 1.....	38
TABELA 19 – CL50, em mg.L ⁻¹ , obtidas em diferentes tempos de exposição com filhotes de <i>G. tigrina</i> expostos a atrazina comercial.....	39
TABELA 20 – CL50, em mg.L ⁻¹ , obtidas em diferentes tempos de exposição com adultos de <i>G. tigrina</i> expostos ao herbicida Atrazina.....	42
TABELA 21 – Número de planárias <i>G. tigrina</i> que apresentaram atraso regenerativo após 120 horas de exposição ao herbicida atrazina comercial.....	42
TABELA 22 – Comparação dos dados obtidos em ensaios de toxicidade aguda e crônica com diferentes organismos aquáticos expostos ao herbicida atrazina.....	43
TABELA 22 – Comparação dos dados obtidos em ensaios de toxicidade aguda e crônica com diferentes organismos aquáticos expostos ao herbicida atrazina – Continuação.....	44
TABELA 23 – Número de planárias <i>G. tigrina</i> que apresentaram atraso regenerativo após 120 horas de exposição às concentrações de nanotubos de carbono de parede múltipla.....	45

TABELA 24 – Mortalidade (%) obtida em diferentes tempos de exposição de filhotes de <i>G. tigrina</i> às amostras coletadas no Ribeirão dos Cristais e na ETE Carioba.....	46
TABELA 25 – Parâmetros Físico-químicos das amostras do Ribeirão dos Cristais, da ETE Carioba e do controle, água de cultivo de <i>G. tigrina</i>	47
TABELA 26 – Número de planárias <i>G. tigrina</i> que apresentaram atraso regenerativo após 120 horas de exposição às amostras do Ribeirão dos Cristais e da ETE Carioba.....	48
TABELA 27 – Resumo dos resultados obtidos para os contaminantes ambientais avaliados com <i>G. tigrina</i> neste trabalho.....	49
TABELA 28 – Dados detalhados das substâncias químicas utilizadas nos ensaios de com <i>G. tigrina</i>	63
TABELA 29 – Dados detalhados dos resultados obtidos nos diferentes tempos de leituras dos ensaios de regeneração encefálica com <i>G. tigrina</i> expostas a concentrações de sulfato de cobre	64
TABELA 30 – Dados detalhados dos resultados obtidos nos diferentes tempos de leituras dos ensaios de regeneração encefálica com <i>G. tigrina</i> expostas a concentrações do corante têxtil C.I. Disperse Red 1.....	65
TABELA 31 – Dados detalhados dos resultados obtidos nos diferentes tempos de leituras dos ensaios de regeneração encefálica com <i>G. tigrina</i> expostas a concentrações de nanotubos de carbono de parede múltipla.....	66
TABELA 32 – Dados detalhados dos resultados obtidos nos diferentes tempos de leituras dos ensaios de regeneração encefálica com <i>G. tigrina</i> expostas a concentrações de sulfato de zinco	67
TABELA 33 – Dados detalhados dos resultados obtidos nos diferentes tempos de leituras dos ensaios de regeneração encefálica com <i>G. tigrina</i> expostas a concentrações de Cromo.....	68
TABELA 34 – Dados detalhados dos resultados obtidos nos diferentes tempos de leituras dos ensaios de regeneração encefálica com <i>G. tigrina</i> expostas a concentrações de atrazina comercial.....	69
TABELA 35 – Dados detalhados dos resultados obtidos nos diferentes tempos de leituras dos ensaios de regeneração encefálica com <i>G. tigrina</i> expostas a amostras do Ribeirão dos Cristais e ETE Carioba.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAS - Chemical Abstracts Service Number
CEO - Concentração de efeito observado
CENO - Concentração de efeito não observado
C.I. - Color Index
CI50 - Concentração de inibição da regeneração de 50% das planárias
Com. - Comércio
cm - Centímetros
cm³ - Centímetro quadrado
CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CL50 - Concentração letal a 50% dos organismos expostos
Cr - Cromo
Cu - Cobre
C.V. - Coeficiente de variação
D.M - Desvio médio
DNA - Ácido desoxirribonucleico
D.P - Desvio padrão
DPD - N,N'-dietil-p-fenildiamina
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs - Espécies reativas de oxigênio
ETA - Estação de Tratamento de Água
ETE - Estação de tratamento de Esgoto
FAPESP - Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo
FT - Faculdade de Tecnologia da Unicamp
g - Grama
h - Horas
Ind. - Indústria
IQ - Instituto de Química da Unicamp
Khz - Quilohertz
L - Litros
LEAL - Laboratório de Ecotoxicologia Aquática e Microbiologia Ambiental Prof. Abílio Lopes
LOAEL - Lowest observed adverse effect level
LQES - Laboratório de Química do Estado Sólido
Ltda. - Limitada
min - Minutos
ml - Mililitro
mm - Milímetro
mg - Miligrama
N - Normal
n° - Número
NBR – Norma Brasileira
NOAEL - No observed adverse effect level
NTC - Nanotubos de carbono
NTC @ 1h - Nanotubos de carbono de paredes múltiplas sob uma hora de oxidação ácida
O.D. - Oxigênio dissolvido
p.a. - padrão analítico

pH - Potencial hidrogeniônico
PRFV - Polímero reforçado com fibra de vidro
UNESP - Universidade Estadual Paulista
UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas
UV - Ultravioleta
Zn - Zinco
 μ S - MiliSiemens
°C - Graus Celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. UTILIZAÇÃO DE PLANÁRIAS EM ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS.....	2
2.2. O USO DA ESPÉCIE <i>GIRARDIA TIGRINA</i> EM TESTES DE MORTALIDADE E ATRASO NA REGENERAÇÃO ENCEFÁLICA.....	8
3. OBJETIVOS.....	11
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
4.1 ORIGEM, CULTIVO E CONTROLE DA SENSIBILIDADE DOS ORGANISMOS-TESTE	12
4.2 SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS E AMOSTRAS AMBIENTAIS.....	16
4.3 EQUIPAMENTOS E ANÁLISES DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	19
4.4 ENSAIOS DE TOXICIDADE.....	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	24
5.1 TESTES COM SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA (ZINCO E CROMO) E CARTA CONTROLE DA SENSIBILIDADE	24
5.2 AVALIAÇÃO DE CONTAMINANTES AMBIENTAIS	30
5.3. DESEMPENHO REPRODUTIVO DE PLANÁRIAS EXPOSTAS AO CORANTE DISPERSE RED 1.....	49
6. CONCLUSÕES	52
7. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	53
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
ANEXO A – SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS	63
ANEXO B – ENSAIOS DE REGENERAÇÃO ENCEFÁLICA	64
ANEXO C – IMAGENS REGISTRADAS NOS ENSAIOS.....	71

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Com os avanços tecnológicos, o uso dos recursos naturais e os hábitos econômicos e sociais atuais, são crescentes e variadas às emissões antrópicas lançadas no ambiente. A água é utilizada como meio de transporte de substâncias, matéria prima, em etapas de processos produtivos diversos, sendo até mesmo usada para descarte de resíduos e, por sua vez, organismos aquáticos tornam-se suscetíveis a exposição contínua de contaminantes.

O objetivo central da ecotoxicologia é avaliar os efeitos deletérios de agentes químicos em populações, comunidades e ecossistemas. Testes de toxicidade são ferramentas que vem sendo utilizadas para esse fim. Nesses testes é importante utilizar organismos apropriados, de relevância ecológica, facilidade de cultivo em laboratório e sensibilidade a diversos contaminantes.

Dentre os diferentes organismos testes destacam-se as planárias de água doce, que são organismos de vida livre e considerados um dos animais mais primitivos. As planárias possuem simetria bilateral, cefalização, cordão espinhal, neurotransmissores similares aos dos humanos, quimiorreceptores e fotosensibilidade. Outra característica importante destes organismos é o mesênquima rico em neoblastos, células-tronco com alta capacidade regenerativa (HYMAN, 1939, SALÓ et al., 2009). São animais hermafroditas, de ocorrência cosmopolita em ambientes lênticos e de fácil cultivo em laboratório.

As planárias vêm sendo utilizadas para avaliar os efeitos adversos de diferentes substâncias químicas e amostras ambientais, porém há grande diversidade metodológica, onde diferentes espécies e protocolos vem sendo empregados, dificultando assim a comparação ou reprodução dos resultados.

Por esse motivo esse trabalho visa analisar as metodologias que vem sendo empregadas, propor algumas padronizações nas condições de cultivo e teste e aplicar os protocolos propostos para avaliar diferentes contaminantes e amostras ambientais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Utilização de planárias em ensaios ecotoxicológicos

Invertebrados vêm sendo usados em testes de laboratório para avaliar a toxicidade de substâncias químicas. O desenvolvimento de testes usando invertebrados tem sido estimulado devido à facilidade de cultivo e manutenção desses organismos de maneira controlada e com custos moderados em laboratório e sua sensibilidade a diferentes classes de poluentes ambientais (LAGADIC E CAQUET, 1998).

Dentre estes animais, os platelmintos são considerados organismos importantes, por ocuparem uma posição chave na evolução dos metazoários, sendo os primeiros seres com simetria bilateral e por ser o quarto maior filo animal da terra (NEWMARK E SÁNCHEZ-ALVARADO, 2002). Entre os platelmintos, as planárias de água doce (Filo Platyelminthes: Classe Tubellaria: Sub Ordem Tricladida: Infra Ordem Paludicola) tem elevada plasticidade e a habilidade de regenerar-se completamente a partir de pequenos fragmentos (1/279 de um organismo adulto), sendo este fenômeno conhecido há mais de 200 anos (IANNACONE E TEJADA, 2007).

Características tais como capacidade regenerativa, relevância ecológica, distribuição cosmopolita e simplicidade morfológica, combinadas a uma posição filogenética intermediária, fazem as planárias interessantes para estudos ecotoxicológicos (SÁNCHEZ-ALVARADO E NEWMARK, 1999).

Os primeiros trabalhos científicos utilizando planárias em abordagens ecotoxicológicas foram realizados por Rulon (1946), que expos alguns animais a cloreto de lítio e a cianeto de sódio. No trabalho de Johnson et al. (1959) organismos foram expostos ao agente antifúngico e antibacteriano Fungicromin, e no estudo de Jenkins (1959) planarias regenerantes foram expostas a tiouréia. Posteriormente, planárias como organismo teste foram utilizadas em ensaios referentes à ação da radiação ionizante (MIX E SPARKS, 1969), surfactantes não iônicos (SASKI et al., 1971), componentes da planta *Cannabis sativa* (LENICQUE et al., 1972) e de metabólitos de DDT (KOUYOUMJIAN E UGLOW, 1974; PHILLIPS et al., 1974).

A Tabela 1 apresenta um resumo do levantamento bibliográfico realizado sobre o uso de planárias como organismo teste. Pode-se observar a diversidade de substâncias, métodos e espécies utilizadas e o recente crescimento de publicações utilizando estes organismos.

TABELA 1 – Levantamento bibliográfico sobre o uso de planárias de água doce em avaliações ecotoxicológicas

Espécie de planária	Amostra-teste	Efeito observado	Referência Bibliográfica
<i>Girardia tigrina</i>	Cobre, Zinco, Cádmio, Mercúrio e Cromo	Mortalidade e degeneração	Sáfadi, 1993
	Cromo	Mortalidade	Preza e Smith, 2001
	Efluente de refinaria de petróleo	Alteração no processo de regeneração encefálica	Barros et al., 2006
	Radiação (Raio γ), metilmetanosulfonato e ciclofosfamido	Mortalidade, alteração no processo de regeneração encefálica e ocorrência de micronúcleos	Knakievicz et al., 2008
	Cobre	Acumulação do metal, alteração da mobilidade, alteração no processo de regeneração encefálica, ocorrência de micronúcleos e análise do desempenho reprodutivo	Knakievicz e Ferreira, 2008
	Malation e Fibronil	Mortalidade, alterações histológicas e alteração no processo de regeneração encefálica	Butturi-Gomes, 2008
	Irradiação UV	Mortalidade, alterações morfológicas e na mobilidade	Kalafatić et al., 2006
	(-)-nicotina, picrotoxin, N-metil D-aspartato e carbamazepina	Alterações comportamentais e na mobilidade	Remarkrishnan e Desaer., 2011
<i>Polycelis felina</i>	Esterigmatocistina	Mortalidade	Piontek, 2010
	Campos magnéticos	Alteração da regeneração e na fissão corpórea	Novikov et al., 2008
	Zinco	Mortalidade, alterações morfológicas, na mobilidade e no processo de regeneração encefálica	Franjević et al., 2000
	Cádmio	Alterações mitóticas nos neoblastos de planárias regenerantes	Kalafatić et al., 2004
	Mercúrio	Alterações mitóticas nos neoblastos de planárias regenerantes	Kalafatić et al., 2004b
	Herbicida Norflurazon	Mortalidade, dano do material genético, alterações histológicas, comportamentais e de mobilidade	Horvat et al., 2005
	Amônia	Mortalidade e alterações na mobilidade	Alonso e Camargo, 2011

TABELA 1 – Levantamento bibliográfico sobre uso de planárias de água doce em avaliações ecotoxicológicas – **Continuação**

Espécie de planária	Amostra-teste	Efeito observado	Referência Bibliográfica
	Irradiação UV	Mortalidade, alterações morfológicas e na mobilidade	Kalafatic et al., 2006
<i>Dugesia japonica</i>	Radiação (Raio-X)	Alterações nos neoblastos de planárias regenerantes	Salveti et al., 2009
	Surfactantes iônicos e não iônicos	Mortalidade, ocorrência de estresse oxidativo e alteração na atividade da colinesterase	Mei-Hui, 2008
<i>Girardia schubarti</i>	Cobre	Alterações na atividade da catalase e ocorrência de estresse protéico	Guecheva et al., 2003
	Cobre	Dano do material genético	Guecheva et al., 2001
	Cobre	Mortalidade, alteração no processo de regeneração encefálica e dano do material genético	Prá et al., 2006
	Água de rio	Dano do material genético	Prá et al., 2005
	Fungicida Dithane®	Alterações morfológicas, enzimáticas e na mobilidade	Wiilland et al., 2007
<i>Dugesia gonocephala</i>	Radiação (Raio γ), metilmetanosulfonato e ciclofosfamido	Mortalidade, alteração no processo de regeneração encefálica e ocorrência de micronúcleos	Knakievicz et al., 2008
	Cocaína e outros agentes farmacológicos	Alterações enzimáticas e na mobilidade	Palladini et al., 1996
<i>Dugesia dorotocephala</i>	6-hidroxidopamina	Alterações histológicas e na mobilidade	Caronti et al., 1999
	Metanfetamina, cocaína e cafeína	Alterações na mobilidade	Sacavage et al., 2008
	3-Iodo-L-tirosina	Alteração no processo de regeneração encefálica e alterações enzimáticas	Ness et al., 1996
<i>Girardia festae</i>	Cocaína	Alterações comportamentais e na mobilidade	Raffa e Desai, 2005
	Carbofurano	Alteração no processo de regeneração corpórea	Innacone e Tejada, 2007
<i>Dugesia sp.</i>	Dimetilsulfóxido	Mortalidade e alterações na mobilidade	Pagán et al., 2006
	Dimetilsulfóxido e Cafeína	Mortalidade e alterações na mobilidade	Pagán et al., 2009
<i>Dugesia etrusca</i>	Alumínio, Cromo e Cádmio	Alteração no processo de regeneração encefálica	Calevro et al., 1998 e 1999
<i>Dugesia ryukyensis</i>	Bisfenol A e 17 β -estradiol	Alterações morfológicas e no processo de regeneração corpórea	Miyashita et al., 2011

TABELA 1 – Levantamento bibliográfico sobre uso de planárias de água doce em avaliações ecotoxicológicas – **Continuação**

Espécie de planária	Amostra-teste	Efeito observado	Referência Bibliográfica
<i>Dugesia lugubris</i>	Metilmercúrio	Alteração no processo de regeneração corpórea e acumulação de metal	Medvedev, 2008
<i>Polycelis tenuis</i>	Metilmercúrio	Alteração no processo de regeneração corpórea e acumulação do metal	Medvedev, 2008

Apesar da variedade de trabalhos, não há uma norma técnica que padronize os testes com planárias de água doce. Desta forma, observa-se que, por exemplo, planárias de diversas idades e espécies diferentes vêm sendo utilizadas em ensaios de mortalidade, sendo reportado na literatura o uso de filhotes (PREZA E SMITH, 2001; PRÁ et al., 2006; MEI-HUI, 2008; KNAKIEVICZ E FERREIRA, 2008), de adultos (SÁFADI, 1993; PAGÁN et al., 2006; HORVAT et al., 2005; KNAKIEVICZ E FERREIRA, 2008; BUTTURI-GOMES, 2008) e de espécimes sem idade definida (PALLADINI et al., 1996; WILAND et al., 2007; SACAVAGE et al., 2008; KNAKIEVICZ et al., 2008).

Sáfadi (1993) e Preza e Smith (2001) propuseram condições padronizadas para os ensaios de mortalidade utilizando planárias da espécie *Girardia tigrina* adultas e filhotes, respectivamente. Sáfadi (1993) propôs que este ensaio fosse conduzido utilizando planárias adultas, com órgão reprodutor visível e capacidade de postura de casulos, sendo cinco organismos expostos a 100 ml de amostra, em duplicata por 96 horas. Durante os testes os animais não foram alimentados e as soluções teste, preparadas em água de cultivo, foram renovadas a cada 24 horas.

Já Preza e Smith (2001) propuseram ensaios de mortalidade com filhotes com comprimento máximo de 4 mm e idade máxima de 10 dias, exposição de 10 a 20 organismos em frascos contendo 50 ml da solução teste, em recipientes de 100 ml, em duplicata e com observações após 24 e 48 horas de exposição.

Apesar das tentativas de padronização, os trabalhos mais recentes não adotaram os métodos acima citados e empregaram diferentes protocolos, sendo também apresentados materiais e

métodos incompletos, dificultando que se possa fazer a comparação entre os procedimentos adotados (MEI-HUI, 2008; KNAKIEVICZ E FERREIRA, 2008; BUTTURI-GOMES, 2008).

Para que os resultados dos ensaios com planárias possam ser comparados, torna-se necessária a definição de um método padronizado. Também é importante realizar testes com substâncias de referencia visando avaliar a robustez do método, bem como a sensibilidade dos organismos.

Usualmente nos testes ecotoxicológicos são utilizados organismos em sua fase mais sensível, ou seja, em geral no período inicial da vida dos mesmos (ZAGATTO E BERTOLETTI, 2008; ABNT, 2006). Devido à alta taxa de mortalidade de planárias em sua fase intermediária de crescimento (SÁFADI, 1993; BUENO-SILVA E FISCHER, 2005), tem-se que filhotes da planária *G. tigrina* podem ser obtidos com mais facilidade que adultos em culturas de laboratório. Estes já demonstraram ser mais sensíveis que organismos adultos, pelo menos para alguns metais (PREZA E SMITH, 2001; SÁFADI, 1993). Desta forma, torna-se interessante a utilização de filhotes em testes de mortalidade.

Dentre os diversos organismos nos quais o processo regenerativo já foi estudado, destacam-se os anfíbios caudados (salamandras e tritões) e as planárias, as quais possuem capacidade regenerativa avançada e cujos aspectos biológicos vêm sendo estudados há mais de 200 anos (OVIEDO E BEANE, 2009; IANNACONE E TEJADA, 2007). Estes organismos também são alvos de interesse devido aos já antigos relatos da capacidade destes em responder a agentes químicos carcinogênicos durante processos regenerativos (BEST E MORITA, 1982; OKAMOTO, 1997; SCHAEFFER, 1993).

A relevância em entender esse processo deriva das pesquisas de células tronco, células indiferenciadas que tem a capacidade de auto substituição e produção de células específicas. Enquanto células troncos embrionárias dividem-se e geram diferentes tipos de células do corpo, as células tronco adultas de tecidos específicos são normalmente restritas a formar tipos específicos de células (ANDERSON et al., 2001; MORRISON, 2001; WAGERS et al., 2002; GURLEY E SÁNCHEZ-ALVARADO, 2008). Para um animal adulto substituir uma estrutura perdida, as células devem ser reprogramadas. Para realizar uma regeneração, animais adultos necessitam promover a proliferação de células diferentes, a ativação de células tronco reservas, a formação de novas células tronco com limitada capacidade de auto renovação (células

progenitoras), ou uma combinação destas estratégias. As células participantes deste processo necessitam ainda serem guiadas precisamente até as áreas requeridas e, uma vez que a regeneração é completada, uma ordem específica se faz necessária para reportar o sucesso regenerativo e sinalizar o término do processo. Caso contrário, a resposta inicial pode continuar ativa por tempo indeterminado, causando consequências indesejadas para a homeostase corporal (GURLEY E SÁNCHEZ-ALVARADO, 2008; OVIEDO E BEANE, 2009).

Diferente dos caudados que se regeneram através de células pós-mitóticas, as quais entram novamente no ciclo celular e se rediferenciam, as planárias utilizam em seu processo regenerativo células indiferenciadas chamadas neoblastos. Os neoblastos são considerados células tronco adultas somáticas e são o único tipo de célula na planária com a capacidade de se dividir. Além disso, os neoblastos são capazes de produzir os 40 tipos de células encontradas neste animal (OVIEDO E BEANE, 2009; AGATA E WATANABE, 1999; SALÓ, 2006, SALÓ et al., 2009).

A presença de neoblastos em abundância no mesênquima das planárias as fazem capazes de regenerar-se completamente desde pequenos grupos de aproximadamente 10,000 células, sendo que os fragmentos podem ser oriundos de qualquer parte do corpo deste animal. Um agente estressor é capaz de interromper a regeneração deste animal somente impedindo a divisão celular ou causando a perda dos neoblastos (GURLEY E SÁNCHEZ-ALVARADO, 2008; SÁNCHEZ-ALVARADO, 2004).

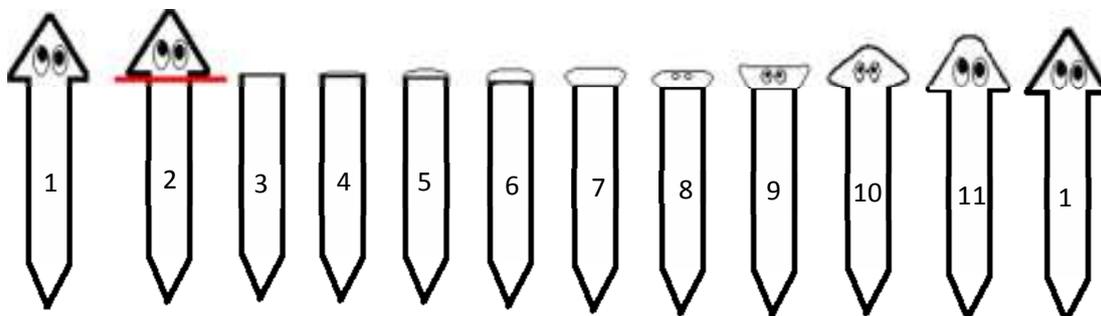
Sabendo que várias classes de contaminantes são capazes de afetar o processo regenerativo das planárias sob condições controladas de exposição e das demais vantagens técnicas e biológicas em utilizar esse organismo, os ensaios de regeneração podem ser interessantes em estudos ambientais de teratogênese e carcinogênese (KANAKIEVICZ E FERREIRA, 2008; KANAKIEVICZ et al., 2008; KALAFATIC et al. 2004; CALEVRO et al., 1998).

Neste sentido, Sabourin et al. (1985) e Calevro et al. (1998) propuseram ensaios de regeneração encefálica com planárias para a avaliação de contaminantes ambientais. Organismos adultos sadios foram submetidos à decapitação e expostos ao contaminante de interesse. Outros autores, utilizando essa abordagem, obtiveram resultados que comprovaram a capacidade de diferentes substâncias químicas em influenciar negativamente o processo regenerativo das

planárias (BUTTURI-GOMES, 2008; IANNAcone E TEJADA, 2007; BARROS et al., 2006; PRÁ et al., 2006 ; BUENO et al., 2002).

O processo de regeneração encefálica de planárias de água doce (FIGURA 1) é finalizado entre 5 a 14 dias após a decapitação. A velocidade de cada etapa deste processo ocorre em tempos diferentes de acordo com a espécie, a alimentação e a temperatura (EGGER et al, 2007, SÁNCHEs-ALVARADO, 2004).

FIGURA 1 – Esquema representativo da dinâmica de regeneração encefálica em planárias



1 - Planária adulta, 2- Planária seccionada, 3 – Planária imediatamente após secção (início do processo de cicatrização e migração dos neoblastos para a região lesionada), 4 – Planária aproximadamente 2 horas após a secção (processo de cicatrização finalizado), 5 – Proliferação mitótica dos neoblastos na região amputada, com formação do aglomerado celular inespecífico blastema, 6 – Crescimento do blastema, 7 – Início da formação das aurículas, 8 – Aparecimento discreto dos ocelos e diferenciação mais significativa das aurículas, 9 – Formação completa dos ocelos, crescimento da região encefálica e das aurículas, 10 – Definição da região encefálica em proporção similar a de origem, 11 – Planária finalizando regeneração, 1 - Planária adulta regenerada. **Fonte: Produção do próprio autor com base no descrito por Saló et al. (2009) e Gurley e Sanches-Alvarado (2008).**

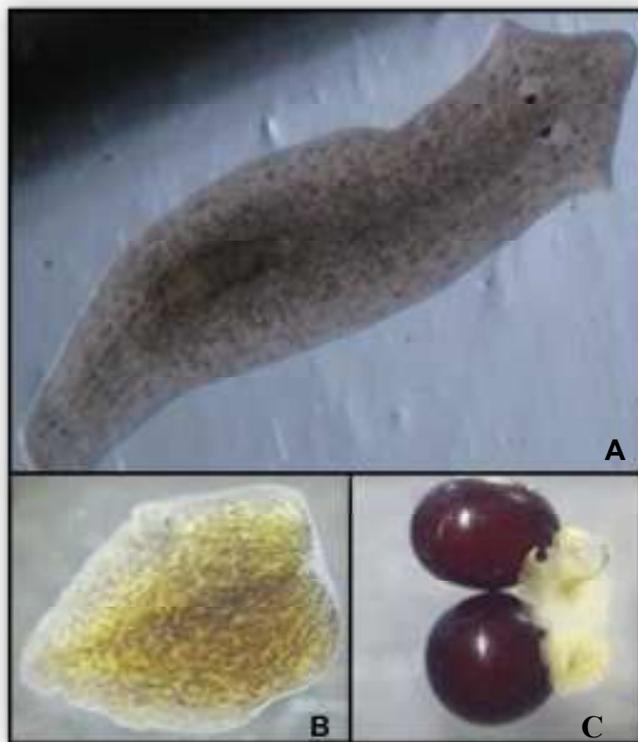
2.2. O uso da espécie *Girardia tigrina* em testes de mortalidade e atraso na regeneração encefálica

Dentre as várias espécies de planárias que vêm sendo utilizadas para os ensaios de mortalidade e regeneração encefálica, destaca-se a espécie *G. tigrina*. As planárias desta espécie são caracterizadas por habitarem ambientes aquáticos lênticos, por botarem casulos esféricos providos de pedúnculos e possuir uma excelente capacidade regenerativa. Além disso, este verme achatado é provido de cabeça triangular, a qual se distingue do corpo pela presença de duas aurículas curtas e grossas e pela presença de dois ocelos fotossensíveis. Em sua pigmentação

dérmica específica, a superfície ventral do corpo, translúcida, se diferencia da dorsal, castanho pigmentado (HYMAN, 1939).

Essa espécie de vida livre integra a cadeia alimentar dos ecossistemas aquáticos atuando como saprófaga e predadora de moluscos, larvas e outras planárias. Hermafroditas, a reprodução desses animais pode ocorrer de maneira sexuada ou assexuada. A reprodução sexuada consiste na fecundação cruzada com troca mútua de espermatozoides de duas planárias e postura de casulos, enquanto que a assexuada ocorre por fissão da região pós-faríngea de organismos adultos. Essas planárias tem o tamanho médio de 3 mm quando recém nascidas e de 13 a 18 mm quando adultas, sendo que podem chegar até 22 mm de comprimento (BUENO-SILVA E FICHER, 2005). Na Figura 2 observa-se um espécime jovem, detalhe da região pós faríngea seccionada característica de reprodução assexuada e casulos, típicos de reprodução sexuada.

FIGURA 2 – Planária de água doce *Girardia tigrina*



A - Espécime jovem; **B** - Região pós-faríngea característica de reprodução assexuada e **C** - Casulos típicos de reprodução sexuada. **Imagem ilustrativa e fora de escala. Fonte: arquivos do LEAL FT/UNICAMP**

Ao serem cultivados de forma controlada em laboratório, os organismos dessa espécie chegam à fase adulta em aproximadamente três meses após o nascimento, se reproduzem sexuadamente durante todo o ano, gerando casulos com um curto período de incubação (BUENO-SILVA E FICHER, 2005; KNAKIEVICZ et al., 2006). Destaca-se que *G. tigrina* demonstrou maior adaptabilidade ao cultivo em laboratório que *G. shubarti* (KNAKIEVICZ et al., 2006). Desta forma *G. tigrina* parece ser uma espécie adequada para ser empregada em testes de toxicidade.

3. OBJETIVOS

Estabelecer protocolos para o monitoramento das culturas e realização dos testes de mortalidade e atraso na regeneração encefálica com *G. tigrina*, e aplicar os mesmos para a avaliação de contaminantes e amostras ambientais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Origem, cultivo e controle da sensibilidade dos organismos-teste

Os organismos utilizados descendem de espécimes de *G. tigrina* coletados nos tanques de criação de plantas e invertebrados do Instituto de Biociências da UNESP - Campus Rio Claro, SP e que foram devidamente identificados (BARROS et al., 2006).

Em março de 2005 alguns destes animais foram cedidos ao Laboratório de Ecotoxicologia e Microbiologia Ambiental - LEAL – FT/UNICAMP, quando foram feitas alterações gradativas nas condições de cultivo, visando à obtenção de organismos saudáveis, via reprodução sexuada, em quantidades adequadas às necessidades do laboratório. Para a elaboração do método de cultivo foram analisadas e adaptadas diferentes propostas encontradas na literatura científica.

Optou-se pelo uso de água de torneira desclorada como água de cultivo (IANNACONE E TEJADA, 2007; MEI-HUI, 2008; BUTTURI-GOMES, 2008). Quanto aos recipientes de criação dos animais, foram utilizados potes de plásticos atóxicos com tampa, sendo mantida uma densidade populacional de 0,04 indivíduo por mL, conforme recomendado por Reynoldson et al. (1965).

São vários os alimentos que vem sendo empregados no cultivo de planárias em laboratório como, minhocas (BUENO-SILVA E FISCHER, 2005), fígado de frango (ÁGATA E WATANABE, 1999; KOBAYASHI et al., 1999; IANNACONE E TEJADA, 2007), gema de ovo (KNAKIEVICZ et al., 2006) e fígado bovino. Este parece apresentar qualidades nutricionais ideais para o cultivo sadio de planárias em laboratório, de acordo com os estudos de Sáfadi (1993), Guecheva et al. (2001), Bueno et al. (2002), Barros et al. (2006) e Knakievicz et al. (2006). O fígado bovino tem um período de digestão em *G. tigrina* de aproximadamente 197 horas e é indicado para alimentação semanal das culturas (LIMA, 1954).

Em relação às condições ambientais para o cultivo, foram adotadas as condições estabelecidas por Preza e Smith (2001), ou seja, temperatura ambiente e fotoperíodo de 16 horas de luz artificial e 8 horas de escuro.

Neste estudo a alimentação dos organismos, a limpeza dos recipientes de cultivo, a renovação da água de manutenção e o controle da mortalidade, fecundidade e natalidade foram

realizados semanalmente. A metodologia adotada neste trabalho para o cultivo de *G. tigrina* em laboratório está apresentada na Tabela 2

TABELA 2 – Condições adotadas para o cultivo de *Girardia tigrina* em laboratório

Parâmetro	Condições de cultivo														
	Água de torneira desclorada e constantemente aerada, mantida em tanque de 50 L tampado. A cada novo lote preparado, análises físico-químicas foram realizadas (conforme item 4.3), mantendo-se os seguintes valores:														
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Parâmetro</th> <th>Valor</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Oxigênio dissolvido (O.D)</td> <td>> 3,0 mg.L⁻¹ O₂</td> </tr> <tr> <td>pH</td> <td>6,5 a 7,6</td> </tr> <tr> <td>Dureza</td> <td>40 a 48 mg.L⁻¹ de CaCO₃</td> </tr> <tr> <td>Cloro</td> <td>< 0,02 mg.L⁻¹ Cl₂</td> </tr> <tr> <td>Temperatura</td> <td>Ambiente</td> </tr> <tr> <td>Algas e fungos aparentes</td> <td>Não aparentes</td> </tr> </tbody> </table>	Parâmetro	Valor	Oxigênio dissolvido (O.D)	> 3,0 mg.L ⁻¹ O ₂	pH	6,5 a 7,6	Dureza	40 a 48 mg.L ⁻¹ de CaCO ₃	Cloro	< 0,02 mg.L ⁻¹ Cl ₂	Temperatura	Ambiente	Algas e fungos aparentes	Não aparentes
Parâmetro	Valor														
Oxigênio dissolvido (O.D)	> 3,0 mg.L ⁻¹ O ₂														
pH	6,5 a 7,6														
Dureza	40 a 48 mg.L ⁻¹ de CaCO ₃														
Cloro	< 0,02 mg.L ⁻¹ Cl ₂														
Temperatura	Ambiente														
Algas e fungos aparentes	Não aparentes														
	Na ocorrência de fungos, algas e cloro, descartou-se o lote. Quando necessário, usou-se soluções para correção da dureza (Soluções 1 e 2) e soluções de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio para correção do pH, elaboradas conforme NBR 12713 (ABNT, 2006)														
Características dos recipientes de cultivo	Recipientes plásticos de 4 L, com tampa e identificação indelével														
Alimentação	Pedaços de fígado bovino, de aproximadamente 23 cm ³ , mantidos nos cristalizadores por 4 horas e disponibilizados semanalmente														
Troca da água de cultura	Remoção e contagem dos organismos e dos possíveis casulos dos recipientes após decorridas as 4 horas de exposição ao alimento. Inserção dos organismos nos recipientes específicos limpos e contendo água de cultivo fresca														
Manejo dos casulos e controle da natalidade	No momento da troca, os casulos contados foram alocados em recipientes identificados contendo água de cultivo, os quais foram submetidos à observação semanal. Na ocorrência de recém-nascidos, estes foram contados e utilizados para ensaios de toxicidade ou montagem de novos cristalizadores. Utilizou-se planilhas de controle														
Volume de água de cultivo em cada recipiente de cultivo	Para evitar fuga de organismos, os recipientes foram preenchidos até o limite de 90% de sua capacidade														

TABELA 2 – Condições adotadas para o cultivo de *Girardia tigrina* em laboratório -
Continuação

Parâmetro	Condições de cultivo
Densidade populacional	< 0,04 organismos/ml
Fotoperíodo, temperatura e aeração	16 h de luz e 8 h de escuro, temperatura ambiente. Aeração constante nos recipientes
Segregação dos organismos por idade	Semanalmente, com registro em planilha de controle
Registro semanal de fecundidade e natalidade	No dia da troca e durante outras observações semanais. Registros em planilhas de controle
Instrumentação para manipulação	Pincéis macios de números variados

Dentre as várias substâncias que podem ser utilizadas como referência em testes de sensibilidade, o cromo e o zinco vêm sendo amplamente empregados. Eles possuem vários dos requisitos necessários para serem usados como substância de referência, tais como alta solubilidade em água, relativa estabilidade química e alta toxicidade (ZAGATTO E BERTOLETTI, 2008).

O zinco já foi utilizado em ensaios de mortalidade com a planária de água doce *Polycelis felina* no estudo de Franjević et al. (2000) e nos ensaios com *G. tigrina* realizados por Sáfadi (1993). Há também pesquisas que demonstraram os efeitos adversos do cromo frente a filhotes (PREZA E SMITH, 2001) e adultos (SÁFADI, 1993) de *G. tigrina*.

No presente trabalho foram realizados sete ensaios de sensibilidade utilizando filhotes de planárias com base nas metodologias propostas por Knakievicz e Ferreira (2008), Mei-Hui (2008), Prá et al. (2006) e Preza e Smith (2001), utilizando zinco e cromo para fins comparativos.

Para a realização dos testes de sensibilidade, filhotes de *G. tigrina* com no máximo 10 dias de nascidos foram segregados dos recipientes de cultivo. Selecionou-se somente organismos que visualmente não apresentaram lesões ou deformidades e que estavam com boa capacidade locomotiva.

No mínimo cinco concentrações de cada metal dissolvidos em água de cultivo foram empregadas, sendo que cada concentração foi testada em duplicata. Para o controle (água de

cultivo) e concentrações testes foram introduzidos 7 organismos em cada réplica contendo 50 ml (com o auxílio de pincéis nº 0), de forma a expor 14 organismos a cada concentração.

Os recipientes foram dispostos em bandejas plásticas sendo imediatamente cobertos com plástico transparente e dispostos em prateleiras próximas ao local de cultivo. Não houve renovação de solução nem alimentação durante o teste, conforme o proposto por Sáfadi (1993) e Preza e Smith (2001).

A mortalidade e outras alterações foram observadas após 24, 48, 72 e 96 horas de exposição. As alterações morfológicas observadas foram registradas mediante fotografias em sistema de documentação composto por estereoscópio Zeiss© modelo Stemi 2000 (aumento de 50 vezes) com câmera Canon© modelo Powershot S10 acoplada.

As planárias sobreviventes foram retiradas das soluções-teste, sacrificadas com álcool etílico 98% e descartadas em lixo comum. Os resíduos das soluções-teste foram destinados de acordo com os protocolos estabelecidos pela Divisão de Gerenciamento de Resíduos da Faculdade de Tecnologia/Universidade Estadual de Campinas (SANTOS, 2011).

Os testes de sensibilidade foram expressos em concentração letal 50% (CL50) e este valor foi obtido por meio do teste estatístico não paramétrico Trimmed Spearman-Kärber, o qual está disponível no software J.Spear (HAMILTON et al., 1977). Foram também calculadas as médias aritméticas (**X**), o desvio padrão normal (**DP**) e coeficiente de variação (**CV**) das CL50 observadas. O coeficiente de variação foi calculado dividindo-se o desvio padrão pelas médias multiplicado por 100 e expresso em %.

Como o zinco apresentou menor coeficiente de variação entre os experimentos, o mesmo foi escolhido como substância de referencia neste trabalho (vide Item 5.1). Foi elaborada uma carta-controle da sensibilidade dos organismos filhotes (ZAGATTO E BERTOLETTI, 2008), utilizando os dados dos testes realizados com zinco no presente estudo e, utilizando a mesma metodologia já empregada nos primeiros sete experimentos. Foram realizados outros sete ensaios adicionais, no decorrer de 2011.

Visando determinar uma faixa de sensibilidade e aceitabilidade dos resultados calculou-se as CL50 médias dos testes e os valores equivalentes à média somada ou subtraída de dois desvios padrões, os quais foram adotados como limite superior e inferior, respectivamente, conforme sugerido por Zagatto e Bertolletti (2008).

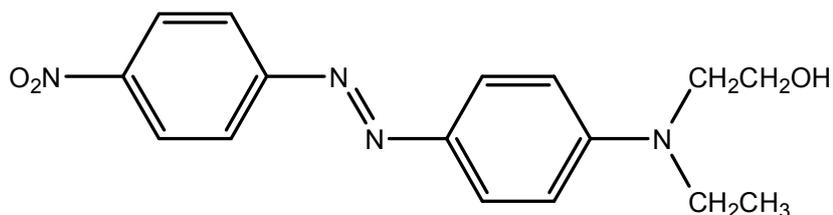
4.2 Substâncias químicas e amostras ambientais

Na escolha da substância de referência usou-se o cromo, na forma de dicromato de potássio (CAS 7778-50-9, Cromoline® Química Fina Ltda, 99% de pureza) e o zinco, que foi testado na forma de sulfato de zinco heptahidratado (CAS 7446-20-0, Casa de Química® Ind. e Com. Ltda, 99% de pureza).

Referente às substâncias e amostras de interesse ambiental, testou-se o cobre, na forma de sulfato de cobre pentahidratado (CAS 7758-99-8, Cromoline® Química Fina Ltda, 99% de pureza), um corante têxtil, um herbicida, nanomateriais e amostras ambientais.

O corante têxtil avaliado foi o produto comercial C.I. Disperse Red 1 (CAS 2872-52-8, N-Ethyl-N-(2-hydroxyethyl)-4-(4-nitrophenylazo aniline, PCIL® Ltda), Este corante faz parte da lista dos compostos analisados no Projeto Temático “Avaliação da ocorrência, toxicidade/genotoxicidade e processos para degradação de corantes em efluentes e águas superficiais” (FAPESP N° 08/10448-7). Este produto comercial foi caracterizado quimicamente por Vacchi (2012). Ele é composto pelo corante principal C.I. Disperse Red 1 (60%) (Figura 3), surfactante (20%) e outros corantes oriundos de impurezas da síntese química (20%).

FIGURA 3 – Estrutura química do corante principal C.I. Disperse Red 1



Atrazina (CAS 1912-24-9) foi testada na forma comercial (ATRANEX®, 50% de pureza) e também na forma padrão (Sigma-Aldrin, 99% de pureza) com fins comparativos. No caso do produto puro utilizou-se concentrações abaixo de 33 mg.L⁻¹, que corresponde ao limite da

solubilidade desta substância (JIANG E ADAMS, 2006) e a solução-estoque foi agitada por uma hora antes dos testes.

Nanotubos de carbono de parede múltipla tratados com uma hora de oxidação ácida (NTC@1h) foram também avaliados. Este material foi produzido e cedido pelo LQES-IQ/Unicamp e a sua caracterização físico-química foi descrita por Honório (2012). Esse material faz parte das amostras avaliadas no projeto “Interação de nanomateriais a poluentes ambientais: Modulação da eco/genotoxicidade” (CNPq N° 476660/2009).

Estes materiais são testados em dispersão, pois são insolúveis em água. Soluções-estoque de 50 mg.L^{-1} de NTC@1h foram preparadas de acordo com Honório (2012). A solução-estoque foi ultrasonicada ($42\text{Khz} \pm 6\%$) por 30 minutos e então utilizada no preparo das concentrações-teste.

Amostras ambientais foram também avaliadas. Foram selecionados dois locais de coleta, o Ribeirão dos Cristais – Cajamar, SP (Figura 4), localizado na região metropolitana de São Paulo e a estação de tratamento de esgoto de Americana, SP. Destaca-se que o Ribeirão dos Cristais possui em seu histórico a ocorrência de mutagenicidade (UMBUZEIRO et al., 2005). Segundo estes autores, dentre os compostos mutagênicos identificados nas amostras, destacaram-se três corantes têxteis oriundos de uma indústria de tingimento que lança seus efluentes neste corpo hídrico.

As coletas foram realizadas de acordo com a NBR 9898 (ABNT, 1987) em 22 de Setembro de 2011. No Ribeirão dos Cristais foram coletadas amostras no ponto 1 (P1) a 300 metros do cano de descarte de efluentes (P2) e no terceiro ponto (P3) a 500 metros à montante do lançamento. As amostras foram transportadas para o laboratório e analisadas para pH, condutividade, oxigênio dissolvido, dureza e cloro, de acordo com as metodologias de APHA (1998) e utilizando os equipamentos descritos no item 4.3.

FIGURA 4 – Localização dos pontos de coletas do Ribeirão dos Cristais (Cajamar- SP)



A Figura 4 indica a localização dos pontos de coleta em Cajamar–SP, do trecho analisado, já a seta laranja indica o trecho analisado do Ribeirão dos Cristais. **Fonte: Google Maps.**

O segundo local analisado foi a ETE Carioba, a qual é responsável pelo tratamento do esgoto doméstico e efluentes industriais de parte da cidade de Americana (Estado de São Paulo). A atividade industrial têxtil desta região é destaque no cenário econômico brasileiro e gera preocupação por se localizar na bacia do Rio Piracicaba, que tem grande importância como recurso hídrico para abastecimento no interior do estado (PAULA-JUNIOR et al., 2005; BALAN E MONTEIRO, 2001, SILVANO E BEGOSSI, 2001).

Amostras da entrada e saída da estação de tratamento foram coletadas de acordo com NBR 9898 (ABNT, 1987) em 11/09/2011. As amostras foram transportadas para o laboratório, onde foram analisadas para pH, condutividade, oxigênio dissolvido, dureza e cloro de acordo APHA (1998) e utilizando os equipamentos descritos no item 4.3.

Um resumo dos contaminantes e amostras ambientais analisados neste estudo está expresso na Tabela 3.

TABELA 3 – Descrição resumida dos contaminantes e amostras ambientais analisados neste estudo

Amostra	Descrição
Cobre	Cu ²⁺ , na forma de sulfato de cobre
CI Disperse Red 1	Azo corante têxtil comercial
Atrazina	Herbicida na forma comercial e pura
NTC@1h	Nanotubos de carbono de parede múltipla após 1 hora de oxidação ácida
P1	Ribeirão dos Cristais, montante do lançamento de efluentes
P2	Ribeirão dos Cristais, lançamento de efluentes
P3	Ribeirão dos Cristais, jusante do lançamento de efluentes
P1C	Entrada da ETE Carioba
P2C	Saída da ETE Carioba

4.3 Equipamentos e análises de parâmetros físico-químicos

O sistema de descloração da água de torneira consistiu de mangueira de silicone, onde uma extremidade foi acoplada à torneira e a outra a uma garrafa plástica limpa de 500 ml, com diversos furos na parte inferior. Esta garrafa foi preenchida com camadas sucessivas de carvão ativado e pedras de aquário, sendo estes dois materiais separados por polímero reforçado com fibra de vidro (PRFV, CAS 65997-17-3), formando um filtro para descloração. A água desclorada foi armazenada em recipiente de 50L com tampa.

Os parâmetros físico-químicos foram analisados de acordo APHA, (1998). Para a medida de oxigênio dissolvido empregou-se um oxímetro YSI modelo 55/12 FT; de pH, o medidor marca Marte modelo MB-10; da dureza total, utilizou-se o método da titulação com ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA); o cloro residual livre foi medido em colorímetro Hach Pocket pelo método de N,N'-dietil-p-fenildiamina (DPD, com precisão de ± 0,02 ppm) e para verificação da presença de algas e fungos na água de cultivo foi feita uma avaliação visual. Quando necessário, a dureza e o pH das soluções testes e da água de cultivo foram corrigidos utilizando soluções de ácido e base e de sais específicos, de acordo com a NBR -12713 (ABNT, 2006).

4.4 Ensaios de toxicidade

4.4.1. *Mortalidade com filhotes*

Os ensaios utilizando filhotes e a expressão dos resultados foi realizada utilizando a mesma metodologia utilizada nos ensaios de sensibilidade, a qual foi descrita no item 4.1. Para o cobre, foram realizados cinco ensaios, para os compostos C.I. Disperse Red 1, herbicida atrazina e NTC@1h foram realizados três ensaios e para as amostras ambientais foi conduzido um ensaio para cada ponto coletado no Ribeirão dos Cristais e da ETE Carioba.

4.4.2. *Regeneração encefálica*

Butturi-Gomes (2008) propôs que ensaios de mortalidade com planárias adultas fossem utilizados preliminarmente aos ensaios de regeneração encefálica, visando obter concentrações subletais das amostras-teste. Deste modo, ensaios de mortalidade utilizando adultos foram realizados preliminarmente baseando-se na metodologia proposta por Sáfadi (1993).

Neste caso, utilizou-se o mesmo método descrito no item 4.1, com algumas modificações. Foram utilizados animais com idade superior a três meses e empregaram-se triplicatas contendo 100 mL para cada concentração. Foram introduzidos 5 organismos pré-selecionados em cada réplica, com o auxílio de pincéis nº 12, de forma a expor 15 organismos por concentração. Para a expressão dos resultados foram usados os mesmos tratamentos estatísticos descritos no item 4.1.

Foram conduzidos três ensaios com os metais de referência zinco e cromo visando além de verificar a viabilidade do método, obter concentrações não letais das substâncias adotadas. Quanto aos contaminantes ambientais, foram realizados três ensaios com o metal cobre e com o corante C.I. Disperse Red 1, dois com o herbicida atrazina comercial e três com os nanotubos de carbono.

Os testes de regeneração encefálica foram realizados de acordo com Knakievicz e Ferreira (2008) e Butturi-Gomes (2008). Planárias adultas sadias e em jejum por no máximo 24 horas foram segregadas e decapitadas em seu momento de maior alongação corpórea, sendo o corte realizado com bisturi na região imediatamente anterior as aurículas. Para cada concentração

analisada (no mínimo cinco) foram preparadas quatro réplicas contendo 20 mL de solução e 5 organismos decapitados em cada frasco. Diariamente foi realizada a renovação das soluções testes e a observação da etapa regenerativa apresentada em cada organismo.

As alterações observadas foram registradas através de fotografias em um sistema de observação e documentação composto por estereoscópio Zeiss© (modelo Stemi 2000 - aumento de 50 vezes) com câmera Canon© modelo Cybershot S10 acoplada.

Cada etapa ou situação observada nos períodos de leituras foi representada e registrada por um símbolo alfanumérico conforme a Tabela 4.

TABELA 4 - Simbologia empregada para registro das observações realizadas nos ensaios de regeneração encefálica

Código Adotado	Etapa de regeneração ou alteração correspondente
O	Corpos recém-decapitados
A	Início da formação do blastema
B	Blastema visível e normal
C	Início do surgimento das aurículas
D	Início do surgimento dos ocelos
E	Ocelos e aurículas mais definidos
F	Formação completa dos ocelos e das aurículas
Z	Má cicatrização, com ocelo e sem aurículas
X	Degeneração corpórea elevada
P	Planária seccionada, sem região pós-faringe
*	Cicatrização não realizada

Para cada tempo de exposição e concentração-teste anotou-se o número de planárias em cada etapa de regeneração. O ensaio foi considerado finalizado quando os organismos nos recipientes controles, contendo somente água de cultivo, apresentaram regeneração completa da região encefálica (usualmente 5 dias), (BARROS et al., 2006).

Diversas são as metodologias empregadas para a expressão dos resultados dos ensaios regenerativos utilizando planárias. Knakievicz e Ferreira (2008) expressaram os resultados em CI50 - concentração de inibição da regeneração de 50% dos organismos - e em CENO - concentração de efeito não observado. Já Calevro et al. (1998), além de realizar análise estatística dos seus resultados, comentaram detalhadamente as alterações observadas em cada concentração-teste.

Neste trabalho, ao final do ensaio de regeneração, os efeitos inibitórios das substâncias testes foram estimados através da maior concentração que não causou efeito adverso aos organismos (CENO) e da menor concentração que causou efeito estatisticamente significativo aos organismos (CEO), como também foi descrita as alterações morfológicas e os estágios observados nas planárias que apresentaram atraso.

Visando a obtenção dos valores de CENO e CEO de cada ensaio, calculou-se o número de planárias com atraso na regeneração (**Pax**) em cada concentração-teste. Para o cálculo deste valor, utilizou-se a seguinte equação:

$$\text{(Equação 1)} \quad \mathbf{Pax} = \mathbf{Ptx} - \mathbf{Pcx}$$

Onde a sigla **Ptx** corresponde ao número de planárias com atraso regenerativo na concentração-teste no tempo **x** e a sigla **Pcx** corresponde ao número de planárias com atraso na regeneração no controle no tempo **x**.

A maior concentração onde o valor de **Pax** foi igual a 0 foi considerada a CENO e a primeira concentração onde o valor de **Pax** foi maior que 0 foi considerada a CEO.

A ocorrência de mais de 3 valores negativos de **Pax** em um mesmo tempo de leitura indica melhor condição para regeneração nas concentrações testes que no controle. Nestes casos deve-se analisar o potencial da substância em auxiliar a regeneração encefálica, a qualidade da água de controle, ou até mesmo a necessidade de repetição ou anulação do ensaio.

4.4.3 Alteração do desempenho reprodutivo de adultos

Durante os ensaios de mortalidade e de regeneração encefálica com animais adultos com o corante C.I. Disperse Red 1 observou-se que os organismos expostos não produziram casulos, diferentemente dos organismos do controle. Desta forma, decidiu-se analisar o desempenho reprodutivo de *G. tigrina* expostas a este corante.

O desempenho reprodutivo de *G. tigrina* foi avaliado baseando-se no método de Knakievicz e Ferreira (2008).

Animais saudáveis com idade superior a três meses e com visível capacidade de produção de casulos foram aleatoriamente retirados do recipiente de cultivo e colocados em um pote de plástico limpo contendo 1 litro da solução teste, em uma densidade populacional de 25 planárias por litro, sendo preparados quatro grupos de exposição, denominados G1, G2, G3 e G4.

O ensaio foi conduzido em três etapas: na primeira etapa (adaptação), todos os grupos foram expostos somente à água de cultivo, sendo monitorada a produção de casulos de cada grupo por duas semanas. Na segunda etapa (exposição), que durou cinco semanas, três grupos foram expostos a 0.01, 0.1 e 1 mg.L⁻¹, G2, G3 e G4, respectivamente, do corante comercial C.I. Disperse Red 1 e um grupo, G1, foi mantido sem o corante. Na terceira e última etapa (recuperação), a exposição ao corante foi interrompida e os animais de todos os grupos foram expostos somente à água de cultivo, por duas semanas.

Durante o experimento os animais foram observados e alimentados com fígado bovino uma vez por semana, utilizando os mesmos procedimentos e condições empregadas no cultivo. Após a troca total das soluções teste foram feitas contagem e segregação dos casulos e observação dos aspectos morfológicos dos organismos. Os recipientes foram aerados com compressor comum de aquário e mantidos próximos ao local de cultivo.

Os resultados foram expressos em fecundidade média (*fc*) de cada grupo nos diferentes estágios analisados (Etapa 1 – Adaptação, Etapa 2 – Exposição e Etapa 3 – Recuperação). A fecundidade média foi calculada através da seguinte expressão:

$$\text{(Equação 2)} \quad fc = \frac{\sum \frac{Csx}{P_{sx}}}{Ts}$$

Onde *fc* é a fecundidade média, *Csx* é o número total de casulos obtidos na semana *x*, *P_{sx}* é o número de planárias vivas na semana *x* e *Ts* é o total das semanas.

Utilizando o software Origin® Pro 8 foi realizada a análise de variância ANOVA e comparação das *fc* médias mediante o uso do teste Tukey (nível de significância $\alpha = 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Testes com substâncias de referência (zinco e cromo) e carta controle da sensibilidade

Os resultados dos ensaios com filhotes *G. tigrina* e substâncias de referência estão apresentados nas Tabelas 5 e 6. Segundo Environment Canada (1990), um teste ecotoxicológico é considerado aceitável em relação à precisão analítica quando o coeficiente de variação dos resultados não for superior a 30%.

Observa-se que os valores das CL50 obtidas com cromo (Tabela 5), após 24h, tiveram variação superior a 30%, o que não ocorreu nos ensaios com zinco (Tabela 6), que em todos os períodos analisados apresentaram variação de 12%. Nos ensaios com cromo observa-se que houve aumento da letalidade ao longo do período de exposição, isto é, o valor da CL50 diminuiu ao longo do tempo, fato este não observado nos ensaios com zinco, que apresentaram letalidade estabilizada já nas primeiras 24h de exposição.

TABELA 5 – CL50, em mg.L⁻¹ de Cr⁶⁺, obtidas em diferentes tempos de exposição com filhotes de *G. tigrina*

CL50 [mg.L ⁻¹]				
ENSAIO	24 h	48 h	72 h	96 h
1 ^a	13	11	8	7
2 ^b	11	11	11	7
3 ^b	N.C.	27	20	11
4 ^b	N.C.	29	18	15
5 ^b	18	8	5	3
6 ^b	15	10	5	4
7 ^b	14	5	2	5
CL50 Média ± DP	12 ± 3	14 ± 10	10 ± 7	7 ± 5
CL50 Média ^c ± DP		9,2 ± 5,5		5 ± 1
C.V. (%)	18	66	70	66

N.C.: valor não calculável pelo método estatístico adotado pela ausência de mortalidade no período; CL50: concentração letal a 50% dos organismos; D.P.: desvio padrão; C.V.: Coeficiente de variação. Concentrações utilizadas nos ensaios: ^a (0.01, 0.03, 0.18, 0.27, 0.3, 0.9, 3.5 e 35 mg.L⁻¹ de Cr⁶⁺); ^b (0.9, 1.8, 3.5, 7, 10, 18 e 35 mg.L⁻¹ de Cr⁶⁺); ^c Valores na literatura obtidos em ensaios com filhotes de *G. tigrina* expostos a cromo (Preza e Smith, 2001).

Os valores médios das CL50 48h ($14 \pm 10 \text{ mg.L}^{-1}$) e 96h ($7 \pm 5 \text{ mg.L}^{-1}$) para cromo com filhotes de *G. tigrina* foram similares aos reportados por Preza e Smith (2001), que realizaram este ensaio 6 vezes. Porém no presente estudo o coeficiente de variação obtido após as 96 horas de exposição (66%) foi bem superior ao obtido por estes autores (21%). A discrepância destes valores pode ser explicada pela variação metodológica aplicada entre os trabalhos, pelos erros intrínsecos e extrínsecos e, principalmente, pela instabilidade deste metal em solução aquosa.

Referente aos ensaios com zinco, os valores das CL50 obtidos foram mais reprodutíveis quando comparado com os valores obtidos com cromo. A rápida letalidade (24 horas) sugere que este seja uma substância de referência adequada, permitindo a finalização do teste de sensibilidade em apenas 24h.

TABELA 6 – CL50, em mg.L^{-1} de Zn^{2+} , obtidas em diferentes tempos de exposição com filhotes de *G. tigrina*

ENSAIO	CL50 [mg.L^{-1}]			
	24 h	48 h	72 h	96 h
1 ^a	2	2	2	2
2 ^a	1,6	1,6	1,6	1,6
3 ^a	1,6	1,6	1,6	1,6
4 ^b	1,6	1,6	1,6	1,6
5 ^b	1,3	1,3	1,3	1,3
6 ^b	1,6	1,6	1,6	1,6
7 ^b	1,7	1,7	1,7	1,7
CL50 Média ± DP	$1,6 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,2$
C.V. (%)	12	12	12	12

CL50: concentração letal a 50% dos organismos; D.P.: desvio padrão; C.V.: coeficiente de variação. Concentrações utilizadas nos ensaios ^a (0.1, 0.2, 0.5, 1.1, 2.2, 4.5 e 6.8 mg.L^{-1} de Zn^{2+}) e ^b (0.1, 0.2, 0.5, 1.1, 1.7, 2.2, 4.5 e 6.8 mg.L^{-1} de Zn^{2+}).

Na condição controle não foram observadas mortes ou quaisquer outras alterações morfológicas ou comportamentais nos organismos. Desta forma foi excluída qualquer interferência da água de cultivo nos resultados observados.

A rápida letalidade do sulfato de zinco e maior variação (33%) nos ensaios de sensibilidade utilizando dicromato de potássio como substância de referência foram também reportados por Sáfadi (1993) em ensaios com adultos de *G. tigrina*.

Observou-se também que nos ensaios de mortalidade de adultos, preliminares aos ensaios de regeneração realizados com zinco o coeficiente de variação foi inferior a 30% (Tabela 7).

TABELA 7 – CL50, em mg.L⁻¹ de Zn²⁺, obtidas em diferentes tempos de exposição com adultos de *G. tigrina* em testes preliminares aos ensaios de regeneração encefálica

ENSAIO	CL50 [mg.L ⁻¹]			
	24 h	48 h	72 h	96 h
1	4	3	3	3
2	3	3	3	3
3	2	2	2	2
CL50 Média ± DP	3 ± 1	3 ± 1	3 ± 1	3 ± 1
CL50 Média ^a ± DP				3 ± 0,1
C.V. (%)	33	22	22	22

CL50: concentração letal a 50% dos organismos; D.P.: desvio padrão; C.V.: Coeficiente de variação. Concentrações utilizadas nos ensaios: 1.1, 1.7, 2.2, 3.4, 4.5, e 7 mg.L⁻¹ de Zn²⁺; ^a Valor na literatura obtido em ensaios com adultos de *G. tigrina* expostos a Zinco (Sáfadi, 1993).

Com cromo observa-se na Tabela 8 que as mortalidades só iniciaram após 24 horas de exposição, fato este que também ocorreu em dois dos ensaios com filhotes e este metal. Observa-se também que os resultados, diferente dos ensaios com filhotes, demonstraram baixa variação analítica, sendo os coeficientes de variação inferiores aos obtidos nos ensaios com *G. tigrina* adultas e zinco.

Além disso, observa-se que a CL 50 96h obtida no presente estudo está aproximadamente 12 vezes superior ao encontrado por Sáfadi (1993) em seus ensaios utilizando adultos de *G. tigrina* e cromo. As diferenças entre as metodologias empregadas, bem como as características físico-químicas da água de diluição usada podem explicar esta variação elevada entre os valores, visto a elevada influência da água de cultivo na toxicidade de metais (CARVALHO et al., 2003, VADAMANIKAM E SHAZILLI, 2008)

TABELA 8 – CL50, em mg.L⁻¹ de Cr⁶⁺, obtidas em diferentes tempos de exposição com adultos de *G. tigrina* em testes preliminares aos ensaios de regeneração encefálica

ENSAIO	CL50 [mg.L ⁻¹]			
	24 h	48 h	72 h	96 h
1	N.C	29	22	16
2	N.C	33	26	18
3	N.C	33	23	14
CL50 Média ± DP	N.C	31± 2	23 ± 2	16 ± 2
CL50 Média^a ± DP				1,3 ± 0,4
C.V. (%)	N.C	7	9	12

N.C.: valor não calculável pelo método estatístico adotado, por não haver mortalidades no período; CL50: concentração letal a 50% dos organismos; D.P.: desvio padrão; C.V.: Coeficiente de variação. Concentrações utilizadas nos ensaios: 10, 14, 21, 25, 28 e 35 mg.L⁻¹ Cr⁶⁺; ^a Valor na literatura obtido em ensaios com adultos de *G. tigrina* expostos a Cromo (Sáfadi, 1993).

Nos ensaios de regeneração encefálica com o zinco (Tabela 9), obteve-se, após 120 horas de exposição, 0.57 como CENO e 1.7 como CEO, ambas em mg.L⁻¹ de Zn²⁺. Neste ensaio, na concentração 1.7 mg.L⁻¹ observou-se 3 planárias com atraso regenerativo, sendo que duas destas apresentavam discreto crescimento do blastema (Fase A) e uma apresentava início do surgimento das aurículas e dos ocelos (Fases C e D).

TABELA 9 – Número de planárias *G. tigrina* que apresentaram atraso regenerativo após 120 horas de exposição às concentrações de Zinco

Ensaio	Zn ²⁺ [mg.L ⁻¹]					
	Controle	0,57	1,7	2,3	3,4	4,5
1	<i>Pc</i> ₁₂₀ 0	<i>Pt</i> ₁₂₀ 0	<i>Pt</i> ₁₂₀ 3	<i>Pt</i> ₁₂₀ 3	<i>Pt</i> ₁₂₀ 1	*
	<i>Pa</i> ₁₂₀	0	3	3	1	*

*Pc*₁₂₀: Número de planárias com atraso regenerativo no controle após 120 horas de observação; *Pt*₁₂₀: Número de planárias com atraso regenerativo na solução teste após 120 horas de observação e *Pa*₁₂₀: Número Real de planárias com atraso regenerativo na solução teste após 120 horas de observação. O símbolo * representa a mortalidade de todos os organismos-teste.

Com o cromo (Tabela 10) obteve-se 3.5 como CENO e 7.0 como CEO, ambos valores em mg.L⁻¹ de Cr⁶⁺. Na concentração onde as planárias apresentaram atraso, observou-se uma planária

apresentando início do surgimento dos ocelos e das aurículas (Fases D e E) e outra apresentando somente blastema discreto (Fase A).

TABELA 10 – Número de planárias *G. tigrina* que apresentaram atraso regenerativo após 120 horas de exposição às concentrações de cromo

		Cr ⁶⁺ [mg.L ⁻¹]				
Ensaio	Controle	3,5	7	14	21	28
1	P _{C120} 0	P _{t120} 0	P _{t120} 2	P _{t120} 1	*	*
	P _{a120}	0	2	1	*	*

P_{C120}: Número de planárias com atraso regenerativo no controle após 120 horas de observação; P_{t120}: Número de planárias com atraso regenerativo na solução teste após 120 horas de observação e P_{a120}: Número Real de planárias com atraso regenerativo na solução teste após 120 horas de observação. O símbolo *representa a mortalidade de todos os organismos-teste.

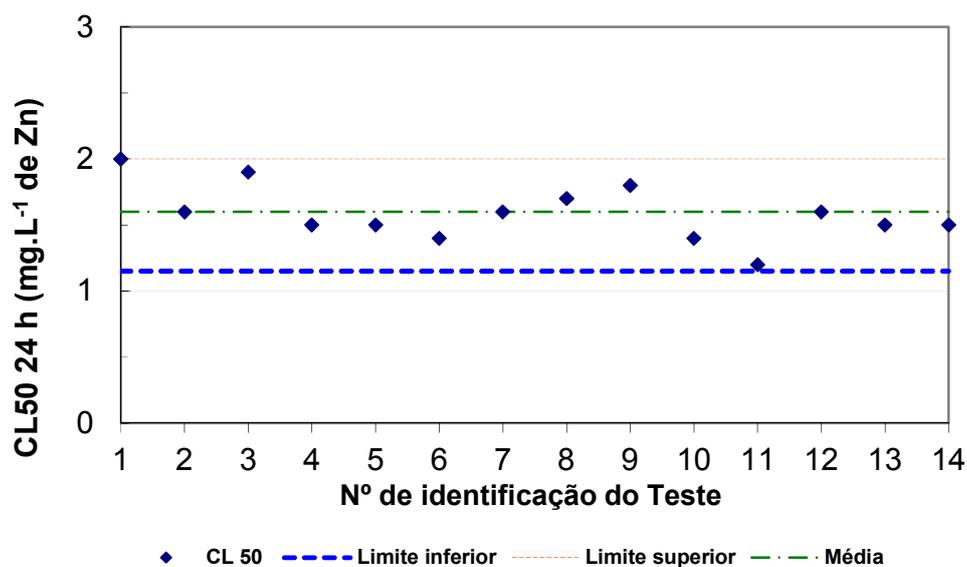
Os efeitos de metais sobre processos regenerativos são poucos estudados (CALEVRO et al., 1998). Sobre a toxicidade, sabe-se que metais como cobre, ferro e cromo atuam em ciclo redox, produzindo espécies reativas de oxigênio (EROs) (STOHS E BAGCHI, 1995). O estresse oxidativo gerado por estes metais induzem a peroxidação de lipídios, danos no DNA e alteram a homeostasia de diversos minerais essenciais. O estresse oxidativo pode também afetar várias rotas metabólicas, como as de reparo do DNA (PRÁ et al., 2006).

Franjevic et al. (2000) constatou inibição da regeneração, desintegração de células epiteliais, redução no número de células de produção de muco (rhabdites) e destruição mitocondrial em planárias *P. felina* regenerantes expostas a zinco. O sistema nervoso intacto e uma completa multiplicação e migração dos neoblastos são necessárias para uma completa regeneração em planárias (GURLEY E SÁNCHEZ-ALVARADO, 2008; SÁNCHEZ-ALVARADO, 2004), desta forma tem-se que zinco e cromo interferem nestes processos.

Para a elaboração da carta-controle da sensibilidade dos organismos filhotes o zinco foi escolhido pois apresentou-se melhor que o cromo quanto à rapidez na resposta e uniformidade dos resultados. Para a elaboração da carta-controle (Figura 5) utilizou-se os valores das CL50 24h dos 14 testes.

A carta controle demonstrou uniformidade na sensibilidade dos organismos a esse metal, sendo possível definir claramente faixas de aceitabilidade dos ensaios.

FIGURA 5 - Carta-controlre da sensibilidade de filhotes de *G. tigrina* expostos a Zinco, CL50 (24h) expressas em mg.L^{-1} de Zn^{2+}



A fim de aferir constantemente a sensibilidade dos espécimes de *G. tigrina* cultivados no LEAL/FT-UNICAMP, os resultados dos próximos ensaios de sensibilidade com organismos filhotes deverão ser plotados nesta mesma carta controle. A partir desses dados só poderão ser aceitos resultados contidos na faixa limitada pela média ± 2 D.P (Figura 5).

5.2 Avaliação de contaminantes ambientais

Cobre

Os ensaios de mortalidade de filhotes (Tabela 11) apresentaram boa repetitividade, sendo que a letalidade iniciou-se nas primeiras 24 horas de exposição e foi estabilizada nas primeiras 48 horas. O coeficiente de variação dos resultados, após 96 horas de exposição, foi de 17%, podendo então a precisão analítica ser considerada boa (ENVIRONMENT CANADA, 1990).

TABELA 11 – CL50, em mg.L⁻¹ de Cu²⁺, obtidas em diferentes tempos de exposição com filhotes de *G. tigrina* expostos a sulfato de cobre

ENSAIO	CL50 [mg.L ⁻¹]			
	24 h	48 h	72 h	96 h
1	1	0,5	0,5	0,5
2	0,7	0,6	0,5	0,5
3	0,7	0,7	0,7	0,7
4	1	0,5	0,5	0,5
5	0,7	0,5	0,5	0,5
CL50 Média ± DP	0,8 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1
C.V. (%)	14	16	17	17

CL50: concentração letal a 50% dos organismos; D.P.: desvio padrão; C.V.: coeficiente de variação. Concentrações utilizadas nos ensaios: 0,3, 0,6, 1,3, 2, e 2,3 mg.L⁻¹ de Cu²⁺.

Nos ensaios de mortalidade com adultos, necessários para a realização dos ensaios de regeneração encefálica, pode-se observar também estabilização das mortalidades após 48 horas de exposição.

O valor médio da CL50 96h obtido com organismos adultos no presente trabalho foi superior ao obtido por Sáfadi (1993). Esta variação pode ser explicada pela diferença entre os métodos de exposição adotados e pela qualidade de água de diluição empregada, visto que a toxicidade desse metal demonstra estar associada a parâmetros como pH, dureza e temperatura (CARVALHO et al., 2003).

TABELA 12 – CL50, em mg.L⁻¹ de Cu²⁺, obtidas em diferentes tempos de exposição com adultos de *G. tigrina* expostos a sulfato de cobre

ENSAIO	CL50 [mg.L ⁻¹]			
	24 h	48 h	72 h	96 h
1	3	1,8	1,5	1,5
2	2,8	1,6	1,2	1,5
3	3	2	1,6	1,6
CL50 Média ± DP	2.9 ±0,1	1,8 ± 0,2	1,4 ±0,2	1,5 ± 0,05
CL50 Média ^a ± DP				0,4 ± 0,02
C.V. (%)	3,9	11	14	3,7

CL50: concentração letal a 50% dos organismos; D.P.: desvio padrão; C.V.: Coeficiente de variação. Concentrações utilizadas nos ensaios: 0.39, 1.57, 6.27, 12.54 e 25.08 mg.L⁻¹; ^a Valores na literatura obtidos em ensaios com adultos de *G. tigrina* expostos a Cobre (Sáfadi, 1993).

No ensaio de regeneração foi possível observar que as concentrações não letais de cobre não foram capazes de inibir a regeneração das planárias, sendo somente possível observar retardo regenerativo das planárias exposta a CL50 96h de 1,5 mg.L⁻¹ de Cu²⁺, a qual fora obtida previamente nos ensaios com organismos adultos.

Como é possível visualizar na Tabela 13, considerando às 120 horas de exposição e a completa regeneração das planarias no controle, tem-se que a CENO obtida foi 0.4 e a CEO foi 1.6, ambos valores expressos em mg.L⁻¹ de Cu²⁺.

TABELA 13 – Número de planárias *G. tigrina* que apresentaram atraso regenerativo após 120 horas de exposição às concentrações de cobre

Ensaio	Controle	Cu ²⁺ [mg.L ⁻¹]				
		0,1	0,4	1,6	3,2	6,4
1	P _{C120} 0	P _{t120} 0	P _{t120} 0	P _{t120} 7	*	*
	P _{a120}	0	0	7	*	*

P_{C120}: Número de planárias com atraso regenerativo no controle após 120 horas de observação; P_{t120}: Número de planárias com atraso regenerativo na solução teste após 120 horas de observação e P_{a120}: Número Real de planárias com atraso regenerativo na solução teste após 120 horas de observação. O símbolo * representa a mortalidade de todos os organismos-teste.

Na concentração 1.6 mg.L⁻¹, onde planárias com retardo regenerativo foram observadas, constatou-se que, após as 120 horas de avaliação, duas planárias permaneceram na fase A (início da formação do blastema), uma planária permaneceu na fase B (blastema visível e normal), três

planárias permaneceram na fase D (início do surgimento dos ocelos) e uma planária permaneceu na fase E (ocelos e aurículas mais definidos). Ainda nesta concentração, oito planárias morreram, sendo que a mortalidade destes organismos foi observada após 48 horas de exposição. Na concentração controle, todas as planárias apresentaram regeneração completa (Fase F) após as 120 horas do ensaio. Alguns exemplos de atrasos regenerativos observados neste ensaio estão apresentados no Anexo C, Figura C.

A toxicidade deste metal em planárias está associada a EROS e danos a componentes celulares (PRÁ et al., 2006). Em ensaios de regeneração realizados por Knakievicz e Ferreira (2008), o cobre demonstrou ser pouco mutagênico para planárias. A genotoxicidade deste metal demonstrou estar associada a mecanismos de reparo do DNA (GUECHEVA et al., 2001).

Na Tabela 14 estão tabulados os valores referentes à toxicidade do cobre sobre diferentes organismos aquáticos ou que passam alguma etapa do ciclo de vida em meio aquoso, obtidos em uma revisão da literatura recente sobre esse assunto.

TABELA 14 – Comparação dos dados obtidos em ensaios de toxicidade aguda e crônica com diferentes organismos aquáticos expostos a cobre

Organismos	Valor em mg.L ⁻¹ de Cu ²⁺ - <i>end point</i>	Referência
	Cordados	
<i>Mugil chephalus</i>	CL50 6.3 – 24h, nascimento de embriões 5.33 – 48h, nascimento de embriões 4.35 – 96h, nascimento de embriões 3.58 – 120h, nascimento de embriões 2.65 – 144h, nascimento de embriões 1.80 – 168h, nascimento de embriões	Zyadah e Abdel-Baky, 2000
<i>Tilapia zillii</i>	CL50 9.2 – 24h, mortalidade 5.5 – 48h, mortalidade 4.5 – 72h, mortalidade 3.3 – 96h, mortalidade	
	Larva de díptera	
<i>Chironomus ramosus</i>	CL50 3.28 – 24h, mortalidade 1.07 – 48h, mortalidade 0.78 – 72h, mortalidade 0.18 – 96h, mortalidade	Majumdar e Gupta, 2012

TABELA 14 – Comparação dos dados obtidos em ensaios de toxicidade aguda e crônica com diferentes organismos aquáticos expostos a cobre – **Continuação**

Organismos	Valor em mg.L ⁻¹ de Cu ²⁺ - <i>end point</i>		Referência
Artrópodes			
<i>Chasmagnathus granulata</i>	CL50	0.22 - mortalidade larva	Ferrer et al., 2006
	96h	130 - mortalidade de jovens	
<i>Ceriodaphnia reticulata</i>	CE50	0.5 – mortalidade de adulto	Bossuyt e Janssen, 2005
	48h		
<i>Allorchestes compressa</i>	CL50	0.11 – mortalidade de jovens	Ahsanullah e Florence, 1984
	96h	0.5 – mortalidade de adulto	
<i>Daphnia longispina</i>		0.018 – mortalidade	
<i>Disparalona rostrata</i>		0.070 – mortalidade	
<i>Pleuroxus truncatus</i>		0.052 – mortalidade	
<i>Scapholebris mucromata</i>		0.005 – mortalidade	
<i>Simocephalus exspinosus</i>		0.019 – mortalidade	
<i>Acroperus harpae</i>		0.013 – mortalidade	
<i>Chydorus sphaericus</i>		0.027 – mortalidade	
<i>Eurycercus lamellatus</i>		0.024 – mortalidade	
<i>Simocephalus vetulus</i>		0.019 – mortalidade	
<i>Alona quadrangularis</i>		0.028 – mortalidade	
<i>Daphnia galeata</i>		0.023 – mortalidade	
<i>Daphnia magna</i>		0.028 – mortalidade	
<i>Daphnia longispina</i>		0.011 – mortalidade	Bossuyt e Janssen, 2005
<i>Simocephalus vetulus</i>		0.017 – mortalidade	
<i>Acantholeberis curvirostri</i>		0.012 – mortalidade	
<i>Acroperus elongatus</i>		0.016 – mortalidade	
<i>Bosmina longirostris</i>		0.009 – mortalidade	
<i>Ceriodaphnia pulchella</i>		0.016 – mortalidade	
<i>Chydorus ovalis</i>		0.033 – mortalidade	
<i>Scapholeberis microcephala</i>		0.016 – mortalidade	
<i>Pseudosida variabilis</i>	CENO	0.0009 – 15min, fuga	Gutierrez et al., 2012
	CEO	0.004 – 15min, fuga	
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	CENO	< 0.002 – 15min, fuga	
	CEO	0.002 – 15min, fuga	
<i>Daphnia magna</i>	CENO	0.05 – 15min, fuga	
	CEO	< 0.05 – 15min, fuga	
<i>Notodiaptomus conifer</i>	CENO	< 0.003 – 15min, fuga	
	CEO	0.003 – 15min, fuga	
<i>Argyrodiaptomus falcifer</i>	CENO	< 0.014 – 15min, fuga	
	CEO	0.014 – 15min, fuga	

TABELA 14 – Comparação dos dados obtidos em ensaios de toxicidade aguda e crônica com diferentes organismos aquáticos expostos a cobre – **Continuação**

Organismos	Valor em mg.L ⁻¹ de Cu ²⁺ - <i>end point</i>	Referência
Molusco		
<i>Utterbackia inbecillis</i>	CL50 0.04 - 24h, mortalidade	Connors e Black, 2004 Piyatiratitivorakul, et al., 2006
<i>Pomacea sp</i>	4.84 - 24h, mortalidade	
	1.85 - 48h, mortalidade	
	0.92 - 72h, mortalidade	
	0.12 - 96h, mortalidade	
	0.12 - 96h, mortalidade	
Platelminto		
<i>Girardia tigrina</i>	CL50 0.5 - 96h, mortalidade filhotes	Este trabalho
	1.5 - 96h, mortalidade adultos	
	CENO 0.4 - 120h, regeneração encefálica	
	CEO 1.6 - 120h, regeneração encefálica	

Observa-se na Tabela 14 que muitos foram os organismos e *endpoints* empregados na avaliação da toxicidade deste metal. Destaca-se que a maioria dos dados na literatura refere-se à toxicidade deste sobre artrópodes, seguido pelos cordados. Em média, os artrópodes demonstram serem os organismos mais sensíveis. Os cordados foram os menos sensíveis e todos os demais grupos empregados apresentaram sensibilidade similar a este metal, incluindo os platelmintos.

Entre todos os ensaios com planárias, observa-se que o ensaio de mortalidade de filhotes foi o mais sensível a este contaminante, isto é, foi através deste que obteve-se a menor concentração que ocasionou efeito deletério as planárias. Este fato pode estar relacionado a este contaminante e a relação área de superfície corpórea/balanço osmótico diferente entre adultos e filhotes (PREZA E SMITH, 2001).

Corante C.I. Disperse Red 1

Durante todos os ensaios e em todas as soluções-teste acima de 10 mg.L⁻¹ obteve-se precipitação do corante devido à baixa solubilidade deste produto. Este fato tornou os ensaios mais interessantes visto que as planárias passam a maior parte do tempo deslizando sobre as superfícies dos recipientes de teste e de cultivo, e em raízes e objetos submersos no ambiente natural (SÁFADI, 1993).

Destaca-se ainda que, após 24 horas de exposição, observou-se que todos os organismos apresentaram derme com coloração avermelhada, principalmente a região encefálica. Esta observação pode estar associada à absorção de moléculas do corante na derme das planárias durante a respiração dérmica das mesmas.

Na Tabela 15, referente aos ensaios com filhotes de *G. tigrina*, observa-se que as mortalidades ocorreram já nas primeiras 24 horas e que os resultados apresentaram em todos os momentos de leitura coeficiente de variação inferior a 30%, considerado satisfatório (ENVIRONMENT CANADA, 1990).

TABELA 15 – CL50, em mg.L⁻¹, obtidas em diferentes tempos de exposição com filhotes de *G. tigrina* expostos ao corante têxtil C.I. Disperse Red 1

ENSAIO	CL50 [mg.L ⁻¹]			
	24 h	48 h	72 h	96 h
1	127	127	74	67
2	120	91	79	79
3	131	111	87	80
CL50 Média ± D.P.	126 ± 6	110 ± 18	80 ± 7	75 ± 7
C.V. (%)	4	16	8	10

CL50, concentração letal a 50% dos organismos; D.P., desvio padrão; C.V., coeficiente de variação. Concentrações utilizadas nos ensaios: 10, 50, 100, 150 e 200 mg.L⁻¹ do corante comercial C.I. Disperse Red 1.

Nos ensaios com organismos adultos, observou-se que as mortalidades iniciaram nas primeiras 24 horas, porém estas ocorreram somente na maior concentração (250 mg.L⁻¹). Desta forma, só foi possível calcular a CL50 após decorridas 48 horas de exposição (Tabela 16).

Os ensaios com adultos apresentaram boa precisão analítica em todos os momentos de leitura, sendo que o coeficiente de variação variou 4% em média. Desta forma, os dados podem ser considerados aceitáveis (ENVIRONMENT CANADA, 1990).

TABELA 16 – CL50, em mg.L⁻¹, obtidas em diferentes tempos de exposição com adultos de *G. tigrina* expostos ao corante têxtil C.I. Disperse Red 1

CL50 [mg.L ⁻¹]				
ENSAIO	24 h	48 h	72 h	96 h
1	N.C	201	179	159
2	N.C	207	156	148
3	N.C	198	162	150
CL50 Média ± D.P.	N.C	202 ± 4	165 ± 12	152 ± 6
C.V. (%)	N.C	2	7	4

N.C.: valor não calculável pelo método estatístico adotado, por não haver mortalidades no período. CL50, concentração letal a 50% dos organismos; D.P., desvio padrão; C.V., coeficiente de variação. Concentrações utilizadas nos ensaios: 50, 100, 150, 200 e 250 mg.L⁻¹.

Nos ensaios de regeneração encefálica (Tabela 17) nas concentrações não letais ocorreu atraso regenerativo das planárias. Após 120 horas de observação e utilizando-se do número de planárias não completamente regeneradas calculou-se a CENO e a CEO, as quais foram 10 e 50 mg.L⁻¹ de C.I. Disperse Red 1 comercial, respectivamente.

TABELA 17 – Número de planárias *G. tigrina* que apresentaram atraso regenerativo após 120 horas de exposição ao corante têxtil C.I. Disperse Red 1

Disperse Red 1 [mg.L ⁻¹]						
Ensaio	Controle	10	50	100	150	200
1	$P_{C_{120}}$ 1	$P_{t_{120}}$ 0	$P_{t_{120}}$ 2	$P_{t_{120}}$ 5	$P_{t_{120}}$ 5	$P_{t_{120}}$ 10
	$P_{a_{120}}$	-1	1	4	4	9

$P_{C_{120}}$: Número de planárias com atraso regenerativo no controle após 120 horas de observação; $P_{t_{120}}$: Número de planárias com atraso regenerativo na solução teste após 120 horas de observação e $P_{a_{120}}$: Número Real de planárias com atraso regenerativo na solução teste após 120 horas de observação.

Na concentração 50 mg.L⁻¹, o organismo com atraso regenerativo ficou estagnado na fase E (ocelos e aurículas mais definidos), já nas concentrações 100 e 150 mg.L⁻¹, quatro planárias permaneceram nesta mesma fase. Na concentração 200 mg.L⁻¹ dez organismos morreram, três permaneceram na fase * (cicatrização não realizada), três na fase Z (má cicatrização, com ocelo e sem aurículas) e quatro na fase C (início da formação das aurículas). Alguns exemplos de atrasos regenerativos observados neste ensaio estão apresentados no Anexo C, Figura D.

Dentre as planárias que morreram observou-se antes da morte elevada degeneração corpórea e alterações de comportamento. Quanto à degeneração, observou-se lesões dérmicas com perda da organização dos tecidos, fato este já observado nos ensaios de Sáfadi (1993) com metais. Quanto ao comportamento, observou-se alterações como *headbop* (aceno de cabeça enquanto movem-se para frente), *corkscrew* (movimento irregular do corpo, como torções), *tailtwist* (torção da cauda) e *headshing* (balanço de cabeça), comportamentos estes descritos por Raffa e Desai (2005), no estudo com planárias *Dugesia dorotocephala* expostas a cocaína, indicados por esses autores como sinais de abstinência à essa droga. Sendo assim, estas mudanças de comportamento indicam uma ação subletal do corante, possivelmente relacionada ao sistema neurológico das planárias. No Anexo C, Figuras A e B encontram-se exemplos destas observações.

Foi observado também, em todos os organismos aumento na produção de muco, com resultante aglomeração do corante. A formação de muco em planárias está associada à ação de células específicas presentes em sua epiderme, podendo o aumento na produção de muco estar associado à lise dessas células (FRANJEVIC et al., 2000). Znidarić et al. (1995) relacionam o aumento da produção de muco como mecanismo de defesa de organismos de água doce contra agentes estressores. Desta forma, o aumento na produção de muco observado nos ensaios pode estar associado à defesa das planárias frente ao corante.

Observou-se também que durante esses experimentos os organismos expostos ao corante não casulopositaram. Testes para investigar esse efeito foram realizados e então apresentados na página 49.

Realizou-se uma comparação dos efeitos do corante C.I. Disperse Red 1 obtidos neste trabalho com dados da literatura (Tabela 18).

TABELA 18 – Comparação dos dados obtidos em ensaios de toxicidade aguda e crônica com diferentes organismos aquáticos expostos ao corante comercial têxtil Disperse Red 1

Organismo	Valor em mg.L ⁻¹ de Red 1 - <i>end point</i>	Referência
Artrópodes		
<i>Daphnia similis</i>	CE50 48h	0.13 – mortalidade e imobilidade
<i>Daphnia magna</i>	CE50 48h	0.58 – mortalidade e imobilidade
<i>Ceriodaphnia silvestri</i>	CE50 48h	0.78 – mortalidade e imobilidade
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	CL50 48h	0.48 – mortalidade e imobilidade
	CI50 192h	0.22 – fecundidade
<i>Daphnia similis</i>	CE50 48h	0.13* – mortalidade e imobilidade
Algas		
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	CI50 72h	38.5 – inibição do crescimento celular
Cnidários		
<i>Hydra attenuata</i>	CE50 96h	1.9 – mudanças morfológicas (todas)
	CL50 96h	47.9 - mudanças morfológicas (tulipa e desintegração)
	CI50 169h	31.6 – reprodução
Cordados		
<i>Danio rerio</i>	CL50 96h	>50 – mortalidade
Platelminto		
<i>Girardia tigrina</i>	CL50	75 – 96h, mortalidade filhotes
		152 – 96h, mortalidade adultos
	CENO	10 - 120h, regeneração encefálica
	CEO	50 - 120h, regeneração encefálica

*corante puro (95%)

Observa-se que os artrópodes foram os organismos mais sensíveis, sendo estes seguidos pelo cnidário. As planárias e a alga apresentaram sensibilidade semelhante e para o cordado (*D.rerio*) o corante não foi tóxico nas concentrações testadas.

Nos ensaios com as planárias, o *endpoint* de atraso na regeneração encefálica foi o mais sensível.

Herbicida Atrazina

Nos ensaios de mortalidade com filhotes de *G. tigrina* (Tabela 19) observa-se que a atrazina causou mortalidade nas primeiras 24 horas de exposição. Foram feitos três experimentos, registrando mortalidade a cada 24h. Somente no teste com 48h (Tabela 19) obteve-se coeficiente de variação superior a 30%, valor recomendado por Environment Canada, (1990).

TABELA 19 – CL50, em mg.L⁻¹, obtidas em diferentes tempos de exposição com filhotes de *G. tigrina* expostos a atrazina comercial

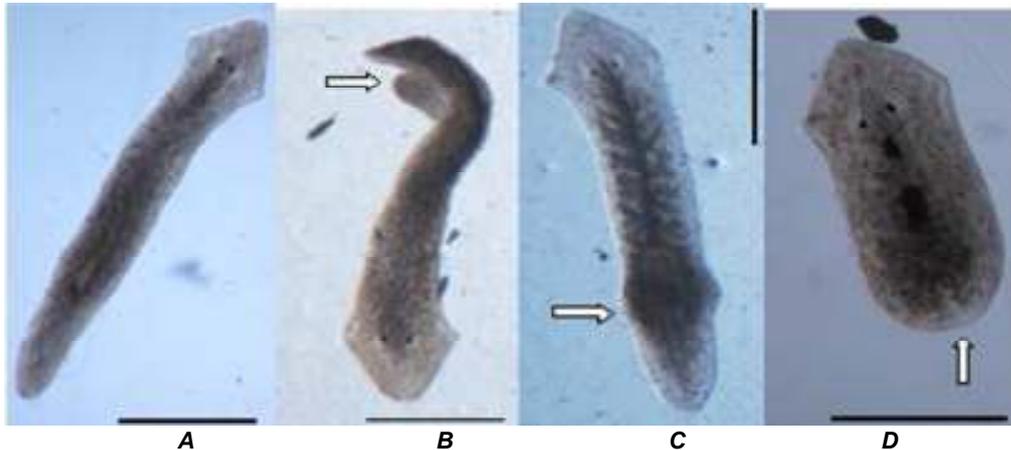
ENSAIO	CL50 [mg.L ⁻¹]			
	24 h	48 h	72 h	96 h
1	53	37	34	34
2	84	70	55	53
3	61	44	37	31
CL50 Média ± D.P.	66 ± 16	50 ± 17	42 ± 11	39 ± 11
C.V. (%)	24	35	27	30

CL50: concentração letal a 50% dos organismos; D.P.: desvio padrão; C.V.: coeficiente de variação. Concentrações utilizadas nos ensaios: 10, 25, 50, 75, 100, 125 e 150 mg.L⁻¹.

Nos tempos superiores a 24 horas de exposição e nas concentrações maiores que 25 mg.L⁻¹ as planárias apresentaram mudanças morfológicas específicas, as quais não haviam sido observadas anteriormente neste trabalho e que não estavam presentes nas literaturas consultadas referentes as planárias.

As mudanças observadas especificamente foram: alteração do formato corpóreo com inchaço na região da faringe, perda da região pós-faríngea, bem como exposição intermitente da faringe. Estas alterações apresentadas na Figura 6, foram observadas em diferentes organismos-teste e não apresentaram evolução, permanecendo as planárias com estas mudanças durante as 96 horas de observação.

FIGURA 6 – Mudanças morfológicas observadas em filhotes de *G. tigrina* após 24 horas de exposição à atrazina

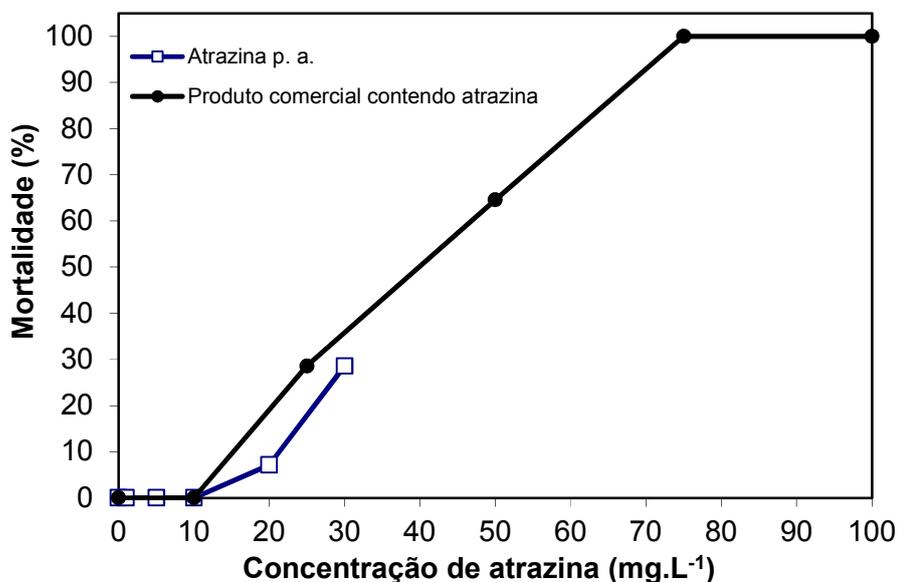


A = controle negativo, organismo normal, **B** = faringe retrátil permanentemente exposta, **C** = inchaço da região da faringe e **D** = perda da região pós-faríngea. Escala das barras = 1 mm

Visando verificar se estas alterações estavam relacionadas à atrazina e não aos surfactantes presentes no herbicida comercial foi realizado adicionalmente um ensaio com atrazina pura. Com este produto, na concentração 33 mg.L^{-1} e após 24 horas de exposição, também foram observadas as mesmas alterações obtidas com a atrazina comercial.

Foram comparadas as respostas da atrazina comercial e do produto puro usando a curva de mortalidade obtida no teste número 3 com atrazina comercial (Tabela 19) e a curva de mortalidade obtida no ensaio com o produto puro (Figura 7). As concentrações nos dois testes foram expressas em atrazina. No caso do produto comercial, que continha 50% de atrazina, a solução foi preparada com o estoque líquido, expressando-se as concentrações teste em atrazina equivalente.

FIGURA 7 – Curvas concentração-resposta referente à mortalidade das planárias filhotes expostas a atrazina comercial e padrão, após 96 horas de exposição. As concentrações foram expressas em atrazina.



Observa-se que as duas curvas apresentaram comportamento similar, podendo-se afirmar que os efeitos adversos observados estão relacionados somente a atrazina e não ao surfactante presente no produto comercial.

Destaca-se que as áreas das planárias afetadas pela atrazina são as responsáveis pela alimentação e reprodução destes organismos, desta forma, tornam-se necessários estudos específicos que possam esclarecer o mecanismo de ação deste herbicida sobre *G. tigrina*.

Nos ensaios com organismos adultos observa-se que as mortalidades tiveram início já nas primeiras 24h (Tabela 20). Dois testes independentes foram realizados e os coeficientes de variação nos diferentes tempos de leitura estiveram abaixo de 30% (Tabela 20).

TABELA 20 – CL50, em mg.L⁻¹, obtidas em diferentes tempos de exposição com adultos de *G. tigrina* expostos ao herbicida Atrazina

ENSAIO	CL50 [mg.L ⁻¹]			
	24 h	48 h	72 h	96 h
1	148	115	86	42
2	153	107	95	39
CL50 Média ± D.P.	150 ± 3	111 ± 5	90 ± 6	40 ± 2
C.V. (%)	2	5	7	5

CL50, concentração letal a 50% dos organismos; D.P., desvio padrão; C.V., coeficiente de variação. Concentrações utilizadas nos ensaios: 10, 25, 50, 100, 150, 200 e 250 mg.L⁻¹ de Atrazina.

Tanto nos ensaios com adultos quanto nos ensaios com filhotes notou-se que os organismos, diferentemente do teste-controle, permaneceram planando sob as soluções ou mantiveram-se fixados nas bordas superiores dos recipientes durante os momentos imediatamente posteriores à inserção destas nas amostras, numa tentativa de fuga.

Segundo Kolasa (2001) planárias e outros turbelários possuem um sistema de detecção de agentes químicos, usado geralmente para identificação de presas e que podem explicar esse comportamento de fuga.

Nos ensaios de regeneração encefálica observou-se que as planárias apresentaram atraso regenerativo nas concentrações não letais (Tabela 21). Obteve-se 10 como CENO e 25 como CEO, ambos os valores em mg.L⁻¹ de atrazina comercial.

TABELA 21 – Número de planárias *G. tigrina* que apresentaram atraso regenerativo após 120 horas de exposição ao herbicida atrazina comercial

Ensaio	Atrazina [mg/L]					
	Controle	5	10	25	75	100
1	<i>P_{C120}</i> 3	<i>P_{t120}</i> 0	<i>P_{t120}</i> 0	<i>P_{t120}</i> 6	<i>P_{t120}</i> *	<i>P_{t120}</i> *
	<i>P_{a120}</i>	-3	-3	3	*	*

P_{C120}: Número de planárias com atraso regenerativo no controle após 120 horas de observação; *P_{t120}*: Número de planárias com atraso regenerativo na solução teste após 120 horas de observação e *P_{a120}*: Número Real de planárias com atraso regenerativo na solução teste após 120 horas de observação. O símbolo *representa a mortalidade de todos os organismos-teste.

Na concentração 25 mg.L⁻¹ e após as 120 horas de regeneração encefálica, das 20 planárias inicialmente expostas e decapitadas, 14 morreram e outras 6 apresentaram distúrbios na regeneração encefálica. Observou-se três planárias apresentando início do surgimento dos ocelos e das aurículas (Fases C e D), duas apresentando ocelos e aurículas mais definidos (Fase E) e uma com início da formação do blastema (Fase A).

A Tabela 22 abaixo apresenta comparação dos dados obtidos neste trabalho com ensaios de toxicidade aguda e crônica realizados com diferentes organismos expostos ao herbicida atrazina.

TABELA 22 – Comparação dos dados obtidos em ensaios de toxicidade aguda e crônica com diferentes organismos aquáticos expostos ao herbicida atrazina

Organismos	Valor em mg.L ⁻¹ de atrazina - <i>end point</i>	Referência
Cordados		
<i>Oreochromis niloticus</i>	CL50 96h 5.02 – mortalidade	Botelho et al., 2009
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	CL50 96h 36.8 – mortalidade alevinos	Santos e Botelho, 2010
<i>Colossoma macropomum</i>	CL50 96h 22 – mortalidade de juvenis	Chapadense et al., 2009
<i>Channa punctatus</i>	CL50 64 – 24h, mortalidade 49 – 48h, mortalidade 44 – 72h, mortalidade 42 – 96h, mortalidade	Nwani et al., 2011
Molusco		
<i>Biomphalaria tenagophila</i>	CL50 96h 26 – mortalidade adultos 14 – mortalidade recém eclodidos >50 – Embriões CENO 96h 10 – dano em adultos 5 – danos em recém eclodidos 50 – dano em embriões	Oliveira-Filho, 2003
<i>Utterbackia inbecillis</i>	CL50 24h 241 – mortalidade	Connors e Black, 2004
Artrópodes		
<i>Daphnia similis</i>	CE50 48h 42 – mortalidade e imobilidade	Anacleto et al., 2010
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	CE50 48h 8 – mortalidade e imobilidade CI50 48h 4,5 – mortalidade e imobilidade	
<i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	CE50 48h 8 – mortalidade e imobilidade CI50 196h 4.5 – fecundidade	
<i>Thamnocephalus platyurus</i>	CE50 37 – 24h, mortalidade ou imobilidade	Palma et al., 2008
<i>Daphnia magna</i>	36 – 48h, mortalidade ou imobilidade	

TABELA 22 – Comparação dos dados obtidos em ensaios de toxicidade aguda e crônica com diferentes organismos aquáticos expostos ao herbicida atrazina –
Continuação

Organismos	Valor em mg.L ⁻¹ de atrazina - <i>end point</i>	Referência
Artrópodes		
<i>Daphnia carinata</i>	CE50 48h	24 - mortalidade ou imobilidade
<i>Paratya australiensis</i>	CL50 96h	8.4 - mortalidade
<i>Robertsonia propinqua</i>	CL50 96h	7 - mortalidade recém nascidos
Alga		
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	CI50 72h	1.4 - inibição do crescimento celular
	CE 96h	0.24 - inibição do crescimento
	CENO 96h	0.004 - inibição do crescimento
	CE50	0.15 - inibição do crescimento
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	CE50	0.07 - inibição do crescimento
Macrófita		
<i>Lemna minor</i>	CL50 96h	0.15 - mortalidade
	CENO 96h	0.08 - crescimento de biomassa
	CEO 96h	0.15 - crescimento de biomassa
<i>Lemna gibba</i>	CE40 168h	0.09 - inibição do crescimento
Cnidário		
<i>Hydra attenuata</i>	CE50	55 - mudanças morfológicas
Larva de díptera		
<i>Chironomus tepperi</i>	CL50 240h	19 - mortalidade
Bactéria		
<i>Vibrio fischeri</i>	CI50	> 6 - inibição da luminescência
	30 min	69 - inibição da luminescência
		23 - inibição da luminescência
Platelmintos		
<i>Girardia tigrina</i>	CL50	39 - 96h, mortalidade filhotes
		40 - 96h, mortalidade adultos
	CENO	10 - 120h, regeneração encefálica
	CEO	25 - 120h, regeneração encefálica

Observa-se na Tabela 22 que os organismos mais sensíveis a atrazina foram as algas e as macrófitas, sendo que os artrópodes apresentaram sensibilidade mediana. As bactérias, os platelmintos, o cnidário e a larva de díptera, bem como os moluscos e os cordados apresentaram, em média, sensibilidade similar.

No que se refere aos ensaios com as planárias, quando comparados entre si, observa-se que o *endpoint* regeneração encefálica foi o mais sensível a este composto.

Nanotubos de Carbono de parede múltiplas

Durante as 96 horas dos três ensaios de mortalidade com as concentrações de nanotubos de carbono de parede múltiplas, tanto utilizando-se organismos filhotes quanto adultos, não foram observadas nenhuma mortalidade ou qualquer alteração morfológica. As concentrações testadas foram 0.1, 0.5, 1.0, 2.5 e 5.0 mg.L⁻¹, podendo então considerar-se que a CL50 96 h deste contaminante é maior que 5 mg.L⁻¹.

Apesar da não letalidade deste material, destaca-se que durante ambos ensaios observou-se acúmulo dos nanotubos no muco produzido pela derme das planárias. Esse muco, comum em planárias, possui a função biológica de auxiliar a locomoção ciliada destes organismos, podendo estar relacionado à alimentação destas (KOLASA, 2001), bem como pode ter sua produção aumentada na presença de agentes estressores (FRENJEVIC et al., 2002).

Nos resultados do ensaio de regeneração encefálica com os nanotubos (Tabela 23), é possível observar que somente na concentração 0,1 mg.L⁻¹ de NTC@1h uma planária apresentou atraso na regeneração. Esta, em vez de apresentar formação completa dos ocelos e das aurículas (Fase F), apresentava ocelos e aurículas definidos (Fase E). Como o número de planárias apresentando atraso nesta concentração foi pequeno (5%) e por nas concentrações superiores não terem ocorrido atrasos, esse resultado não parece estar relacionado à exposição aos nanotubos. Porém mais testes poderiam ser realizados para verificar o potencial desses materiais, em baixas concentrações, em auxiliar a regeneração encefálica de planárias.

TABELA 23 – Número de planárias *G. tigrina* que apresentaram atraso regenerativo após 120 horas de exposição às concentrações de nanotubos de carbono de parede múltipla

NTC@1h [mg.L ⁻¹]						
Ensaio	Controle	0,1	0,5	1,0	2,5	5,0
1	$P_{C_{120}}$ 0	$P_{t_{120}}$ 1	$P_{t_{120}}$ 0	$P_{t_{120}}$ 0	$P_{t_{120}}$ 0	$P_{t_{120}}$ 0
	$P_{a_{120}}$	1	0	0	0	0

$P_{C_{120}}$: Número de planárias com atraso regenerativo no controle após 120 horas de observação; $P_{t_{120}}$: Número de planárias com atraso regenerativo na solução teste após 120 horas de observação e $P_{a_{120}}$: Número Real de planárias com atraso regenerativo na solução teste após 120 horas de observação

Em geral esses nanomateriais não tem apresentado toxicidade aguda em ensaios com organismos aquáticos, por isso alguns autores vêm verificando se esses materiais poderiam atuar como moduladores da toxicidade de outros agentes tóxicos (YAN et al., 2008, BLAISE et al., 2008, PULSKAMP et al., 2007).

A ação tóxica dos nanomateriais sobre organismos aquáticos, principalmente dos nanotubos de carbono, está geralmente associada a efeitos subletais e genotóxicos e ao tipo de tratamento químico que os nanomateriais são submetidos (ROBERTS et al., 2007, TEMPLETON et al., 2006, WEI et al., 2010)

Neste trabalho não foi observado nenhum efeito deletério as planárias ocasionado pela exposição aos nanotubos de carbono avaliados nos *endpoints* medidos (mortalidade de jovem e regeneração encefálica).

Amostras ambientais – Ribeirão dos Cristais e Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) Carioba

Foram obtidos dados sobre amostras ambientais em ensaios de mortalidade com filhotes de *G. tigrina* (Tabela 24). Antes dos ensaios, análises físico-químicas foram realizadas nas amostras coletadas e os resultados foram apresentados na Tabela 25.

TABELA 24 – Mortalidade (%) obtida em diferentes tempos de exposição de filhotes de *G. tigrina* às amostras coletadas no Ribeirão dos Cristais e na ETE Carioba

Tempo de exposição (h)	Mortalidade [%]					
	Controle	P1	P2	P3	P1.C	P2.C
24	0	0	100	0	100	100
48	0	0	100	0	100	100
72	0	0	100	0	100	100
96	0	0	100	0	100	100

P1: Ribeirão dos Cristais montante; P2: Ribeirão dos Cristais cano de despejo de efluente, P3: Ribeirão dos Cristais, jusante. P1.C: Entrada da ETE Carioba e P2.C: Saída da ETE Carioba.

TABELA 25 – Parâmetros Físico-químicos das amostras do Ribeirão dos Cristais, da ETE Carioba e do controle, água de cultivo de *G. tigrina*

Parâmetros Físico-Químicos						
Amostra	pH	Condutividade μS/cm	Dureza mg.L ⁻¹ CaCO ₃	Cloro mg.L ⁻¹ CL ₂	Temperatura °C	Oxigênio Dissolvido mg.L ⁻¹ O ₂
P1.C	7.14	1687	60	1,17	27.3	1.57
P2.C	7.22	1471	90	0.87	27	1.87
P1	6.57	118.5	25	0.01	20.4	3.33
P2	7.14	1045	80	0.83	22	1.53
P3	6.63	172.4	30	0.12	20.7	2.08
Controle	7.72	241.7	46	0.00	23	4.61

P1: Ribeirão dos Cristais montante; **P2:** Ribeirão dos Cristais cano de despejo de efluente, **P3:** Ribeirão dos Cristais, jusante. **P1.C:** Entrada da ETE Carioba e **P2.C:** Saída da ETE Carioba.

A amostra do cano de despejo de efluentes industriais e domésticos no Ribeirão dos Cristais - P2, apresentou toxicidade aos filhotes de *G. tigrina* (Tabela 24). Esta amostra causou 100% de letalidade já nas primeiras 24h de exposição.

Analisando os parâmetros físico-químicos desta amostra (Tabela 25), observa-se que, quando comparada aos demais pontos de coleta deste ribeirão, esta é a que possui maiores valores de condutividade elétrica, dureza e cloro residual.

Já as amostras P1 e P3, que situam-se no Ribeirão dos Cristais a montante e jusante do despejo, respectivamente, não apresentaram toxicidade apesar da dureza e cloro destas se apresentarem acima dos níveis indicados para o cultivo sadio de *G. tigrina*.

Quanto aos ensaios de mortalidade de filhotes com as amostras da ETE Carioba (Tabela 25), tanto a amostra da entrada do tratamento (P1.C) quanto a da saída (P2.C) apresentaram mortalidade de todos os organismos já nas primeiras 24 horas de análise. As referidas amostras apresentaram altos valores de condutividade elétrica, cloro residual e dureza, o que poderia explicar o efeito observado.

Nos ensaios de regeneração encefálica a amostra antes (P1.C) e após tratamento (P2.C) da ETE carioba apresentou letalidade a todos os organismos nas concentrações testadas, não sendo possível avaliar esse *endpoint*.

Das amostras do Ribeirão dos Cristais, somente o ponto P2 (cano de despejo de efluentes) apresentou efeito deletério sobre as planárias regenerantes. Das 20 planárias adultas decapitadas que foram inicialmente expostas, 17 sobreviveram as 120h de ensaio. Destas, 5 apresentaram-se na Fase A (início da formação do blastema), 2 na fase D (início do surgimento dos ocelos), 5 nas fases C e D (início do surgimento das aurículas e início do surgimento dos ocelos), 3 na fase O (corpos decapitados) e 2 na fase X (degeneração corpórea elevada).

TABELA 26 – Número de planárias *G. tigrina* que apresentaram atraso regenerativo após 120 horas de exposição às amostras do Ribeirão dos Cristais e da ETE Carioba

Amostras ambientais 120 horas							
Ensaio	Pontos de Coleta						
	Controle	P1	P2	P3	P1.C	P2.C	
1	$P_{C_{120}}$ 0	$P_{t_{120}}$ 0	$P_{t_{120}}$ 17	$P_{t_{120}}$ 0	$P_{t_{120}}$ *	$P_{t_{120}}$ *	
	$P_{a_{120}}$	0	17	0	*	*	

$P_{C_{120}}$: Número de planárias com atraso regenerativo no controle após 120 horas de observação; $P_{t_{120}}$: Número de planárias com atraso regenerativo na solução teste após 120 horas de observação e $P_{a_{120}}$: Número Real de planárias com atraso regenerativo na solução teste após 120 horas de observação. **P1**: Ribeirão dos Cristais montante; **P2**: Ribeirão dos Cristais cano de despejo de efluente, **P3**: Ribeirão dos Cristais, jusante. **P1.C**: Entrada da ETE Carioba e **P2.C**: Saída da ETE Carioba. O símbolo *representa a mortalidade de todos os organismos-teste.

Observou-se que as amostras ambientais que causaram mortalidade de filhotes e atraso na regeneração encefálica de *G. tigrina* foram as do cano de despejo de efluentes no Ribeirão dos Cristais (P2) e da entrada (P1.C) e saída (P2.C) da Estação de Tratamento de Efluentes Carioba.

Quanto aos potenciais contaminantes ambientais testados, cujos resultados foram resumidos na Tabela 27, em média as planárias (platelmintos) demonstraram sensibilidade intermediária em relação aos demais níveis tróficos empregados, exceto no caso da atrazina, onde permaneceram entre as menos sensíveis e no caso do NTC@1h, onde não apresentou sensibilidade às concentrações testadas.

TABELA 27 – Resumo dos resultados obtidos para os contaminantes ambientais avaliados com *G. tigrina* neste trabalho

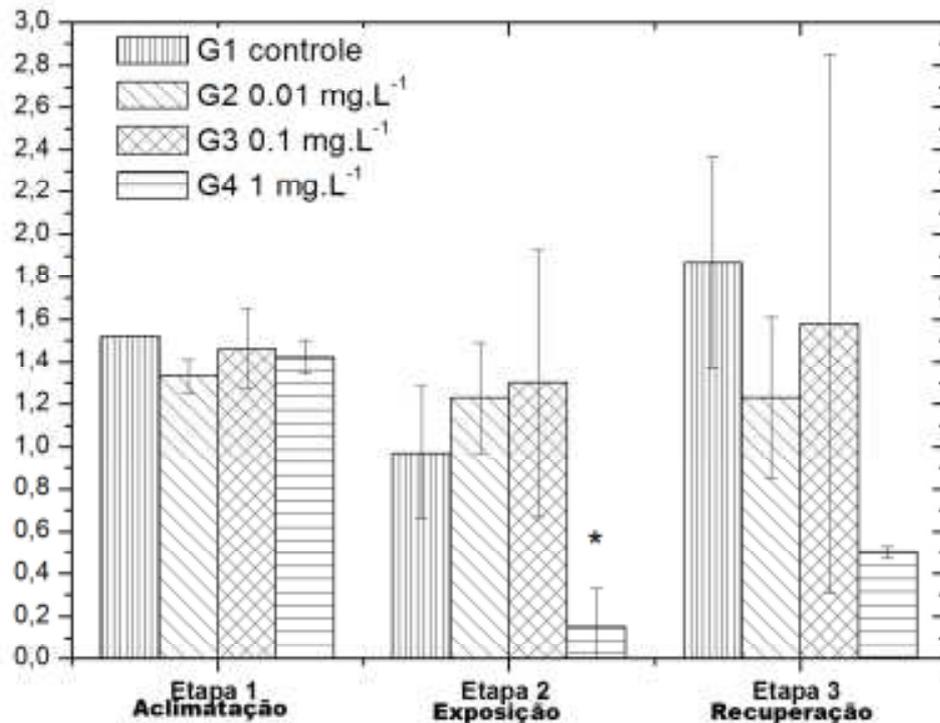
<i>Endpoint</i>			
Amostra	Valor médio em mg.L ⁻¹ ± D.P.		Valor em mg.L ⁻¹
	Mortalidade filhotes CL50 96h	Mortalidade adultos CL50 96h	Regeneração encefálica
Cobre, Cu²⁺	0.5 ± 0.1 (N=5)	1.5±0.05 (N=3)	CENO 120h – 0.4 CEO 120h – 1.6
CI Disperse Red 1	75± 7 (N=3)	152± 6 (N=3)	CENO 120h – 10 CEO 120h – 50
Atrazina	39±11 (N=3)	40±2 (N=2)	CENO 120h – 10 CEO 120h – 25
NTC@1h	>5 (N=3)	>5 (N=3)	CENO 120h – 5 CEO 120h – >5

5.3. Desempenho reprodutivo de planárias expostas ao corante Disperse Red 1

Como observou-se que tanto nos ensaios de mortalidade como nos ensaios de regeneração encefálica os organismos não postaram casulos durante os experimentos e que no tratamento controle a casuloposição ocorreu normalmente, foram conduzidos ensaios para verificar se o corante poderia afetar o desempenho reprodutivo de adultos de *G. tigrina*.

Durante a etapa 2 de exposição das planárias às concentrações subletais do corante C.I. Disperse Red 1, o grupo G4 (ao ser exposto a 1 mg.L⁻¹ deste composto) apresentou diferença estatisticamente significativa na fecundidade média, quanto comparado aos demais grupos nesta mesma etapa (Figura 8).

FIGURA 8 – Dinâmica da fecundidade média das planárias durante as etapas do ensaio de performance reprodutiva com o corante comercial C.I. Disperse Red 1



Etapa 1 – Fecundidade média nos primeiros 14 dias de aclimação dos organismos ao sistema teste. Etapa 2 – Fecundidade média obtida nos 35 dias de exposição dos organismos ao corante têxtil comercial C.I. Disperse Red 1. Etapa 3 – Fecundidade média obtida nos 14 dias de recuperação dos organismos após a exposição ao corante. Anova $P < 0.05$ e Tukey: $\alpha = 0.05$. O grupo identificado com * representa aquele que apresentou diferença significativa quando comparado com os demais grupos desta mesma

Tanto na Etapa 1 – Aclimação quanto na Etapa 3 – Recuperação não foram observadas alterações estatisticamente significativas da fecundidade em nenhum dos grupos analisados, o que demonstrou a capacidade dos organismos do grupo G4, quanto na ausência do corante, de se recuperarem e normalizarem a casuloposição.

Durante a alimentação semanal na Etapa 2, observou-se que os organismos, na concentração 1 mg.L^{-1} apresentaram coloração avermelhada na derme, após a primeira semana de exposição. Além disso, na segunda semana de exposição os animais desta concentração apresentaram dificuldade em se alimentarem, pois estes, diferentes do controle e demais

tratamentos, não se aproximavam dos pedaços de fígado distribuídos, ficando somente fixos nas paredes internas dos recipientes-teste e com a faringe retrátil exposta, sempre em direção ao alimento.

As planárias estão sempre em movimento, seja para caça de alimento, seja na busca por parceiros sexuais ou para sua fuga e proteção. Ao notarem a presença de uma presa nas proximidades e utilizando seus quimiorreceptores, estas se direcionam ao alimento visando o emprego de sua faringe retrátil para ingestão do fluido alimentar (KOLASA, 2001).

Com base nestes dados, o comportamento observado referente à dificuldade de alimentação na presença do corante pode ser considerado um efeito adverso subletal.

Sabe-se que as planárias possuem reservatórios de lipídios dispersos em todo o corpo e que estas, na ausência prolongada de alimento, podem diminuir de tamanho corpóreo e praticar canibalismo (BUENO-SILVA e FISHER, 2005, KNAKIEVICZ et al., 2006).

Neste sentido contou-se semanalmente, durante todas as etapas do ensaio, o número de planárias em cada grupo bem como se observou qualitativamente o tamanho corpóreo dos organismos-testes. Não foram observados mortalidade, canibalismo ou mudança de tamanho corpóreo. Mais estudos poderiam ser realizados para esclarecer os mecanismos envolvidos na ação desse corante sobre a fecundidade das planárias, principalmente se a dificuldade de se alimentar estaria ocasionando a redução da casuloposição.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que:

- Um protocolo para o monitoramento da sensibilidade das culturas de *Girardia trigrina* foi estabelecido, sendo que o zinco foi a substância mais apropriada tendo como vantagem o ensaio de sensibilidade poder ser finalizado em 24h. Os métodos de realização do ensaio de regeneração encefálica e de mortalidade de filhotes foram eficazes para a observação de efeitos adversos das substâncias analisadas.
- Todas as amostras testadas apresentaram efeito deletério às planárias, exceto os nanotubos de carbono de parede múltipla. O *endpoint* atraso na regeneração encefálica foi mais sensível que a mortalidade de filhotes.
- O corante têxtil C.I. Disperse Red 1 causou alteração significativa na fecundidade de planárias adultas.
- Conclui-se que os organismos demonstraram sensibilidade apropriada e uniforme, que os métodos adotados foram eficazes na avaliação de contaminantes ambientais, que o método de regeneração encefálica foi o mais sensível quanto ao de mortalidade de filhotes e que diferentes ensaios, como performance reprodutiva, podem ser também adotados na utilização de planárias de água doce na ecotoxicologia. Os protocolos utilizados neste estudo podem ser utilizados como subsídios na elaboração futura de normas técnicas de testes com planárias de água doce.

7. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Empregar análises histológicas e celulares para estudar as alterações morfológicas observadas em *G. tigrina* quando expostas ao herbicida atrazina.

Utilizar os *endpoints* mortalidade de filhotes e regeneração encefálica para avaliar outros contaminantes e amostras ambientais, visando ampliar o banco de dados disponíveis com esses organismos.

Avaliar a possibilidade do emprego de *endpoints* subletais em planárias de água doce - como mudanças comportamentais (produção excessiva de muco, alteração na movimentação e de alimentação); mudanças morfológicas (formato e coloração corpórea); bem como performance reprodutiva de adultos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agata, K.; Watanabe K. Molecular and cellular aspects of planarians regeneration. **Seminars in cell e Developmental biology**, v. 10, p. 377-83, 1999.

Ahsanullah, M.; Florence, T.M. Toxicity of copper to the marine amphipod *Allorchestes compressa* in the presence of water and lipid-soluble ligands. **Marine Biology**, v. 84(1), p. 41-45. 1984.

Alonso, A.; Camargo, J.A. The freshwater planarian *Pollicelis felina* as a sensitive species to assess the long-term toxicity of ammonia. **Chemosphere**, v. 84, p. 533-637, 2011.

American Public Health Association – APHA, 1998. **Standard methods for the examination of water and wastewater**, 20 ed., AWWA: Washington.

Anacleto, L.R.; Caloto-Oliveira, A.; de-Almeira, G.; Vavvhi, F.I.; Ribeiro, A.R.; Papani, D.P.; Umbuzeiro, G.A. Avaliação dos efeitos ecotoxicológicos do herbicida atrazina, **IN: XVIII Congresso interno de iniciação científica da Unicamp. Campinas – São Paulo, 22 e 23 de Setembro de 2010**

Anderson, D.J.; Gage, F.H.; Weissman, I.L. Can stem cells cross lineage boundaries? **Natural Medicine**, v.7, p. 393-395, 2001.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 9898** Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores. Rio de Janeiro, 1987. 22p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12713**. Ecotoxicologia aquática – toxicidade aguda – método de ensaio com *Daphnia* spp. (cladóceras, crustácea). Rio de Janeiro, 2004. 20p. Versão corrigida 2006.

Balan, D.S.L.; Monteiro, R.T.R. Decolorization of textile indigo dye by ligninolytic fungi. **Journal of Biotechnology**, v. 89, p 141-145, 2001.

Barros, G. S.; Angelis, D.F.; Furlan, L. T.; Corrêa-Junior, B. Utilização de planárias da espécie *Dugesia (Girardia) tigrina* em testes de toxicidade de efluentes de refinaria de petróleo. **Journal of Brazilian Society of Ecotoxicology**. v. 1(1), p 67-70, 2006.

Baun, A.; Sorensen, S.R.; Rasmussen, R.F.; Hartmann, N.B.; Koch, C.B. Toxicity and bioaccumulation of xenobiotic organic compounds in the presence of aqueous suspension of aggregates of nano-C60. **Aquatic toxicology**, v. 86, p. 379 – 387, 2008.

Best, J. B.; Morita, M., Planarians as a model system for in vitro teratogenesis studies. **Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis**, v. 2, p. 277-291, 1982.

Blaise, C.; Gagné, F.; Férard, J.F.; Eullaffroy, P. Ecotoxicology of Selected Nano-Materials to aquatic organisms. **Environmental Toxicology**, v. 23(5) p. 591-598, 2008.

Botelho, R.G.; Santos, J.B.; Oliveira, T.A.; Braga, R.R.; Byrro, E.C.M. Toxicidade Aguda de Herbicidas a Tilápia (*Oreochromis niloticus*). **Planta Daninha**, v. 27 (3) p. 621-626, 2009.

Bossuyt, B. T. A.; Janssen, C. R. Copper toxicity to different field-collected cladocera species: intra- and inter-species sensitivity. **Environmental Pollution**, v. 136, p. 145-154, 2005.

Bueno, D.; Fernández-Rodríguez, J.; Cardona, A.; Hernández-Hernández, V.; Romero, R. A Novel invertebrate trophic factor related to invertebrate neurotrophins is involved in planarians body regional survival and asexual reproduction. **Developmental Biology**, v. 252, p. 188-201, 2002.

Bueno-Silva, M.; Fischer, M. L. Estudo da biologia de *Girardia tigrina* (Girard, 1850) (Platyhelminthes: Tricladida: Paludicola): Análise do crescimento, reprodução e mortalidade em laboratório. **Acta Biológica Leopoldensia**, v. 27 (1), p. 11-18, 2005.

Butturi-Gomes, D. **Avaliação dos efeitos dos inseticidas Malation e Fipronil sobre a viabilidade e regeneração de *Girardia tigrina* (platyhelminthe, tricladida)**. 2008, 67p. Trabalho de conclusão de curso (Ecologia) – Instituto de Biociência de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

Calevro, F.; Filippi, C.; Deri, P.; Albertosi, C.; Batistoni, R. Toxic effects of aluminium, chromium and cadmium in intact and regenerating freshwater planarians. **Chemosphere**, v. 38 (1), p. 245, 1999.

Calevro, F.; Filipi, C.; Deri, P.; Albertosi, C.; Batistoni, R. Toxic effects of aluminium, chromium and cadmium in intact and regenerating freshwater planarians. **Chemosphere** v. 37 (4). p. 651-659, 1998.

Caronti, B.; Morgotta, V.; Merante, A.; Pontiere, F.E.; Palladini, G. Treatment with 6-hydroxydopamine in planaria (*Dugesia gonocephala* s.l.): morphological and behavior study. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 123, p.201-207, 1999.

Carvalho, C.S.; Selistre-de-Araujo, H.S.; Fernandes, M.M. Hepatic metallothionein in a teleost (*Prochilodus scrofa*) exposed to copper at pH 4.5 and pH 8.0. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**. v. 137, 225-234, 2003.

Chapadense, P.F.G.; Castro, F.A.; Almeida, J.A.; Moron, S.E. Toxicidade do herbicida atrazina em *Colossoma macropomum*. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**., v. 12 (2), p. 398-405, 2009.

Connors, D. E; Black, M. C. Evaluation of lethality and genotoxicity in the freshwater mussel *Utterbackia imbecillis* (Bivalvia: Unionidae) exposed singly and in combination to chemicals used in lawn care. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 46, p. 362-371, 2004.

DeLorenzo, M.E.; Serrano, L. Individual and mixture toxicity of three pesticides: Atrazine, Chlorpyrifos, and Chlorothalonil to the marina phytoplankton Species *Dunaliella tertiolecta*. **Journal of Environmental Science and Health**. v.B38 (5), p529-538, 2003.

Egger, B.; Gschwentner, R.; Rieger, R. Free-living flatworms under the knife: past and present. **Development genes and evolution**. v. 217, p. 89-104, 2007.

Environmental Canada. 1990. **Guidance document on control of toxicity test precision using reference toxicants**. Report EPS 1/RM/12. 85p.

Fairchild, J.F.; Ruessler, D.S.; Haveland, P.S.; Carlson, A.R. Comparative Sensitivity of *Selenastrum capricornutum* and *Lemna minor* to sixteen herbicides. **Archives of Environmental Contaminations and Toxicology**. v.32, p. 353-357, 1997.

Ferraz, E.R.A.; Umbuzeiro, G.A.; de-Almeida, G.; Caloto-oliveira, A.; Chequer, F.M.D.; Zanoni, M.V.B.; Dorta, D.J.; Oliveira, D.P. Differential Toxicity of Disperse Red 1 and Disperse Red 13 in the Ames Test, HepG2 Cytotoxicity Assay, and *Daphnia* Acute Toxicity Test. **Environmental Toxicology**. v. 26 (5) p. 489-497, 2011.

Ferrer, L.; Andrade, S.; Asteasuain, R.; Marcovecchio, J. Acute toxicities of four metals on the early life estages of the crab *Chasmagnathus granulata* from Bahía Blanca stuary, Argentina. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 65, p. 209-217, 2006.

Franjević, D.; Krajna, A.; Kalafatić, M.; Ljubescic, N. The effects of zinc upon the survival and regeneration of planarian *Polycelis felina*. **Biologia, Bratislava**, v. 55 (6), p.689-694, 2000.

Guecheva, T.N.; Erdtmann, B.; Benfato, M.S.; Henriques, J.A.P. Stress protein response and catalase activity in freshwater planarian *Dugesia* (Girardia) *schubarti* exposed to copper. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 56, p. 351–357, 2003.

Guecheva, T.N.; Henriques, J.A.; Erdtmann, B. Genotoxic effects of copper sulphate in freshwater planarian in vivo, studied with the single-cell gel test (comet assay), **Mutation Research**. v. 497, p. 19-27, 2001

Gurley, K.A.; Sánchez-Alvarado, A. **Stem cell in animal of regeneration**. StemBook, ed. The Stem Cell Research Community, 2008. 23p. StemBook: <http://www.stembook.org>.

Gutierrez, M.F.; Paggi, J.C.; Gagneten, A.M. Microcrustaceans escape behavior as an early bioindicator off copper, chromium and endosulfan toxicity. **Ecotoxicology**. v. 21, p. 428-438, 2012.

Hamilton, M. A.; Russo, R. C.; Trurston, R. V. Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental. Science. Technology**, v. 11, p. 714-719, 1977.

Hack, L.A.; Tremblay, L.A.; Wratten, S.D.; Forrester, G.; Keesing, V. Zinc sulfate and atrazine toxicity to the marine herpactioid copepod *Robertsonia propinqua*. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**. v. 42 (1), p. 93-98, 2008.

Hernando, M.D.; De Vettori, S.; Martinez Bueno, M.J.; Fernandez-Alba, A.R. Toxicity evaluation with *Vibrio fischeri* test of organic chemicals used in aquaculture. **Chemosphere**. v. 68 , p. 724-730, 2007.

Honório, J.G. **Modulação da genotoxicidade de 1-Nitropireno por nanotubos de carbono de paredes múltiplas**, 2012, 71p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Tecnologia, Universidade Estadual de Campinas.

Horvat, T.; Kalafatic, M.; Kopjar, N.; Kovacevic, G. Toxicity testing of herbicide norflurazon on an aquatic bioindicator species – the planaria *Polycelis felina* (Daly). **Aquatic Toxicology**, v. 73, p.342-352, 2005.

Hyman, L. H. Studies on the morphology, taxonomy and distribution of North American triclad Turbellaria, IX. The priority of *Dugesia* (Girard, 1850) over *Euplanaria* (Hesse, 1897) with notes on American species of *Dugesia* **Transactions of the American Microscopical Society**, v. 58, p. 264-75, 1939.

Iannacone, J.; Tejada, M. Empleo de la regeneración de la planaria de agua dulce *Girardia festae* (Borelli, 1898) (Tricladida: Dugesiidae) para evaluar la toxicidad del carbofurano. **Neotropical Helminthology**, v. 1(1), p. 7 – 13, 2007.

Jenkins, M.M. The effects of thiourea and some related compounds on regeneration in planarians. **Biological Bulletin**, v. 116 (1), p. 106-114, 1959.

Jiang, H.; Adams, C. Treatability of cholo-s-triazines by conventional drinking water treatment technologies. **Water research**, v. 40, p. 1657-1667, 2006.

Johnson, W.H.; Franklin, L.C.; Miller, C.A. The complete loss of pigment in planarians in a solution of fungichromin. **Anatomical Record**, v. 134 (3), p. 588-589, 1959.

Kafatatić, M.; Kopjar, N.; Besendorfer, V. The impairments of neoblast division in regenerating planarian *Polycelis felina* (Daly) caused by in vitro treatment with cadmium sulfate. **Toxicology in vitro**, v. 18, p. 99-107, 2004.

Kafatatić, M.; Kopjar, N.; Besendorfer, V. The influence of mercuric chloride on neoblast division in regenerating planarian *Polycelis felina* (Daly.). **Water, air, and soil pollution**, v.156 , p. 195-210, 2004b.

Kafatatić, M.; Kovacevic, G.; Franjevic, D. Resistance of two planarian species to UV-irradiation. **Folia Biológica**, v. 54, p.103-108, 2006.

Knakievicz, T.; Vieira, S. M.; Erdtmann, B.; Ferreira, H.B. Reproductive modes and life cycles of freshwater planarians (Platyhelminthes, Tricladida, Paludicola) from southern Brazil. **Invertebrate Biology**, v. 125 (3), p. 212-221, 2006.

Knakievicz, T.; Ferreira, H.B. Evaluation of copper effects upon *Girardia tigrina* freshwater planarians based on a set of biomarkers. **Chemosphere**, v. 71, p. 419–428, 2008.

Knakievicz, T.; Silveira, P.A.; Ferreira, H.B. Planarian neoblast micronucleus assay for evaluating genotoxicity. **Chemosphere**, v.72, p.1267-1273, 2008.

Kobayashi, C.; Watanabe, K.; Agata, K. The process of pharynx regeneration in Planarians. **Developmental Biology** v. 211, p. 27-38, 1999.

Kolasa, J. Flatworms: Turbellaria and Nemertea. p.155-180 IN: **Ecology and classification of north American freshwater invertebrates**. 2nd Edition. AP, United States of America, 2001.

Kouyoumjian, H.H.; Uglow, R.F. Some aspects of the toxicity of p,p'-DDT, p,p'-DDE and p,p'-DDD to the freshwater planarian *Polycelis felina* (tricladida). **Environmental Pollution**. v.7 (2), 103-109. 1974.

- Lagadic L.; Caquet T. Invertebrates in testing of environmental chemicals: are they alternatives? **Environmental health perspectives**, v. 106 (2), p. 593-611, 1998.
- Lenicque, P. M.; Poulot, M.; Paris, M.R. Effects of some components of cannabis sativa on regenerating planarian worm *Dugesia tigrina*. **Experientia**, v. 28 (11), p. 1399, 1972.
- Lima, O. S. Preparação total de planárias e observações sobre a digestão. **Ciência e Cultura**, v.6, p.162-4, 1954.
- Majumdar, T.M.; Gupta, A. Acute and chronic toxicity of copper on aquatic insect *Chironomus ramosus* from Assam, India. **Journal of Environmental Biology**, v. 33, p. 139-142, 2012.
- Miyashita, H.; Nakagawa, H.; Kobayashi, K.; Hoshi, M.; Matsumoto, M. Effects of 17 β -Estradiol and Bisphenol A on the formation of reproductive organs in planarians. **Biology Bulletin**, v. 220, p. 47-56, 2011.
- Medvedev, I.V. Regeneration in two freshwater planarian species exposed to methylmercury compounds, **Russian Journal of Developmental Biology**, v. 39 (4), p.232-235, 2008.
- Mei-Hui, L. Effects of nonionic and ionic surfactants on survival, oxidative stress, and cholinesterase activity in planarian. **Chemosphere**, v. 70, p. 1796–1803, 2008.
- Mix, M.C.; Sparks, A.K. Histological effects of ionizing radiation on planarian, *Dugesia tigrina*. **National Cancer Institute Monographs**, v. 32, p. 693, 1969.
- Mohammad, M.; Itoh, K.; Suyama, K. Effects of herbicides on *Lemna gibba* and recovery after prolonged exposure. **Archives of Environmental Toxicology**. v. 58. p. 605-612, 2010.
- Morrison, S.J. Stem cell potential: can anything make anything? **Current Biology**, v. 11, p. 7-9, 2001.
- Newmark, P. A.; Sánchez-Alvarado, A. Not your father's planarians: a classic model enters the era of functional genomics. **Nature Reviews Genetics**. v. 3, p 210-220, 2002.
- Ness, D.K.; Foley, G.L.; Villar, D.; Hansey, L.G. Effects of 3-Iodo-L-tyrosine, a Tyrosine Hydroxylase Inhibitor, on eye pigmentation and biogenic amines in the planarian *Dugesia dorotocephala*. **Fundamentals and applied toxicology**, v. 30, p. 153-161, 1996.
- Novikov, V.V.; Sheiman, I.M.; Fesenko, E.E. Effect of weak static and low-frequency alternating magnetic field on the fission and regeneration of the planarian *Dugesia (girardia) tigrina*. **Bioelectromagnetics**, v. 29, p. 387-393, 2008.
- Nwani, C.D.; Nagpure, N.S.; Kunar, R.; Kushwaha, B.; Kunar, P.; Lakra, W.S. Mutagenic and genotoxic assessment of atrazine-based herbicide to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus test and single cell gel electrophoresis. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v.31, p.314-322, 2011.

Oliveira-Filho, E.C. **Efeitos de substâncias químicas sobre a reprodução de moluscos de água doce: estudos com caramujos do gênero *Biomphalaria***. 2003, 139 p. Tese (Doutorado), Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

Oviedo, N.J.; Beane, W.S. Regeneration: the origin of cancer or a possible cure? **Seminars in cell e Developmental biology**, v. 20, p. 557-564, 2009.

Okamoto, M. Simultaneous demonstration of lens regeneration from dorsal iris and tumor production from ventral iris in the same newt eye after carcinogen administration. **Differentiation**, v. 61, p. 285-92, 1997.

Pagán, O. R.; Rowlands, A.L.; Urban, K.R. Toxicity and behavior effects of dimethylsulfoxide in planaria. **Neuroscience letters**, v. 407, p. 274-278, 2006.

Pagán, O. R.; Coudron, T.; Kaneria, T. The flatworm planaria as a toxicology and behavioral pharmacology animal model in undergraduate research experiences. **The journal of undergraduate neuroscience education**, v.7 (2), p. A48-A52, 2009.

Palladini, G.; Ruggeri, S.; Stocchi, F.; Pandis, M.F.; Venturini, G.; Margotta, V. A pharmacological study of cocaine activity in planaria. **Complements in Biochemistry and Physiology**, v.115C (1), p.41-45, 1996.

Palma, P.; Palma, V.L.; Fernandes, R.M.; Soares, A.M.V.M.; Barbosa, I.R. Acute toxicity of atrazine, endosulfan sulfate and chlorpyrifos to *Vibrio fischeri*, *Thamnocephalus platyurus* and *Daphnia magna*, relative to their concentrations in surface waters from the Alentejo region of Portugal. **Bulletim of Environmental Contamination and Toxicology**. v.81, p 485-489, 2008.

Pascoalino, M. P.; Marcone, G. P. S.; Jardim, W. F. Os nanomateriais e a questão ambiental. **Química Nova**, v. 33 (2), p 421-430, 2010.

Paula-Junior, D. R.; Moraes, L.M.; Camargo, S.A.R.; Nour, E. A. A.; Roston, D. M. Estabilização de lodos de esgoto utilizando reatores anaeróbios sequenciais (sistema RAS). **Revista Brasileira de Ciências Ambientais**, v.1, p. 40 – 46, 2005.

Phillips, J.; Wells, M.; Chandler, C.; Metabolism of DDT by freshwater planarian *Phagocata velata*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 12 (3) p. 355-358, 1974.

Phyu, Y.L.; Warne, M.S.J.; Lim, R.P. Toxicity of atrazine and molinate to the cladoceran *Daphnia carinata* and the effect of river water and bottom sediment on the their Bioavailability. **Archives of Environmental Contaminations and Toxicology**. v. 46. p. 308-315, 2004.

Phyu, Y.L.; Warne, M.S.J.; Lim, R.P. Toxicity and bioavailability of atrazine and molinate to the freshwater shrimp (*Paratya australiensis*) under laboratory and simulated field conditions. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60, p. 113-122, 2005.

Phyu, Y.L.; Warne, M.S.J.; Lim, R.P. The toxicity and bioavailability of atrazine and molinate to *Chironomus tepperi* tarvae in laboratory and river in the presence and abstinence of sediment. **Chemosphere**. v. 58, p. 1231-1239, 2005.

Piontek, M. Use of Planarian *Dugesia tigrina* Girard bioassay for assessing the toxicity of sterigmatocystin produced by *Aspergillus versicolor tiraboschi*. **Environmental Protection Engineering**, v. 36, p. 65-71, 2010.

Piyatiratitivorakul, P.; Ruangareerat, S.; Vajarasathira, B. Comparative toxicity of heavy metal compounds to the juvenile golden apple snail, *Pomacea sp.* **Fresenius Environmental Bulletin**, v.15, p. 379-384, 2006.

Prá, D.; Lau, A. H.; Knakievicz, T.; Carneiro, F. R.; Erdtmann, B. Environmental genotoxicity assessment of an urban stream using freshwater planarians. **Mutation Research**, v. 585, p.79-85, 2005.

Prá, D.; Guecheva, T.; Franke, I.R.; Knakievicz, T.; Erdtmann, B.; Henriques, J. A. P. Toxicidade e Genotoxicidade do Sulfato de Cobre em Planárias de Água Doce e Camundongos. **Journal of Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 1 (2), p.171-175, 2006.

Preza, D. L. C.; Smith, D. Use of newborn *Girardia tigrina* (Girard, 1850) in acute toxicity tests, **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 50 p 1-3, 2001.

Pulskamp, K.; Diabaté, S.; Krug, H.F. Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. **Toxicology Letters**, v. 168, p. 58-74, 2007.

Raffa, R. B.; Desai, P. Description and quantification of cocaine withdrawal signs in Planaria. **Brain Research**, n.1032, p. 200-201, 2005.

Remakrishnan, L.; Desaer, C. Carbamazepine inhibits distinct chemoconvulsant-induced seizure-like activity in *Dugesia tigrina*. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 4, p. 665-670, 2011.

Reynoldson, T. B.; Young, J. O.; Taylor, M. C. The effect of temperature on life-cycle of four species of lake-dwelling triclad. **Journal of animal ecology**, v. 34 (1), p.23-43, 1965.

Roberts, A.; Mount, A.S.; Seda, B.; Souther, J.; Quiao R.; Lin, S.; Ke., P.C.; Rao, A.M.; Kleine, S.J. In vivo biomodification of lipid-coated carbon nanotubes by *Daphnia magna*. **Environmental Science and Technology**, v. 41, p. 3025-3029, 2007.

Rulon, O. The effects of LICL and NACNS on reconstitution in planarians. **Anatomical Record**, v.94 (3), p. 358-359, 1946

Sabourin, T. D.; Faulk, R. T.; Goss, L. B. The efficacy of three non-mammalian test systems in the identification of chemical teratogenesis. **Journal of Apply Toxicology**, v. 5, p. 227-233, 1985.

Sacavage, S.; Patel, H.; Zielinsk, M.; Acker, J.; Phillips, A.G.; Raffa, R.B.; Rawls S.M. Withdrawal-like behavior in planarians is dependent on drug exposure duration. **Neuroscience Letters**, v. 438, p. 84-88, 2008.

Sáfadi, R.S. **Emprego de planárias de água doce, *Girardia tigrina* (Girard, 1850) (Platyhelminthes, Tricladida, Paludicola) na avaliação de toxicidade de compostos metálicos – proposta metodológica.** 1993, 208 p. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Salveti, A.; Rossi, L.; Bonucelli, L.; Lena, A.; Pugliese, C.; Rainaldi, G.; Evangelista, M.; Gremigni, V. Adult stem cell plasticity: Neoblast repopulation in non-letally irradiated planarians. **Developmental Biology** v.328, p. 305-314, 2009.

Saló, E. The power of regeneration and the stem-cell kingdom: freshwater planarians (Platyelminthes). **Bioessays** v. 28, p. 546-59, 2006.

Saló, E.; Abril, J.F.; Adell, T.; Cebrià, F.; Ackelt, K.; Fernandez-Taboada, E.; Handberg-thorsager, M.; Iglesias, M.; Molina, M.D.; Rodríguez-Esteban, G. Planarian regeneration: achievements and future directions after 20 years of research. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 53, p. 1317-1327, 2009.

Sánchez-Alvarado, A. Planarians. **Current biology**, v.14, n.18, p.737-738, 2004.

Sánchez-Alvarado, A.; Newmark, P.A. Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 96, p.5049-5054, 1999.

Santos, F. F. S. **Implantação do plano de gestão de resíduos químicos da FT-Unicamp: oxidação de herbicidas triazínicos com H₂O₂ e metaloporfirinas.** 104p. 2011. Dissertação (mestrado). Faculdade de Tecnologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

Santos, J.B.; Botelho, R.G. Toxicidade aguda dos herbicidas atrazine e picloram sobre alevinos de *Ctenopharyngodon idella*. p. 3294 -3299 IN: XXVII Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas, Ribeirão Preto, São Paulo, 19 a 23 de junho de 2010.

Saski, W.; Mannelli, M.; Saettone, M.F. Relative toxicity of homologous of nonionic surfactants in planarian. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 60 (6), p. 854, 1971.

Schaeffer, D. J. Planarians as a model system for in vitro teratogenesis studies. **Quality Assurance**, v.2 (3), p. 265-318,1993.

Silvano, R.A.M.; Begossi, A. Seasonal dynamics of fishery at the Piracicaba River. **Fisheries Research**, v. 51, p. 69-86, 2001.

Stohs, S. J.; Bagghi, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. **Free Radical Biology e Medicine**, v. 18, p. 321-336, 1995.

Templeton R.C.; Ferguson P.I.; Washburn K.M.; Scrivens W.A.; Chandler G.T. Life-cycle effects of single-walled carbon nanotubes (swnts) on an estuarine meiobenthic copepod. **Environmental Science and Technology**, v.40, p.7387-7393, 2006.

Umbuzeiro, G.A.; Freeman, H.S.; Warren, S.H.; Oliveira, D.P.; Terao, Y.; Watanabe, T.; Claxton, L.D. The contribution of azo dyes to the mutagenic activity of the cristais river. **Chemosphere**, v. 60, p. 55-64, 2005.

- Vacchi, F.I. **Eco/genotoxicidade do corante comercial CI Disperse Red 1 e seus subprodutos clorados**. 2012, 71p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Tecnologia, Universidade Estadual de Campinas.
- Vacchi, F.I.; Honório, J.G.; Ribeiro, A.R.; Umbuzeiro, G.A. Toxicity evaluation of Disperse Red 1 textile dye using freshwater organisms from different trophic levels – a Pnec proposal. **IN: SETAC Europe 22nd Annual Meeting and 6th SETAC Word Congress**. Berlin, 20-24 May, 2012.
- Vadamanikam, V.J.; Shazilli, N.A.M. Comparative toxicity of nine metals to two dipterian larvae with reference to temperature variation. **Bulletin of Environmental Contamination Toxicology**, v. 80, p 516-520, 2008.
- Wagers, A.J.; Sherwood, R.I.; Cristensen, J.L.; Weissman, I.L. Little evidence for development plasticity of adult hematopoietic stem cells. **Science**, v. 297, p.2256-2259, 2002.
- Wei. I.; Thakkar M.; Chen Y.; Ntim S.A.; Mitra S.; Chang X. Cytotoxicity effects of water dispersible oxidized multiwalled carbon nanotubes on marine alga, *Dunaliella tertiolecta*. **Aquatic toxicology**, v.100, p.194–201, 2010.
- Wiilland, E. F.; Shröder, N. T.; Lacerda, A.S.; Sant'anna, G. S.; Antunese, G. F.; Vinagre, A. S. Morphological and metabolic effects of the fungicide dithane on the planarian *Girardia schubarti*. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular e Integrative Physiology**. **IN: Seventh International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry**. Salvador - Bahia, Brasil, v.148 (1). p. S71, 2007.
- Yan, X.M.; Shi, B.Y.; Lu, J. J.; Feng, C.H.; Wang, D.S.; Tang, H.X. Adsorption and desorption of atrazine on carbono nanotubes. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 321, p. 30-38, 2008.
- Zagatto, P. A.; Bertoletti, E. **Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações** – Segunda edição. Rima, São Carlos, 2008. 498p.
- Znidarić, D.; Kalafatic, M.; Kopjar, N. The survival of *Hydra oligactis* Pallas in unpleasant conditions. **Zeitschrift fuer Angewandte Zoologie**, v. 81, p. 157-163, 1995.
- Zyadah, M.A.; Abdel-Baky, T. E. Toxicity and bioaccumulation of copper, zinc, and cadmium in some aquatic organisms. **Bulletin of Environmental Contaminantion Toxicology**. v. 64, p. 740-747, 2000.

ANEXO A – SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS

TABELA 28 – Dados detalhados das substâncias químicas utilizadas nos ensaios de com *G. tigrina*

Produto	Fórmula	Peso Molecular	Fabricante	Lote	Pureza	Validade
Sulfato de Zinco	ZnSO ₄ .7H ₂ O	294,18	CAQ – Casa de Química Ind. e Com. Ltda	11835/07	99%	06/2011
Dicromato de potássio	K ₂ Cr ₂ O ₇	387,56	Cromoline Química Fina Ltda	05010004	99 – 108,7%	12/2011
Sulfato de Cobre	CuSO ₄ .5H ₂ O	249,68	Cromoline Química Fina Ltda	10611/07	99%	04/2014
Disperse Red 1	(N-Ethyl-N-(2-hydroxyethyl)-4-(4-nitrophenylazo) aniline	---	PCIL – Produtos Químicos para Indústrias LTDA	5221	60%	---
Atrazina	1-chloro-3-ethylamino-5-isopropylamino-2,4,6-triazine	---	ATRANEX	019-07-10675	50%	12/2012

--- Dado não encontrado na amostra

ANEXO B – ENSAIOS DE REGENERAÇÃO ENCEFÁLICA

TABELA 29 – Dados detalhados dos resultados obtidos nos diferentes tempos de leituras dos ensaios de regeneração encefálica com *G. tigrina* expostas a concentrações de sulfato de cobre

Amostra	Sulfato de Cobre (mg.L ⁻¹)	0,39		1,57		6,27		12,54		25,08		CONTROLE	
	Cobre (mg.L ⁻¹)	0,10		0,40		1,6		3,2		6,4			
Tempo	Morta- lidade	Rege- neração	Morta- lidade	Rege- neração	Morta- lidade	Rege- neração	Morta- lidade	Rege- neração	Morta- lidade	Rege- neração	Morta- lidade	Rege- neração	
T _{0h}	0%	100%O	0%	100%O	0%	100%O	0%	100%O	0%	100%O	0%	100%O	
T _{12h}	0%	100%O	0%	100%O	0%	15%X 85%O	40%	10%O 50%*	80%	15%X 5%O	0%	100%O	
T _{24h}	0%	100%A	0%	100%A	0%	5%P 95%A	55%	25%* 20%O	90%	10%*	0%	100%A	
T _{48h}	0%	100%B	0%	100%B	40%	20%O 5%X 10%* 25%B	75%	15%O 5%* 5%A	100%	--	0%	100%B	
T _{72h}	0%	30%C 70%D	0%	25%C 75%D	40%	10%O 5%A 10%B 10%P 25%D	100%	--	--	--	0%	40%C 60%D	
T _{96h}	0%	5%D 95%E	0%	100%E	40%	15%O 10%A 5%D 30%E	--	--	--	--	0%	5%D 95%E	
T _{120h}	0%	100%F	0%	100%F	40%	10%A 5%B 15%D 5%E 25%F	--	--	--	--	0%	100%F	
Temperatura média (°C)							25,3						
O - Corpos acéfalos			X- Degeneração elevada			* – Cicatrização não realizada			P – Planária sem região pós-faringe				
FASE A – Início formação do blastema		B – Blastema visível e normal		C – início surgimento das aurículas		D – início do surgimento dos ocelos							
E - Ocelos e aurículas mais definidos		F – Formação completa dos ocelos e das aurículas											

O símbolo -- representa a mortalidade de todos os organismos-teste.

TABELA 30 – Dados detalhados dos resultados obtidos nos diferentes tempos de leituras dos ensaios de regeneração encefálica com *G. tigrina* expostas a concentrações do corante têxtil C.I. Disperse Red 1

Amostra	Disperse Red 1 (mg.L ⁻¹)	10		50		100		150		200		CONTROLE	
		Morta- lidade	Rege- neração	Morta- lidade	Rege- neração	Morta- lidade	Rege- neração	Morta- lidade	Rege- neração	Morta- lidade	Rege- neração	Morta- lidade	Rege- neração
	Tempo												
	T _{0h}	0%	100%O	0%	100%O	0%	100%O	0%	100%O	0%	100%O	0%	100%O
	T _{12h}	0%	100%O	0%	100%O	0%	100%O	0%	100%O	0%	100%O	0%	100%O
	T _{24h}	0%	100%A	0%	100%A	0%	100%A	0%	100%A	0%	15%* 85%A	0%	100%A
	T _{48h}	0%	100%B	0%	100%B	0%	100%B	0%	100%B	0%	15%* 100%B	0%	100%B
	T _{72h}	0%	100%CD	0%	100%CD	0%	10%B 90%CD	0%	10%B 90%CD	0%	15%* 45%C 85%CD	0%	100%CD
	T _{96h}	0%	100%E	0%	15%C 85%E	0%	25%C 75%E	0%	10%C 90%E	0%	15%* 45%C 40%E	0%	100%E
	T _{120h}	0%	100%F	0%	10%E 90%F	0%	25%E 75%F	0%	25%E 75%F	40%	15%* 15%Z 20%C 10%F	0%	5%E 95%F
Temperatura média (°C)							23 ± 2						
FASE	O - corpos acéfalos			X- degeneração elevada			* - cicatrização não realizada			P – planária sem região pós-faringe			
	A – início formação do blastema			B – blastema visível e normal			C – início surgimento das aurículas			D – início do surgimento dos ocelos			
	E - ocelos e aurículas mais definidos			F – formação completa dos ocelos e das aurículas			Z – Má cicatrização, com ocelo e sem aurículas						

TABELA 31 – Dados detalhados dos resultados obtidos nos diferentes tempos de leituras dos ensaios de regeneração encefálica com *G. tigrina* expostas a concentrações de nanotubos de carbono de parede múltipla

Amostra	Nanotubo de Carbono de parede múltipla (mg.L ⁻¹)	0,1		0,5		1,0		2,5		5,0		CONTROLE	
		Mortalidade	Regeneração	Mortalidade	Regeneração	Mortalidade	Regeneração	Mortalidade	Regeneração	Mortalidade	Regeneração	Mortalidade	Regeneração
	T _{0h}	0%	100%O	0%	100%O	0%	100%O	0%	100%O	0%	100%O	0%	100%O
	T _{12h}	0%	100%O	0%	100%O	0%	100%O	0%	100%O	0%	100%O	0%	100%O
	T _{24h}	0%	100%A	0%	100%A	0%	100%A	0%	100%A	0%	100%A	0%	100%A
	T _{48h}	0%	100%B	0%	5%A 95%B	0%	100%B	0%	100%B	0%	100%B	0%	100%B
	T _{72h}	0%	40%C 100%D	0%	5%B 40%C 95%D	0%	45%C 100%D	0%	30%C 100%D	0%	30%C 100%D	0%	40%C 100%D
	T _{96h}	0%	5%D 95%E	0%	5%D 95%E	0%	100%E	0%	100%E	0%	100%E	0%	5%C 5%D 90%E
	T _{120h}	0%	100%F	0%	5%E 95%F	0%	100%F	0%	100%F	0%	100%F	0%	100%F
Temperatura média (°C)		25,3											
FASE	O - corpos acéfalos	X- degeneração elevada				* - cicatrização não realizada				P - planária sem região pós-faringe			
	A - início formação do blastema	B - blastema visível e normal				C - início surgimento das aurículas				D - início do surgimento dos ocelos			
	E - ocelos e aurículas mais definidos	F - formação completa dos ocelos e das aurículas											

TABELA 32 – Dados detalhados dos resultados obtidos nos diferentes tempos de leituras dos ensaios de regeneração encefálica com *G. tigrina* expostas a concentrações de sulfato de zinco

Amostra	Sulfato de Zinco (mg.L ⁻¹)	2,5		7,5		10		15		20		CONTROLE	
	Zinco (mg.L ⁻¹)	0,57		1,7		2,3		3,4		4,5			
	Tempo	Morta- lidade	Rege- neração	Morta- lidade	Rege- neração	Morta- lidade	Rege- neração	Morta- lidade	Rege- neração	Morta- lidade	Rege- neração	Morta- lidade	Rege- neração
	T _{0h}	0%	100%O	0%	100%O	0%	100%O	0%	100%O	0%	100%O	0%	100%O
	T _{24h}	0%	100%A	0%	80%A 10%* 10%X	35%	45%A 10%* 10%X	70%	25%A 5%X	100%	0%A	0%	100%A
	T _{48h}	0%	100%B	0%	25%A 75%B	55%	10%A 35%B	75%	5%A 20%B	--	--	0%	100%B
	T _{72h}	0%	100%CD	0%	25%A 75%CD	55%	10%A 35%CD	75%	5%A 20%B	--	--	0%	100%CD
	T _{96h}	0%	100%E	0%	10%A 10CD 80%E	55%	10%X 15%B 25%E	95%	5%B	--	--	0%	100%E
	T _{120h}	0%	100%F	0%	10%A 5%CD 85%F	60%	5%X 5%E 30%F	95%	5%B	--	--	0%	100%F
Temperatura média (°C)								25,3					
	O - corpos acéfalos			X- degeneração elevada			* – cicatrização não realizada			P – planária sem região pós-faringe			
FASE	A – inicio formação do blastema			B – blastema visível e normal			C – início surgimento das aurículas			D – início do surgimento dos ocelos			
	E - ocelos e aurículas mais definidos			F – formação completa dos ocelos e das aurículas									

O símbolo -- representa a mortalidade de todos os organismos-teste.

TABELA 33 – Dados detalhados dos resultados obtidos nos diferentes tempos de leituras dos ensaios de regeneração encefálica com *G. tigrina* expostas a concentrações de Cromo

Amostra	Dicromato de potássio (mg.L ⁻¹)	10		20		40		60		80		CONTROLE	
	Cromo (mg.L ⁻¹)	3,5		7		14		21		28			
Tempo	Mortalidade	Rege-neração	Morta-lidade	Rege-neração	Morta-lidade	Rege-neração	Morta-lidade	Rege-neração	Morta-lidade	Rege-neração	Morta-lidade	Rege-neração	
T _{0h}	0%	100%O	0%	100%O	0%	100%O	0%	100%O	0%	100%O	0%	100%O	
T _{12h}	0%	100%O	0%	100%O	0%	100%O	0%	100%O	0%	100%O	0%	100%O	
T _{24h}	0%	100%A	0%	100%A	0%	100%A	0%	100%A	0%	100%A	0%	100%A	
T _{48h}	0%	100%B	0%	100%B	0%	100%B	15%	75%B	40%	60%B	0%	100%B	
T _{72h}	0%	100%CD	0%	100%CD	0%	100%CD	30%	5%CD	75%	5%B	20%CD	0%	40%C
T _{96h}	0%	100%E	0%	100%E	15%	5%X 10%CD 60%E	85%	5%X 10%E	90%	10%E	0%	5%D 90%E	
T _{120h}	0%	100%F	0%	10%E 90%F	55%	5%E 35%F	--	--	--	--	0%	100%F	
Temperatura média (°C)						25,3							
O - Corpos acéfalos			X- Degeneração elevada			* - Cicatrização não realizada			P – Planária sem região pós-faringe				
FASE A – Início formação do blastema		B – Blastema visível e normal		C – início surgimento das aurículas		D – início do surgimento dos ocelos							
E - Ocelos e aurículas mais definidos		F – Formação completa dos ocelos e das aurículas											

O símbolo -- representa a mortalidade de todos os organismos-teste.

TABELA 34 – Dados detalhados dos resultados obtidos nos diferentes tempos de leituras dos ensaios de regeneração encefálica com *G. tigrina* expostas a concentrações de atrazina comercial

Amostra	Atrazina comercial (mg.L ⁻¹)	5		10		25		75		100		CONTROLE	
		Mortalidade	Regeneração	Mortalidade	Regeneração	Mortalidade	Regeneração	Mortalidade	Regeneração	Mortalidade	Regeneração	Mortalidade	Regeneração
	Tempo												
	T _{0h}	0%	100%O	0%	100%O	0%	100%O	0%	100%O	0%	100%O	0%	100%O
	T _{12h}	0%	100%O	0%	100%O	0%	100%O	0%	100%O	0%	100%O	0%	100%O
	T _{24h}	0%	100%A	0%	100%A	0%	15%X 85%A	0%	20%X 80%A	0%	50%X 50%A	0%	100%A
	T _{48h}	0%	100%B	0%	100%B	0%	5%* 30%X 65%B	0%	55%A 45%B	40%	45%X 15%B	0%	100%B
	T _{72h}	0%	100%CD	0%	100%CD	10%	5%* 45%X 40%CD	100%	--	90%	5%X 5%A	0%	100%CD
	T _{96h}	0%	100%E	0%	100%E	70%	5%A 35%CD	--	--	--	--	0%	5%D 95%E
	T _{120h}	0%	100%F	0%	100%F	70%	5%A 15%CD 10%E	--	--	--	--	0%	15%E 85%F
Temperatura média (°C)		25,3											
	O - Corpos acéfalos	X- Degeneração elevada				* - Cicatrização não realizada				P - Planária sem região pós-faringe			
FASE	A - Início formação do blastema	B - Blastema visível e normal				C - início surgimento das aurículas				D - início do surgimento dos ocelos			
	E - Ocelos e aurículas mais definidos	F - Formação completa dos ocelos e das aurículas											

O símbolo -- representa a mortalidade de todos os organismos-teste.

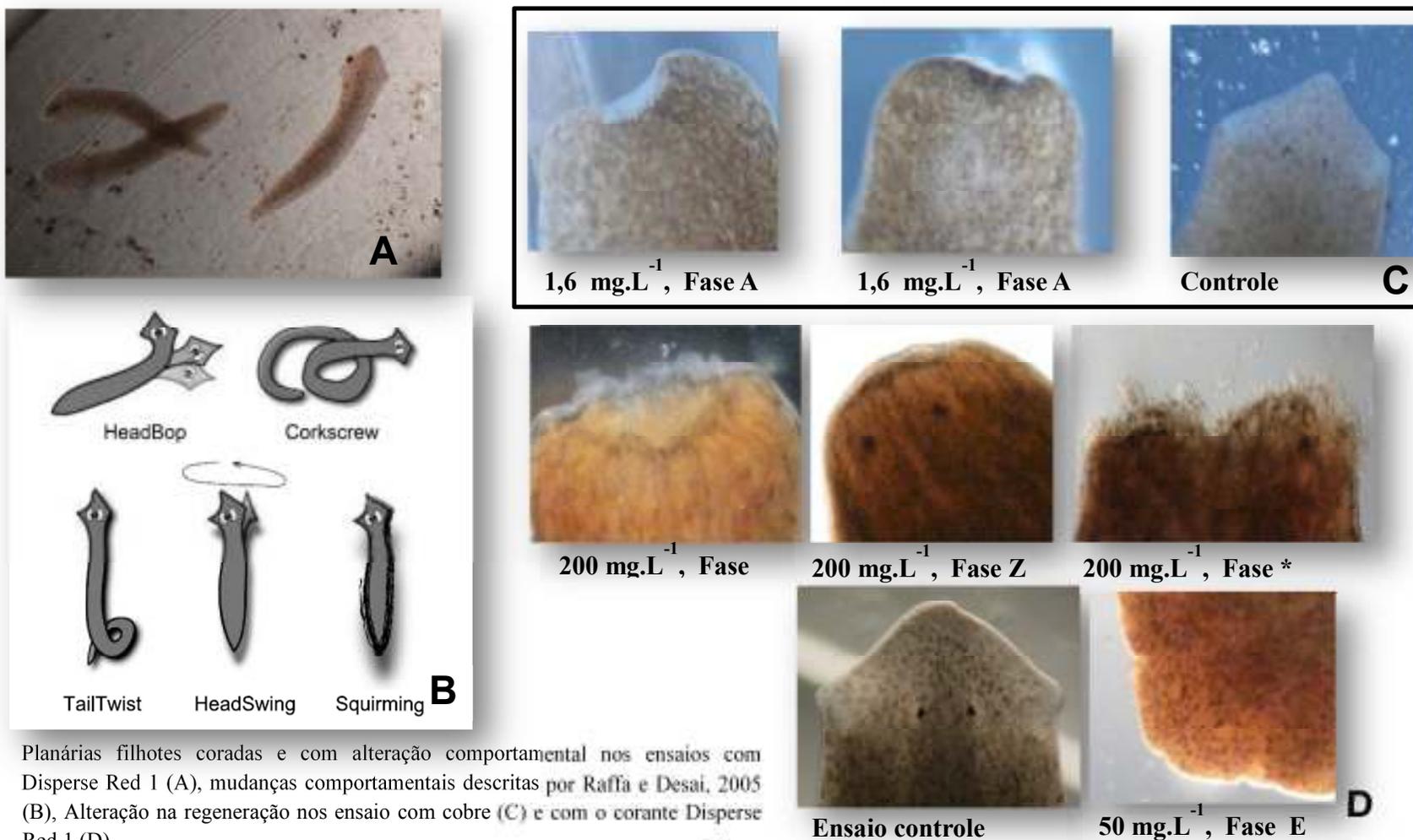
TABELA 35 – Dados detalhados dos resultados obtidos nos diferentes tempos de leituras dos ensaios de regeneração encefálica com *G. tigrina* expostas a amostras do Ribeirão dos Cristais e ETE Carioba

Amostras ambientais	P1		P2		P3		P1.C		P2.C		CONTROLE	
	Morta- lidade	Rege- neração	Morta- lidade	Rege- neração	Morta- lidade	Rege- neração	Morta- lidade	Rege- neração	Morta- lidade	Rege- neração	Morta- lidade	Rege- neração
T _{0h}	0%	100%O	0%	100%O	0%	100%O	0%	100%O	0%	100%O	0%	100%O
T _{12h}	0%	100%O	0%	100%O	0%	100%O	--	--	--	--	0%	100%O
T _{24h}	0%	100%A	0%	25%O 75%A	0%	100%A	--	--	--	--	0%	100%A
T _{48h}	0%	100%B	0%	25%O 75%B	0%	100%B	--	--	--	--	0%	100%B
T _{72h}	0%	100%CD	0%	25%O 75%CD	0%	100%CD	--	--	--	--	0%	5%B 95%CD
T _{96h}	0%	100%E	0%	15%O 10%* 75%CD	0%	5%CD 95%E	--	--	--	--	0%	100%E
T _{120h}	0%	100%F	15%	10%X 15%O 25%A 10%D 25%CD	0%	100%F	--	--	--	--	0%	100%F
Temperatura média (°C)							25,3					
O - Corpos acéfalos			X- Degeneração elevada			* - Cicatrização não realizada			P – Planária sem região pós-faringe			
FASE A – Início formação do blastema		B – Blastema visível e normal			C – início surgimento das aurículas			D – início do surgimento dos ocelos				
E - Ocelos e aurículas mais definidos			F – Formação completa dos ocelos e das aurículas									

P1: Ribeirão dos Cristais montante; **P2:** Ribeirão dos Cristais cano de despejo de efluente, **P3:** Ribeirão dos Cristais, jusante. **P1.C:** Entrada da ETE Carioba e **P2.C:** Saída da ETE Carioba . O símbolo -- representa a mortalidade de todos os organismos-teste.

ANEXO C – IMAGENS REGISTRADAS NOS ENSAIOS

FIGURA 9 – Alterações morfológicas e observações registradas nos ensaios de regeneração encefálica e de mortalidade com *G. tigrina* expostas a cobre a ao corante Disperse Red 1



Planárias filhotes coradas e com alteração comportamental nos ensaios com Disperse Red 1 (A), mudanças comportamentais descritas por Raffa e Desai, 2005 (B), Alteração na regeneração nos ensaio com cobre (C) e com o corante Disperse Red 1 (D).