

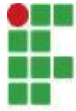
INSTITUTO FEDERAL DO PARANÁ

TIAGO SILVA KENEIPP

**USO DE PLANÁRIAS COMO BIOINDICADORES DE AMBIENTES
AQUÁTICOS**

LONDRINA

2018



INSTITUTO FEDERAL DO PARANÁ

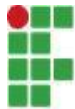
TIAGO SILVA KENEIPP

**USO DE PLANÁRIAS COMO BIOINDICADORES DE AMBIENTES
AQUÁTICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso, modalidade
Relatório de Pesquisa, apresentado ao curso
Técnico em Biotecnologia Integrado ao Ensino
Médio do Instituto Federal do Paraná.

LONDRINA

2018



FOLHA DE APROVAÇÃO

TIAGO SILVA KENEIPP

USO DE PLANÁRIAS COMO BIOINDICADORES DE AMBIENTES AQUÁTICOS

Trabalho de Conclusão de Curso, modalidade Relatório de Pesquisa, apresentado ao Curso Técnico em Biotecnologia Integrado ao Ensino Médio do Instituto Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Técnico em Biotecnologia.

Orientadora: _____

Profa. Dra. Fernanda de O. Martins

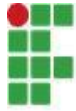
Coorientadora: _____

Profa. Dra. Luciana F. de Oliveira

Profº. Me. Paulo Antonio Cypriano

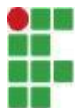
Profº. Dr. Daniel Meneguello Limeira

Londrina, 19 de novembro de 2018.



Ministério da Educação

Dedico esse trabalho às planárias que foram sacrificadas em prol da realização da pesquisa.



AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à minha orientadora Fernanda de Oliveira Martins que me ajudou durante todo o desenvolvimento do trabalho, e me proporcionou momentos de descontração quando eu não me encontrava em condições de fazê-lo.

A todas as pessoas que me ajudaram nas coletas do experimento, principalmente minha coorientadora Luciana Fernandes de Oliveira, pois sem eles o sucesso do trabalho não seria possível.

Também à minha família que me apoiou e me fortaleceu para que eu pudesse chegar até aqui.

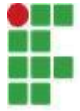
Agradeço a todos os meus amigos que me acompanharam durante todos esses 4 anos, mas em especial a Lorena Liger, Fernanda Barbosa, Heloisa Lima, Carol, Gustavo Yuji, Bianca Soares, Luanna, Maria Fernanda, Gustavo Palote, Isabella Maria, Jonatas, Letícia, Ana Kozan e Murilo Scatamburlo, assim como Kátia Bertolazzi e Guilherme Silveira. Sou grato a todos por me darem forças todos os dias e me ensinarem a nunca desistir do que eu acredito e sonho.

À Daniele Albuquerque, minha amiga querida que com muita paciência me forneceu suporte nos momentos mais difíceis.

Ao corpo docente do Instituto Federal do Paraná, pela disponibilidade e atenção proporcionada a nós alunos.

Também deixo aqui um agradecimento especial ao aluno Jhuan Bahia, estudante do 1º ano de biotecnologia do IFPR, o qual foi um grande ajudante nas coletas e se arriscou durante a madrugada para fazer coleta em prol do trabalho.

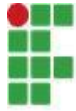
E por fim ao CNPq, que me contemplou com uma bolsa de iniciação científica e me ajudou com os recursos necessários no trabalho.



Ministério da Educação

*“In the death of her reputation,
She felt truly alive.”*

Taylor Swift.



Ministério da Educação

RESUMO

Ao longo do tempo, pode-se observar um grande crescimento dos centros urbanos, acarretando na degradação dos recursos naturais. Em nível mundial, não se vê um ecossistema que não tenha sofrido pela ação do homem, causando muitas interferências na vida animal e também na perda da biodiversidade. O sistema produtivo gera efluentes e resíduos que muitas vezes são descartados de maneira indevida nos ecossistemas, causando sua degradação e prejudicando a qualidade de vida dos seres vivos. Para se verificar a qualidade de ambientes, o uso de agentes biológicos como bioindicadores vem se tornando cada vez mais frequente. Baseado nisso, o presente estudo teve como objetivo geral analisar as planárias como possíveis bioindicadores da qualidade dos ecossistemas em ambientes urbanos, baseado no tempo que esses animais levam para completar o processo de regeneração. Para tal, planárias coletadas no Lago Igapó foram seccionadas e seu tempo para regeneração foi verificado em um controle, no qual elas ficaram mantidas em água mineral, um teste experimental com água do Lago Norte da cidade de Londrina, o qual é o objeto de estudo, e um teste com solução de chumbo. Os resultados obtidos foram comparados em análises estatísticas, a fim de concluir se há ou não diferença no tempo total do processo de regeneração desses animais nessas diferentes condições. Dessa forma, foram obtidos dois dados em relação ao surgimento dos ocelos, sendo eles a média de dias em que os indivíduos apresentaram os ocelos, assim como também o desvio padrão desses resultados. Assim, os testes com água contaminada (T1 a T15) apresentaram média de 3,15 dias e desvio padrão de 0,55; controle (C1 a C14) apresentou média de 3,93 e desvio padrão de 0,92; e por fim os testes de Pb (Pb1 a Pb15) apresentaram média de 3,30 e desvio padrão de 1,01. Da mesma forma foi feito com o estágio de triangulação da cabeça, sendo obtido uma média de dias, e também a frequência deste fenômeno. Assim, os testes com água contaminada (T1 a T15) apresentaram média de 5,00 e uma frequência de 0,733; controle (C1 a C15) apresentou uma média de 5,00 e uma frequência de 6,00; e por fim, os testes de Pb (Pb1 a Pb15) apresentaram uma média de 5,00 e uma frequência de 6,00. A partir destes, foi observado que a incidência de matéria orgânica no ambiente pode afetar de forma significativa a regeneração do organismo.

Palavras-chave: Biomonitoramento; Ecossistemas aquáticos; Platelminhos; Poluentes; Regeneração.

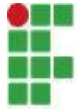


Ministério da Educação

ABSTRACT

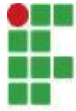
Over time, it can be observed a great growth of the urban centers, causing the degradation of the natural resources. In world-wide aspects, does not see an ecosystem that has not suffered by the action of human beings, which caused many interferences in the animal life and also the loss of the biodiversity. The productive system generates effluents and wastes that are often unduly discarded in ecosystems, causing their degradation and damaging the quality of life of living beings. In order to verify the quality of environments, the use of biological agents as bioindicators is becoming more and more frequent. Based on this, the present study has as general objective to analyze planaria as possible bioindicators of the quality of ecosystems in urban environments, based on the time that these animals take to complete the regeneration process. For this purpose, planarias collected in Lake Igapó were sectioned and their time for regeneration was verified in a control, in which they were kept in mineral water, an experimental test with water from the North Lake of the city of Londrina, which is the object of study, and a lead solution test. The results obtained were compared in statistical analyzes in order to conclude whether or not there is difference in the total time of the regeneration process of these animals in those different conditions. Thus, two data were obtained in relation to the appearance of ocelli, being the mean number of days in which individuals presented the ocelli, as well as the standard deviation of the results. The tests with contaminated water (T1 to T15) had a mean of 3.15 and a standard deviation of 0.55; control (C1 to C14) had a mean of 3.93 and a standard deviation of 0.92; and finally the Pb tests (Pb1 to Pb15) had an average of 3.30 and a standard deviation of 1.01. In the same way it was done with the stage of head triangulation, being obtained an average of days, and also the frequency of this phenomenon. The tests with contaminated water (T1 to T15) presented an average of 5.00 and a frequency of 0.733; control (C1 to C15) presented an average of 5.00 and a frequency of 6.00; and finally, the Pb tests (Pb1 to Pb15) presented an average of 5.00 and a frequency of 6.00. From these, it was observed that the incidence of organic matter in the environment can significantly affect the regeneration of the organism.

Key-words: *Biomonitoring; Aquatic ecosystems; Platelminths; Pollutants; Regeneration.*



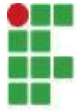
LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Diferenciação das fontes de poluição.	15
FIGURA 2 – Planária em estágio de observação.	18
FIGURA 3 – Localização do Lago Igapó na cidade de Londrina.	22
FIGURA 4 – <i>Salvinia</i> sp.	23
FIGURA 5 – Ponto de coleta das amostras do Lago Norte	23
FIGURA 6 – Corte transversal em planárias	24



LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Levantamento bibliográfico sobre uso de planárias de água doce em avaliações ecotoxicológicas	19
TABELA 2 - Características de cultivo teste	23
TABELA 3 - Período do surgimento dos ocelos	25
TABELA 4 - Período da triangulação da cabeça	27
TABELA 5 - Morte de indivíduos durante o experimento	30



LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

C1 a C15 - Grupo controle.

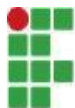
CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

IFPR - Instituto Federal do Paraná

Pb - Chumbo

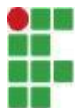
Pb1 a Pb2 - Grupo experimental Chumbo

T1 a T15 - Grupo experimental Teste (água do Lago Norte)



SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 TEMA	12
1.2 PROBLEMA	12
1.3 HIPÓTESE	12
1.4 OBJETIVO GERAL	12
1.5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
1.6 JUSTIFICATIVA	13
2. DESENVOLVIMENTO	14
2.1 CRESCIMENTO DAS ÁREAS URBANAS	14
2.2 FONTES POLUIDORAS	14
2.3 IDENTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES NO AMBIENTE	15
2.4 BIOINDICADORES	16
2.5 PLANÁRIAS COMO BIOINDICADORES	17
2.6 REGENERAÇÃO DE PLANÁRIAS	20
3. METODOLOGIA	22
3.1 AMOSTRAGEM E FORMAS DE COLETA E ORGANIZAÇÃO	22
3.1.1 CRIAÇÃO	22
3.1.2 EXPERIMENTO	23
3.2 ANÁLISE DOS DADOS	24
4. ANÁLISE DE DADOS E RESULTADOS	25
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	30
REFERÊNCIAS	31



1. INTRODUÇÃO

1.1 TEMA

É considerado um bioindicador, um grupo de espécies presentes em um ambiente capaz de indicar, por meio de alterações em seu organismo alterações causadas no ambiente. Assim, muitos estudos vêm sendo realizados para a obtenção destes organismos sensíveis.

Deste modo, dentre os organismos que vêm sendo estudados, encontram-se as planárias, as quais podem ser bioindicadores eficientes devido sua capacidade de interação com o ambiente.

1.2 PROBLEMA

Existe uma quantidade muito grande de espécies de planárias que podem ser utilizadas como bioindicadores, algumas indicadores de boa qualidade ambiental e outras indicadoras de degradação do ambiente. O que as diferenciam são suas especificidades e resistência a diferentes tipos de ambiente.

Deste modo, estudos apontam a utilização da taxa de mortalidade de planárias como um fator indicativo, o que torna este organismo viável na utilização como bioindicador.

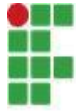
Entretanto, a ausência de estudos a respeito da taxa regenerativa das planárias impede o seu uso como bioindicadores de alterações do ambiente baseado nesse parâmetro.

1.3 HIPÓTESE

Considerando sua alta capacidade de interação com o ambiente, acredita-se que devido a contaminação da água, se obtenha uma diminuição da taxa regenerativa das planárias, a qual irá indicar a qualidade do ambiente aquático estudado.

1.4 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo geral verificar se o tempo de regeneração de planárias de água doce pode variar de acordo com as condições ambientais às quais esses platelmintos estão submetidos, podendo esse tempo ser



indicativo da qualidade ambiental.

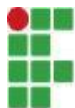
1.5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o tempo de regeneração de planárias coletadas submetidas a corte transversal e mantidas durante o processo de regeneração em água mineral, água do Lago Norte e solução de chumbo
- Comparar o tempo de regeneração das planárias mantidas em água mineral, água do Lago Norte e solução de chumbo;
- Se houver diferença, encontrar possíveis causas ambientais para essa diferença.

1.6 JUSTIFICATIVA

O estudo dos bioindicadores vem se tornando cada vez mais importante para a manutenção ambiental, visto que, atualmente enfrentamos uma grande degradação ambiental devido a alta demanda de recursos naturais.

Assim, ao procurar trabalhos envolvendo o uso de planárias como bioindicadores, mais especificamente utilizando taxas regenerativas como fonte de estudo, percebe-se que estes são muito escassos, o que dificulta novas frentes de pesquisa.



2. DESENVOLVIMENTO

2.1 CRESCIMENTO DAS ÁREAS URBANAS

Ao longo do tempo, pode-se observar um grande crescimento dos centros urbanos, acarretando na degradação dos recursos naturais. Em nível mundial, não se vê um ecossistema que não tenha sofrido pela ação do homem, causando muitas interferências na vida animal e também na perda da biodiversidade (GOULART E CALLISTO, 2003).

O que se pode observar, é uma forte pressão do sistema produtivo, que utiliza os recursos naturais como matéria-prima para a produção de bens, com o intuito de obter capital. Deste modo, o sistema produtivo desenvolve rejeitos e efluentes, além de degradar o meio ambiente (GOULART E CALLISTO, 2003). Como resultado, essas alterações causam uma queda acentuada da biocenose aquática em riachos e lagos urbanos, por conta do descarte indevido de efluentes nestes locais. Assim, o ambiente aquático se torna cada vez mais prejudicado, tendo em vista que ele se apresenta como receptor final de todos os resíduos.

2.2 FONTES POLUIDORAS

A contaminação dada pelo descarte indevido de efluentes e substâncias prejudiciais a biocenose aquática, provém de diversas fontes, mas estas são classificadas como “fontes difusas” e “fontes pontuais” (FIGURA 1).

As fontes pontuais correspondem, essencialmente, aos efluentes domésticos e industriais, sendo aquelas facilmente de serem identificadas. Já as difusas incluem os resíduos provindos principalmente da agricultura (fertilizantes, herbicidas, inseticidas, fungicidas, entre outros), sendo aquelas onde seu ponto inicial da poluição é disperso. Assim, este tipo de poluição pode ser intensificada, dependendo de diversos fatores incluindo as características físicas e químicas no ambiente. (SODRÉ, 2012)

Em um ambiente aquático, essas fontes poluidoras podem se comportar de maneiras mais intensas, causando diversas alterações no ambiente, sendo elas:

- Alteração na paisagem, influenciando os fatores físicos da água, sua turbidez, bloqueio de luz, impedindo que as algas realizem o processo de fotossíntese, e também alteram a matéria orgânica.
- Perda de biodiversidade, causando exposição aguda/crônica das



espécies sensíveis.

- Diminuição da capacidade reprodutiva de espécies.
- Desequilíbrio da teia alimentar.
- Diminuição da qualidade de recursos hídricos, causando risco a saúde humana.

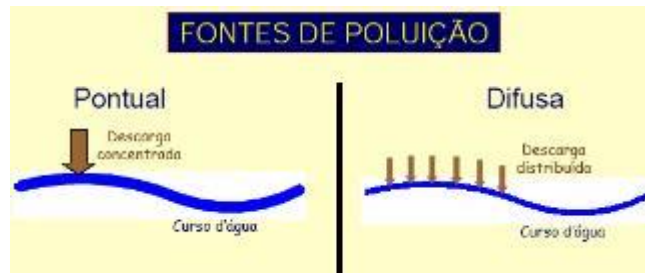


FIGURA 1 - Diferenciação das fontes de poluição

Fonte: <https://bit.ly/2oTtJO1>

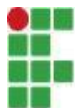
2.3 IDENTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES NO AMBIENTE

A identificação dessas alterações nos ambientes naturais é condição *sine qua non* para a tomada de decisões para sua recuperação e conservação. De acordo com Barbosa *et al.* (2000), a saúde de um ecossistema aquático pode ser inferida com base na caracterização de sua estrutura, levando-se em consideração os elementos biológicos e sua interação com parâmetros físicos e químicos; e o funcionamento, como processos fundamentais à manutenção da biodiversidade, como produção, consumo e decomposição de matéria orgânica. Nesse sentido, diversos estudos têm se focado em desenvolver formas mais eficientes e inovadoras para se verificar a saúde dos ecossistemas.

De acordo com Rapport (1989),

três fatores podem diferenciar “saúde” e “doença” de ecossistemas: 1) a identificação de fatores de risco como resíduos industriais e esgoto como uma ameaça ao funcionamento dos ecossistemas; 2) a falta de “stress” definida pelas características físicas e químicas, ou indicadores biológicos; e 3) a habilidade de um ecossistema de lidar com o “stress”.

A observação e análise desses três fatores pode ser realizada tanto em ecossistemas terrestres, como em ambientes aquáticos, estando estes inseridos em áreas naturais ou mesmo urbanas. Apesar disso, é de se esperar que haja



especificidades dependendo das características do ecossistema estudado.

Assim, a biotecnologia ambiental é uma alternativa precisa e eficaz para enfrentar os desafios cada vez maiores da degradação do meio ambiente, podendo atuar em três momentos: prevenindo, monitorando e restaurando o ambiente. Inserida nela, está presente a Ecotoxicologia aquática, a qual estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos, incluindo a interação das substâncias com o meio dos quais os organismos vivem. Esta ciência possui por finalidade saber em qual grandeza, as substâncias químicas, isoladas ou em forma de misturas, são nocivas, como e onde manifestam seus efeitos.

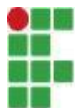
2.4 BIOINDICADORES

As comunidades biológicas refletem a integridade ecológica do ambiente, integrando os efeitos dos diferentes agentes impactantes e fornecendo uma medida agregada dos impactos (BARBOUT et al., 1999). Assim elas são formadas por seres vivos que possuem adaptações a determinadas condições ambientais as quais apresentam limites de tolerância a diferentes alterações no ambiente.

Sendo assim, a melhor maneira de se investigar a saúde de um ecossistema é o acompanhamento sob a forma de um monitoramento ambiental. Nesse sentido, buscam-se ferramentas capazes de verificar rapidamente possíveis impactos, bem como suas causas e efeitos. Uma metodologia cada vez mais utilizada é o uso de bioindicadores para verificar a qualidade dos ambientes, incluindo ambientes aquáticos.

Bioindicadores são espécies, grupos de espécies ou comunidades biológicas cuja presença, quantidade e distribuição indicam a magnitude de impactos ambientais em um ecossistema aquático e sua bacia de drenagem (CALLISTO E GONÇALVES, 2002).

Dessa maneira, um bioindicador permite uma avaliação integrada de efeitos causados por diversas fontes de poluição. Ademais, o uso de bioindicadores é mais eficiente do que algumas medidas instantâneas de parâmetros físicos e químicos que são geralmente medidas em campo e depois utilizadas para avaliação da qualidade das águas. Os bioindicadores mais utilizados são aqueles capazes de diferenciar



entre fenômenos naturais (p.ex. mudanças de estação e ciclos de chuva-seca) e estresses de origem antrópica, relacionados a fontes de poluição pontuais ou difusas (SODRÉ, 2012).

Para que um organismo seja escolhido como bioindicador, suas populações devem possuir grande sensibilidade às mudanças causadas no ambiente em que vivem, ter pouca mobilidade, além de serem muito abundantes. Portanto, quanto mais limitado o seu limite de tolerância, maior sua utilidade como bioindicador (MORALES, 2015).

Especificamente para ambientes aquáticos, como é o caso do Lago Norte, tem-se utilizado muito organismos bentônicos como bioindicadores (CALLISTO, 2000; GOULART E CALLISTO, 2003). Estes são bons bioindicadores para esse tipo de ambiente pois são geralmente permanentes e vivem de semanas a alguns meses no sedimento. Por este motivo, o seu monitoramento torna-se mais eficiente que o monitoramento baseado apenas na mensuração de parâmetros físicos e químicos, como já citado (LENAT e BARBOURT, 1994; ALBA-TERCEDOR, 1996).

2.5 PLANÁRIAS COMO BIOINDICADORES

Invertebrados vêm sendo cada vez mais utilizados em testes toxicológicos. Este aumento se dá devido à facilidade de cultivo e manutenção desses organismos de maneira controlada e com custos moderados, levando em consideração sua sensibilidade a diferentes classes de poluentes ambientais (LAGADIC e CAQUET, 1998).

Dentre as classes dos invertebrados, os platelmintos são considerados organismos importantes, 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 (FIGURA 2) (Filo Platyelminthes: Classe Tubellaria: Sub Ordem Tricladida: Infra Ordem Paludicola). O nome Tricladida advém à forma característica da sua cavidade digestiva ser dividida em três ramos. Assim, as planárias representam cerca de 15% de todas as espécies de vermes achatados.

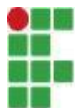


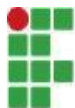
FIGURA 2 - Planária em estágio de observação.

FONTE: Autoria própria.

A potencialidade desses organismos serem utilizados como bioindicadores reside no fato de que estudos toxicológicos conseguem captar efeitos de exposição desses animais a longo prazo. Adicionalmente, outros motivos para se tornarem indicadores de amostras ambientais é por serem de fácil cultivo, terem baixo custo e, por serem organismos considerados simples do ponto de vista filogenético (LAU, 2002). De fato, é sabido que esses animais estão sendo testados como possíveis bioindicadores em alguns ambientes, em decorrência da presença, ausência ou tamanho de suas populações.

Entretanto, um ponto bastante relevante é que além destes fatores, as planárias possuem uma capacidade regenerativa extraordinária, que vai muito além da capacidade de reparar ferimentos, mas também regenerar grandes partes do corpo. Esta regeneração se dá em virtude dos neoblastos, células indiferenciadas - exclusivas dos turbelários - com excepcional plasticidade de desenvolvimento (PECHENIK, 2016). Esse processo de regeneração das planárias é bastante conhecido e discutido. Apesar disso, não se sabe ao certo se existe interferência da poluição presente nos ambientes aquáticos nesse processo, e portanto se diferentes tempos de regeneração podem servir de indicativo de impactos ambientais.

Os primeiros trabalhos científicos utilizando planárias em abordagens ecotoxicológicas foram realizados por Rulon (1946), que expôs alguns animais a cloreto de lítio e a cianeto de sódio. No trabalho de Johnson et al. (1959) onde os organismos foram expostos ao agente antifúngico e antibacteriano Fungicromin, e no

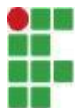


estudo de Jenkins (1959) planárias regenerantes foram expostas a tiouréia (composto orgânico similar a ureia e utilizado em tratamentos médicos como o hipertireoidismo).

A Tabela 1, apresenta um levantamento bibliográfico realizado por Ribeiro (2012), onde pode-se observar a diversidade de ensaios toxicológicos realizados com planárias, e como cada composto pode afetar no desenvolvimento destes organismos.

TABELA 1- Levantamento bibliográfico sobre 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
	Irradiação UV	Mortalidade, alterações morfológicas e na mobilidade.	Kalafatić et al., 2006
<i>Polycelis felina</i>	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., 2004



Ministério da Educação

	Herbicida	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
<i>Dugesia japonica</i>	Radiação (Raio-X)	Alterações nos neoblastos de planárias regenerantes.	Salveti et al., 2009
<i>Girardia schubarti</i>	Água de rio	Dano no material genético.	Prá et al., 2005
<i>Dugesia gonocephala</i>	Cocaína e outros Agentes farmacológicos	Alterações enzimáticas e na mobilidade.	Palladini et al, 1996

FONTE: RIBEIRO, 2012.

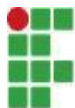
Assim, na tabela, pode-se perceber a presença de muitos metais que estão presentes nas fontes hídricas e que podem danificar o desenvolvimento de planárias. Entre esses metais presentes nas águas, podemos encontrar também o chumbo (Pb), um metal pesado natural, que possui uma cor cinza-azulada, é inodoro, maleável e sensível ao ar. Um aspecto preocupante deste elemento é sua capacidade bioacumulativa em um organismo (MOREIRA e MOREIRA, 2004), o que causa disfunções fisiológicas em seres humanos e animais. O chumbo reage com muitas biomoléculas ou complexos e afeta negativamente a reprodução, sistema nervoso, gastrointestinal, imune, renal, cardiovascular, ósseo, muscular e sistemas hematopoiético, bem como processos de desenvolvimento (JOHNSON, 1998).

Apesar de apresentar uma variedade muito grande de trabalhos, não há uma padronização do uso de planárias em testes ecotoxicológicos. Assim como também não há uma idade definida para se utilizar a planária, sendo presente em estudos juvenis e adultos.

2.6 REGENERAÇÃO DE PLANÁRIAS

Assim como já foi relatado, estudos envolvendo a capacidade regenerativa em planárias e seus aspectos biológicos vêm sendo realizados a mais de 200 anos (OVIEDO E BEANE, 2009; IANNACONE E TEJADA, 2007). O interesse nestes organismos também se dá pela capacidade em responder a agentes químicos durante o processo regenerativo.

Diferente dos anfíbios caudados, o qual sua regeneração parcial já foi comprovada através de células pós-mitóticas, as planárias utilizam em seu processo

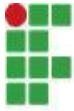


regenerativo células indiferenciadas denominadas neoblastos. Os neoblastos são considerados e comparados às células tronco adultas e são o único tipo de célula encontrada nas planárias que possuem a capacidade de se regenerar. Além disso, esta célula tem a capacidade de produzir os 40 tipos de células presentes neste animal (OVIEDO E BEANE, 2009; AGATA E WATANABE, 1999; SALÓ, 2006, SALÓ et al., 2009).

A presença de neoblastos em abundância no tecido mesodérmico das planárias, é o que as fazem capazes de se regenerar completamente desde pequenos grupos de aproximadamente 10.000 células, sendo os fragmentos oriundos de qualquer parte de seu corpo. Assim, um agente estressor é capaz de interromper seu processo regenerativo somente impedindo a divisão celular ou causando algum tipo de dano nos neoblastos (GURLEY E SÁNCHEZ-ALVARADO, 2008; SÁNCHEZ ALVARADO, 2004).

Sabendo que hoje podemos encontrar diversas classes de contaminantes capazes de atrapalhar o processo regenerativo das planárias, assim como também afetar a vida de outros organismos, os ensaios toxicológicos envolvendo estes organismos se tornam cada vez mais interessantes. Assim, Sabourin et al. (1985) e Calevro et al. (1998) propuseram ensaios de regeneração encefálica em planárias para a avaliação de contaminantes ambientais, decapitando e expondo os organismos ao contaminante de interesse.

Outros autores, utilizando a mesma abordagem, obtiveram resultados que comprovam a capacidade de certos componentes influenciar negativamente o processo regenerativo de planárias (BUTTURI-GOMES, 2008; IANNACONE E TEJADA, 2007; BARROS et al., 2006; PRÁ et al., 2006 ; BUENO et al, 2002). É importante ressaltar que o processo de regeneração encefálica de planárias de água doce 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, SÁNCHEZ-ALVARADO, 2004), assim como também o agente em que o animal está submetido.



3. METODOLOGIA

3.1 AMOSTRAGEM E FORMAS DE COLETA E ORGANIZAÇÃO

3.1.1 COLETA E MANITENÇÃO DOS ANIMAIS NO LABORATÓRIO

Os organismos utilizados no presente estudo, originam-se das margens do Lago Igapó, localizado na cidade de Londrina - $23^{\circ}19'41.6''S$ $51^{\circ}10'26.3''W$ - bacia do Ribeirão Cambé (Figura 3).

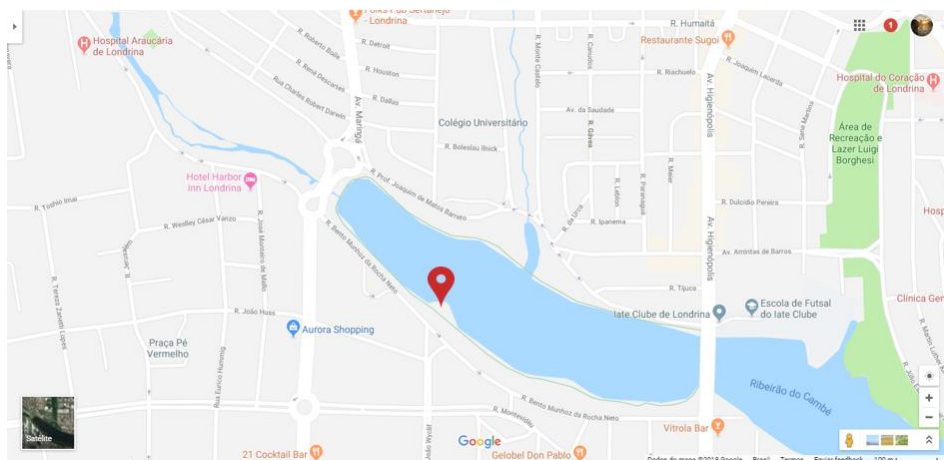


Figura 3 - Localização do Lago Igapó na cidade de Londrina.

FONTE: Google maps.

Por outro lado, foi feita a amostragem de água e vegetação aquática (*Salvinia* sp.) (Figura 4) das margens do Lago Norte, o qual é utilizado como objeto de estudo (Figura 5). No laboratório, as planárias foram mantidas em um aquário com aeração artificial, porém sem filtragem, com o objetivo de manter a população de planárias, sem grandes alterações nas condições originais presentes no ambiente do Lago Norte.

Em relação a alimentação destes organismos, dentre as inúmeras que vem sendo utilizadas, optou-se por uma alimentação natural, ou seja, a alimentação somente com matéria orgânica presente na água do Lago Norte, deste modo os experimentos controle não tiveram uma alimentação devido à falta desta matéria orgânica.

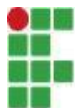


Figura 4 - *Salvinia* sp.
FONTE: A autoria própria



Figura 5 - Ponto de coleta das amostras do Lago Norte
FONTE: A autoria própria

Em relação às condições ambientais para cultivo e manutenção, elas permaneceram em temperatura ambiente, assim como também seu fotoperíodo não foi controlado.

3.1.2 EXPERIMENTO

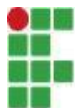
Para os testes efetivos, as planárias foram separadas em controles, teste com água do Lago Norte e teste de solução de Pb assim como mostra a tabela 2.

TABELA 2. Características de criação teste.

	CONTROLE	LAGO	CHUMBO
Nº DE INDIVÍDUOS	15	15	15
ÁGUA DE CULTIVO	Água mineral 10mL	Água do lago 10mL	Solução de chumbo 0,00001µg/L
ALIMENTAÇÃO	-----	Matéria orgânica	-----
CARACTERÍSTICAS DO RECIPIENTE	Recipiente de plástico.	Recipiente de plástico.	Recipiente de plástico.

FONTE: A autoria própria.

Deste modo, cada planária foi separada em uma placa de Petri, a fim de observar suas características individuais. Em cada planária foi realizado um corte transversal (FIGURA 6), originando uma parte posterior com aproximadamente 2 mm de comprimento e outra anterior com tamanho variável. Somente porção posterior do



corpo foi mantida e observada diariamente para verificar o processo de regeneração encefálica.

Tendo em vista que o parâmetro utilizado na análise foi a regeneração dos indivíduos seccionados, considerou-se esse processo completo a partir de dois fatores: aparição dos ocelos e formação completa da cabeça triangulada.

Durante todo o acompanhamento do experimento, os indivíduos teste foram fotografados para a registro dos resultados.

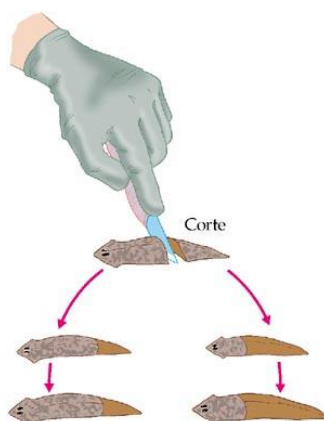


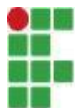
Figura 6 – Corte transversal em planárias.

FONTE: <https://bit.ly/2Phb0qn>

3.2 ANÁLISE DOS DADOS

Para verificar se ocorreu diferença da taxa regenerativa dos indivíduos submetidos a diferentes grupos experimentais, primeiramente os dados foram organizados em tabelas, separando os grupos experimentais e estágios de regeneração (aparição dos ocelos e triangulação da cabeça). Deste modo, utilizou-se uma análise estatística dos dados no programa SIGMAPLOT, o qual é uma plataforma capaz de realizar leituras de dados a fim de gerar gráficos científicos com base nos dados estatísticos.

Na análise, foi realizado um *teste t*, do qual obteve-se dados a respeito da média estatística como também o valor de P, representado a probabilidade de significância, o qual é considerado como significativo $P < 0,05$.



4. ANÁLISE DE DADOS E RESULTADOS

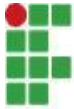
Os resultados obtidos demonstraram que ocorreu regeneração dos indivíduos. Sendo assim, os dados foram organizados em tabelas que são apresentadas abaixo. Os dados presentes nas tabelas são as informações brutas, os quais foram submetidos ao teste estatístico.

No experimento foram utilizados dois estágios para consideração da regeneração completa, sendo eles: o surgimento dos ocelos (representado na TABELA 3); e a triangulação da cabeça (representado na TABELA 4).

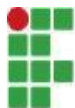
Dessa forma, foram obtidos dois dados em relação ao surgimento dos ocelos, sendo eles a média de dias em que os indivíduos apresentaram os ocelos, assim como também o desvio padrão desses resultados. Assim os testes com água do lago (T1 a T15) apresentaram média de 3,15 dias e desvio padrão de 0,55; controle (C1 a C14) apresentou média de 3,93 dias e desvio padrão de 0,92; e por fim os testes de Pb (Pb1 a Pb15) apresentaram média de 3,30 dias e desvio padrão de 1,01. Da mesma forma foi feito com o estágio de triangulação da cabeça, sendo obtido uma média de dias, e também a frequência em que este fenômeno ocorreu até o 5º dia de observação. Assim, os testes com água do lago (T1 a T15) apresentaram média de 5,00 dias e uma frequência de 0,733, ou seja, aproximadamente 73% dos indivíduos observados tiveram sua cabeça totalmente formada no até o 5º dia; o controle (C1 a C15) apresentou uma média de 5,00 dias e uma frequência de 0,600; e por fim, os testes de Pb (Pb1 a Pb15) apresentaram uma média de 5,00 dias e uma frequência de 0,600.

Tabela 3. Período do surgimento dos ocelos.

EXPERIMENTO SET/OUTUBRO	SURGIMENTO OCELOS		
	DIA	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
T1	3	3,15	0,55
T2	3		
T3	3		
T4	3		
T5	3		



T6	3		
T7	3		
T8	5		
T9	3		
T10	3		
T11	-		
T12	3		
T13	3		
T14	-		
T15	3		
C1	5	3,93	0,92
C2	5		
C3	3		
C4	3		
C5	-		
C6	3		
C7	3		
C8	4		
C9	3		
C10	5		
C11	3		
C12	4		
C13	5		
C14	5		
C15	4		
PB1	3	3,80	1,01
PB2	3		
PB3	3		
PB4	3		
PB5	3		
PB6	5		



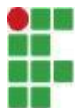
PB7	5
PB8	3
PB9	3
PB10	5
PB11	5
PB12	3
PB13	3
PB14	5
PB15	5

FONTE: Autoria própria.

Os dados apresentados representam as datas do surgimento dos ocelos; Os “-” representam os indivíduos que morreram.

TABELA 4. Período da triangulação da cabeça.

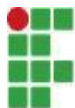
EXPERIMENTO SET/OUTUBRO	TRIANGULAÇÃO DA CABEÇA		
	DIA	MÉDIA	FREQUÊNCIA
T1	5	5,00	0,733
T2	5		
T3	5		
T4	-		
T5	5		
T6	5		
T7	5		
T8	-		
T9	5		
T10	5		
T11	-		
T12	5		
T13	5		
T14	-		
T15	5		
C1	-	5,00	0,600
C2	-		



C3	5		
C4	5		
C5	-		
C6	5		
C7	5		
C8	5		
C9	5		
C10	-		
C11	5		
C12	5		
C13	-		
C14	-		
C15	5		
PB1	5	5,00	0,600
PB2	5		
PB3	5		
PB4	5		
PB5	5		
PB6	-		
PB7	5		
PB8	5		
PB9	-		
PB10	-		
PB11	5		
PB12	5		
PB13	-		
PB14	-		
PB15	-		

FONTE: Autoria própria.

Os dados apresentados representam as datas da triangulação da cabeça; Os "-" representam os indivíduos que morreram ou não obtiveram regeneração completa até o 5º dia.



Os resultados obtidos mostraram que houve uma diferença significativa na regeneração dos indivíduos, quando comparamos os indivíduos teste (submetidos a água do Lago) e os indivíduos controle (submetidos à água mineral limpa) ($P=0,012$). Esta diferença se deu possivelmente devido à presença de matéria orgânica na água do Lago Norte, a qual provém principalmente da descarga de esgoto nas águas. (BRASIL, 2014).

O mesmo não ocorreu, quando comparamos os indivíduos controle (submetidos à água mineral) e os indivíduos do teste de Pb (solução de chumbo), onde o processo regenerativo foi muito semelhante entre os dois grupos, não tendo diferença significativa ($P=0,680$).

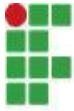
Não houve diferença significativa ($P=0,057$), em relação aos indivíduos teste e teste de Pb. Porém os números indicam uma certa tendência à diferença entre esses dois grupos. Assim como na comparação entre o grupo teste e controle, isso pode estar relacionado à presença de matéria orgânica.

A diferença encontrada entre os três experimentos foi a presença e ausência de matéria orgânica nas soluções. Isto posto, todos organismos vivos necessitam de carbono como um elemento fundamental para sua sobrevivência, assim como outros elementos, e a obtenção destes elementos se dá a partir da degradação de matéria orgânica presente no ambiente. Portanto, a ausência de matéria orgânica em um ambiente pode prejudicar o desenvolvimento dos organismos. Nesse caso específico, é possível que a falta de matéria orgânica no controle e no teste com Pb, tenha limitado a divisão celular dos neoblastos, células indiferenciadas responsáveis pela regeneração dos platelmintos, resultando em um processo de regeneração mais lento.

Entretanto, a presença exacerbada dessa matéria orgânica, partindo do pressuposto de que a presença em níveis elevados de matéria orgânica faz com que os seres vivos necessitem de um grande consumo de oxigênio presente na água, também traz prejuízo ao desenvolvimento destes, já que tal demanda gera, em certos casos, a falta de O_2 , o que poderia extinguir uma parte desta população (BRASIL, 2014).

É importante ressaltar que durante o experimento houveram algumas mortes de indivíduos, em que os dados estão expressos na TABELA 5, porém estes dados não foram de grande significância para o trabalho.

TABELA 5. Morte de indivíduos durante o experimento.



EXPERIMENTO SET/OUTUBRO	DATA DA MORTE
T11	03/10
T14	04/10
C5	01/10
NÚMERO DE INDIVÍDUOS	45
NÚMERO DE MORTOS	3

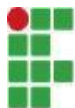
FONTE: Autoria própria.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando a hipótese de que a água contaminada retardaria o processo de regeneração das planárias, os resultados obtidos refutam esta ideia.

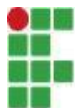
A partir dos objetivos propostos e resultados obtidos no trabalho, pode-se observar que, as planárias possuem um sistema de vida bastante complexo e diferenciado de diversos seres vivos. Foi possível concluir que a taxa regenerativa desses animais pode ser utilizada como bioindicadores ambientais, porém a significância dos dados ainda são poucas. Assim, propõe-se pesquisas mais aprofundadas do assunto de modo a obter resultados mais conclusivos.

É importante ressaltar que no decorrer do experimento observou-se que a escala de tempo utilizada não foi adequada para responder o problema levantado neste trabalho, sendo que pesquisas posteriores a adequação da escala para um outro formato, como a observação por horas, além de um sistema de câmeras fornecendo imagens do desenvolvimento destes organismos em tempo real, seria muito mais efetivo para a pesquisa. Além disso, sugere-se o preparo das soluções que serão utilizadas nos testes, com diferentes concentrações de matéria orgânica, a fim de estabelecer um parâmetro de quão prejudicial seria se houvesse a presença exacerbada da mesma.

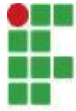


REFERÊNCIAS

- AGATA, K.; Watanabe K. Molecular and cellular aspects of planarians regeneration. **Seminars in cell e Developmental biology**, v. 10, p. 377-83, 1999.
- ANA ISABEL TENJO MORALES, "**Importancia y utilidad de los bioindicadores acuáticos**" En: Colombia. 2015. Revista Biodiversidad Colombia. ISSN: 2344-8539 p.39 - 48 v.5
- BARBOSA, F. A. R.; CALLISTO, M. & GALDEAN, N. (2000). **The diversity of benthic macroinvertebrates as an indicators of water quality and ecosystem health: a case study for Brazil**. Aquatic Ecosystem Health & Management.
- BARBOUR, M.T.; GERRITSEN, J.; SNYDER, B.D.; STRIBLING, J.B. 1999. **Rapid Bioassessment Protocols for Use in Streams and Wadeable Rivers: Periphyton, Benthic Macroinvertebrates and Fish**, 2a ed. EPA 841-B-99-002. U.S. Environmental Protection Agency; Office of Water; Washington, D.C.
- 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.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de controle da qualidade da água para técnicos que trabalham em ETAS / Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde**. – Brasília: Funasa, 2014
- BUENO, D.; FERNÁNDEZ-RODRIGUEZ, 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.
- 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.
- CALLISTO, M. 2000. **Macroinvertebrados bentônicos**. In: Bozelli, R.L.; Esteves, F.A. & Roland, F. Lago Batata: impacto e recuperação de um ecossistema amazônico. Eds. IB-UFRJ/SBL. Rio de Janeiro, 139-152pp.
- CALLISTO, M. & GONÇALVES, J.F.Jr. 2002. **A vida nas águas das montanhas**. *Ciência Hoje* 31 (182): 68-71
- 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.
- GOULART, M.D. & CALLISTO, M. 2003. **Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental**. Revista FAPAM (no prelo).



- 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>.
- IANNACONE, J.; TEJADA, M. Empleo de la regeneración de la planária 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.
- JOHNSON, F. M. The genetic effects of environmental lead. **Mutation Research**, v. 410, p.123-140, 1998.
- LAGADIC, L.; CAQUET, T. Invertebrates in testing of environmental chemicals: are they alternatives? **Environmental health perspectives**, v. 106 (2), p. 593-611, 1998.
- LAU, A.H. **Avaliação Múltipla do Potencial Genotóxico da Poluição Urbana de Porto Alegre - RS**. 2002. p.118. Tese (Doutorado em Ciências), Instituto de Biociências. Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.
- LENAT, D. R. & BARBOUT, M. T. 1994. **Using benthic macroinvertebrate communitie structure for rapid, cost – effective, water quality monitoring: rapid bioassessment**. In: Coeb, S. L. & Spacie, A. (eds) Biological Monitoring of aquatic systems. Lewis Publishers, Boca Ratom, Florida; p. 187-215
- MOREIRA, F. R.; MOREIRA, J.C. Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e seu significado para a saúde. **Revista Panamericana Salud Publica**, v.15(2), p.119-29, 2004.
- 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.
- 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.
- PECHENIK, Jean A.. **Biologia dos Invertebrados**. 7. ed. Porto Alegre: Amgh, 2016.
- 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.
- RAPPORT, D.J. (1989) **What constitutes ecosystem health?** Perspectives in Biology and Medicine, 33, 120-132.



Ministério da Educação

- RIBEIRO, A. R. **Potencial do uso de planárias na avaliação de contaminantes ambientais**. 2012. 88 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia) - Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo, 2012.
- RULON, O. The effects of LICL and NACNS on reconstitution in planarians. **Anatomical Record**, v.94 (3), p. 358-359, 1946
- 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.; RODRÍGUES-ESTEBAN, G. Planarian regeneration: arquiverments 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.
- SODRÉ, F. F. Fontes Difusas de Poluição da Água: Características e métodos de controle. **Aqqua**, Brasília, Df, p.9-16, 2012.