

A UTILIZAÇÃO DE PLANÁRIAS *Girardia schubarti* COMO BIOINDICADORES EM TESTES DE TOXICIDADE COM MERCÚRIO

Alessandra Janaina Becker, Felipe Rogalski & Luis Otávio Goulart

Trabalho realizado, no ano de 2010, pelos acadêmicos do primeiro semestre do curso de Ciências Biológicas – Núcleo Comum/ UFSM, na disciplina de Biologia Celular.

RESUMO

Planárias pertencentes ao gênero *Girardia schubarti* foram submetidas a testes de toxicidade com Cloreto de Mercúrio (HgCl₂). O mercúrio é uma neurotoxina bio- acumuladora que coloca em risco a saúde humana, animal e o equilíbrio ecológico. Seus principais órgãos alvo de intoxicação são o cérebro, pulmão, rim, tubo digestivo e fígado, e por continuidade, medula óssea e sistema cardiovascular, além do sistema nervoso central, principalmente pela inalação de vapor de mercúrio. Pode também causar hiperatividade em crianças e desordem muscular. A etapa inicial do estudo consistiu na determinação da concentração letal (LC₅₀) do HgCl₂, no qual as planárias (n=2 por concentração) foram acondicionadas em recipientes plásticos com 24 mL de água destilada, num período pré - determinado de 96h, submetidas às seguintes concentrações testes (em mg/L HgCl₂): 0 (controle); 0, 001; 0,002; e 0,003. Observou - se que em um período de 24h a concentração testada de mercúrio já havia causado efeitos nas planárias e apenas o controle que continha somente água destilada não sofreu nenhuma alteração. Também foram analisados o balanço de íons da água e os níveis de dureza e alcalinidade.

Palavras-chave: Planárias, bioindicador, toxicidade, mercúrio, água, concentração.

Introdução

O mercúrio (Hg) é o único metal encontrado na forma líquida em condições de temperatura e pressão normal, formando vapores incolores e inodoros. Além disso, o mercúrio ocorre no meio ambiente associado a outros elementos químicos, formando compostos inorgânicos ou sais. Muitos destes compostos têm importância no uso diário tanto na indústria como na agricultura, principalmente como fungicidas. Além de ser utilizado em uma variedade de aplicações: em pilhas, na odontologia e medicina. O mercúrio é considerado um poluente de alto risco,

sendo regulado pela US EPA (United States Environmental Protection Agency). No Brasil o Governo Federal, através do MMA (Ministério do Meio Ambiente) e do Ibama procura desenvolver projetos e leis de inventário nacional, visando reduzir a produção e destinação inadequada de resíduos perigosos, como os metais pesados (incluindo o mercúrio), porém dando maior importância a resíduos industriais.

A intoxicação por mercúrio tem efeitos desastrosos sob o sistema nervoso, causando desde lesões leves até a morte, conforme a concentração. Além de atingir o tecido

animal, desnaturando proteínas, inativando enzimas e alterando a atividade celular tanto pela indução de genes específicos como pela transmissão e influencia de sinais de controle da expressão gênica (KOROPATNICK & ZALAPUS 1997). Experimentos com cloreto de mercúrio (HgCl_2), demonstraram que este composto tem uma afinidade de se ligar à região de interface da molécula de Na-K-ATPase que está profundamente implicada na atividade de transporte de íons. Uma possível associação deste metal à molécula de Na-K-ATPase levaria a supressão da passagem de íons potássio e, conseqüentemente, uma inibição na atividade dos linfócitos B31 em humanos.

Devido ao elevado impacto dos metais pesados em ambientes aquáticos é comum o uso de bioindicadores em testes ecotoxicológicos, a fim de definir respostas biológicas adaptativas a estressores com ênfase a efeitos em humanos. Segundo, NASCIMENTO (2006), bioindicador é todo e qualquer organismo, que permite caracterizar o estado de um ecossistema e evidenciar tão precocemente quanto possível as modificações naturais ou provocadas neste.

O nosso estudo deteve – se na utilização de planárias como organismos biomarcadores por sua considerável sensibilidade a poluentes, além da ampla distribuição geográfica, alta capacidade de regeneração e fácil criação e manutenção em laboratório (CARONTI *et al.*, 1999).

Materiais e Métodos

1. Organismos utilizados

As planárias utilizadas foram as do gênero *Girardia schubarti*, habitantes de ecossistemas lóticos (nascentes de rios e riachos) e nativos do Rio Grande do Sul. Obtidas do Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos, Centro de Biotecnologia, da

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) de Porto Alegre.

2. Cultivo das planárias *G. schubarti*

As planárias foram acondicionadas intactas aos pares em quatro recipientes plásticos tampados distintos de 100mL, preenchidos com água destilada e diferentes concentrações de HgCl_2 , sem renovação, com a exceção do controle que continha somente água destilada. Mantidas em temperatura de $\pm 20^\circ\text{C}$ e fotoperíodo 12h luz e 12h escuro. Depois de feitos os tratamentos, foram coletados 0,2 mL de cada concentração e também no final do experimento, para definição do balanço iônico, os níveis de cloreto na água foram determinados por método colorimétrico segundo ZALL *et al.* (1956) e os níveis de sódio e potássio foram determinados com o auxílio de fotômetro de chama (B262; Micronal, São Paulo, Brazil). A dureza da água foi analisada por método titulométrico com EDTA, e a alcalinidade foi determinada como descrito por BOYD & TUCKER (1992).

3. Cloreto de mercúrio (HgCl_2)

O Cloreto mercúrio (HgCl_2) foi o reagente utilizado para o experimento. Este sólido branco cristalino é um reagente laboratorial. Ele foi usado mais largamente em muitas aplicações, incluindo as medicinais, entretanto, é uma das mais tóxicas formas do elemento mercúrio pela sua solubilidade em água (7.4 g/100 ml [20°C]) em relação a outros compostos de mercúrio. Primeiramente, foi feita a solução - mãe, na qual foram pesados 0,34 mg de HgCl_2 e diluído em 50 mL de água destilada para a obtenção de uma concentração de 0,5mg/L.

Tabela 1. Definição dos níveis iônicos, dureza e alcalinidade

Parâmetros de qualidade da água	Controle	0,001 mg/L HgCl ₂	0,002 mg/L HgCl ₂	0,003 mg/L HgCl ₂
Dureza (mg CaCO ₃ /L)	0	0	0	0
Alcalinidade (mg CaCO ₃ /L)	0	0	0	0
pH	7	-	-	-
Na ⁺	0,0001 mmol/L	0,0001 mmol/L	0,0001 mmol/L	0,0001 mmol/L
Cl ⁻	0,0003 mmol/L	0,0003 mmol/L	0,0003 mmol/L	0,0003 mmol/L
K ⁺	0,00004 mmol/L	0,00004 mmol/L	0,00004 mmol/L	0,00004 mmol/L
Ca ²⁺	0,00032 mmol/L	0,00032 mmol/L	0,00032 mmol/L	0,00032 mmol/L

4. Testes de Toxicidade com Cloreto de mercúrio (HgCl₂)

O trabalho consistiu em duas etapas: 1° - teste de toxicidade e a 2° - processo de regeneração e mobilidade, contudo nosso estudo deteve – se somente ao experimento da primeira etapa.

Foram obtidas oito planárias, as quais foram divididas duas a duas em quatro recipientes plásticos distintos. Os recipientes foram identificados como: T1, T2, T3 e T4 e preenchidos cada um com 24 mL de água destilada.

O T1 foi considerado o controle, o qual continha somente 24 mL de água, sem diluição de nenhum composto. O T2 correspondia à concentração 0,001 mg/L, na qual foram diluídos 24 mL de HgCl₂ da solução – mãe em 24 mL de água. O T3 correspondia à concentração 0,002 mg/L, na qual foram diluídos 48 mL de HgCl₂ da solução – mãe em 24 mL de água e por fim, o T4 correspondia à concentração 0,003 mg/L, na qual foram diluídos 96 mL de HgCl₂ da solução – mãe em 24 mL de água.

O período determinado para a primeira etapa foi de 96h de exposição ao metal pesado, entretanto as concentrações testadas podem ser consideradas concentrações letais (LC₅₀), pois dentro de 24h já haviam causado

danos às planárias, agindo possivelmente sobre o seu sistema nervoso e causando a desintegração dos seus tecidos, levando – as a morte celular.

Na tabela 1 é demonstrado o nível de íons, a dureza a alcalinidade da água do experimento avaliada pelos métodos descritos no tópico 2.

Resultados e discussão

Segundo, os experimentos do presente trabalho e na condição da planária como bioindicador é possível concluir que a dose de 0,001 mg/L pode ser considerada letal para determinados organismos, principalmente como vimos para as planárias e que suas consequências ocorrem de forma rápida, em curtos períodos (Figura 1.).

Seus efeitos biológicos são extremamente variados, abrangendo efeitos citológicos, reprodutivos, genotóxicos e teratogênicos. Baseando – se, na Portaria 1469/2000, do Ministério da Saúde, a qual define como concentração máxima de presença de mercúrio na água para consumo o valor de 0,001 mg/L, sendo que doses de 3 a 30 gramas podem ser fatais ao homem.

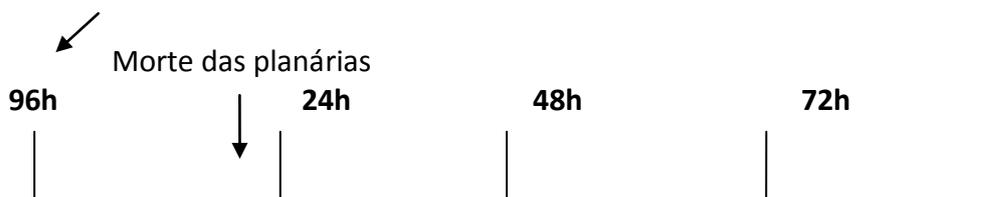


Figura 1. Esquema de procedimento de exposição das planárias intactas ao $HgCl_2$ por um período de 96h com a análise de sobrevivência e mobilidade.

Com isso, deve – se levar em consideração o alto risco do mercúrio como poluente ambiental e como reagente de uso laboratorial, devendo ser manipulado cuidadosamente evitando a contaminação dos diversos ecossistemas e a intoxicação do ser humano e dos diversos organismos presentes nesses ambientes.

Referências

BARROS, G.S.; ANGELIS,D.F., FURLAN, L.T.; CORREA JUNIOR,C.B., Utilização de Planárias da Espécie *Dugesia (Girardia) tigrina* em Testes de toxicidade de Efluente de Refinaria de Petróleo. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol**,v.1,n.1., 67 – 70, 2006.

BOYD, C.E. & TUCKER, C.S. (1992) Water Quality and Pond Soil Analysis for Aquaculture.**Alabama Agricultural Experiment Station**, Auburn University, Alabama.

CAJARAVILLE, M.P.; BENIANNI, J.M.; BLASCO, J.; PORTE,C.; SARASQUETE, C. & VIARENGO, A. The use of biomarkers asses the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Península: a practical approach. **The Scien. Total Environ.**,247: 295 – 311, 2000.

CALEVRO, F., FLIPPI, C., DERI, P., ALBERTOSI, C. & BASTISTINI, R. Toxic effects of Aluminum,

Chromium and Cadmium in intact and regenerating freshwater planarians, **Chemosph.**, 37: 651 – 659, 1998.

CARONTI, B.; MOTTA,V.; MERANTE .A; PONTIERI, F.E. & PALLADINI,G., 1999, Treatment with 6 – hidroxidopamine in *Planaria (Dugesia Gonocephala s.l.)*: Morphological and Behavioral Study. **Comp. Bioch, Phys**, Part. C., 123: 201 – 207.

GSCHEWENTNER, R., LADUNER, P., NIMETH, K., RIEGER, R. Stem cells in a basal bilaterian S-phase and mitotic cells in *Convolutriloba longifissura* (Acoela, Platyhelminthes). **Cell Tissue Research**, 304: 401 – 408 – 2001.

KNAKIEVICZ,T. & FERREIRA,B.H., Evaluation of cooper upon *Girardia Tigrina* freshwater planarians based on a set os biomarkers., **Invert. Bio.**, v.71(30: 419 – 428), 2008.

KNAKIEVICZ,T. & FERREIRA,B.H - Reproductive modes and life cycles os freshwater planarians (*Platyhelminthes, Tricladida, Paludicula*) from southern Brazil: **Invert. Bio.** 125: 212 – 221, 2006.

NASCIMENTO, I. A., PEREIRA, S. A. & LEITE M. B. N. L. Biomarcadores como instrumentos preventivos de poluição. In: ZAGATTO P. A. & BERTOLETTI E. (ed), 2006, **Ecotoxicologia aquática – Princípios e aplicações**. Ed. RiMa. São Carlos, pp. 413 – 432, 2006.

RAFFA, R.B., HOLLAND, L.J., SCHULINGKAMP, R.J., Quantitative assessment of dopamine D2 antagonist activity using invertebrate (*Planaria*) locomotion as a functional endpoint. **J. Pharma. Toxi. Methodos.** 45: 223 – 226, 2001.

RUPPERT, E.E. & BANNERS, R.D. **Zoologia dos Invertebrados**, 6º Ed. São Paulo, Roca: 200 – 235, 2006.

ZALL, D.M., FISHER, M.D., GARNER, Q.M., 1956. Photometric determination of chlorides in water. **Analytical Chemistry** 28, 1665-1678.