
ECOLOGIA

DAVI BUTTURI-GOMES

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS INSETICIDAS
MALATION E FIPRONIL SOBRE A
VIABILIDADE E REGENERAÇÃO DE *GIRARDIA
TIGRINA* (PLATYHELMINTHE, TRICLADIDA).**



Rio Claro
2008

DAVI BUTTURI-GOMES

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS INSETICIDAS MALATION E
FIPRONIL SOBRE A VIABILIDADE E REGENERAÇÃO DE *GIRARDIA*
TIGRINA (PLATYHELMINTHE, TRICLADIDA).

Orientador: PROF.^a DR.^a MARIA APARECIDA MARIN-MORALES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de
Ecólogo.

Rio Claro
2008

574.5 Butturi-Gomes, Davi
B989a Avaliação dos efeitos dos inseticidas Malation e Fipronil
sobre a viabilidade e regeneração de *Girardia tigrina*
(Platyhelminthe, Tricladida) / Davi Butturi-Gomes. –
Rio Claro: [s.n.], 2008
67 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Trabalho de conclusão (Ecólogo) – Universidade
Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Maria Aparecida Marin-Morales

1. Ecologia. 2. Ecotoxicologia. 3. Ensaio do cometa.
4. Histologia. 5. Genotoxicidade. I. Título.

“Nunca o homem inventará nada mais simples nem mais belo do que uma manifestação da natureza. Dada a causa, a natureza produz o efeito no modo mais breve em que pode ser produzido”.

(Leonardo da Vinci)

Dedico este trabalho à minha família.

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dr.^a Maria Aparecida Marin-Morales, pela orientação, ensinamentos, apoio e amizade.

Às professoras Dr.^a Dejanira de Franceschi de Angelis, Dr.^a Cassiana Maria Reganhan Coneglian e, respectivamente, aos seus alunos Diego Ken e Gilberto de Almeida, por terem tão gentilmente cedido parte do material biológico utilizado neste trabalho.

A todos os colegas do departamento e do Laboratório de Mutagênese, especialmente Jaque, Thaís, Dânia e Cintya pelas numerosas dúvidas resolvidas e pela ajuda em todas as fases do desenvolvimento do trabalho.

À Prof.^a Dr.^a Karim Christina Scopinho Furquim pelos ensinamentos e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Simões Pião pelas importantes considerações estatísticas.

À entidade financiadora deste estudo, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (processo nº 2006/07201-8), pelo apoio financeiro.

Aos meus pais Milton e Rosa, meus irmãos Daniela e Danilo, minha sobrinha Natália e meus cunhados, pela paciência, apoio e carinho.

À minha namorada Juliana Oler, pela dedicação, carinho e atenção.

Aos alunos e amigos do curso de Ecologia da turma ingressante em 2005, principalmente Carol e Clarissa, pelo companheirismo.

RESUMO

Neste trabalho foram realizados testes de toxicidade e avaliação dos efeitos sub letais dos inseticidas malation e fipronil, sobre o sistema teste de *Girardia tigrina*, usando para estas análises diversas metodologias. Para avaliação da letalidade dos produtos, planárias adultas foram expostas a diversas concentrações diferentes dos dois inseticidas. Todos os ensaios foram realizados em duplicata, mantidos ao abrigo da luz, a uma temperatura 24-26°C e tiveram a duração de 96h, com observações a cada 24h. Os resultados foram avaliados, estatisticamente, pelos testes “U” de Mann-Whitney, Spearman-Kärber, ANOVA e correlação de Pearson. Os efeitos sobre o sistema-teste, nas diferentes concentrações testadas, variaram de acordo com o tempo de exposição. A CE₅₀, dada pelo teste de Spearman-Kärber, foi de 12,5mg/L para o malation e 13,4mg/L para o fipronil. Quanto aos testes de sub letalidade, foram realizadas análises do potencial de regeneração; histológicas, para avaliação do comprometimento dos tecidos; e o “ensaio do cometa”, para detecção de dano no DNA. Os espécimes seccionados e expostos aos inseticidas demonstraram, entre outros efeitos, um retardo no desenvolvimento dos blastemas regenerativos. As análises histológicas demonstraram que planárias expostas a concentrações mais baixas dos inseticidas possuem maiores danos tanto nos tecidos como em certos tipos celulares. Por meio do ensaio do cometa, foram registrados danos significativos no DNA para todos os tratamentos, quando comparados com o teste controle. Os danos observados neste trabalho podem decorrer em alterações na reprodução, levando a uma diminuição na eficiência competitiva e, conseqüentemente, na chance de sobrevivência destes organismos.

Palavras-chave: *Girardia tigrina*, malation, fipronil, toxicidade, regeneração.

ABSTRACT

In this study were carried out toxicity tests and the evaluation of sub lethal effects of the insecticides malathion and fipronil, over the test system of *Girardia tigrina*, using for these analyses a great variety of methods. For evaluation of the lethal concentrations of the products, adult planarians were exposed to several different concentrations. All the tests were carried out in duplicate, maintained on the shelter of the light, on a temperature 24-26°C and they had the duration of 96h, with observations at each 24h. The results were statically valued by the tests "U" of Mann-Whitney, Spearman-Karber, ANOVA and Pearson correlation. The effects over the system-test, in the different tested concentrations, varied in accordance with the time of exposition. The EC₅₀ given by the test of Spearman-Karber was of 12,5mg/L for malathion and 13,4mg/L for fipronil. The evaluation of sub lethal effects was composed by analyses of the potential of regeneration; histological, for tissue damage evaluation; d; and the "comet assay", for DNA damage detection. The specimens split up and exposed to the insecticides demonstrated, between other effects, retardation in development of the regenerative blastema. The histological evaluation has shown that exposed planarians to lower concentrations of the insecticides cause more significant damage against the tissues and some specific cell types. Through the comet assay, significant damages were noticed in the DNA in all the treatments, when compared with the control group. Such damages may result in reproduction and immunity alterations, which reduce the competitive efficiency and, consequently, the survival chances of these organisms.

Keywords: *Girardia tigrina*, malathion, fipronil, toxicity, regeneration.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	09
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Materiais.....	17
3.1.1 Material Biológico.....	17
3.1.2 Inseticidas e Reagentes.....	17
3.2 Métodos	18
3.2.1 Avaliação das concentrações letais.....	18
3.2.2 Avaliação dos efeitos sobre a regeneração	19
3.2.3 Avaliações histológicas dos tecidos e células.....	21
3.2.3.1 Técnica da hematoxilina-eosina	22
3.2.3.2 Técnica do PAS-azul de Alcian	22
3.2.3.3 Técnica do PAZ-azul de bromofenol.....	22
3.2.3.4 Técnica da Reação de Feulgen	23
3.2.4 Avaliação dos danos sobre o DNA	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5. CONCLUSÃO.....	33
6. REFERÊNCIAS.....	64

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

	Página
Tabela 1	20
Tabelas 2 e 3.....	34
Tabela 4	35
Tabela 5	36
Tabela 6	37
Tabela 7	38
Figura 1	19
Figura 2	21
Figuras 3 a 8	39
Figuras 9 a 14	40
Figuras 15 a 18	41
Figura 19	42
Figura 20	43
Figura 21	44
Figura 22	45
Figura 23	46
Figura 24	47
Figura 25	48
Figura 26	49
Figura 27	50
Figura 28	51
Figuras 29 e 30	52

Figura 31	53
Figura 32	54
Figura 33	55
Figuras 34 e 35	56
Figuras 36 e 37	57
Figuras 38 e 39	58
Figura 40	59
Figuras 41 e 42	60
Figuras 43 e 44	61
Figuras 45 e 46	62
Figura 47	63

1. INTRODUÇÃO

O uso de substâncias químicas para controlar doenças, pragas e plantas daninhas da agricultura teve seu início no final do século XIX, mas, somente após a Segunda Guerra Mundial essa prática seguiu critérios mais científicos (LORENZI, 1990).

Todos os agrotóxicos têm a propriedade comum de bloquear um processo metabólico vital de organismos indesejáveis, para os quais são tóxicos. Estas substâncias químicas agem diretamente nestes organismos, eliminando-os ou controlando-os de alguma maneira, como, por exemplo, interferindo em seu processo reprodutivo (BAIRD, 2002).

O uso de pesticidas constitui, atualmente, a principal estratégia da agricultura para o combate e a prevenção de pragas agrícolas, garantindo alimento em quantidade suficiente e de qualidade superior para a população.

Muitos trabalhos têm revelado a presença de níveis alarmantes de agrotóxicos nos ecossistemas (PARSONS e WITT, 1989). São registrados acúmulos significativos de agrotóxicos no solo, na água, no ar, nas plantas e nos animais. Os impactos desses produtos sobre a biota do solo variam de acordo com as características do químico, as características físicas do ambiente e o tipo de microflora associada (GRISOLIA, 2005).

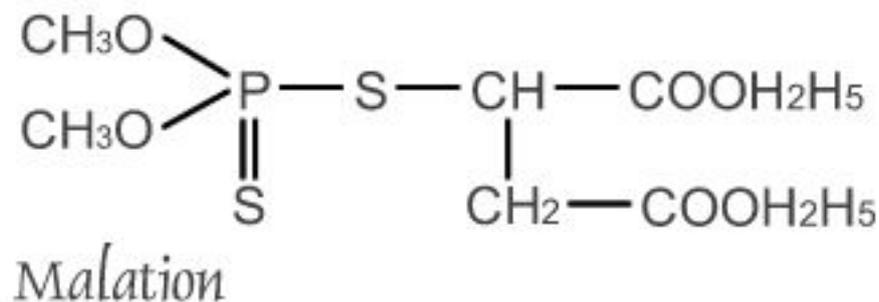
Em relação à água, embora a agricultura seja apenas uma das inúmeras fontes não-pontuais de poluição, geralmente é apontada como a maior contribuinte de todas as categorias de poluentes (EDWIN, 1996). Uma vez na água, dependendo das características físico-químicas, o resíduo do agrotóxico pode tanto se ligar ao material particulado em suspensão, como se depositar no sedimento bentônico ou ainda ser absorvido, podendo então ser detoxicado ou acumulado (TUNDISI, 1990).

Os produtos químicos utilizados na agricultura podem chegar aos rios carreados pelas chuvas, por despejos industriais e urbanos e por assoreamento do solo (YAMAGISHI et al., 1981; OYHAMA et al., 1986). Para Eduards (1973), os agrotóxicos alcançam os ambientes aquáticos por aplicação intencional ou por deriva e escoamento superficial, a partir de áreas que sofreram aplicações diretas desses produtos.

Os agrotóxicos presentes em corpos d'água podem penetrar nos sistemas biológicos, pela transferência indireta, via cadeia alimentar, ou diretamente, quando ingeridos diretamente junto com os alimentos ou associados ao material particulado em suspensão. Organismos aquáticos podem acumular os agrotóxicos em concentrações muito acima daquelas encontradas nas águas em que vivem (NIMMO, 1985).

Dados de Crestana (2000) indicam que o Brasil ocupa hoje o quarto maior mercado de pesticidas mundial e o oitavo em uso por área cultivada, distribuindo no ambiente aproximadamente 150.000 toneladas ao ano. Dentre os químicos mais usados na agricultura, temos os herbicidas e os inseticidas.

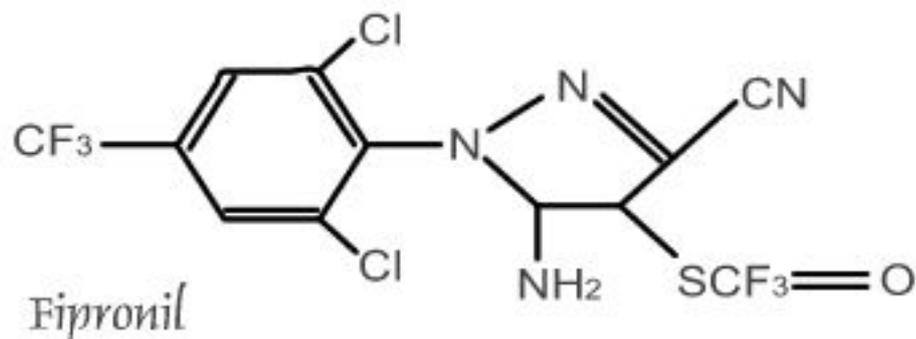
O malation, um potente inseticida, se caracteriza por ser um líquido âmbar amarelado, tão solúvel em água quanto em solventes orgânicos (coeficiente K_{ow} muito semelhante em ambos) e de fórmulas empírica $C_{10}H_{19}O_6PS_2$ e estrutural como indica a figura abaixo (LOURIVAL, 1999; REEVE *apud* ZAGATTO, 2006).



Este inseticida parece inibir a ação da acetilcolinesterase, uma enzima que se liga à molécula de acetilcolina, causando perturbações nos sistemas nervoso autônomo, periférico e central e do músculo esquelético (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003). O composto atinge a atmosfera pelos mais variados tipos de aplicação e é, comumente, usado nas culturas de algodão, arroz, citros e tomate, podendo atingir ambientes aquáticos, nos quais, segundo Enrich-Prast (2006), diminui as taxas de nitrificação em curto prazo, por acometimento de populações de bactérias, quando expostas a concentrações maiores que 5µg/L. Além da contaminação ambiental citada, o inseticida persiste ao longo da cadeia alimentar de forma acumulativa. O malation entra no organismo pelas vias respiratórias e cutânea, e é também absorvido no intestino. Este inseticida promove alteração e inibição de certas enzimas do fígado de peixes, com conseqüentes deformações destes organismos. Nas concentrações de 0,1-5 ppm podem ocasionar mortes e também inibir o

crescimento de algas. Nos sistemas orgânicos, o malation se degrada em 24 horas, sendo expulso pela via urinária (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

O fipronil é um inseticida pertencente ao grupo químico fenil pirazol, sendo considerado como tóxico da classe II (altamente tóxico). A composição química da substância é 5-amino-1-(2,6-dicloro- α - α - α -trifluor-p-tolil)-4-triflurometilsulfinil-pirazol-3-carbonitrila e sua fórmula estrutural se apresenta na figura abaixo (LOURIVAL, 1999).



Este inseticida entra no organismo por ingestão e por via cutânea, com conseqüências que variam de espécie para espécie. O inseticida se liga ao canal de Cloro e bloqueia sua ativação pelo ácido gama-aminobutírico (GABA), uma substância que controla o fluxo de íons Cl^- , através da membrana da célula nervosa. Dessa forma, a ausência da inibição sináptica causa uma hiperexcitação do sistema nervoso central (SNC), o que leva o organismo à morte. Estes efeitos de envenenamento do SNC, que se dá pelo antagonista neurotransmissor inibitório GABA, ocorrem quando o ácido é liberado nas terminações nervosas pré-sinápticas e se liga ao receptor da proteína pós-sináptica, pelo canal de cloro intrínscio. Quando o GABA se liga ao receptor, o canal é aberto, os íons Cl^- fluem para dentro do neurônio pós-sináptico. Esta permeabilidade ao cloro pode hiperpolarizar o potencial de membrana, promovendo uma diminuição do impulso nervoso estimulado (BLOOMQUIST, 2000).

Esse inseticida é largamente usado, no Brasil, nas culturas de algodão, arroz, batata, cana-de-açúcar, cevada, feijão, milho, pastagens, soja e trigo, mas, pelo alto grau de toxicidade registrado em organismos expostos, tem seu uso proibido na Europa.

Com a freqüente exposição dos ambientes naturais e, conseqüentemente, dos seres vivos a uma variedade cada vez maior de substâncias químicas e agentes promotores de anormalidades, tem sido necessária a intensificação no

desenvolvimento de testes utilizando os mais variados organismos, para se analisar, mais amplamente, as possíveis atuações desses elementos sobre a biota.

As planárias são Platelmintos de vida livre, pertencentes ao grupo dos turbelários. Segundo Ball (1974), as planárias pertencem a três famílias distintas (Dendrocoelidae, Dugesiidae e Planariidae) e a quinze diferentes gêneros (Dendrocoelidae: *Baikalobia*, *Bdellocephala*, *Dendrocoelopsis*, *Dendrocoelum*, *Neodendrocoelum* e *Proctyla*; Dugesiidae: *Dugesia*, *Girardia* e *Schimidtea*; Planariidae: *Atrioplanaria*, *Crenobia*, *Phagocata*, *Plagnolia*, *Planaria* e *Polycelis*). As planárias apresentam reprodução assexuada ou sexuada, embora em algumas espécies a reprodução pode se dar por ambas as formas (HYMAN, 1951). Segundo Baguña & Romero (1981), que estudaram as espécies *Girardia tigrina* e *G. mediterrânea*, as planárias possuem 13 tipos básicos de células: neoblastos, nervosas, epidérmicas, parenquemas, gastrodérmicas, caliciformes, células do rabdito, musculares, células de pigmentação, células-flama, basófilas, listradas e acidófilas, sendo que os neoblastos representam o tipo mais freqüente nesses animais (cerca de 30%). Esses mesmos autores também quantificaram as células dos indivíduos e estabeleceram uma relação diretamente proporcional entre o comprimento do corpo e o número de células que eles apresentam.

As planárias são encontradas em córregos, lagos e lugares úmidos e apresentam uma grande capacidade de regeneração (WATERMOLEN, 2005). O processo regenerativo em planárias é sempre uma resposta a uma dada lesão (NEEDHAM, 1952 *apud* REDDIEN & SANCHÉZ-ALVARADO, 2004). É possível identificar duas formas de regeneração nas planárias, a morfolaxia e a epimorfose. A primeira se refere ao remodelamento de tecidos existentes, por meio da migração de células; a segunda inclui a formação de novos tecidos por meio de proliferação mitótica e especialização de células indiferenciadas (MORGAN, 1901 *apud* REDDIEN & SÁNCHEZ-ALVARADO, 2004). Os fatores que induzem a um ou a outro processo regenerativo nas planárias são desconhecidos, embora existam indícios de que o epitélio turbelário pode ser uma fonte desses estímulos (CHANEBOIS; BAGUÑA; KATO, *apud* REDDIEN & SANCHEZ-ALVARADO, 2004). Entretanto, alguns autores afirmam que ambos os processos agem conjuntamente para completar a regeneração, principalmente quando a lesão é alguma forma de amputação. Durante uma secção, inicialmente o animal procura se esquivar do agente que o lesa, possivelmente se tratando de um reflexo para evitar um predador

potencial. Ocorre uma forte contração muscular no ponto da amputação e, em alguns minutos, por meio da morfolaxia as perdas de tecidos são contidas com a produção de uma camada mucosa, esta que, segundo Reisinger & Kelbetz (1964) *apud* Reddien & Sanchez-Alvarado (2004), possui, possivelmente, funções imunológicas. No período de 5 a 12 horas depois da amputação, ocorre um pico mitótico. Próximo ao local da lesão, verifica-se a formação de uma porção epidérmica e/ou mesenquimal sem pigmentação, conhecida como blastema (SALÓ & BAGUÑA, 1984 *apud* REDDIEN & SANCHEZ-ALVARADO, 2004). O blastema é de fato o material regenerante das planárias e é constituído de células indiferenciadas (neoblastos) que se proliferam por mitose e que migram até o local.

Experimentos realizados por Dubois (1949) e Bardeen & Baetjer (1904) *apud* Reddien & Sanchez-Alvarado (2004) demonstraram, por meio da exposição de planárias a raios gama antes e durante a regeneração, que tanto a proliferação quanto a migração são indispensáveis para que ocorra o processo regenerativo e que os animais podem morrer, caso os blastemas não atinjam o estágio de regeneração completa. Kalafatic et al. (2003), em experimentos de exposição das planárias a concentrações de 100µM, 10µM e 1µM de cádmio, registraram um decréscimo na divisão mitótica dos neoblastos, o aparecimento de aberrações cromossômicas, além de mortalidade, nas primeiras 24 horas, em mais de 40% dos indivíduos expostos a concentração de 100µM de Cd²⁺. O ensaio do cometa realizado por Guecheva et al. (2001) e por Prá et al. (2006) com planárias da espécie *Girardia schubarti*, expostas a sulfato de cobre, demonstrou um aumento do dano no DNA, de forma concentração-dependente, como também registrado por Horvat et al. (2005), quando expuseram planárias da espécie *Polycelis felina* ao herbicida norflurazon.

Estudos citogenéticos e de conteúdo nuclear apontam um número cromossômico de 2n=16 e um valor C de 3,76pg, para a espécie *G. tigrina* (Ibas et al., 1989, *apud* ALVAREZ, 1996; GREGORY et al., 2000; BENYA et al., 2007).

As planárias, por apresentarem regeneração com conseqüente formação de blastemas regenerativos, a partir de divisão mitótica dos neoblastos (BRONSTED, 1969; TESHIROGI, 1986; SÁNCHEZ-ALVARADO, 2006), constituem um organismo com grande vantagem para utilização em testes de toxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e teratogenicidade.

Um grande número de técnicas para detectar o dano no material genético (micronúcleo, mutações, aberrações cromossômicas, entre outras técnicas) tem sido usado para visualizar efeitos biológicos resultantes da ação de substâncias. Entretanto, muitas dessas técnicas possuem limitações como dificuldade de aplicação e baixa sensibilidade.

Uma abordagem mais eficaz para se experimentar a genotoxicidade é o “ensaio do cometa”, também chamado “single cell gel” (SCG) (TICE et al., 2000). Trata-se de um teste sensível e rápido para a detecção da genotoxicidade potencial de agentes químicos ou físicos, utilizando células em suspensão, dissociadas, lisadas e eletroforisadas. Esta técnica possui várias “versões”, mas todas consistem na passagem de uma corrente elétrica por células lisadas, deslocando o DNA que se apresenta fragmentado, para fora do nucleóide (FAIRBAIRN et al., 1995; COTELLE & FÉRARD, 1999; JHA, 2008).

Ao longo do tempo, métodos diferentes de eletroforese foram descritos por alguns autores, que resultaram na técnica do Cometa. A primeira versão do ensaio foi introduzida por Östling & Johanson, em 1984, constituindo uma técnica microeletroforética para visualização direta de DNA danificado em células individuais. Nessa técnica, células embebidas em agarose são colocadas em uma lâmina para microscopia, lisadas em detergente e alta concentração salina. Nestas condições, o DNA livre é eletroforisado em condições de pH neutro. As células cujo DNA apresentou alta frequência de quebras de fita dupla, tomam a forma de um “cometa”. A cauda do cometa é, na verdade, as porções quebradas do DNA que migram em direção ao anodo (FAIRBAIRN et al., 1995; COTELLE & FÉRARD, 1999; TICE et al., 2000).

Subseqüentemente, foi introduzida outra técnica de microgel envolvendo eletroforese sob condições alcalinas (pH > 13), para detectar os danos sobre o DNA. Trata-se do protocolo de Singh et al. (1988) *apud* Tice et al. (2000), que, por meio do desenvolvimento do ensaio sob tais condições, demonstrou danos no material genético, devido a quebras de fita simples, quebras associadas com sítios de reparo, cuja ação foi incompleta, e sítios acalaliláveis, que são os efeitos provocados pela maior parte das substâncias genotóxicas.

Assim como nas versões neutras, a versão alcalina visa quantificar o dano no DNA pelo tamanho da “cauda” do cometa e pela intensidade da fluorescência, por

observações diretas ou pela análise de imagens (FAIRBAIRN et al., 1995; COTELLE & FÉRARD, 1999; TICE et al., 2000; JHA, 2008).

Uma série de vantagens ao se utilizar o ensaio do cometa, ao invés de outros testes de genotoxicidade, é apontada por Tice et al. (2000), como: alta sensibilidade para detectar baixos níveis de danos no DNA; necessidade de poucas células por amostra; flexibilidade do teste; baixo custo; facilidade de aplicação; geração de poucos resíduos; rapidez no desenvolvimento de cada experimento.

O teste do cometa é utilizado em diversas áreas das ciências biológicas, como a clínica, biologia da radiação, monitoramento humano, toxicologia genética e ecotoxicológica, fazendo-se necessária a ampliação, principalmente, nos estudos com organismos que ainda não têm respostas conhecidas frente à ação tóxica de poluentes ambientais (COTELLE & FÉRARD, 1999).

2. OBJETIVOS

Tendo em vista que os agrotóxicos podem afetar diversos organismos, acometer a sua reprodução e até mesmo leva-los à morte, este trabalho teve como objetivo:

- Investigar as concentrações letais dos inseticidas malation e fipronil sobre o sistema biológico de *Girardia tigrina* (planária);
- Estimar os efeitos de concentrações sub-letais dos produtos sobre a regeneração da planária;
- Avaliar os danos promovidos por concentrações sub-letais sobre as células e tecidos do animal, por meio de análises histológicas;
- Avaliar o dano no DNA desse organismo, por meio do ensaio do cometa.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Material Biológico

O material biológico utilizado neste trabalho constituiu de *Girardia tigrina* (planária), mantido em criadouros (recipientes de vidro) no Laboratório de Mutagênese do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, SP. Para manutenção do plantel, os animais foram alimentados duas vezes por semana com fígado bovino.

3.1.2 Inseticidas e Reagentes

- O inseticida malation utilizado nos testes, refere-se ao produto comercial 500 CE (concentrado emulsionável), pertencente ao grupo químico dos organofosforados. A concentração do composto ativo (CA), denominado malationa, recomendada para aplicação de campo é 1500 mg/L, a qual foi utilizada como referência inicial para o desenvolvimento dos testes.
- O fipronil, por ser um inseticida muito utilizado no Brasil e proibido na Europa, foi utilizado neste trabalho para avaliação de sua toxicidade sobre o organismo teste *G. tigrina*. Os testes foram desenvolvidos utilizando-se primeiramente a concentração indicada para aplicação em campo (1250 mg/L) e, a partir dela, foram estabelecidas as concentrações letais (CE50) e as sub-letais para *G. tigrina*.
- O metil-metano sulfonato (MMS) é um ácido sulfônico muito utilizado na produção de solventes e no controle populacional de insetos e mamíferos considerados praga. Neste trabalho, o produto foi utilizado como controle positivo dos testes realizados, pela reconhecida ação tóxica sobre organismos-testes. A fórmula deste produto comercializado pela Sigma Aldrich Biotechnology é $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{CH}_3$.
- A tripsina, na concentração de 0,4% diluída em água deionizada, foi usada para romper a ligação entre as células, promovendo assim uma dissociação celular.

- A agarose comum foi utilizada para realizar a pré-gelatinização das lâminas que foram utilizadas para o ensaio do cometa. A solução é uma mistura de 3g de Agarose em 200mL de PBS.
- A agarose LMP (agarose de baixo peso) foi utilizada para concentrar a suspensão celular sobre as lâminas pré-gelatinizadas. Trata-se de uma solução de 0,25g de Agarose LMP dissolvida em 50mL de PBS.
- A solução estoque de lise pH10 foi utilizada para o preparo da solução de lise final. Trata-se de uma mistura de 146,1g de NaCl, 37,2g de EDTA-titriplex 100mM, 1,2g de Tris 10mM 890mL de água deionizada.
- A solução de lise final foi usada para romper as membranas celulares e eliminar o citoplasma. Esta solução é constituída de uma mistura de 1 mL de Triton X-100, 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e 89mL de Solução Estoque de Lise.
- O tampão de eletroforese foi utilizado na cuba de eletroforese para permitir a passagem da carga elétrica adequada, durante o ensaio do cometa. É uma solução de 5mL de EDTA-titriplex 200mM, 30mL de NaOH 10N e 1000mL de água deionizada a 4°C.
- A solução de neutralização Tris pH7,5 foi utilizada para lavagem das lâminas, após a exposição na cuba de eletroforese. Trata-se de uma mistura de 48,5g e 950mL de água deionizada.
- O brometo de etídio, sob a concentração de 0,002mg/mL em água deionizada, é um corante fluorescente que foi utilizado na coloração das lâminas analisadas em microscópio. O produto utilizado foi o comercializado pela Sigma Aldrich Biotechnology.

3.2 Métodos

3.2.1 Avaliação das concentrações letais do malation e do fipronil

Para avaliação das concentrações letais do malation, planárias adultas foram expostas a diversas concentrações do inseticida. O número total de indivíduos utilizados para a realização das experimentações foi de 528, sendo 8 para cada controle (positivo e negativo) e 8 para cada uma das 10 concentrações testadas (1500¹; 500; 300; 30; 10,5; 10; 9,5; 8,5; 7,5 e 5 mg/L)². Todos os ensaios foram

¹ Concentração recomendada para utilização do malation em campo.

² As concentrações escolhidas são representativas de ensaios preliminares de padronização.

realizados em duplicata, mantidos ao abrigo da luz, com temperatura variando entre 24°C e 26°C e tiveram a duração de 96 horas. Os resultados foram obtidos pela tripla repetição dos testes (I, II e III) para as 10 concentrações testadas. Todos os resultados foram avaliados estatisticamente pelos testes “U” de Mann-Whitney e de Spearman-Karber.

Para avaliação das concentrações letais do fipronil, planárias adultas foram expostas a diversas concentrações do inseticida. O número total de indivíduos utilizados para a realização das experimentações foi de 176, sendo 8 para cada controle (positivo e negativo) e 8 para cada uma das 10 concentrações testadas (1250³; 125; 25; 20,7; 17,7; 16,6; 12,5; 11,8; 7,9; 1,25 mg/L)². Todos os ensaios foram realizados em duplicata, mantidos ao abrigo da luz, com temperatura variando entre 24°C e 26°C e tiveram a duração de 96h. O teste único realizado foi avaliado estatisticamente pelo teste de Spearman-Karber.

3.2.2 Avaliação do efeito de concentrações sub-letais do malation e do fipronil sobre a regeneração de planárias

Definidas as maiores concentrações não letais dos produtos (8mg/L para o malation e 7,9mg/L para o fipronil), elas foram utilizadas para a obtenção de mais outras 2 concentrações subseqüentemente menores, para se estimar os efeitos destas concentrações não letais dos produtos sobre a regeneração do organismo testado (Tabela 1). A regeneração foi estimulada por meio de secções transversais na Prefaringe, porção do aparelho digestório, que fica situada logo abaixo da cabeça (Figura 01).

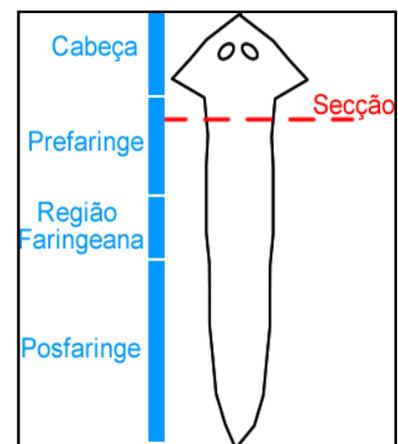


Figura 01: esquema representativo da planária e localização das porções do aparelho digestório e da secção transversal realizadas.

³ Concentração recomendada para utilização do fipronil em campo.

Tabela 1: Concentrações sub-letais dos inseticidas Malation e Fipronil utilizadas nos testes com porções regenerantes, nas avaliações histológicas e no Ensaio do Cometa para o organismo teste *Girardia tigrina*

Inseticidas (mg/L)	Porções Regenerantes	Avaliações Histológicas	Ensaio do Cometa
<i>Malation 8,0</i>	X	NA	NA
<i>Malation 0,8</i>	X	X	X
<i>Malation 0,08</i>	X	X	X
<i>Fipronil 7,9</i>	X	NA	NA
<i>Fipronil 0,79</i>	X	X	X
<i>Fipronil 0,079</i>	X	X	X

NA: Concentração não avaliada

X: Concentração avaliada

Para os ensaios com os inseticidas testados neste trabalho, foram utilizados 132 indivíduos, assim distribuídos: 84 para o teste tipo “a”; 48 para o teste tipo “b”, como segue:

a) Planárias submetidas às concentrações sub-letais, por um período contínuo de 96 horas. Nestes experimentos, para cada inseticida, 6 dos 12 indivíduos testados, divididos igualmente em duas réplicas, após a secção, permaneceram nos recipientes com as mesmas concentrações dos inseticidas, por um período de 72 horas. Os 6 indivíduos restantes foram, após a secção, colocados em recipiente com água mineral, também por 72 horas (teste de recuperação). Os 6 espécimes utilizados para os controles negativos foram expostos somente à água mineral por 96h. Após esse período, os indivíduos foram seccionados e foram avaliados, quanto ao seu potencial de regeneração, e novamente mantidos por mais 72h em água mineral. Assim, para se avaliar comparativamente a formação dos blastemas regenerativos, todos os espécimes foram monitorados e fotografados, sob lupa, com aumento máximo de 120x, em intervalos de 24h (Figura 02-A).

b) Planárias retiradas do criadouro foram mantidas em água mineral e alimentadas por 3 dias consecutivos, seguido de jejum por 24 horas. Neste teste, 18 indivíduos, dos 24 testados, divididos igualmente em duas réplicas, foram seccionados e submetidos às diferentes concentrações testadas de cada inseticida, nos quais 6 indivíduos foram expostos à concentração não letal mais alta (C1); 6 à concentração 2 (diluição de 1:1 da concentração 1 em água – V/V);

e 6 à concentração 3 (diluição 1:1 da concentração 2 em água – V/V). Os 6 indivíduos restantes, após secção, permanecem em água mineral (controle negativo). As porções regenerantes foram monitoradas e fotografadas durante 72h, sob lupa, com aumento máximo de 120x, a cada 24 horas (Figura 02-B).

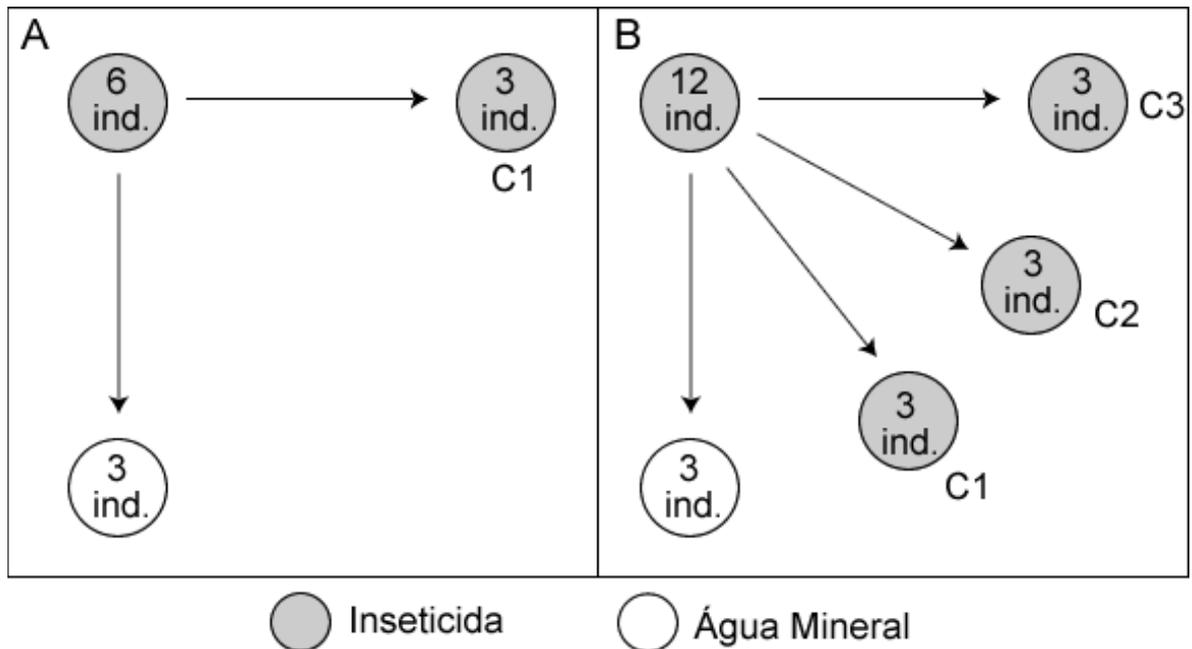


Figura 02: Sistemas de exposição utilizados. A: O esquema representa a seqüência de eventos que constituem o experimento “a” (no exemplo, estamos representando apenas 1 das 2 réplicas realizadas). B: O esquema representa a seqüência de eventos que constituem o experimento “b”, também ilustrando apenas 1 das réplicas. C1, C2, C3 = concentrações testadas.

3.2.3 Avaliação histológica do efeito de concentrações sub-letais do malation e do fipronil sobre os tecidos

Foram avaliadas duas concentrações sub-letais dos inseticidas malation e fipronil (Tabela 1) para estimar os danos causados sobre os tecidos do organismo testado. Nestes experimentos, após exposição prévia por 96h às concentrações, as planárias foram seccionadas, transversalmente, na região da Prefaringe (Figura 01). Após a secção, as porções regenerantes foram novamente expostas às concentrações acima citadas, por mais 72h. As porções regenerantes foram, então, fixadas em paraformaldeído por 24h, seguido de um banho em tampão fosfato de sódio pH7,4, por mais 24h. Após este processo, o material foi desidratado em concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90%

e 95%), em banhos de 15 minutos cada, transferidos para resina de embebição (marca Leica), incluído e seccionado. O material foi seccionado em cortes com espessura de 3 µm, que foram recolhidos em lâminas de vidro e processados em diferentes técnicas histológicas.

3.2.3.1- Técnica da hematoxilina de Harris-eosina aquosa

As lâminas contendo os cortes foram embebidos em água destilada por 1 minuto, para hidratação, sendo posteriormente coradas por 10 minutos em hematoxilina e lavadas em água. Na seqüência, foram coradas com eosina, por 10 minutos, sendo novamente lavadas e secas. As lâminas foram montadas em bálsamo do Canadá, para posterior observação ao microscópio de luz.

3.2.3.2- Técnica conjugada PAS (Ácido Periódico-Schiff)-azul de Alcian

A técnica conjugada PAS-azul de Alcian detecta a presença de polissacarídeos totais, pela reação do PAS e polissacarídeos ácidos por meio do azul de Alcian.

As lâminas contendo as secções permaneceram por 30 minutos em solução de azul Alcian 1% diluído em Ácido Acético 3%. O material foi lavado em água destilada e submetido ao ácido periódico 1% durante 5 minutos. Na seqüência, as lâminas passaram pelo reativo de Schiff por 15 minutos e, em seguida, foram lavadas em água corrente por 10 minutos. A montagem final foi executada em bálsamo do Canadá, para posterior observação ao microscópio de luz.

3.2.3.3- Técnica conjugada PAS (Ácido Periódico-Schiff)-azul de bromofenol

Esta técnica detecta polissacarídeos totais pela reação do PAS e proteínas totais, por meio da reação com o azul de bromofenol.

As lâminas contendo as secções foram submetidas ao ácido periódico 1% por 15 minutos e, em seguida, deixadas em água corrente durante 5 minutos. Na seqüência, o material permaneceu em reativo de Schiff durante 10 minutos, sendo, posteriormente corado com azul de bromofenol por 15 minutos. Na seqüência, o material foi submetido ao ácido acético 0,5%, por 5 minutos, e lavado em água corrente durante 3 minutos. A montagem final foi elaborada em bálsamo do Canadá, para posterior observação ao microscópio de luz.

3.2.3.4- Técnica da Reação de Feulgen

As lâminas contendo os cortes histológicos foram hidrolisadas por 11 minutos em solução de HCl 1N a 60°C. Na seqüência, o material foi lavado em água destilada, submetido ao reativo de Schiff por 2 horas e lavado, por 5 minutos, em água corrente. Em seguida, os cortes foram contra-corados com eosina aquosa durante 5 minutos e lavados em água corrente. Após secas, as lâminas foram montadas em Balsamo do Canadá, para posterior observação ao microscópio de luz.

3.2.4 Avaliação do efeito genotóxico de concentrações sub-letais do malation e do fipronil por meio do ensaio do cometa

Foram avaliadas duas concentrações sub-letais dos inseticidas malation e fipronil para estimar os danos causados sobre o DNA (Tabela 1). Nestes experimentos, após exposição prévia por 96h às concentrações, os tecidos das planárias foram dissociados, tanto mecânica quanto quimicamente, para obtenção de uma suspensão celular, como descrito por Guecheva et al. (2001). A dissociação mecânica consistiu em macerar 4 indivíduos, transferidos diretamente do tratamento com o auxílio de um pincel a uma gaze dupla, colocada sobre tubo eppendorf previamente umedecida com 100 µL de Tripsina 0,4% a 37°C. Após a maceração, a gaze foi lavada com 300 µL de Tripsina 0,4% a 37°C. A suspensão celular obtida foi, imediatamente, misturada com agarose LMP, na proporção de 1:5 V/V. Essa mistura foi espalhada em lâminas pré-gelatinizadas com agarose comum, cobertas com lamínula e, após esse procedimento, dispostas em freezer a 4°C para solidificar. Após a solidificação, as lamínulas foram retiradas para realizar a lise das células, com a solução de lise final por, pelo menos, 1 hora em geladeira. As lâminas foram dispostas em cuba horizontal de eletroforese e cobertas com o tampão de eletroforese durante 20 minutos, para relaxamento. Para ser processada a eletroforese, o aparelho foi calibrado para 25V e 300mA. Após 20 minutos de corrida de eletroforese, as lâminas foram lavadas com solução de neutralização por 3 banhos de 5 minutos cada. Após secagem, as lâminas foram coradas com brometo de etídio, cobertas com lamínula e observadas sob microscópio de epifluorescência. Os controles positivos desses experimentos consistiram em expor a mistura de Agarose LMP e suspensão celular à radiação UV, durante 10 minutos. O ensaio do cometa foi

repetido 3 vezes. Os resultados foram analisados, estatisticamente, pelo teste de ANOVA (método de Bonferroni com nível de significância $\alpha=0,025$) e pela Correlação de Pearson (nível de significância $\alpha=0,05$), para avaliar a relação dose-resposta entre os tratamentos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os testes realizados com os inseticidas malation e fipronil apresentaram resultados semelhantes, indicando um alto grau de comprometimento que estes produtos promovem nos organismos expostos, o que reforça a capacidade desses inseticidas de contaminar o ambiente, como é esperado para todos os agrotóxicos.

Para o desenvolvimento dos testes de avaliação letal e sub-letal, para os dois inseticidas, foram utilizados um total de 933 espécimes de *Girardia tigrina*. Esse alto número de indivíduos utilizados justifica-se pela necessidade que tivemos de padronizar os testes, uma vez que não foram encontradas citações na literatura relacionada à área da Ecotoxicologia, referente à toxicidade destes inseticidas sobre planárias adultas. Durante o desenvolvimento dos experimentos, procurou-se reduzir, ao máximo, o número de indivíduos utilizados, sem, contudo, comprometer a credibilidade dos resultados obtidos.

Os controles positivos, realizados com MMS, nas concentrações de 0,4mM, 0,2mM e 0,1mM, tiveram 100% de mortalidade para todos os testes realizados. Os testes controles negativos foram desenvolvidos em água mineral, pH 4,3, e propiciaram 100% de sobrevivência dos espécimes.

As Tabelas 2 e 3 registram os dados de sobrevivência e a porcentagem de mortalidade dos espécimes, após 96 horas, para as 10 concentrações do malation nos Testes I, II e III, bem como nas 10 concentrações de fipronil no único teste realizado. Com os resultados obtidos, no fim dos ensaios, para ambos os inseticidas, pode-se concluir que um único experimento é suficiente para determinação da toxicidade dos produtos, não havendo necessidade de repetições, como foi realizado para os testes com o malation. A credibilidade de testes únicos justifica-se pela própria característica do teste estatístico utilizado (Spearman-Karber), que não considera o número de repetições realizadas, mas sim os ensaios realizados com concentrações diferentes. Desta forma, os resultados únicos, quando avaliados pelo teste de Spearman-Karber, apresentam a mesma precisão que testes múltiplos, dispensando-se a necessidade das repetições para os ensaios com o inseticida fipronil.

As diferentes concentrações testadas do malation e do fipronil mostraram um efeito sobre o sistema-teste que variou de acordo com o tempo de exposição (Figuras de 3 a 8 para o malation e Figuras de 9 a 14 para o fipronil). Os resultados dos ensaios realizados com malation mostraram que as concentrações menores que 8,0 mg/L não foram tóxicas para os espécimes de *G. tigrina*, apresentando resultados não significativos pelo teste “U” de Mann-Whitney ($p=0,0833$). Os testes realizados com concentrações maiores que 30,0 mg/L apresentam resultados estatisticamente significativos, quando comparados com o controle negativo ($p=0,0055$).

A concentração letal média para 50% da população, estimada pelo teste de Spearman-Kärber, para o malation, foi de 12,5 mg/L. O intervalo de confiança de 95% tem como limites inferior e superior de 10,0 mg/L e 15,8 mg/L, respectivamente. Os valores encontrados para a concentração letal para 50% da população (CE₅₀ 96h), para os Testes I, II e III, foram de 12,4 mg/L, 12,2 mg/L e 12,9 mg/L, respectivamente. Estes resultados possuem um intervalo de confiança de 95%, com limites inferior e superior, respectivamente, de 10,1mg/L e 15,3 mg/L para o Teste I; 9,5 mg/L e 15,8 mg/L para o Teste II e 10,3 mg/L e 16,2 mg/L para o Teste III (Tabela 4). As diferentes respostas observadas para as diversas concentrações testadas são, provavelmente, devido às características individuais dos espécimes utilizados ou das pequenas diferenças de concentração decorrentes das diferentes preparações. Estes dados reforçam a citação de Bueno et al. (1997) que também obtiveram diferentes respostas entre indivíduos de mesmo tamanho, quando realizaram testes de regeneração com estes organismos-testes.

O Teste único realizado com o fipronil indicou, pelo teste estatístico de Spearman-Kärber, que a CE₅₀ 96h deste inseticida, para a espécie *G. tigrina*, é de, aproximadamente, 13,4mg/L (intervalos de confiança de 95% e limites superior e inferior 15,1mg/L e 11,9mg/L, respectivamente) (Tabela 4).

Segundo Zagatto (2006), a resposta de sobrevivência (ou mortalidade) dos organismos vivos, frente à ação tóxica de uma substância, pode ser representada, graficamente, por uma curva sigmóide. Além disso, é possível realizar uma transformação linear dos dados, que, plotados, geram uma reta (com uma inclinação específica que, se comparada com a inclinação dada pela ação de outras substâncias, estima a semelhança dos mecanismos e a velocidade de ação dos produtos) e duas curvas de intervalos de confiança (superior e inferior). Com as

curvas obtidas se estima a CE_{50} , pois é neste ponto do gráfico (50% de mortalidade) que se obtém uma proximidade maior entre as duas curvas, cujos intervalos menores oferecem informações de menor variação. Os resultados obtidos nos nossos ensaios, mostrados nas Figuras 15 e 16, corroboram as afirmações de Zagatto (2006), quando analisamos a curva de concentração-resposta do inseticida malation sobre o sistema de *G. tigrina*. Os nossos resultados são próximos do padrão sigmóide de resposta esperada. A transformação linear dos dados apresenta intervalos de confiança bem visualizados, mostrando discordância com os resultados obtidos pelo teste de Spearman-Kärber. Entretanto, a curva sigmóide, referente à concentração-resposta esperada do fipronil (Figuras 17 e 18), não foi muito adequada aos padrões esperados, fato que, segundo o mesmo autor, pode estar ligado a alguma propriedade química do próprio produto. Quando comparamos a ação dos inseticidas pela linearização dos dados, observamos que, apesar do malation parecer ser mais tóxico, por apresentar menor valor de CE_{50} , o fipronil parece agir mais rapidamente nos organismos, pois o acréscimo de, por exemplo, 1mg/L em uma dada concentração do fipronil causa um maior comprometimento dos espécimes do que o acréscimo dos mesmos 1mg/L para a mesma concentração do malation (Figura 19). Assim, recomenda-se que o preparo das soluções do fipronil, para utilização em campo, seja feita obedecendo critérios mais rigorosos. Contudo, pela alta toxicidade do malation, é recomendável também que sejam aplicados em campo as menores concentrações possíveis deste produto.

Quando foram analisadas os efeitos das três concentrações sub-letais do malation (8,0 mg/L, 0,8 mg/L e 0,08 mg/L) sobre a planária *G. tigrina*, notamos uma alta mortalidade dos espécimes para a concentração mais alta, apesar do teste “U” de Mann-Whitney indicar que esta concentração (8,0 mg/L) não seria letal. Por meio da comparação do desenvolvimento dos blastemas regenerativos, feitas durante 72h (Figura 20), pudemos concluir que, dentre os indivíduos sobreviventes, todas as porções regenerantes testadas com a concentração de 8,0 mg/L, tanto para os ensaios de exposição contínua como os testes de recuperação, apresentaram certo retardo no desenvolvimento dos seus blastemas. Notamos também que os indivíduos expostos, continuamente, à concentração 0,8mg/L apresentaram atraso no desenvolvimento de seus blastemas regenerativos, em oposição aos ensaios de recuperação para esta mesma concentração (0,8 mg/L) e testes contínuos e recuperados com a concentração de 0,08 mg/L, que, juntamente com o controle

negativo, apresentaram desenvolvimento normal dos blastemas, após 72h da secção (Figura 20).

Os indivíduos expostos ao fipronil, nas concentrações sub-letais de 7,9 mg/L, 0,79 mg/L e 0,079 mg/L, como esperado, não apresentaram mortalidade nas primeiras 96 horas. Após a secção, observamos um atraso na regeneração, para todas as concentrações, tanto nos grupos de exposição contínua como nos grupos de recuperação, sendo que a concentração mais alta (7,9 mg/L), no grupo de exposição contínua, pareceu inibir, completamente, a formação dos blastemas regenerativos (Figura 21).

Quanto aos testes “b” com o inseticida malation, foram observados resultados semelhantes aos obtidos pelo teste “a” com esse mesmo inseticida. A concentração mais alta (8,0 mg/L) ocasionou morte de todas as porções regenerantes, além de promover um maior atraso na formação dos blastemas regenerativos. A concentração de 0,8 mg/L induziu um leve retardo no desenvolvimento dos blastemas regenerativos (Figura 22).

O teste “b”, realizado com o inseticida fipronil, induziu deformações nos blastemas para a concentração 3 (0,079 mg/L), um leve retardo de desenvolvimento para a concentração 2 (0,79 mg/L) e, como no teste “a” com esse inseticida, uma completa inibição da formação dos blastemas para a concentração 1 (7,9 mg/L). Segundo Tingle et al. (2000) o fipronil é uma substância capaz de inibir a divisão celular em arroz, impedindo que as sementes germinem. É possível que essa ação de inibição do ciclo celular possa ser a razão da não formação dos blastemas regenerativos, quando os espécimes de *G. tigrina* ficam expostos a altas concentrações (porém não letais) do inseticida fipronil.

Pelas observações do potencial regenerativo dos blastemas de organismos expostos aos inseticidas malation e fipronil, podemos inferir que parece haver uma relação inversamente proporcional entre o grau nutricional das planárias e o seu potencial de regeneração. Planárias com maior grau de nutrição exibiram um menor potencial regenerativo de seus blastemas do que os indivíduos que passaram por jejum de, aproximadamente, 1 semana. Nossos resultados preliminares parecem indicar que a atividade fisiológica relacionada à digestão pode envolver um alto gasto energético, o que indisponibiliza energia necessária para a proliferação celular. Por outro lado, deficiências nutricionais também podem estimular a regeneração, resposta esta relacionada à situação de estresse que estimula a

alocação de energia para a reprodução (estratégia r), em detrimento do desenvolvimento (estratégia k), situação que aumenta as chances de sobrevivência da espécie.

Os resultados obtidos a partir das secções histológicas das planárias do grupo controle mostraram a presença de diferentes tipos celulares na epiderme. Dentre as células observadas, foram encontradas células cubóides, mais externamente dispostas, as quais continham cílios na região ventral do animal; células alongadas, que se encontram na base da epiderme. Na superfície da epiderme foram também verificadas a presença de inúmeros rabditos e de uma camada de muco de constituição glicoprotéica. Os rabditos, diferentemente dos outros tipos celulares da epiderme, apresentam alta concentração de proteínas e polissacarídeos ácidos (Figuras 24 a 27).

Ainda no grupo controle, foram verificadas abaixo da epiderme, camadas de fibras musculares, que possuem grande quantidade de proteínas. Na seqüência, foi observado parênquima, onde foram encontradas células fixas do parênquima e células caliciformes, células basófilas, células de pigmento e células do tecido nervoso, possivelmente o periférico. Abaixo do parênquima, foi observada a gastroderme. As células fixas do parênquima apresentam forma irregular e citoplasma com inúmeros grânulos de secreção, constituídos, principalmente, por polissacarídeos (marcação pelo PAS), e grânulos com reação negativa a todos os testes empregados. As caliciformes apresentaram grânulos contendo polissacarídeos (marcação pelo PAS) e polissacarídeos ácidos. Os tipos caliciformes contêm numerosos grânulos negativos pela coloração HE, envoltos por fina camada de citoplasma. As células pigmentares apresentaram-se fortemente marcadas pelo PAS. Os feixes nervosos correspondem aos prolongamentos de neurônios, constituídos por uma região central bastante corada pela hematoxilina e a periférica pela eosina. Ambas as regiões demonstram reação negativa ao azul de Alcian.

O tubo digestivo do grupo controle pode ser descrito como sendo uma gastroderme revestida por um epitélio. As células da gastroderme apresentam forma de meia-lua, citoplasma preenchido por grânulos acidófilos e basófilos, regiões com grande concentração de proteínas, polissacarídeos e polissacarídeos ácidos, além de grânulos maiores, com reação negativa aos corantes utilizados.

Tais informações apresentadas acima corroboram os trabalhos de Baguña & Romero (1981) e Bueno et al. (1997), que relataram a presença dos mesmos tipos celulares em planárias da espécie *Girardia tigrina*.

Quanto aos resultados obtidos com as técnicas histológicas realizadas com planárias submetidas aos inseticidas fipronil e ao malation (Tabelas 5 e 6), ficou claro que essas substâncias exerceram influência sobre as características celulares, sendo que as concentrações mais baixas, de ambas as substâncias, provocaram maiores alterações, o que pode estar relacionado com uma maior permeabilidade celular, quando estes inseticidas apresentam-se em baixas concentrações. Fica evidente, pelos nossos ensaios, que as altas concentrações dos inseticidas estudados parecem não disponibilizar o químico para dentro da célula, resultados estes que corroboram os dados de Pedro (2008), que, por meio de estudos de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do inseticida fipronil em *Allium cepa*, demonstrou que concentrações mais baixas desse inseticida produzem maior ação sobre as células. Estes resultados alertam para uma preocupação, quanto às contaminações ambientais, pois os químicos que atingem o meio ambiente podem sofrer sucessivas diluições, promovendo contaminações residuais. No caso do fipronil, estes resíduos podem comprometer ainda mais a biota exposta a este inseticida.

Pelas análises histológicas, pode-se observar que os inseticidas testados levaram a alterações celulares, tais como uma maior produção de polissacarídeos ácidos em diversos tecidos das planárias expostas a ambos os inseticidas. Além disso, muitas das características químicas celulares foram perdidas, decorrentes da desorganização destes tecidos alterados.

As alterações causadas pelo fipronil referem-se, principalmente, aos danos nas células fixas do parênquima e em células nervosas, nas quais se pôde notar a atrofia dos prolongamentos neuronais, tanto da região periférica quanto da central. Quanto às células do parênquima, foi observada uma degeneração, não sendo mais possível a sua identificação em muitos casos. Essa desorganização do tecido ocasionou a formação de grandes vacúolos e, em consequência disto, a proliferação de neoblastos, células indiferenciadas que migram para as regiões comprometidas. As células fixas do parênquima que ainda puderam ser identificadas apresentaram um aumento nos constituintes protéicos, o que pode estar relacionado com reações enzimáticas para detoxicação celular. Em concentrações maiores, o inseticida

promoveu um estímulo sobre a produção de muco, aumento na quantidade de células alongadas da epiderme e a proliferação de rabinos. Por outro lado, em concentrações mais baixas, essa substância promoveu danos na gastroderme, incluindo destruição de microvilosidades e descaracterização morfológica dessas células. Ao contrário do esperado, células fixas do parênquima do grupo exposto à maior concentração, ainda que com menos grânulos no citoplasma, apresentaram uma maior definição dos seus limites. As concentrações altas testadas parecem ter estimulado a produção de muco, que pode ter sido o agente protetor contra entrada da substância na célula. Entretanto, em ambas as concentrações testadas do fipronil, foram identificados núcleos picnóticos e, em alguns casos, degeneração nuclear – cariorrexe. Tais alterações se distribuíram pelos tecidos epidérmico e parenquimático, atingindo também os feixes nervosos, estes, que na concentração mais alta do produto, apresentaram diminuição acentuada da região central (Figuras 28 a 35).

Quanto à ação do malation, verificou-se que algumas alterações provocadas por esta substância sobre planárias, foram semelhantes àquelas observadas nos espécimes submetidos ao fipronil. Porém, algumas características celulares foram observadas somente para os indivíduos submetidos ao malation, como a hipertrofia marcante das células caliciformes, a diminuição de polissacarídeos na epiderme, e alteração nuclear. Esta última anormalidade, contudo, só foi observada para as células da epiderme e da região parenquimática mais externa, quando estas foram submetidas à concentração mais alta de malation, principalmente na epiderme e na região parenquimática mais externa. Notou-se também, com a ação deste inseticida, a degeneração na região periférica dos feixes nervosos (Figuras 36 a 43).

A análise das lâminas obtidas pelo ensaio do cometa demonstrou níveis acentuados de dano no DNA dos espécimes expostos. Para cada grupo, controles e tratamentos, foram analisados 100 nucleóides, que foram classificados em 5 níveis de dano, variando da classe 0 (nucleóide intacto) até 4 (morte celular) (Figura 44). Pela análise, foram também identificados alguns nucleóides de tamanhos diferentes, geralmente maiores do que aqueles considerados para análise (Figura 45). Essa variação se deu, provavelmente, devido à heterogeneidade da população de células obtidas na suspensão.

O score médio obtido para o controle negativo foi de 105,67. Todos os tratamentos apresentaram score mais alto do que esse, sendo 216,67 e 200,67 para

a concentrações de 0,08 mg/L e 0,8 mg/L do malation, respectivamente; 184,00 e 186,67 para as concentrações de 0,079 mg/L e 0,79 mg/L de fipronil, respectivamente. O controle positivo foi o que resultou em maiores níveis de dano, com score médio igual a 311,33 (Tabela 7).

A análise estatística de ANOVA foi significativa ($p < 0,025$) na comparação entre os scores do controle negativo e de todos os tratamentos realizados. Os tratamentos também foram estatisticamente diferentes do controle positivo. Entretanto, quando foram comparados os tratamentos entre si, não foram detectadas diferenças significativas em nenhuma das combinações possíveis (Figuras 46 e 47).

A correlação de Pearson não foi adequadamente estabelecida para o malation ou para o fipronil, demonstrando que os níveis de dano não possuem uma dependência dose-resposta. Apesar de não ter sido significativa, a correlação de Pearson indicou um valor $r = -0,27$ para o malation, que quer dizer uma relação inversamente proporcional àquela esperada pela dependência dose-resposta, o que reforça a hipótese de que concentrações mais baixas podem ocasionar maiores níveis de dano.

Segundo Jha (2008), existem diversas conseqüências ambientais decorrentes das quebras de DNA promovidas por inúmeros agentes, detectadas pelo ensaio do cometa, como, por exemplo, o acometimento da reprodução a interferência no material genético, que pode levar a danos em todos os níveis de organização, tais como comunidade ou até mesmo biocenose. Além disso, os efeitos das quebras de DNA podem se refletir sobre o sistema imunológico de diversos organismos, não se restringido apenas aos indivíduos, mas reduzir a eficiência competitiva de toda uma espécie.

5. CONCLUSÃO

A partir desses resultados, podemos concluir que planárias da espécie *Girardia tigrina* são animais adequados para a simulação de contaminação ambiental em laboratório e que possuem potencial para a realização de testes de toxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade com amostras ambientais.

É possível observar que as concentrações recomendadas para utilização em campo, tanto do malation quanto do fipronil, são muito superiores àquelas suportada pelo bioindicador *G. tigrina* e que concentrações sub letais possuem efeitos diversos em todos os níveis de organização dessa espécie, o que pode estar colocando em risco a biota de recursos hídricos associados, às atividades agrícolas que fazem uso desses inseticidas.

Concluiu-se ainda, que ambientes impactados com agrotóxicos organofosforados e fenis pirazol possuem efeitos semelhantes sobre os organismos não-alvo. Pelo estudo realizado, alertamos para a necessidade do estabelecimento de normas mais rigorosas contra o uso abusivo de substâncias que possam impactar o Meio Ambiente, como os inseticidas.

Tabela 2: Avaliação da toxicidade de 10 concentrações do inseticida Malation para o organismo teste *G. tigrina*

Teste 1		1500mg/L	500mg/L	300mg/L	30mg/L	10,5mg/L	10,0mg/L	10,0mg/L	9,5mg/L	8,5mg/L	7,5mg/L	5,0mg/L
Nº de Ind. Após 96h na Amostra 1		0	0	0	0	6	6	6	3	2	7	8
Nº de Ind. Após 96h na Amostra 2		0	0	0	0	4	6	6	6	6	7	8
Média do Nº de Ind. Após 96h		0	0	0	0	5	6	6	4,5	4	7	8
Mortalidade Média (%)		100	100	100	100	37.5	25	43.75	50	12.5	0	
Teste 2		1500mg/L	500mg/L	300mg/L	30mg/L	10,5mg/L	10,0mg/L	10,0mg/L	9,5mg/L	8,5mg/L	7,5mg/L	5,0mg/L
Nº de Ind. Após 96h na Amostra 1		0	0	0	0	6	7	4	4	7	7	8
Nº de Ind. Após 96h na Amostra 2		0	0	0	0	4	3	4	4	4	7	7
Média do Nº de Ind. Após 96h		0	0	0	0	5	5	4	4	5,5	7	7,5
Mortalidade Média (%)		100	100	100	100	37.5	37.5	50	31.25	12.5	6.25	
Teste 3		1500mg/L	500mg/L	300mg/L	30mg/L	10,5mg/L	10,0mg/L	10,0mg/L	9,5mg/L	8,5mg/L	7,5mg/L	5,0mg/L
Nº de Ind. Após 96h na Amostra 1		0	0	0	0	5	5	2	2	8	7	8
Nº de Ind. Após 96h na Amostra 2		0	0	0	0	6	5	7	7	8	7	7
Média do Nº de Ind. Após 96h		0	0	0	0	5,5	5	4,5	8	8	7	7,5
Mortalidade Média (%)		100	100	100	100	31.25	37.5	43.75	0	12.5	6.25	

Amostras 1 e 2: réplicas

Tabela 3: Avaliação da toxicidade de 10 concentrações do inseticida Fipronil para o organismo-teste *G. tigrina*

Teste Único		1250mg/L	250mg/L	25mg/L	20,7mg/L	17,7mg/L	16,6mg/L	12,5mg/L	11,8mg/L	7,9mg/L	1,25mg/L
Nº de Ind. Após 96h na Amostra 1		0	0	0	1	0	5	6	3	8	8
Nº de Ind. Após 96h na Amostra 2		0	0	0	0	2	3	6	4	8	8
Média do Nº de Ind. Após 96h		0	0	0	0,5	1	4	6	3,5	8	8
Mortalidade Média (%)		100	100	100	93.75	87.5	50	25	56.25	0	0

Amostras 1 e 2: réplicas

Tabela 4: Valores da CE50 para diferentes tempos de exposição obtidos nos testes realizados com *G. tigrina* para diferentes concentrações dos inseticidas Malation e Fipronil

	Estimativa (mg/L)	IC95% Inf. (mg/L)	IC95% Sup. (mg/L)	
24h	Teste I	16.4	14.4	18.7
	Teste II	10.7	9.4	12.2
	Teste III	16.2	13.9	18.8
	Teste Único	24.0	17.3	33.5
48h	Teste I	13.8	11.4	16.7
	Teste II	14	11.4	17.1
	Teste III	12.7	10.2	15.9
	Teste Único	17.4	13.7	22.3
72h	Teste I	12.4	10.1	15.3
	Teste II	13.4	10.7	16.7
	Teste III	12.5	9.7	16.1
	Teste Único	14.9	13,1	16.9
96h	Teste I	12.4	10.1	15.3
	Teste II	12.2	9.5	15.8
	Teste III	12.9	10.3	16.2
	Teste Único	13.4	11.9	15.1

Resultados obtidos pelo teste estatístico de Spearman-Kärber

Tabela 5: Histoquímica dos diferentes tipos celulares de *Girardia tigrina* exposta e não exposta ao inseticida fipronil.

Tecidos	Concentrações (mg/L)									
	Controle			fipronil 0,079			fipronil 0,79			
	AA	AB	PAS	AA	AB	PAS	AA	AB	PAS	PAS
Células										
<i>Alongada</i>	+ (Fig. 25A-B);	++ (Fig. 26 A);	+++ (Fig. 25A-B e Fig. 26A);	+++ (Fig. 29A);	++ (Fig. 30A-B);	+++ (Fig. 29A);	++ (Fig. 33A-B);	++ (Fig. 34B);	++ (Fig. 33A-B e Fig. 34B);	++ (Fig. 33A-B e Fig. 34B);
<i>Cubóide</i>	+ (Fig. 25A-B);	+ (Fig. 26A);	+++ (Fig. 25A-B e Fig. 26A);	+++ (Fig. 29A);	++ (Fig. 30A);	+++ (Fig. 29A e Fig. 30A);	+++ (Fig. 33A-B);	++ (Fig. 34B);	+++ (Fig. 33A-B e Fig. 34B);	+++ (Fig. 33A-B e Fig. 34B);
<i>Rabdio</i>	+++ (Fig. 25A-B);	+++ (Fig. 26A-B);	+++ (Fig. 25A-B e Fig. 26A-B);	+++ (Fig. 29A);	++ (Fig. 30A-B);	+++ (Fig. 29A e Fig. 30A-B);	+++ (Fig. 33A-B);	+++ (Fig. 34A);	+++ (Fig. 33A-B e Fig. 34A);	+++ (Fig. 33A-B e Fig. 34A);
Músculo										
	- (Fig. 25B);	+++ (Fig. 26B);	+++ (Fig. 26B);	+++ (Fig. 29A);	++ (Fig. 30B);	+++ (Fig. 29A e Fig. 30B);	- (Fig. 33A-B);	++ (Fig. 34B);	+++ (Fig. 33A-B e Fig. 34B);	+++ (Fig. 33A-B e Fig. 34B);
<i>Fixa</i>	- (Fig. 25C-D);	+ (Fig. 26C);	+++ (Fig. 25C-D);	#;	++ (Fig. 30D);	++ (Fig. 30D);	- (Fig. 33C);	#;	+++ (Fig. 33C);	+++ (Fig. 33C);
Parênquima										
<i>Caticiforme</i>	++ (Fig. 25C);	#;	+ (Fig. 25C);	#;	#;	#;	++ (Fig. 33C);	#;	++ (Fig. 33C);	++ (Fig. 33C);
	- (Fig. 25C);		- (Fig. 25C-D);							
Tubo Digestivo										
<i>da Gastroderme</i>	+++ (Fig. 25E-F);	#;	+++ (Fig. 25E-F);	#;	+++ (Fig. 30C);	+++ (Fig. 30C);	+++ (Fig. 33F);	+++ (Fig. 34F);	+++ (Fig. 34F);	+++ (Fig. 34F);

AA: técnica do azul de Alcian; AB: técnica do azul de bromofenol; PAS: técnica do PAS; (+) reação fracamente positiva; (++) reação medianamente positiva; (+++) reação fortemente positiva; (-) reação negativa; #; não observado.

Tabela 6: Histoquímica dos diferentes tipos celulares de *Girardia tigrina* exposta e não exposta ao inseticida malation.

	Concentrações (mg/L)									
	Controle			malation 0,08			malation 0,8			
Tecidos	AA	AB	PAS	AA	AB	PAS	AA	AB	PAS	PAS
Células										
<i>Alongada</i>	+ (Fig. 25A-B);	++ (Fig. 26 A);	+++ (Fig. 25A-B e Fig. 26A);	#;	+++ (Fig. 38B);	++ (Fig. 38B);	++ (Fig. 41A);	++ (Fig. 42A);	++ (Fig. 41A e 42A);	++ (Fig. 41A e 42A);
<i>Cuboide</i>	+ (Fig. 25A-B);	+ (Fig. 26A);	+++ (Fig. 25A-B e Fig. 26A);	+ (Fig. 37A);	++ (Fig. 38A);	++ (Fig. 37A e Fig. 38A);	+ (Fig. 41A);	++ (Fig. 42A);	+ (Fig. 41A e 42A);	+ (Fig. 41A e 42A);
Epiderme										
<i>Rabdito</i>	+++ (Fig. 25A-B);	+++ (Fig. 26A-B);	+++ (Fig. 25A-B);	++ (Fig. 37A);	+++ (Fig. 38A-B);	++ (Fig. 38A-B);	++ (Fig. 41A-B);	++ (Fig. 42A);	++ (Fig. 41A-B e 42A);	++ (Fig. 41A-B e 42A);
Músculo										
<i>Fixa</i>	- (Fig. 25B);	+++ (Fig. 26B);	+++ (Fig. 26B);	#;	++ (Fig. 38B);	++ (Fig. 38B);	- (Fig. 41A-B);	#;	++ (Fig. 41A-B);	++ (Fig. 41A-B);
<i>Calciiforme</i>	++ (Fig. 25C);	#;	++ (Fig. 25B);	++ (Fig. 37B);	++ (Fig. 38E);	++ (Fig. 37B e 38B);	+++ (Fig. 41D);	#;	++ (Fig. 41D);	++ (Fig. 41D);
<i>da Gastroderme</i>	+++ (Fig. 25E-F);	#;	+++ (Fig. 25E-F);	#;	#;	#;	#;	#;	#;	#;
Tubo Digestivo										
<i>Fixa</i>	- (Fig. 25C-D);	+ (Fig. 26C);	+++ (Fig. 25C-D);	#;	#;	#;	- (Fig. 41C);	+ (Fig. 42B);	+++ (Fig. 41C);	+++ (Fig. 41C);
<i>Calciiforme</i>	++ (Fig. 25C);	#;	++ (Fig. 25C);	++ (Fig. 37B);	++ (Fig. 38E);	++ (Fig. 37B e 38B);	+++ (Fig. 41D);	#;	++ (Fig. 41D);	++ (Fig. 41D);
<i>da Gastroderme</i>	+++ (Fig. 25E-F);	#;	+++ (Fig. 25E-F);	#;	#;	#;	#;	#;	#;	#;
Tubo Digestivo										
<i>Fixa</i>	- (Fig. 25C-D);	+ (Fig. 26C);	+++ (Fig. 25C-D);	#;	#;	#;	- (Fig. 41C);	+ (Fig. 42B);	+++ (Fig. 41C);	+++ (Fig. 41C);
<i>Calciiforme</i>	++ (Fig. 25C);	#;	++ (Fig. 25C);	++ (Fig. 37B);	++ (Fig. 38E);	++ (Fig. 37B e 38B);	+++ (Fig. 41D);	#;	++ (Fig. 41D);	++ (Fig. 41D);
<i>da Gastroderme</i>	+++ (Fig. 25E-F);	#;	+++ (Fig. 25E-F);	#;	#;	#;	#;	#;	#;	#;
Tubo Digestivo										
<i>Fixa</i>	- (Fig. 25C-D);	+ (Fig. 26C);	+++ (Fig. 25C-D);	#;	#;	#;	- (Fig. 41C);	+ (Fig. 42B);	+++ (Fig. 41C);	+++ (Fig. 41C);
<i>Calciiforme</i>	++ (Fig. 25C);	#;	++ (Fig. 25C);	++ (Fig. 37B);	++ (Fig. 38E);	++ (Fig. 37B e 38B);	+++ (Fig. 41D);	#;	++ (Fig. 41D);	++ (Fig. 41D);
<i>da Gastroderme</i>	+++ (Fig. 25E-F);	#;	+++ (Fig. 25E-F);	#;	#;	#;	#;	#;	#;	#;
Tubo Digestivo										
<i>Fixa</i>	- (Fig. 25C-D);	+ (Fig. 26C);	+++ (Fig. 25C-D);	#;	#;	#;	- (Fig. 41C);	+ (Fig. 42B);	+++ (Fig. 41C);	+++ (Fig. 41C);
<i>Calciiforme</i>	++ (Fig. 25C);	#;	++ (Fig. 25C);	++ (Fig. 37B);	++ (Fig. 38E);	++ (Fig. 37B e 38B);	+++ (Fig. 41D);	#;	++ (Fig. 41D);	++ (Fig. 41D);
<i>da Gastroderme</i>	+++ (Fig. 25E-F);	#;	+++ (Fig. 25E-F);	#;	#;	#;	#;	#;	#;	#;
Tubo Digestivo										
<i>Fixa</i>	- (Fig. 25C-D);	+ (Fig. 26C);	+++ (Fig. 25C-D);	#;	#;	#;	- (Fig. 41C);	+ (Fig. 42B);	+++ (Fig. 41C);	+++ (Fig. 41C);
<i>Calciiforme</i>	++ (Fig. 25C);	#;	++ (Fig. 25C);	++ (Fig. 37B);	++ (Fig. 38E);	++ (Fig. 37B e 38B);	+++ (Fig. 41D);	#;	++ (Fig. 41D);	++ (Fig. 41D);
<i>da Gastroderme</i>	+++ (Fig. 25E-F);	#;	+++ (Fig. 25E-F);	#;	#;	#;	#;	#;	#;	#;

AA: técnica do azul de Alcian; AB: técnica do azul de bromofenol; PAS: técnica do PAS; (+) reação fracamente positiva; (++) reação medianamente positiva; (+++) reação fortemente positiva; (-) reação negativa; #: não observado.

Tabela 7: Efeitos genotóxicos causados pela ação dos inseticidas Malation e Fipronil sobre organismo teste *Girardia tigrina*, observados pelo Ensaio do Cometa

Concentrações (mg/L)	Scores de dano (0-400)	Nucleóides sem dano (%)
Controle Negativo	105,67 ± 09,71	43,33 ± 12,66
Malation 0,08	216,67 ± 16,74	3,00 ± 2,00
Malation 0,8	200,67 ± 24,42	6,00 ± 2,65
Fipronil 0,079	184,00 ± 90,57	18,67 ± 26,31
Fipronil 0,79	186,67 ± 34,65	8,00 ± 15,57
Controle Positivo	311,33 ± 14,15	0

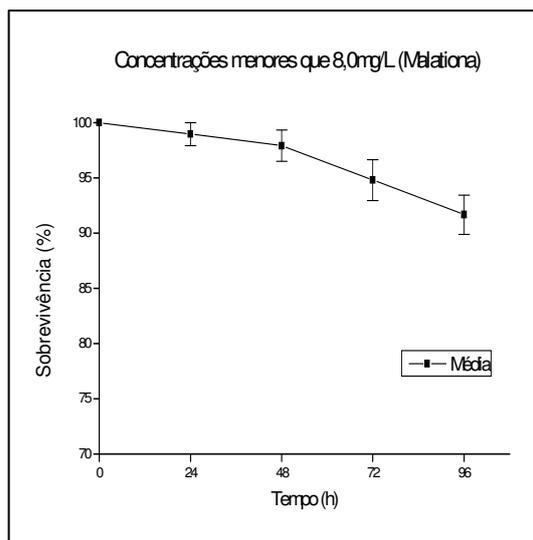


Figura 3: Gráfico representando todos os testes realizados com concentrações inferiores a 8,0 mg/L de malationa (CA).

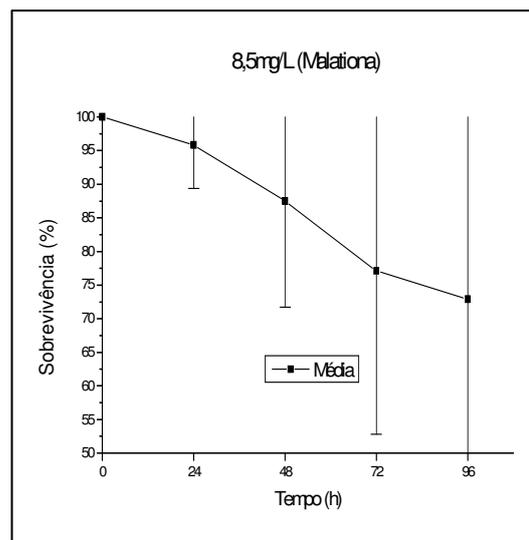


Figura 4: Gráfico representando os resultados obtidos nos testes realizados com a concentração de 8,5 mg/L de malationa (CA).

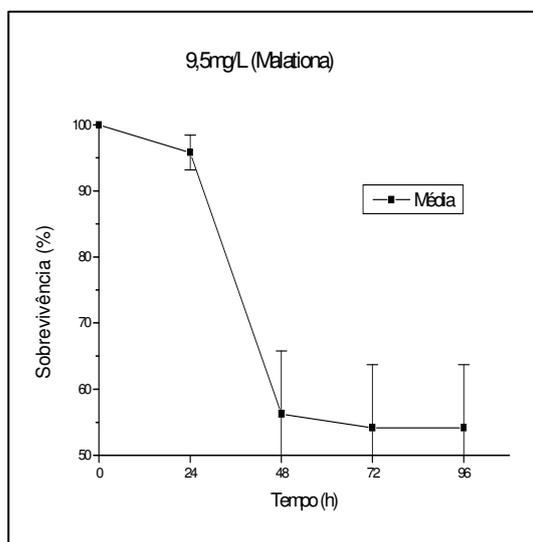


Figura 5: Gráfico representando os resultados obtidos nos testes realizados com a concentração de 9,5 mg/L de malationa (CA).

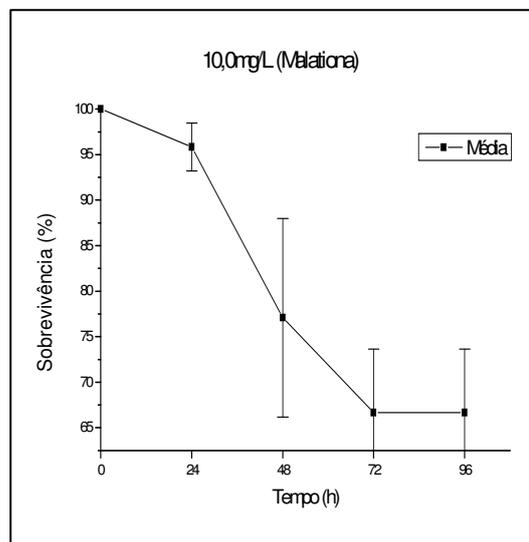


Figura 6: Gráfico representando os resultados obtidos nos testes realizados com a concentração de 10,0 mg/L de malationa (CA).

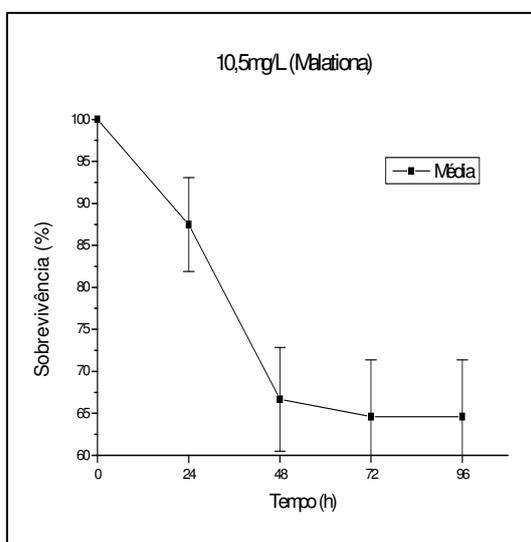


Figura 7: Gráfico representando os resultados obtidos nos testes realizados com a concentração de 9,5 mg/L de malationa (CA).

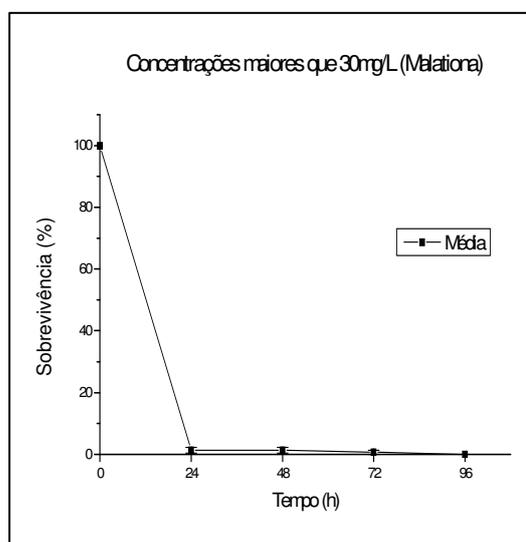


Figura 8: Gráfico representando todos os testes realizados com concentrações superiores a 30,0 mg/L de malationa (CA).

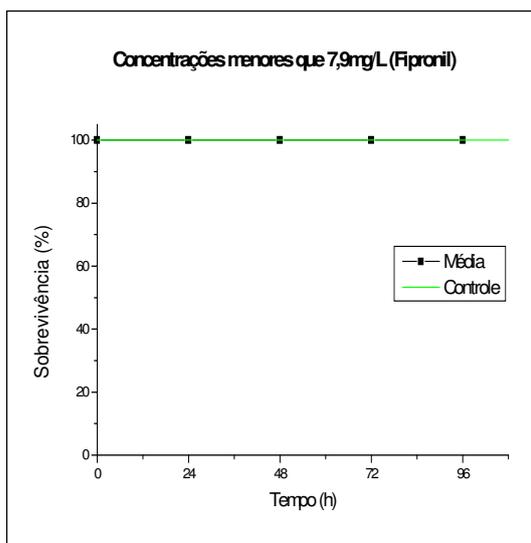


Figura 9: Gráfico representando todos os testes realizados com concentrações inferiores a 7,9 mg/L de fipronil.

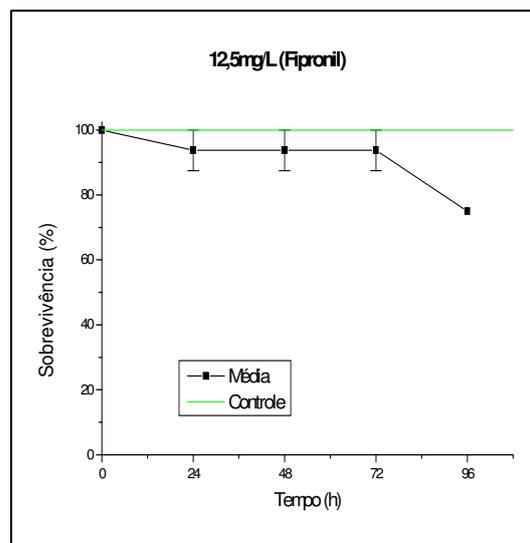


Figura 10: Gráfico representando os resultados obtidos nos testes realizados com a concentração de 12,5 mg/L de fipronil

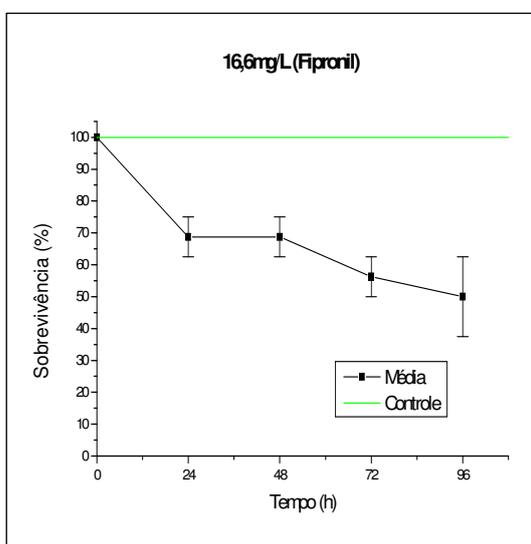


Figura 11: Gráfico representando os resultados obtidos nos testes realizados com a concentração de 16,6 mg/L de fipronil.

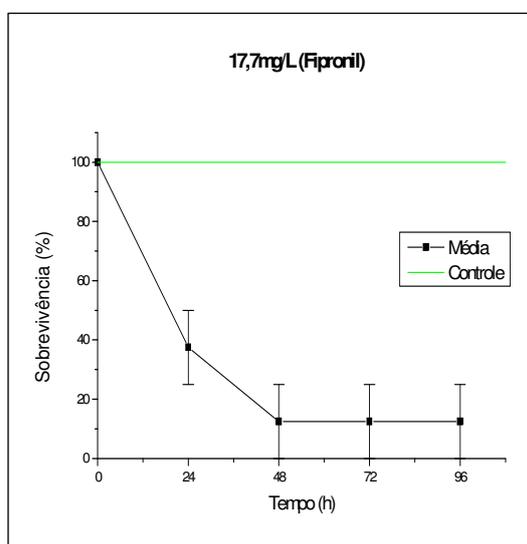


Figura 12: Gráfico representando os resultados obtidos nos testes realizados com a concentração de 17,7 mg/L de fipronil

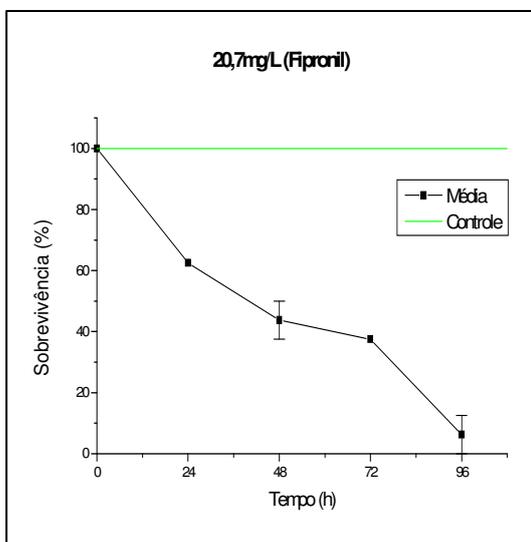


Figura 13: Gráfico representando os resultados obtidos nos testes realizados com a concentração de 20,7 mg/L de fipronil

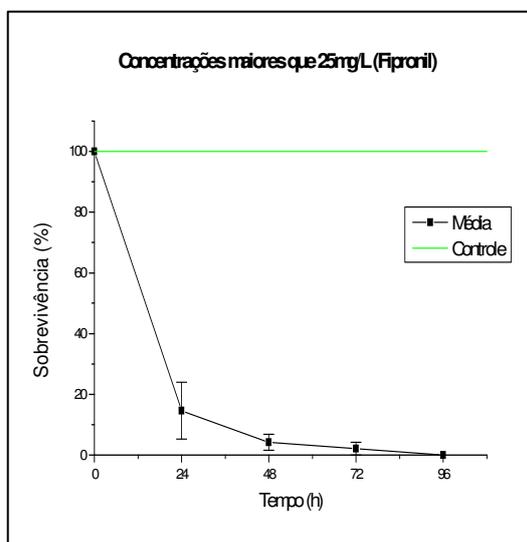


Figura 14: Gráfico representando todos os testes realizados com concentrações superiores a 25,0 mg/L de fipronil

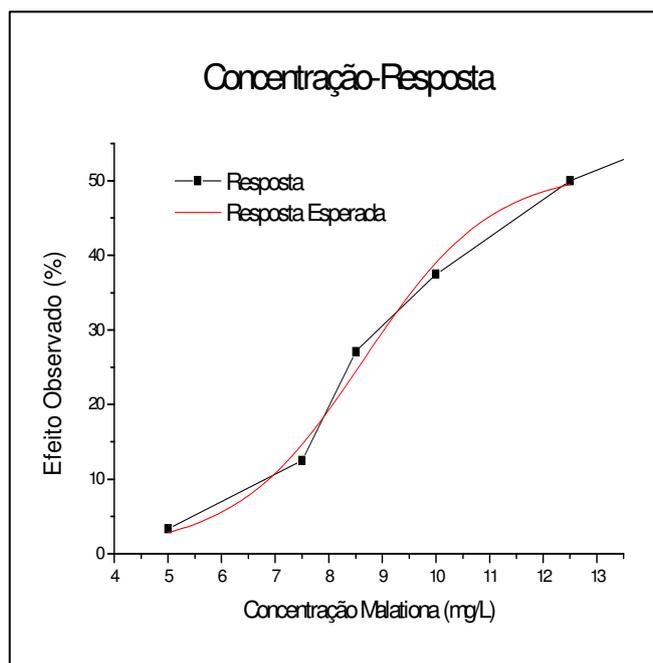


Figura 15: Gráfico representando a curva sigmóide (em vermelho) padrão de resposta esperada para o malation.

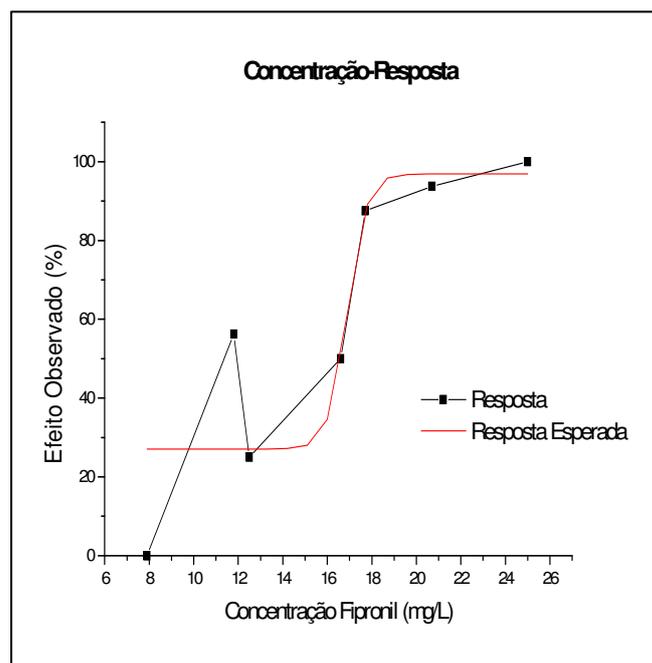


Figura 17: Gráfico representando a curva sigmóide (em vermelho) padrão de resposta esperada para o fipronil.

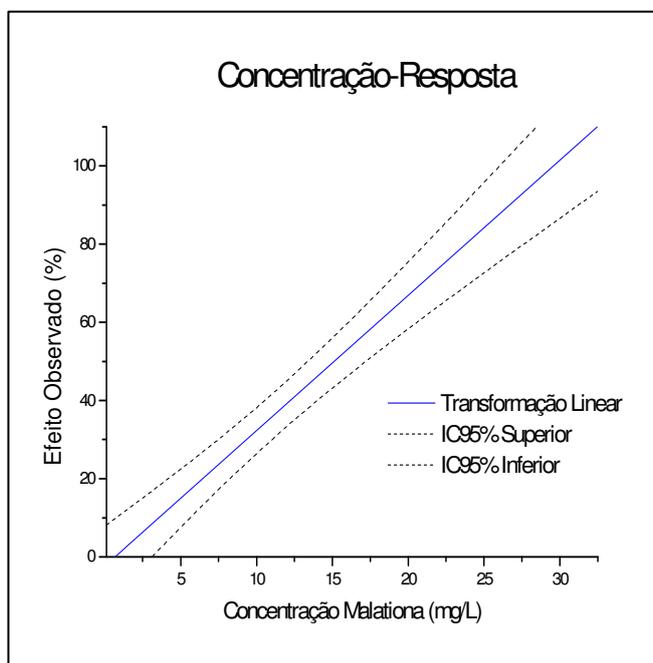


Figura 16: Gráfico representando a Transformação Linear dos dados obtidos para o malation(azul) com os limites inferior e superior (linhas tracejadas).

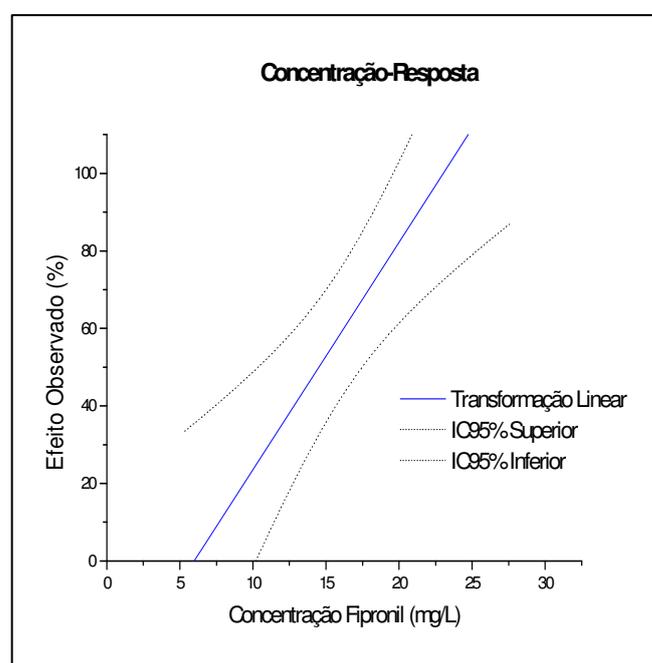


Figura 18: Gráfico representando a Transformação Linear dos dados obtidos para o fipronil (azul), com os limites inferior e superior (linhas tracejadas).

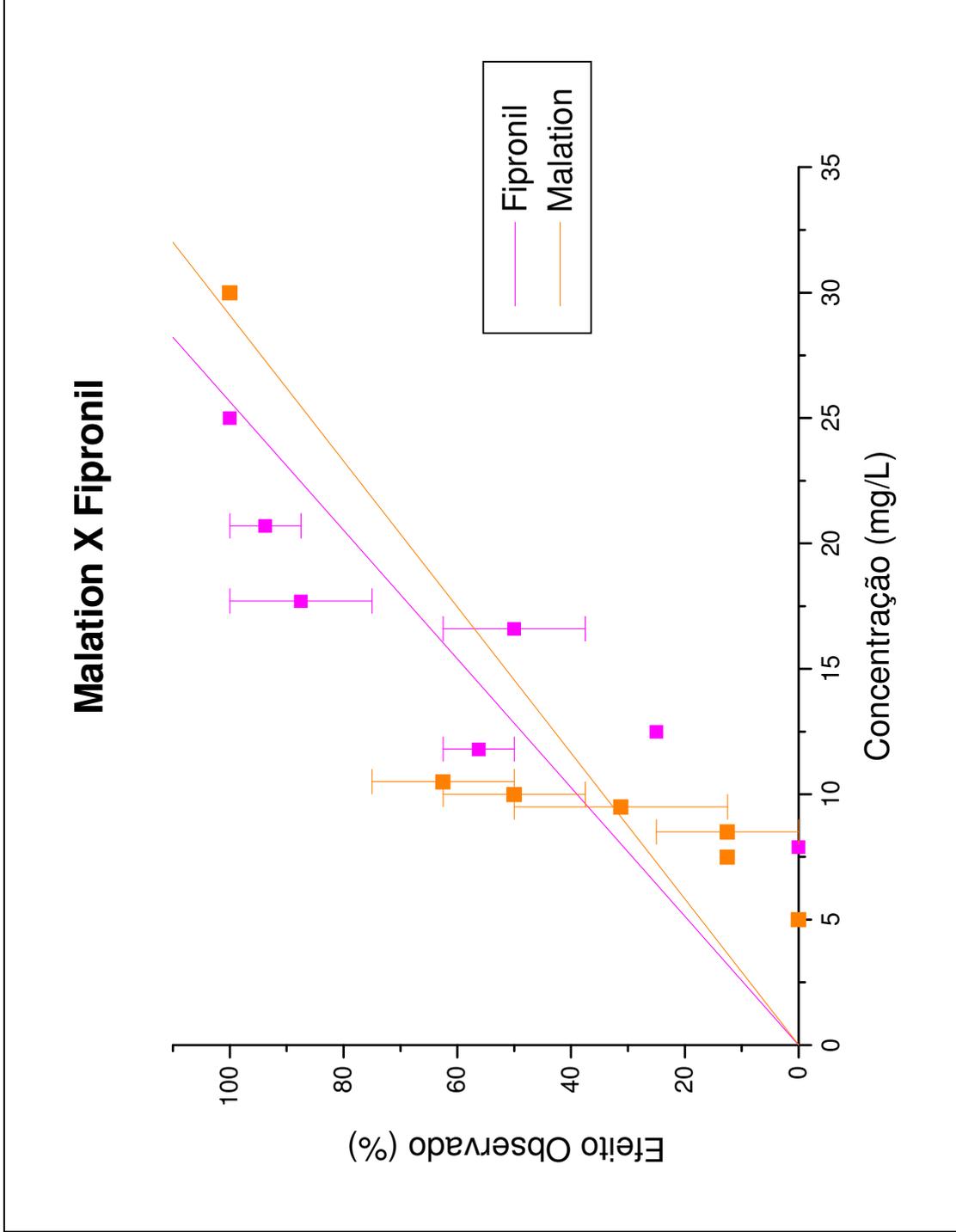


Figura 19: Gráfico comparando os mecanismos e a velocidade de ação dos inseticidas malation e fipronil.

FIGURA 20

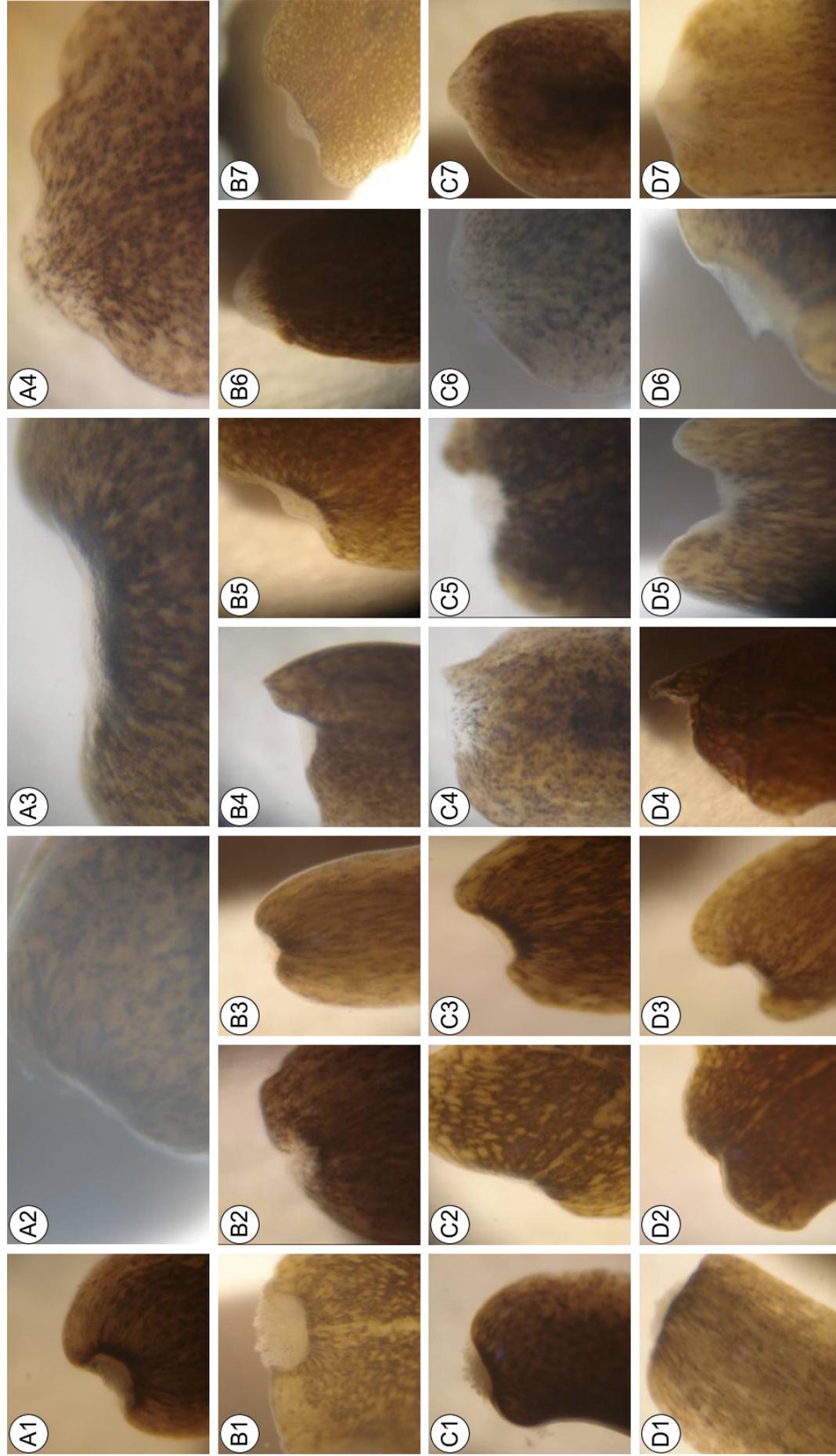


Figura 20: Teste "a" com o malation – Fotodocumentação das porções regenerantes de *G. tigrina*, nos tempos de 0, 24, 48 e 72h, após a secção. A1-4: controle negativo; B1-7: concentração de 8,0 mg/L de malation; C1-7: concentração de 0,8 mg/L de malation; D1-7: concentração de 0,08 mg/L de malation. Os grupos de número 1 são representativos do tempo = 0. A2, B2-3, C2-3 e D2-3: fotografias das observações após 24h. A3, B4-5, C4-5 e D-5: após 48h. A4, B6-7, C6-7 e D6-7: após 72h. Os grupos de números 2, 4 e 6 referem-se à exposição contínua dos indivíduos a uma dada concentração. Já os grupos de números 3, 5 e 7 referem-se aos registros fotográficos dos indivíduos que foram recuperados em água mineral.

FIGURA 21

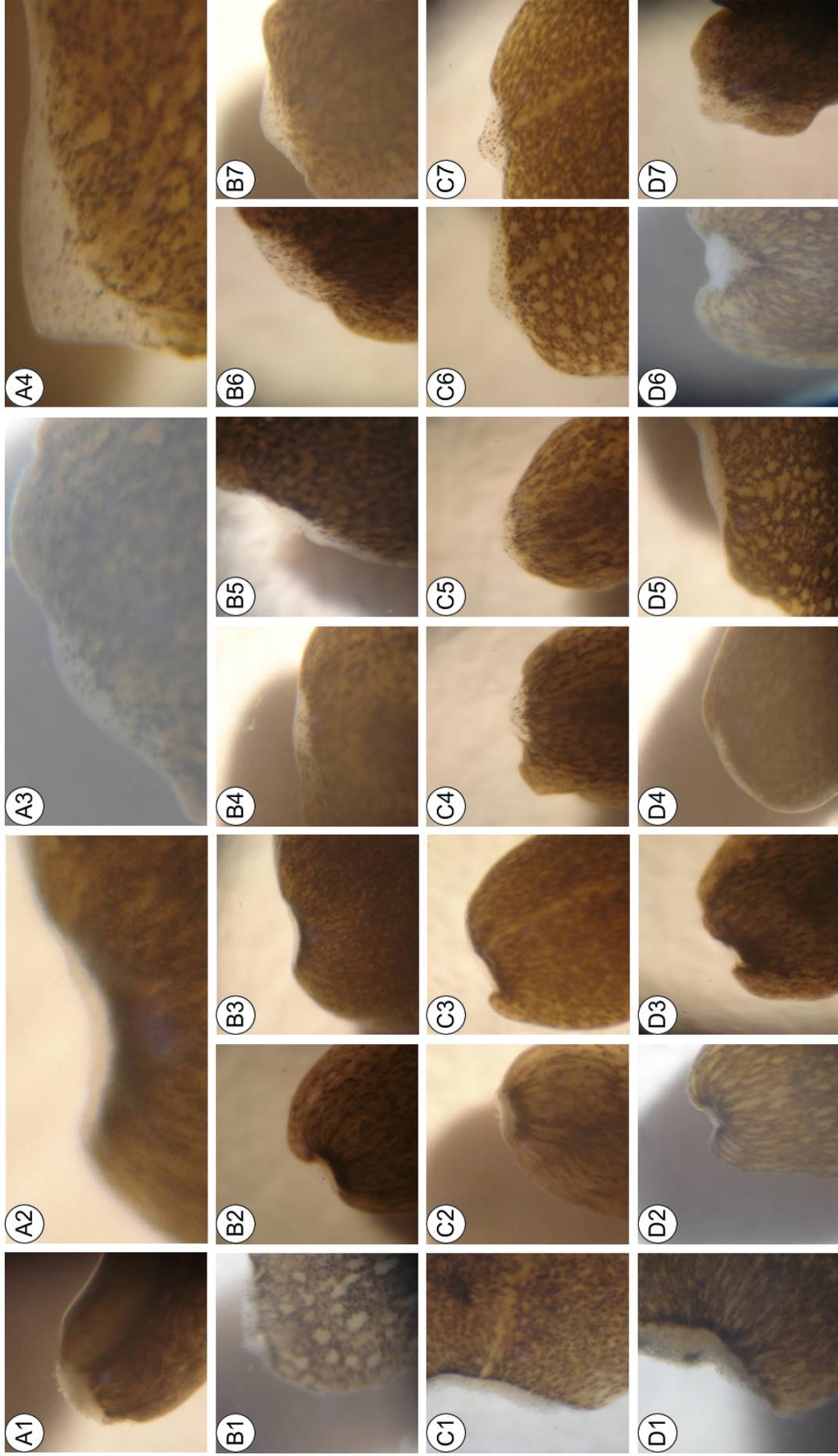


Figura 21: Teste "a" com o fipronil – Fotodocumentação das porções regenerantes de *G. tigrina*, nos tempos de 0, 24, 48 e 72h, após a secção. A1-4: controle negativo; B1-7: concentração de 7,9 mg/L de fipronil; C1-7: concentração de 0,79 mg/L de fipronil; D1-7: concentração de 0,079 mg/L de fipronil. Os grupos de número 1 são representativos do tempo = 0. A2, B2-3, C2-3 e D2-3: fotografias das observações após 24h. A3, B4-5, C4-5 e D-5: após 48h. A4, B6-7, C6-7 e D6-7: após 72h. Os grupos de números 2, 4 e 6 referem-se à exposição contínua dos indivíduos a uma dada concentração. Já os grupos de números 3, 5 e 7 referem-se aos registros fotográficos dos indivíduos que foram recuperados em água mineral.

FIGURA 22

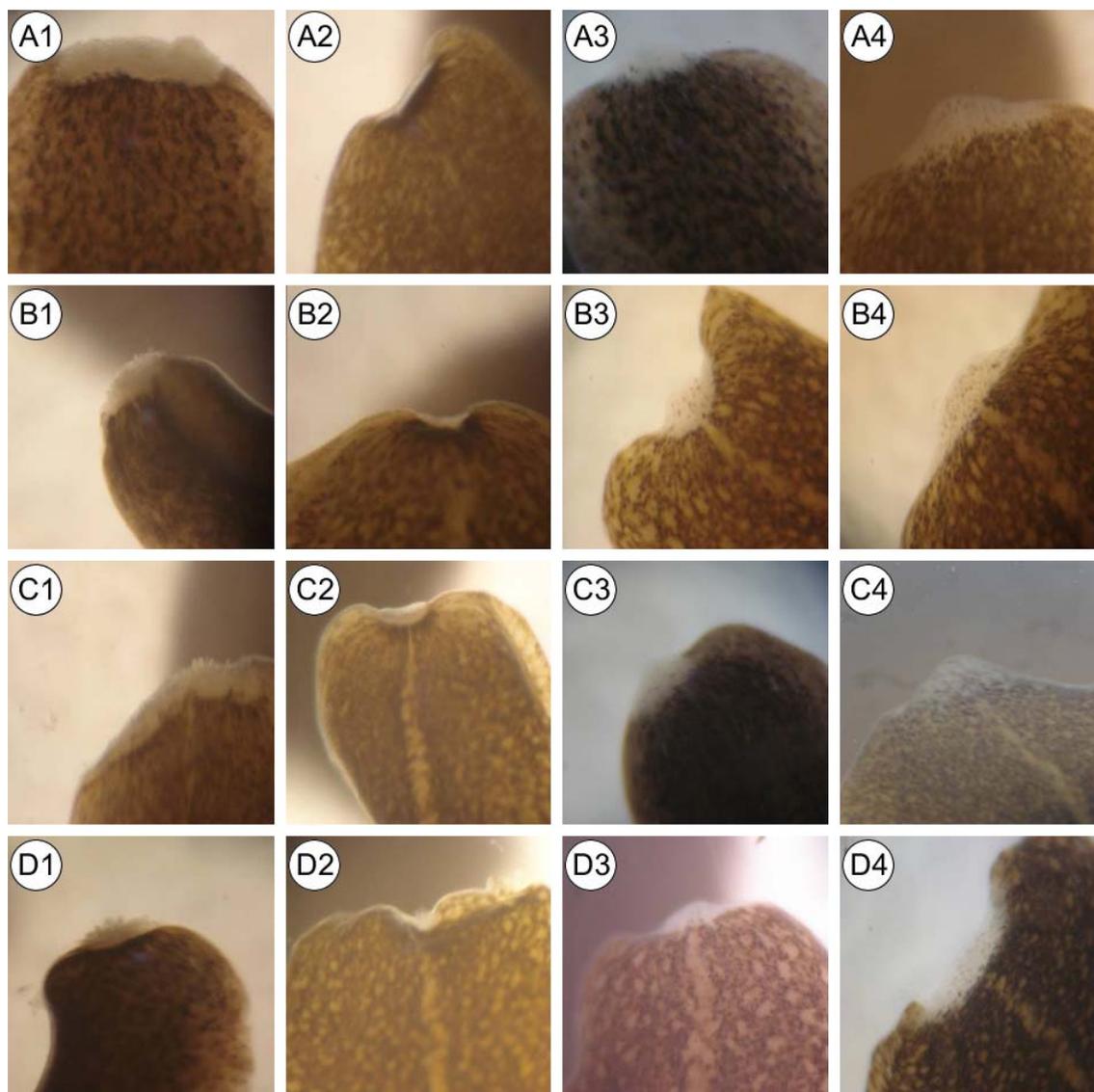


Figura 22: Teste “b” com o malation – Fotodocumentação das porções regenerantes de *G. tigrina*, nos tempos de 0, 24, 48 e 72h, após a secção. A1-4: controle negativo; B1-4: concentração de 8,0 mg/L de malation; C1-4: concentração de 0,8 mg/L de malation; D1-4: concentração de 0,08 mg/L de malation. Em todas as situações, os números 1, 2, 3 e 4 se referem aos tempos 0, 24, 48 e 72h, respectivamente.

FIGURA 23

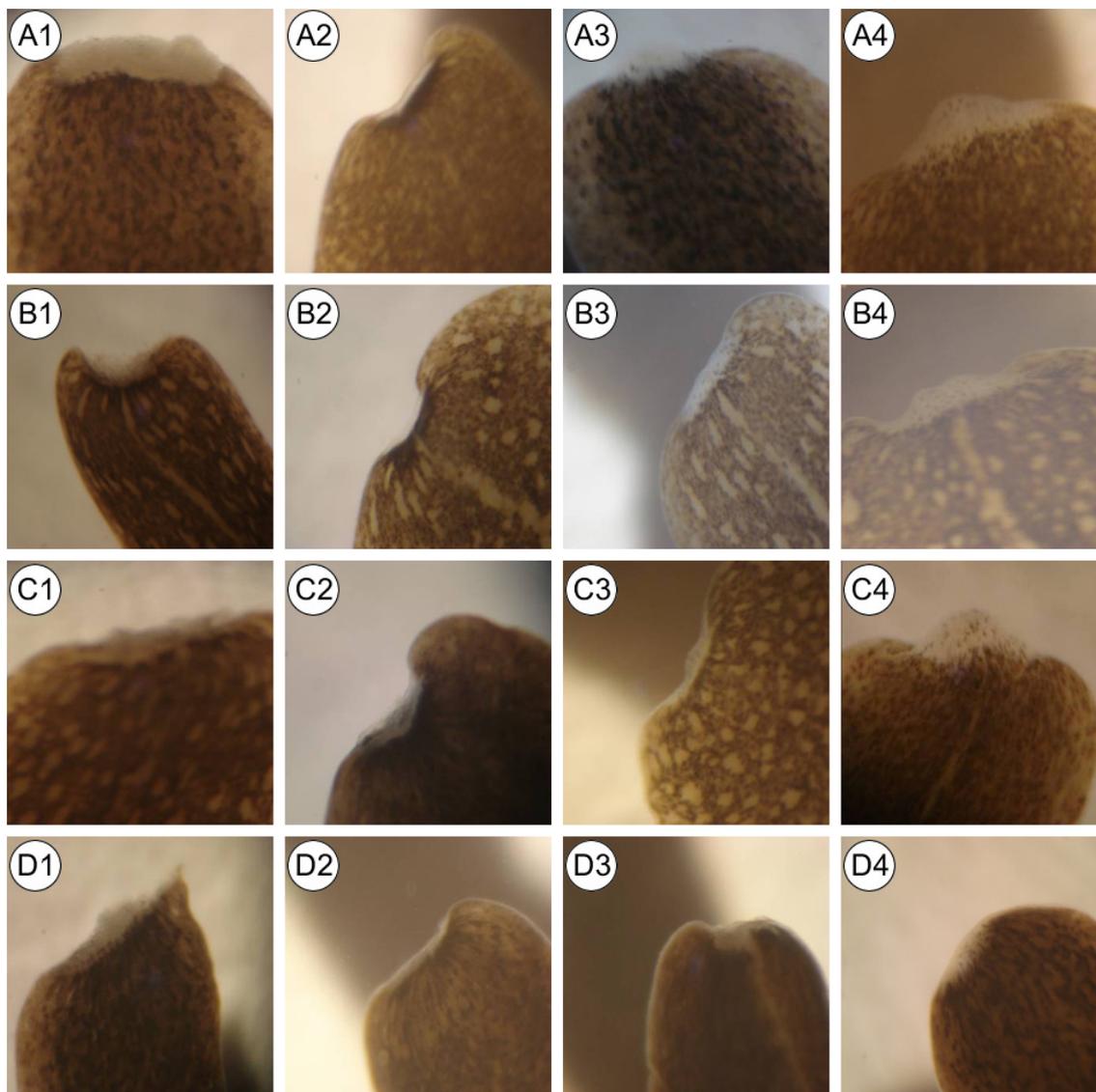


Figura 23: Teste “b” com o fipronil – Fotodocumentação das porções regenerantes de *G. tigrina*, nos tempos de 0, 24, 48 e 72h, após a secção. A1-4: controle negativo; B1-4: concentração de 7,9 mg/L de fipronil; C1-4: concentração de 0,79 mg/L de fipronil; D1-4: concentração de 0,08 mg/L de fipronil. Em todas as situações, os números 1, 2, 3 e 4 se referem aos tempos 0, 24, 48 e 72h, respectivamente.

Figura 24: Secções histológicas de planárias *Girardia tigrina* do grupo controle (técnica da hetamoxilina-eosina). ci: lúmen; ed: epiderme dorsal; ev: epiderme ventral; g: célula da gastroderme; n: tecido nervoso; p: tecido parenquimático; pf: célula fixa do parênquima; c: célula caliciforme.
Barra: A, C, E, I= 500µm; B, D, F, G, H, J, K= 300µm.

FIGURA 24

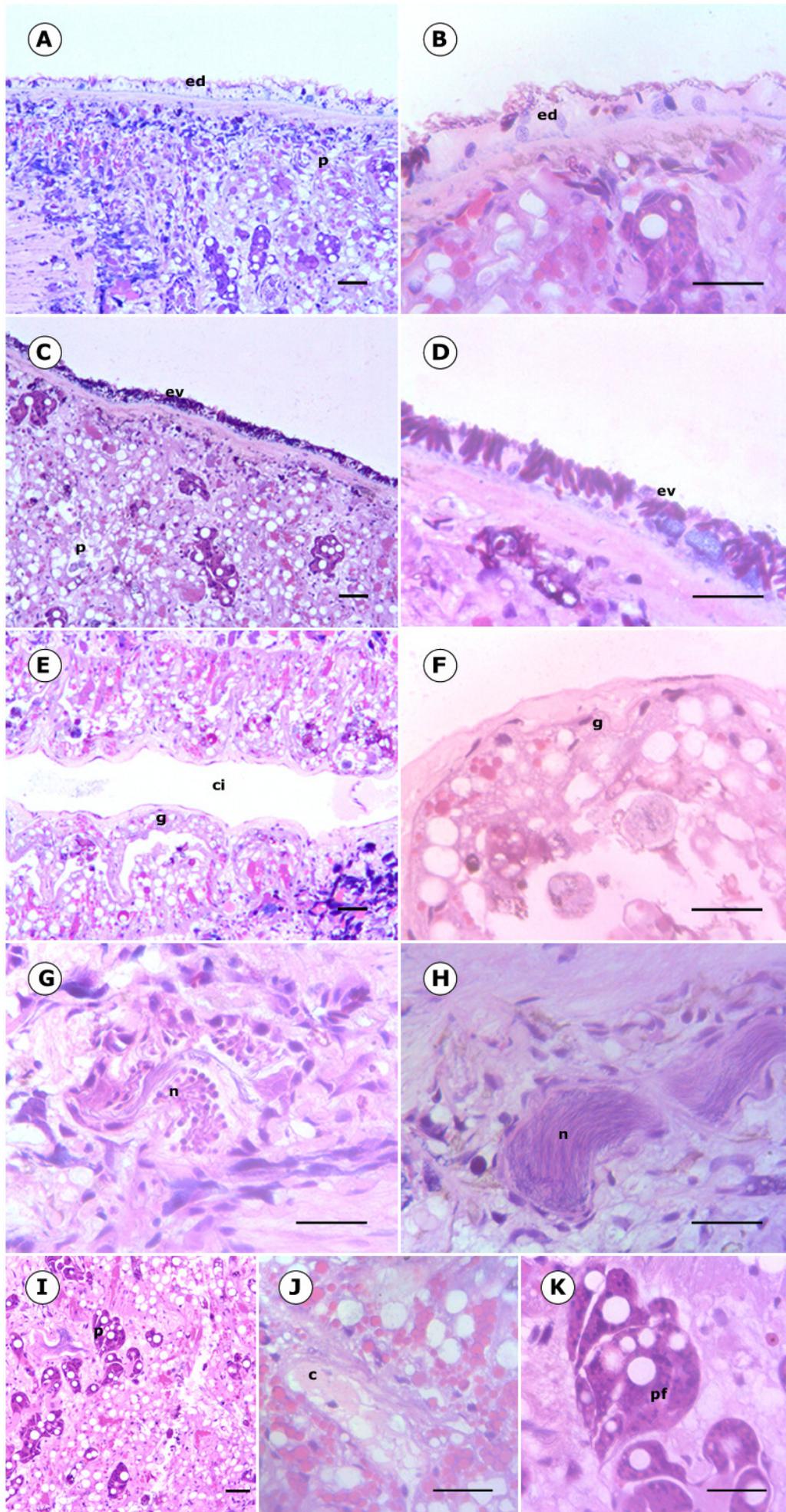


Figura 25: Secções histológicas de planárias *Girardia tigrina* do grupo controle (técnica do PAS-azul de Alcian). c: célula calciforme; ci: lúmen; ev: epiderme ventral; m: músculo; n: tecido nervoso; p: tecido parenquimático; pf: célula fixa do parênquima.

Barra: A-H= 300µm.

FIGURA 25

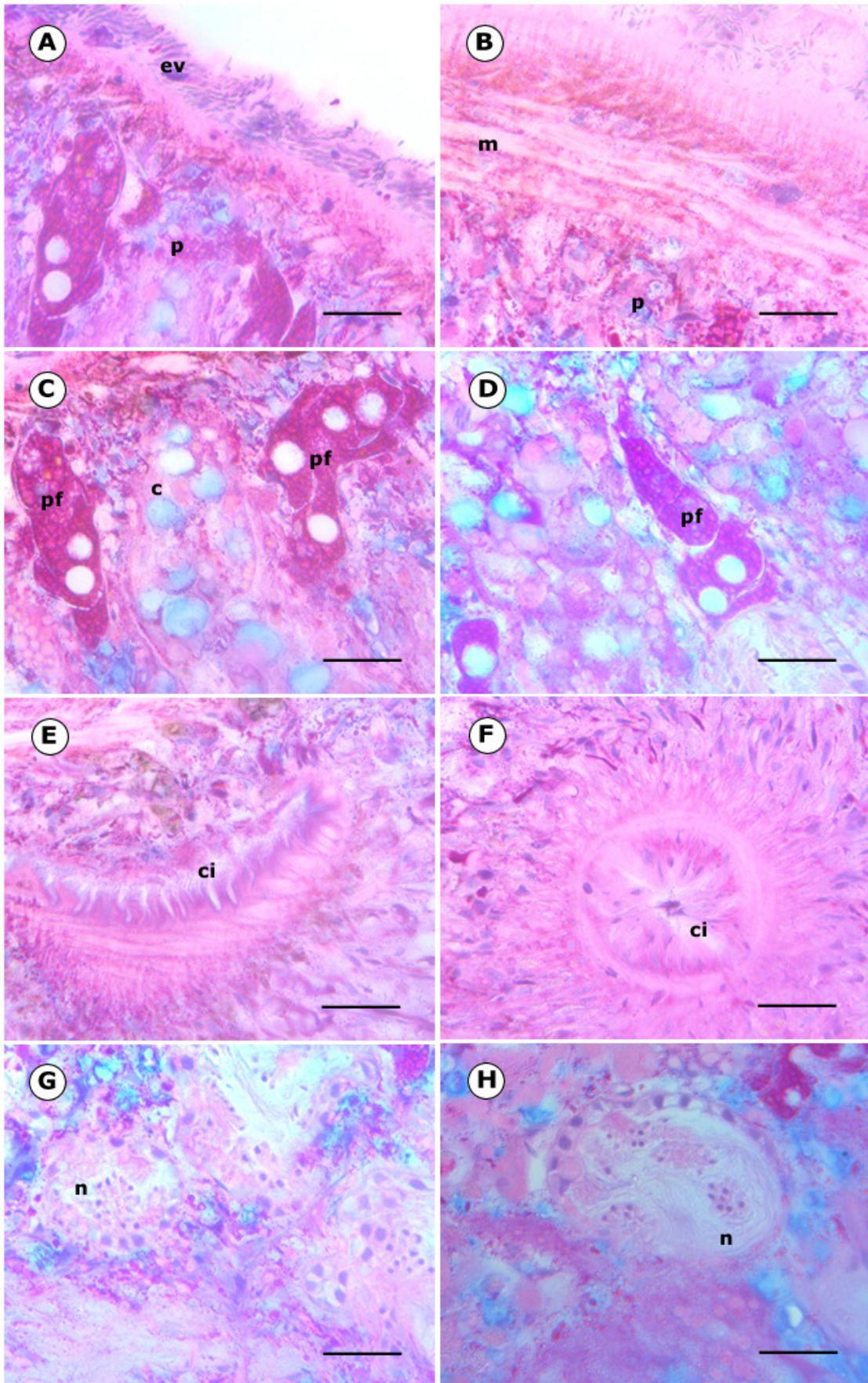


FIGURA 26

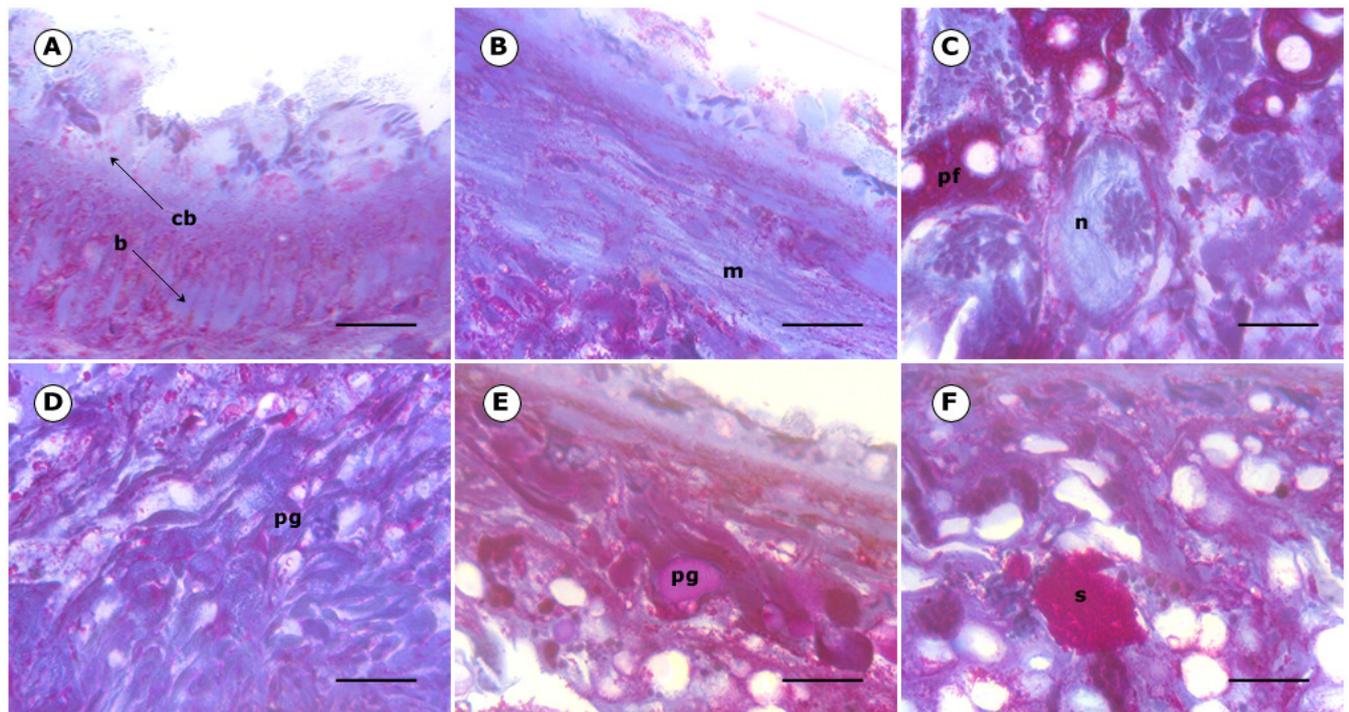


Figura 26: Secções histológicas de planárias *Girardia tigrina* do grupo controle (técnica do PAS-azul de bromofenol). b: célula alongada da epiderme; cb: célula cubóide da epiderme; m: músculo; n: tecido nervoso; pf: célula fixa do parênquima; pg: célula de pigmentação; s: secreção basófila. Barra: A-F= 300μm.

FIGURA 27

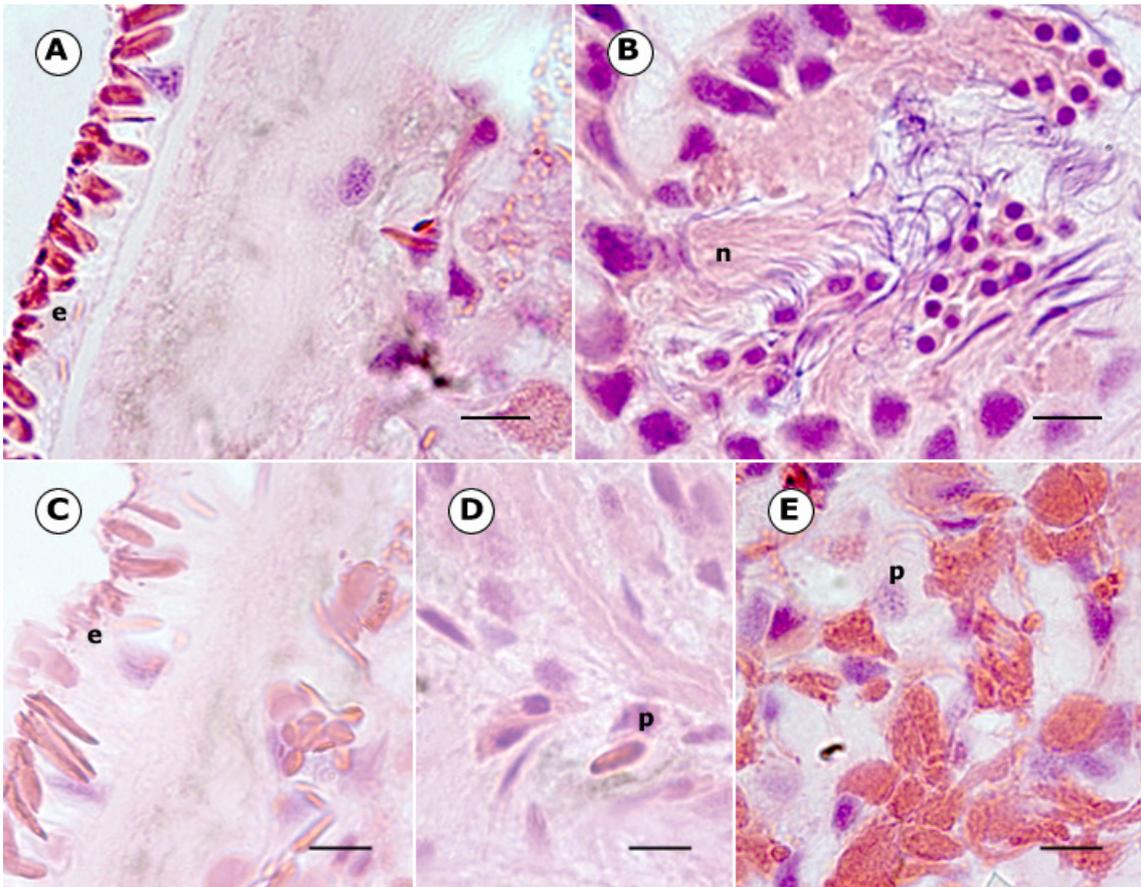


Figura 27: Secções histológicas de planárias *Girardia tigrina* do grupo controle (técnica da Reação de Feulgen). e: epiderme; n: feixe nervoso; p: tecido parenquimático.

Barra: A-E= 100 μ m.

Figura 28: Secções histológicas de planárias *Girardia tigrina* submetidas à concentração de 0,079mg/L de fipronil (técnica da hetamoxilina-eosina).

c: célula caliciforme; ci: lúmen; ev: epiderme ventral; g: célula da gastroderme; m: músculo; nb: neoblasto; p: tecido parenquimático; pf: célula fixa do parênquima.

Barra: A, C, G= 500 μ m; B, D, E, F, H= 300 μ m.

FIGURA 28

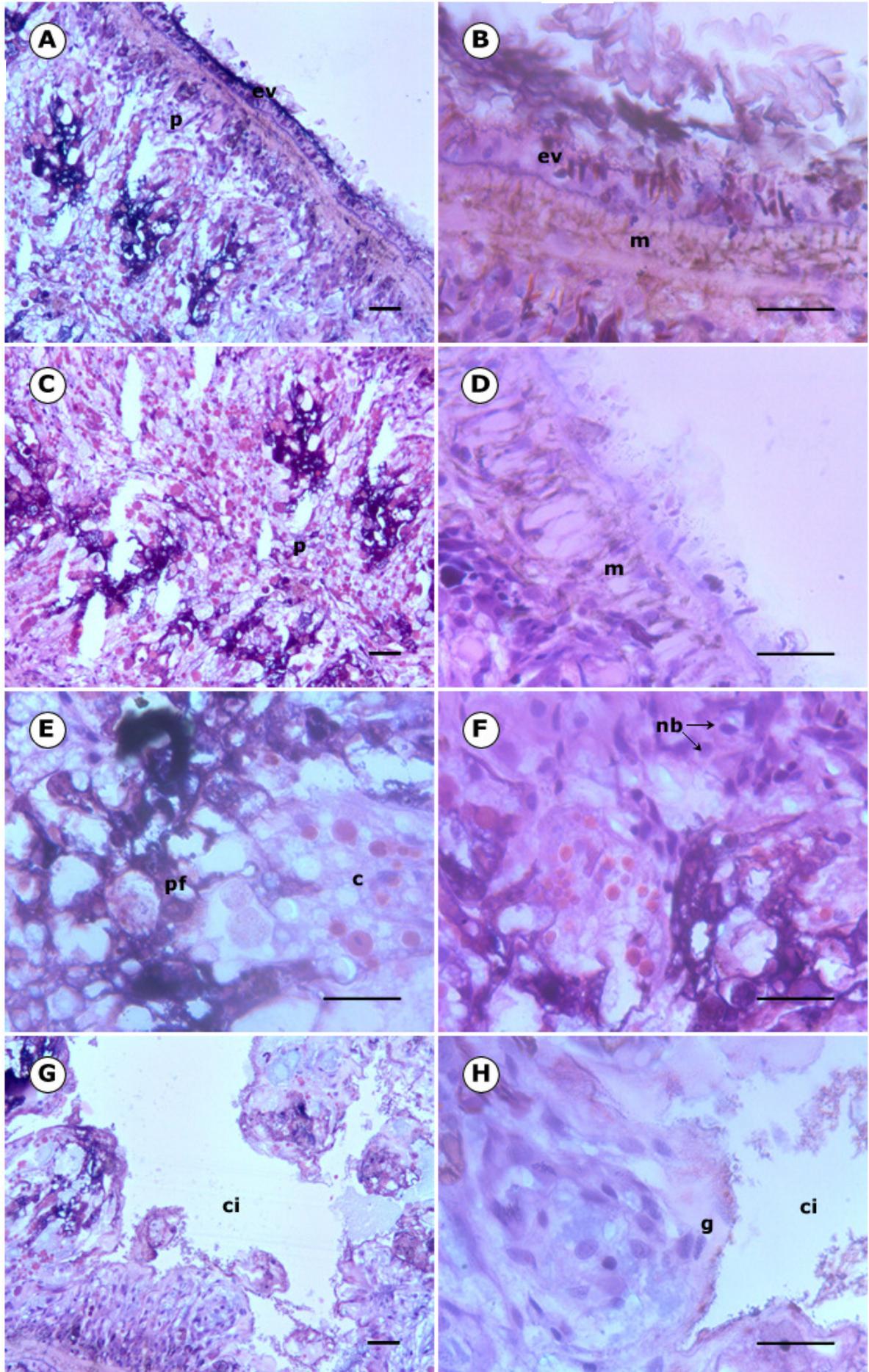


FIGURA 29

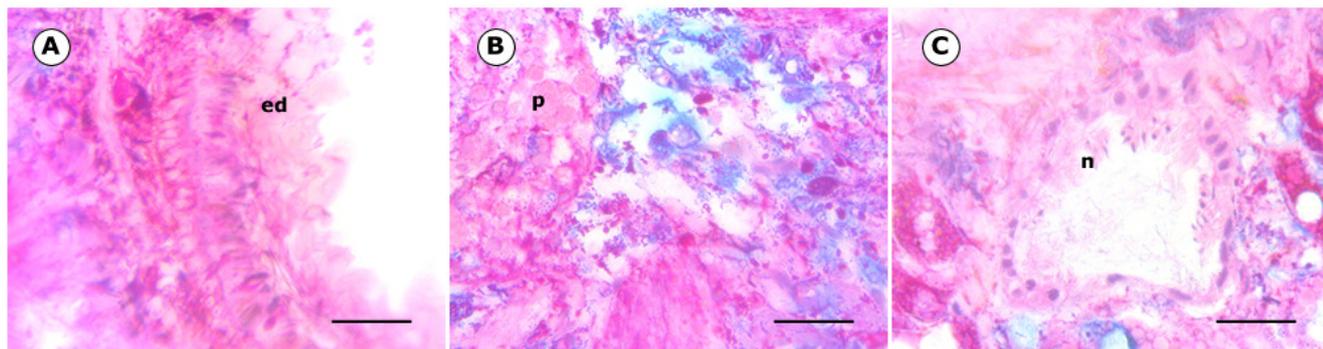


Figura 29: Secções histológicas de planárias *Girardia tigrina* submetidas à concentração de 0,079mg/L de fipronil (técnica do PAS-azul de Alcian). ed: epiderme dorsal; n: tecido nervoso; p: tecido parenquimático. Barra: A-C= 300µm.

FIGURA 30

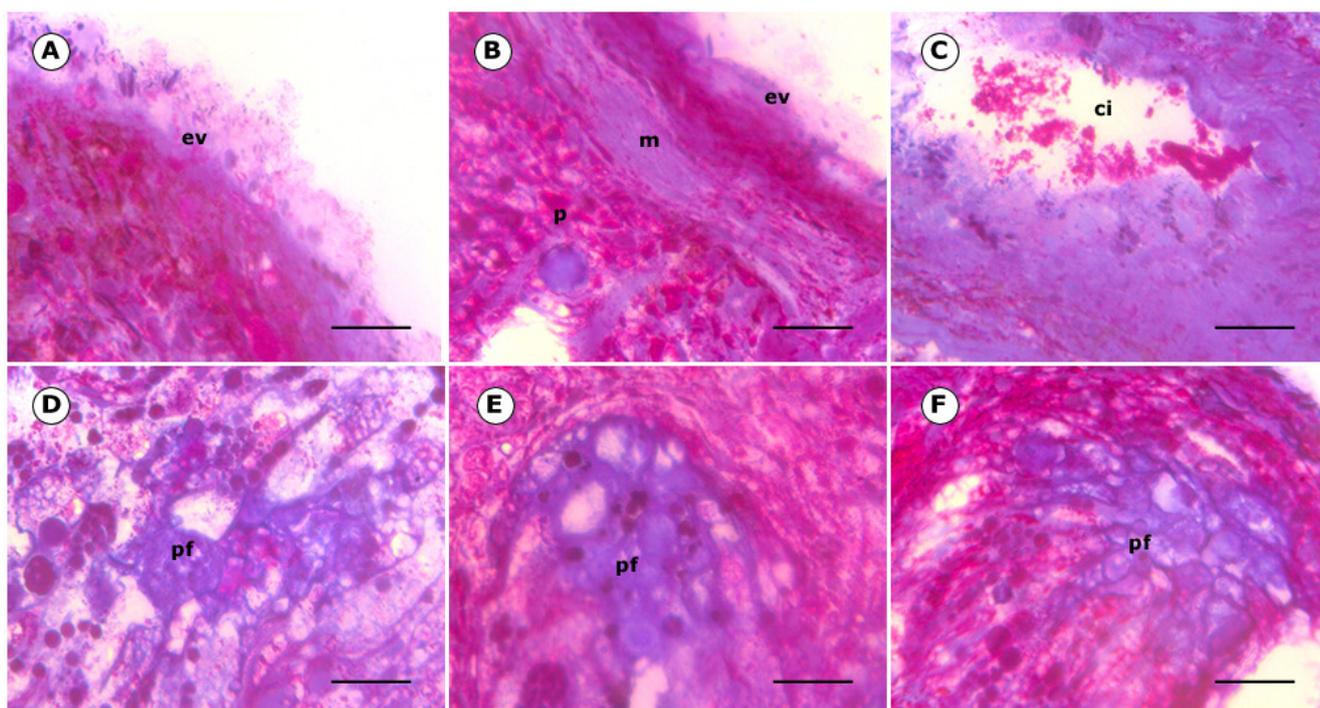


Figura 30: Secções histológicas de planárias *Girardia tigrina* submetidas à concentração de 0,079mg/L de fipronil (técnica do PAS-azul de bromofenol).ci: lúmen; ev: epiderme ventral; m: músculo; p: tecido parenquimático; pf: célula fixa do parênquima. Barra: A-F= 300µm.

FIGURA 31

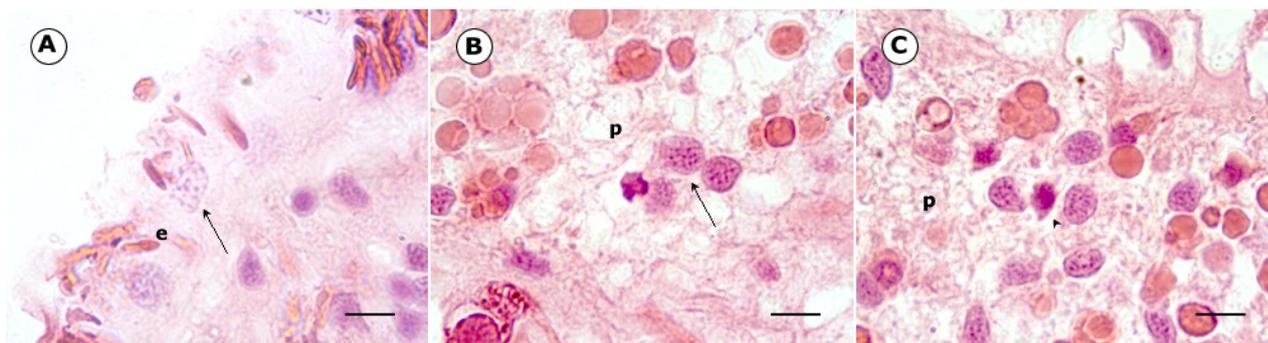


Figura 31: Secções histológicas de planárias *Girardia tigrina* submetidas à concentração de 0,079mg/L de fipronil (técnica da Reação de Feulgen).e: epiderme; p: tecido parenquimático; seta: alterações nucleares; cabeça de seta: picnose.

Barra: A-C= 100µm.

Figura 32: Secções histológicas de planárias *Girardia tigrina* submetidas à concentração de 0,79mg/L de fipronil (técnica da hetamoxilina-eosina). ev: epiderme ventral; n: tecido nervoso; p: tecido parenquimático; pf: célula fixa do parênquima.

Barra: A= 500µm; B, C, D, E= 300µm.

FIGURA 32

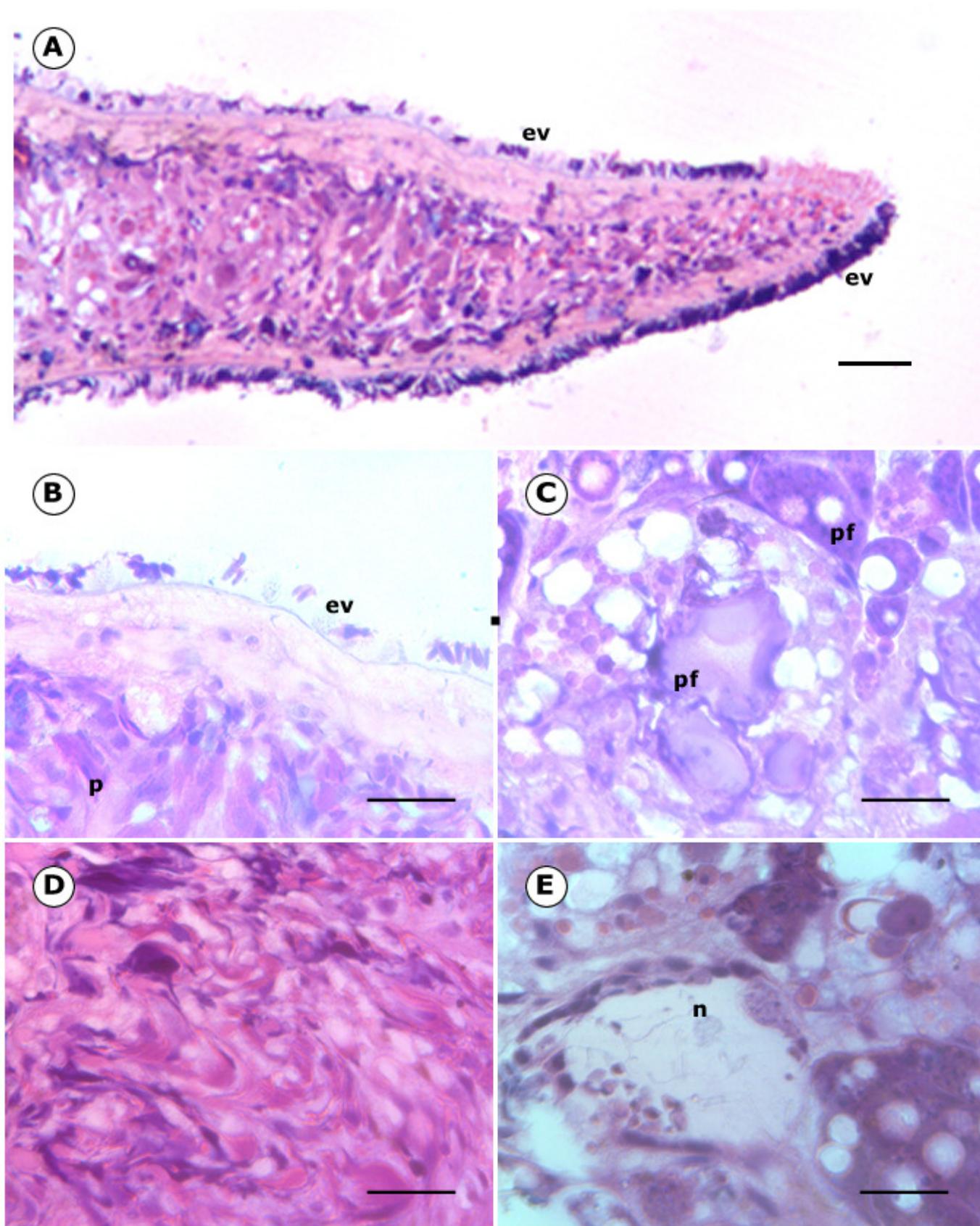


Figura 33: Secções histológicas de planárias *Girardia tigrina* submetidas à concentração de 0,79mg/L de fipronil (técnica do PAS-azul de Alcian). c: célula calciforme; ev: epiderme ventral; m: músculo; n: tecido nervoso; p: tecido parenquimático; pf: célula fixa do parênquima; ci: lúmen.
Barra: A-H= 300µm.

FIGURA 33

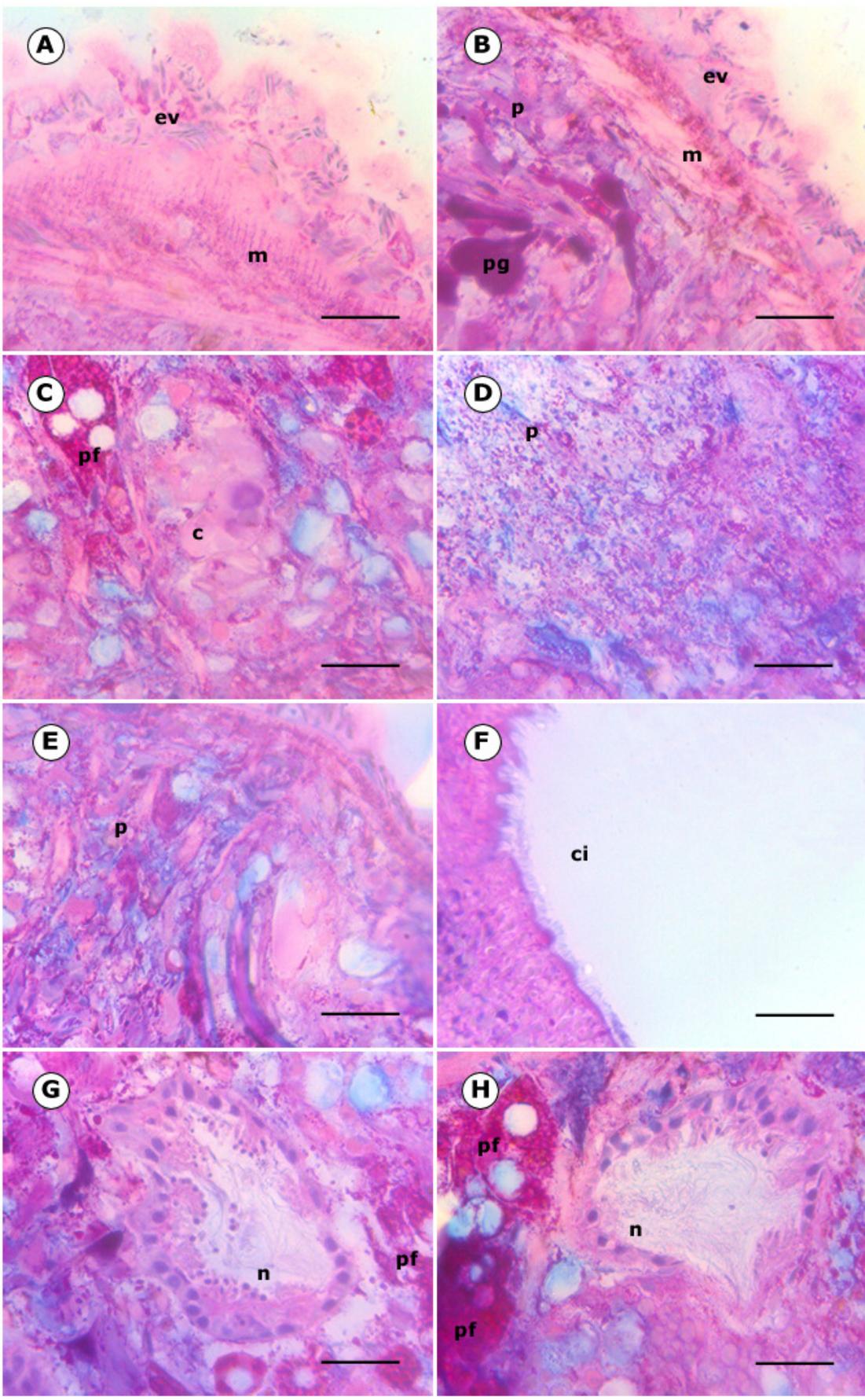


FIGURA 34

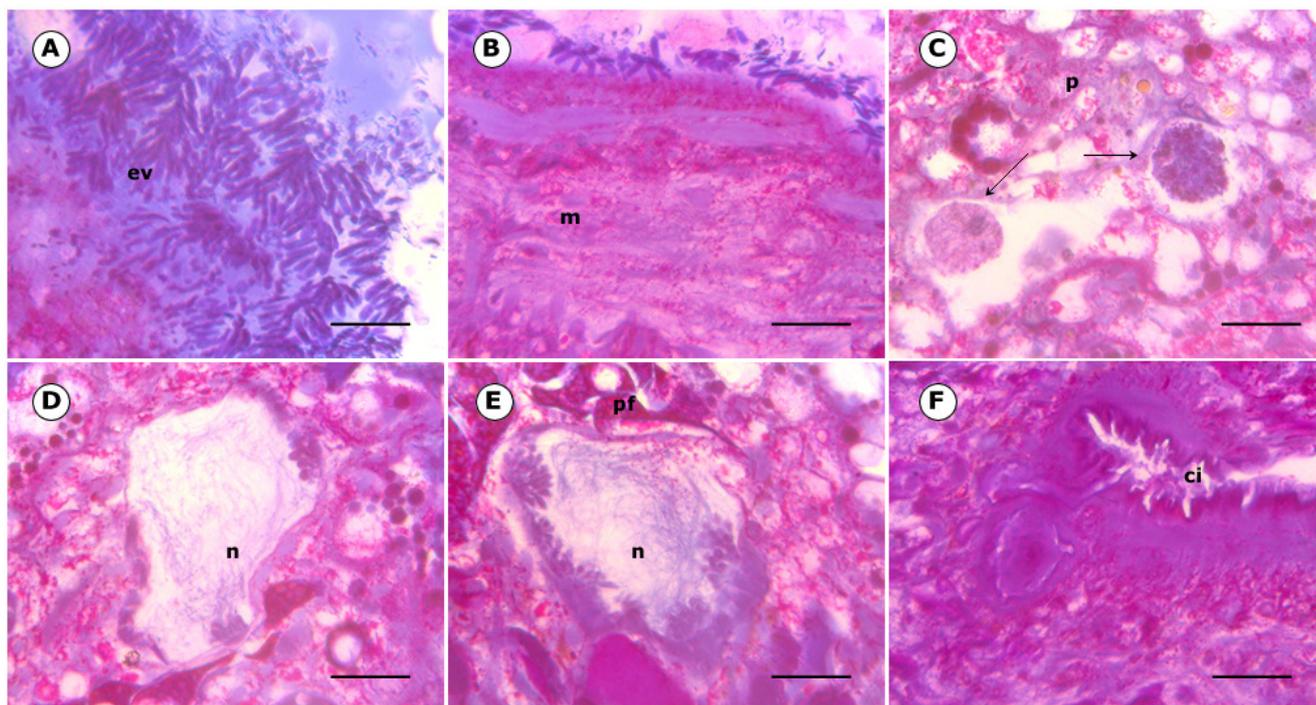


Figura 34: Secções histológicas de planárias *Girardia tigrina* submetidas à concentração de 0,79mg/L de fipronil (técnica do PAS-azul de bromofenol). ci: lúmen; ev: epiderme ventral; m: músculo; n: tecido nervoso; p: tecido parenquimático; pf: célula fixa do parênquima. Barra: A-F= 300µm.

FIGURA 35

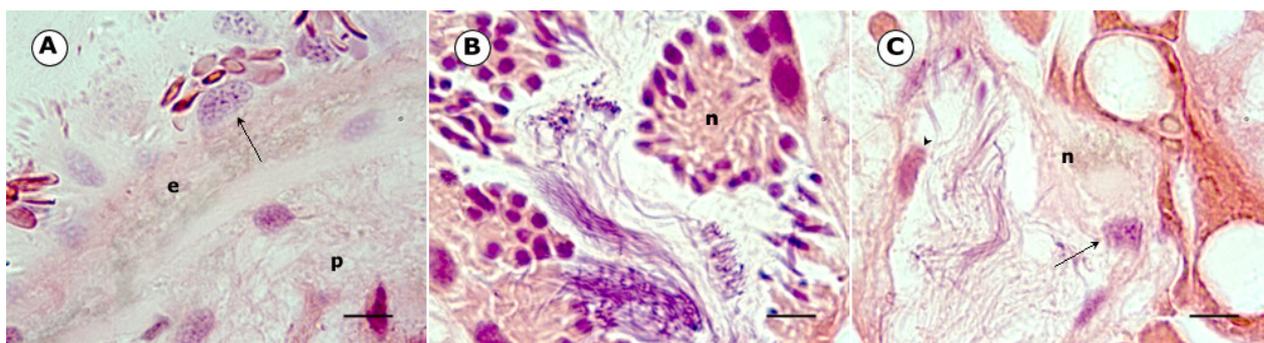


Figura 35: Secções histológicas de planárias *Girardia tigrina* submetidas à concentração de 0,79mg/L de fipronil (técnica da Reação de Feulgen). e: epiderme; m: músculo; n: feixe nervoso; p: tecido parenquimático; seta: alterações nucleares; cabeça de seta: cariorrexe. Barra: A-C= 100µm.

FIGURA 36

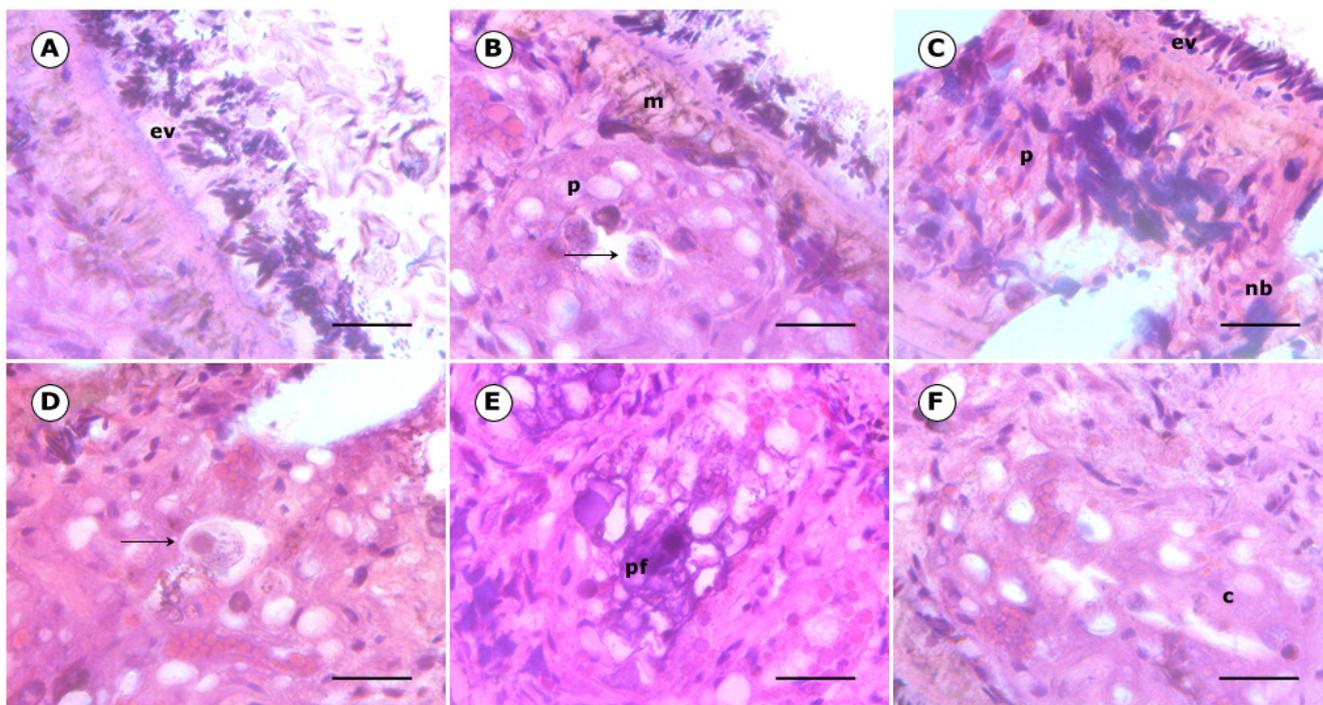


Figura 36: Secções histológicas de planárias *Girardia tigrina* submetidas à concentração de 0,08mg/L de malation (técnica da hetamoxilina-eosina). c: célula caliciforme; seta: vacuolização; ev: epiderme ventral; m: músculo; nb: neoblasto; p: tecido parenquimático; pf: célula fixa do parênquima.
Barra: A-F= 300µm.

FIGURA 37

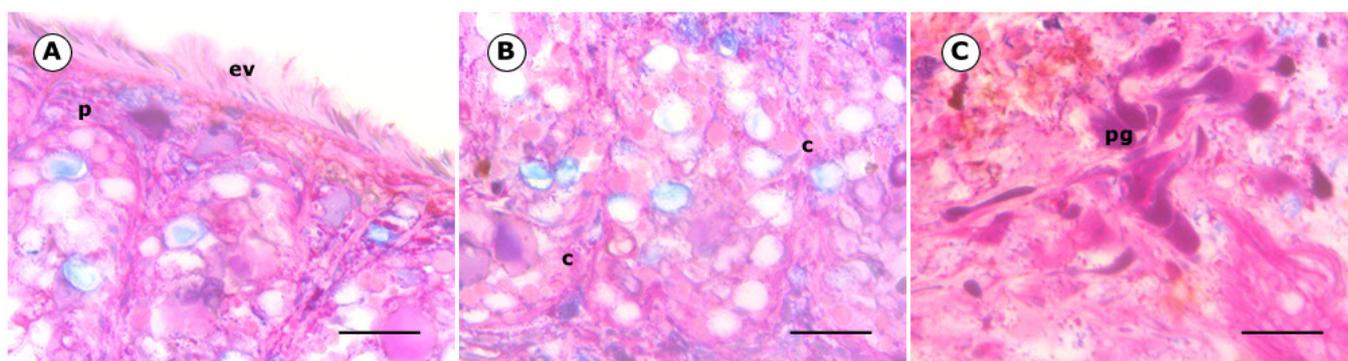


Figura 37: Secções histológicas de planárias *Girardia tigrina* submetidas à concentração de 0,08mg/L de malation (técnica do PAS-azul de Alcian). c: célula caliciforme; ev: epiderme ventral; p: tecido parenquimático; pg: célula de pigmento.
Barra: A-C= 300µm.

FIGURA 38

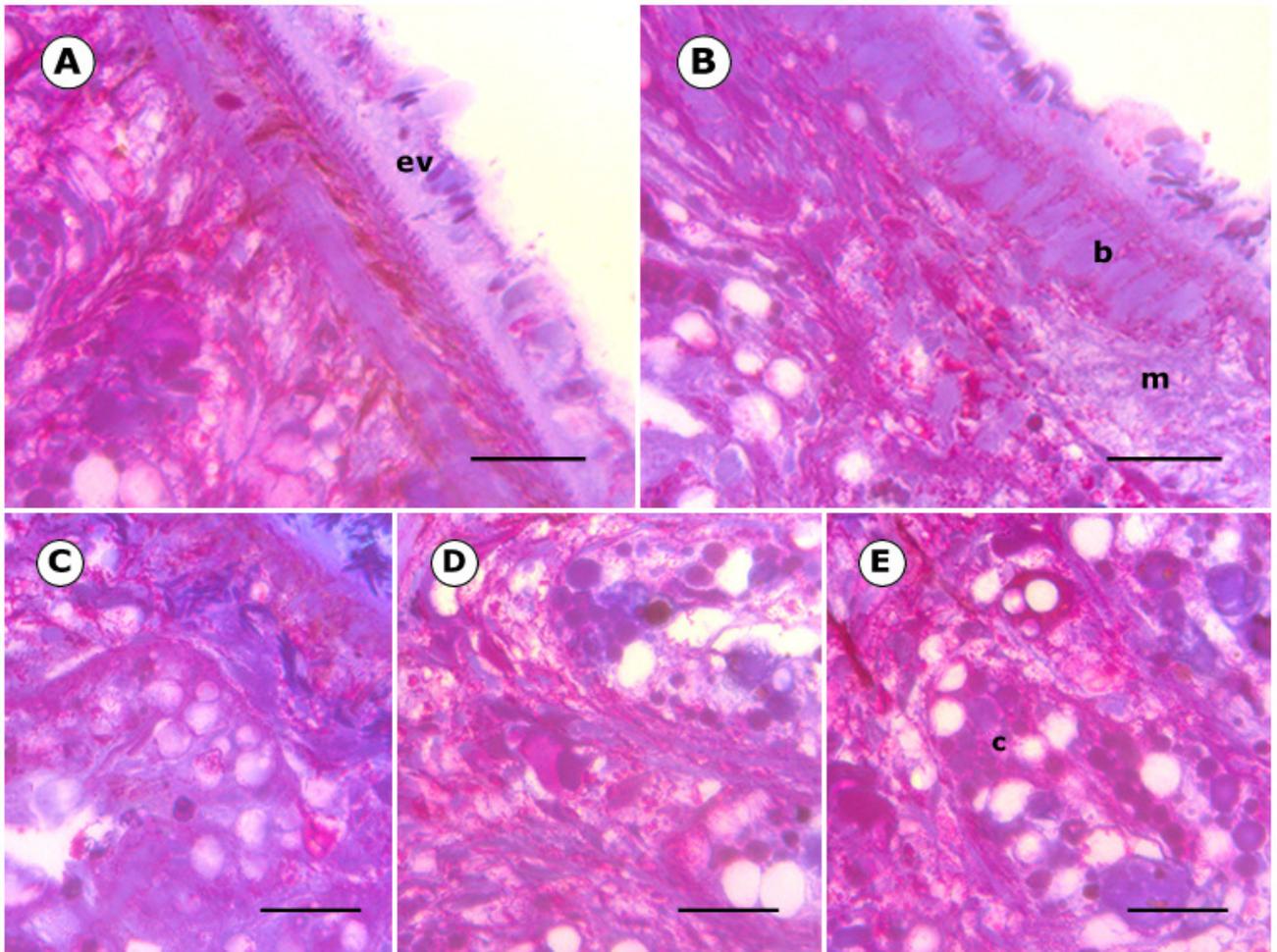


Figura 38: Secções histológicas de planárias *Girardia tigrina*, submetidas à concentração de 0,08mg/L de malation (técnica do PAS-azul de bromofenol). b: célula alongada da epiderme; c: célula caliciforme; ev: epiderme ventral; m: músculo.

Barra: A-E= 300µm.

FIGURA 39

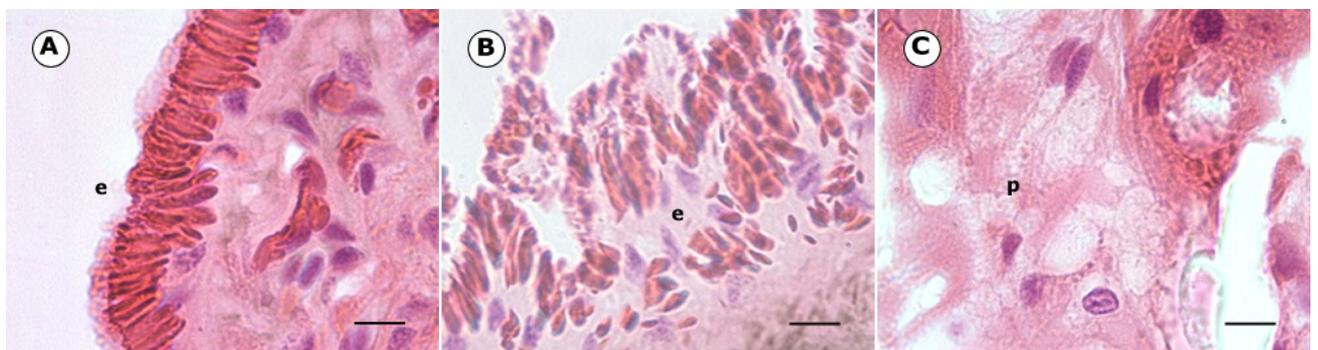


Figura 39: Secções histológicas de planárias *Girardia tigrina*, submetidas à concentração de 0,08mg/L de malation (técnica da Reação de Feulgen). e: epiderme; p: tecido parenquimático.

Barra: A-C= 100µm.

Figura 40: Secções histológicas de planárias *Girardia tigrina* submetidas à concentração de 0,8mg/L de malation (técnica da hetamoxilina-eosina). c: célula caliciforme; ci: lúmen; ev: epiderme ventral; n: tecido nervoso; p: tecido parenquimático; pf: célula fixa do parênquima.
Barra: A-G= 300µm.

FIGURA 40

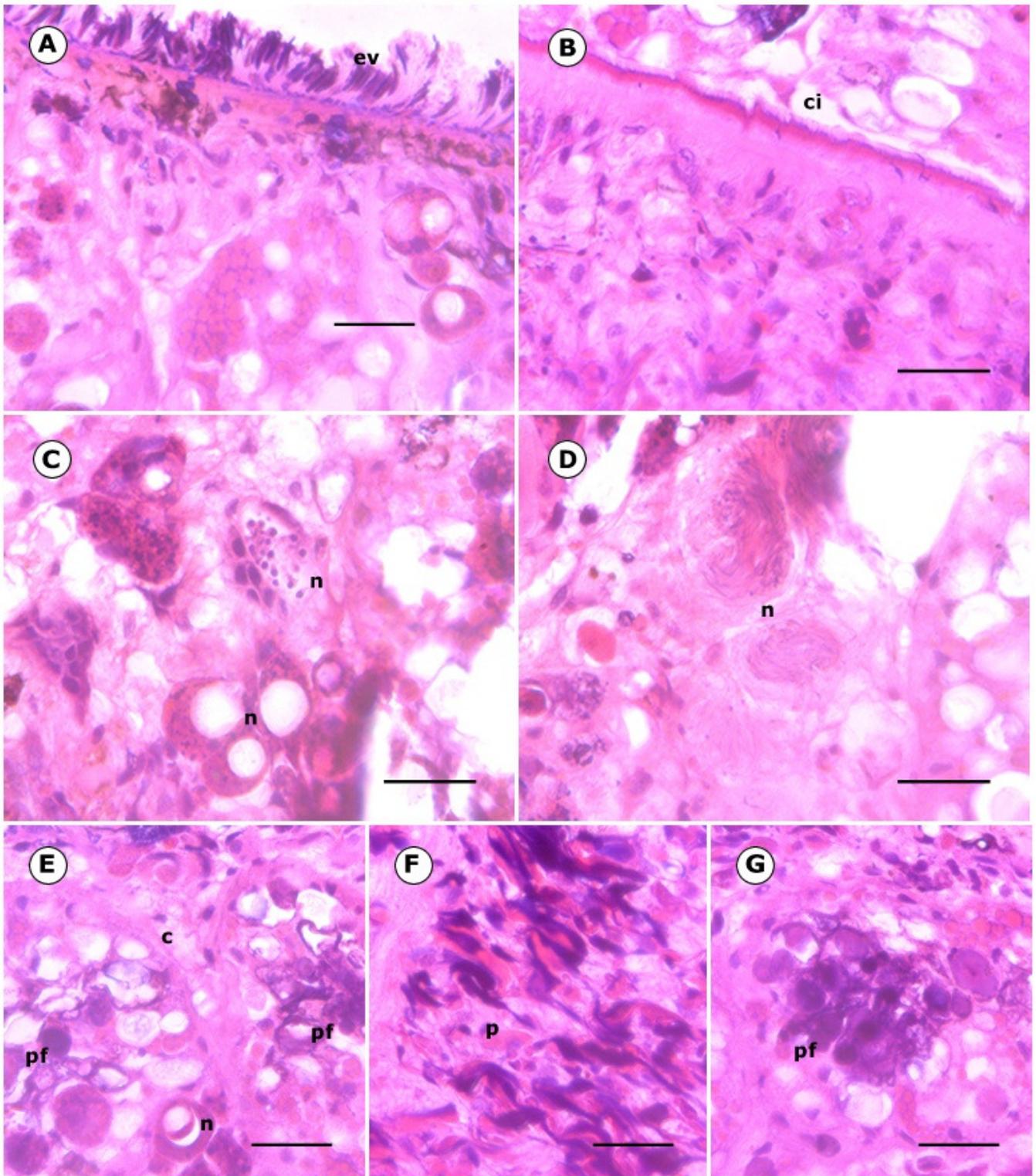


FIGURA 41

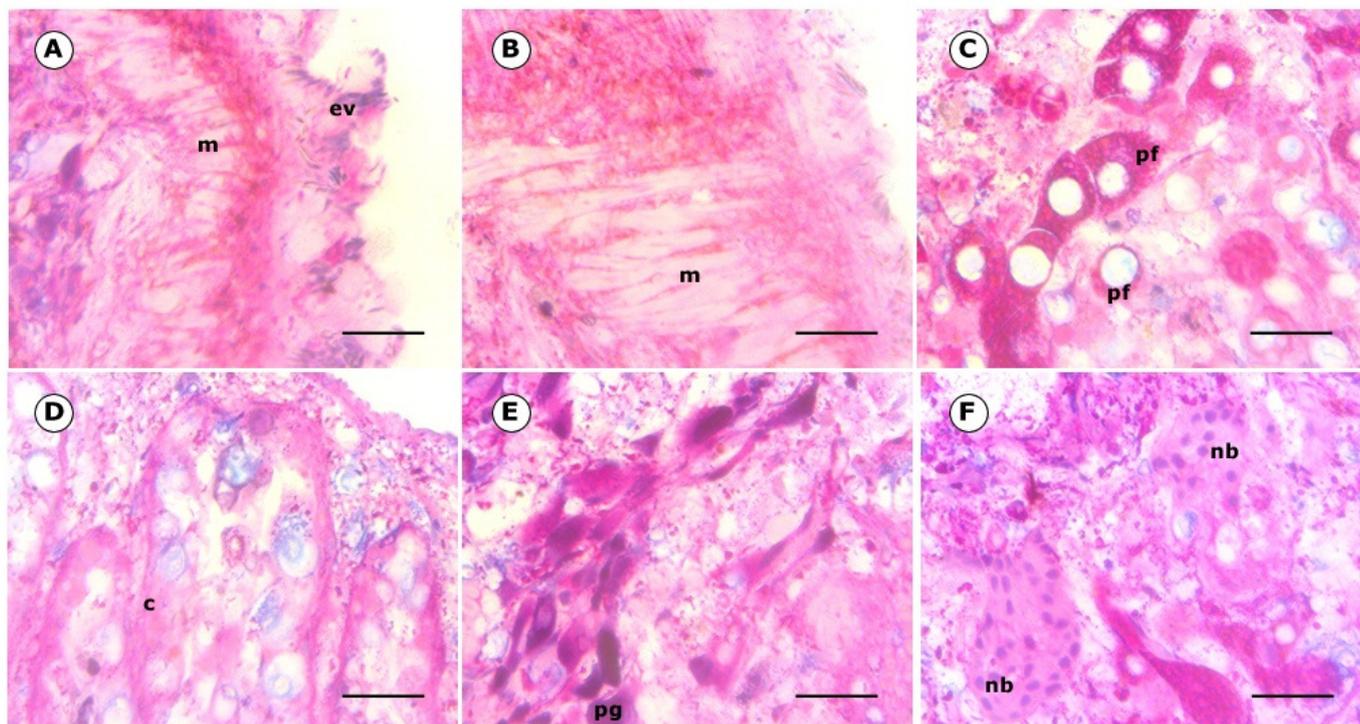


Figura 41: Secções histológicas de planárias *Girardia tigrina* submetidas à concentração de 0,8mg/L de malation (técnica do PAS-azul de Alcian). c: célula caliciforme; ev: epiderme ventral; m: músculo; nb: neoblasto; pf: célula parênquima; pg: célula de pigmentação. Barra: A-F= 300µm.

FIGURA 42

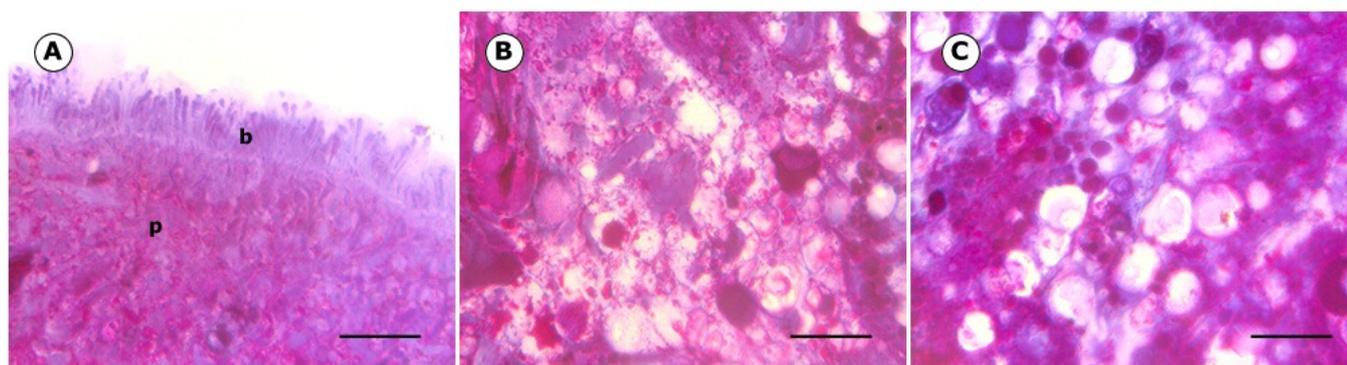


Figura 42: Secções histológicas de planárias *Girardia tigrina*, submetidas à concentração de 0,8mg/L de malation (técnica do PAS-azul de bromofenol). b: célula alongada da epiderme; p: tecido parenquimático. Barra: A-C= 300µm.

FIGURA 43



Figura 43: Secções histológicas de planárias *Girardia tigrina*, submetidas à concentração de 0,8mg/L de malation (técnica da Reação de Feulgen). e: epiderme ventral; n: feixe nervoso; p: tecido parenquimático; seta: alterações nucleares.

Barra: A-C= 100µm.

FIGURA 44

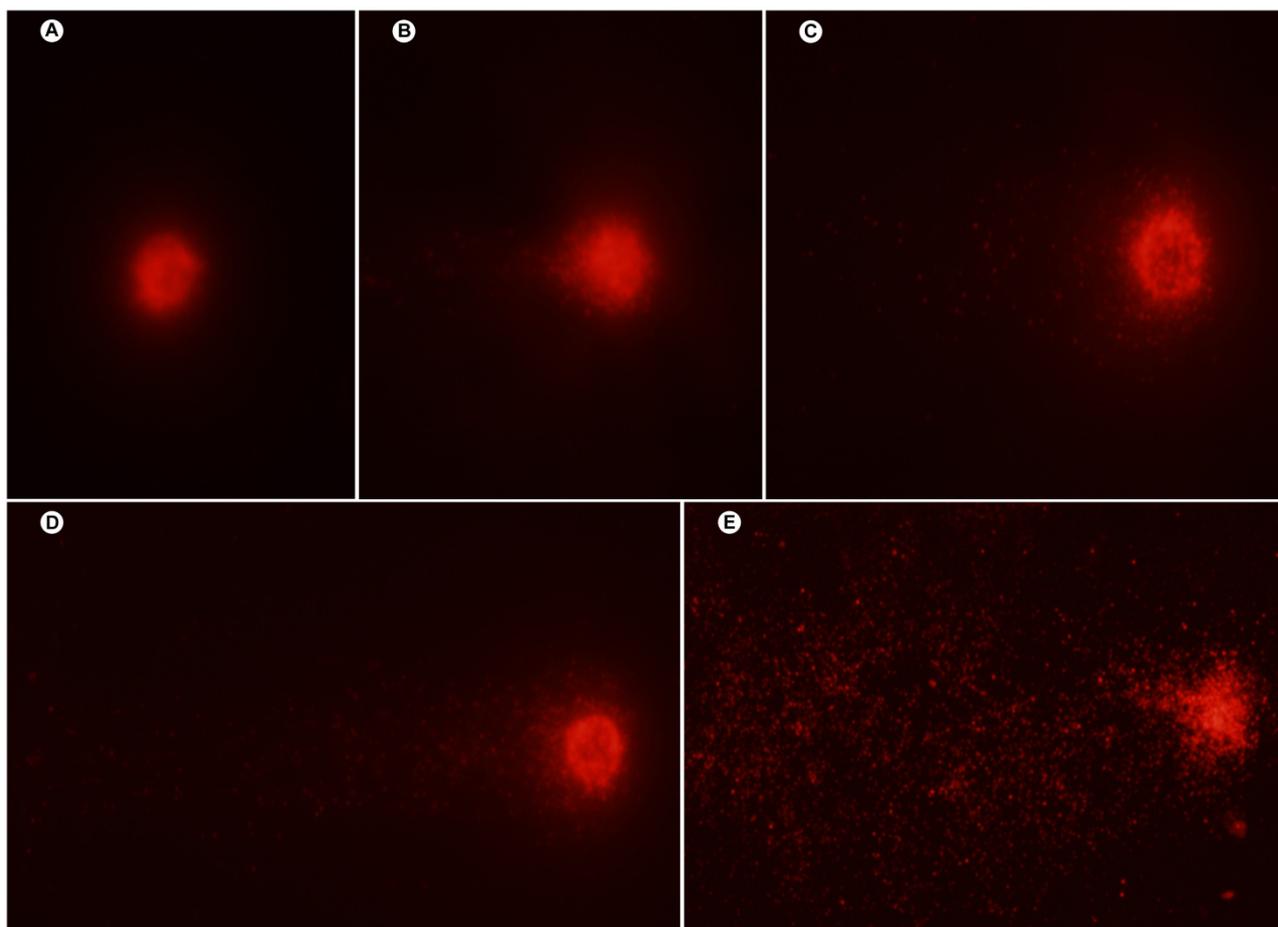


Figura 44: Cinco classes de dano no DNA observadas nas lâminas submetidas ao Ensaio Cometa. A: Classe 0, nucleóide intacto; B: Classe 1, pequeno dano; C: Classe 2, médio dano; D: Classe 3: grande dano; Classe 4: nucleóide pulverizado, indicando morte celular. Apenas nucleóides de tamanhos semelhantes foram analisados. Aumento: 400x

FIGURA 45

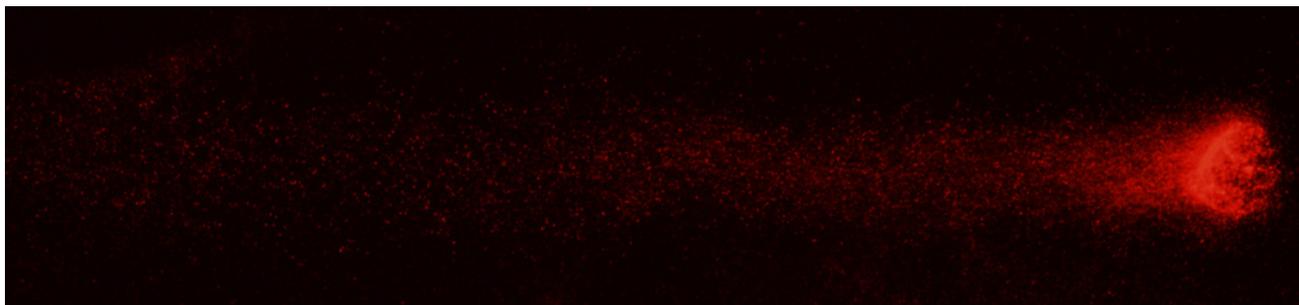


Figura 45: Cometa de classe 3 representando a heterogeneidade de tamanhos de nucleóides na população de células. A ocorrência desses tipos de nucleóides se dá, provavelmente, pela diferença de tipos celulares. Para as análises estatísticas, esses tipos raros não foram considerados. Aumento: 200x

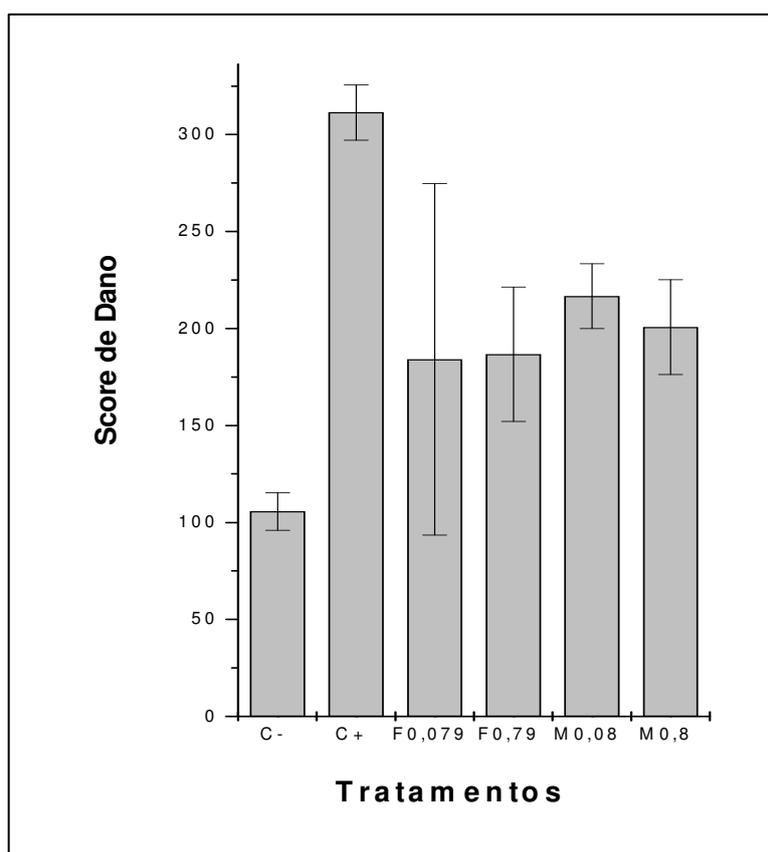


Figura 46: Gráfico representando os scores médios de dano no DNA observado pelo ensaio do

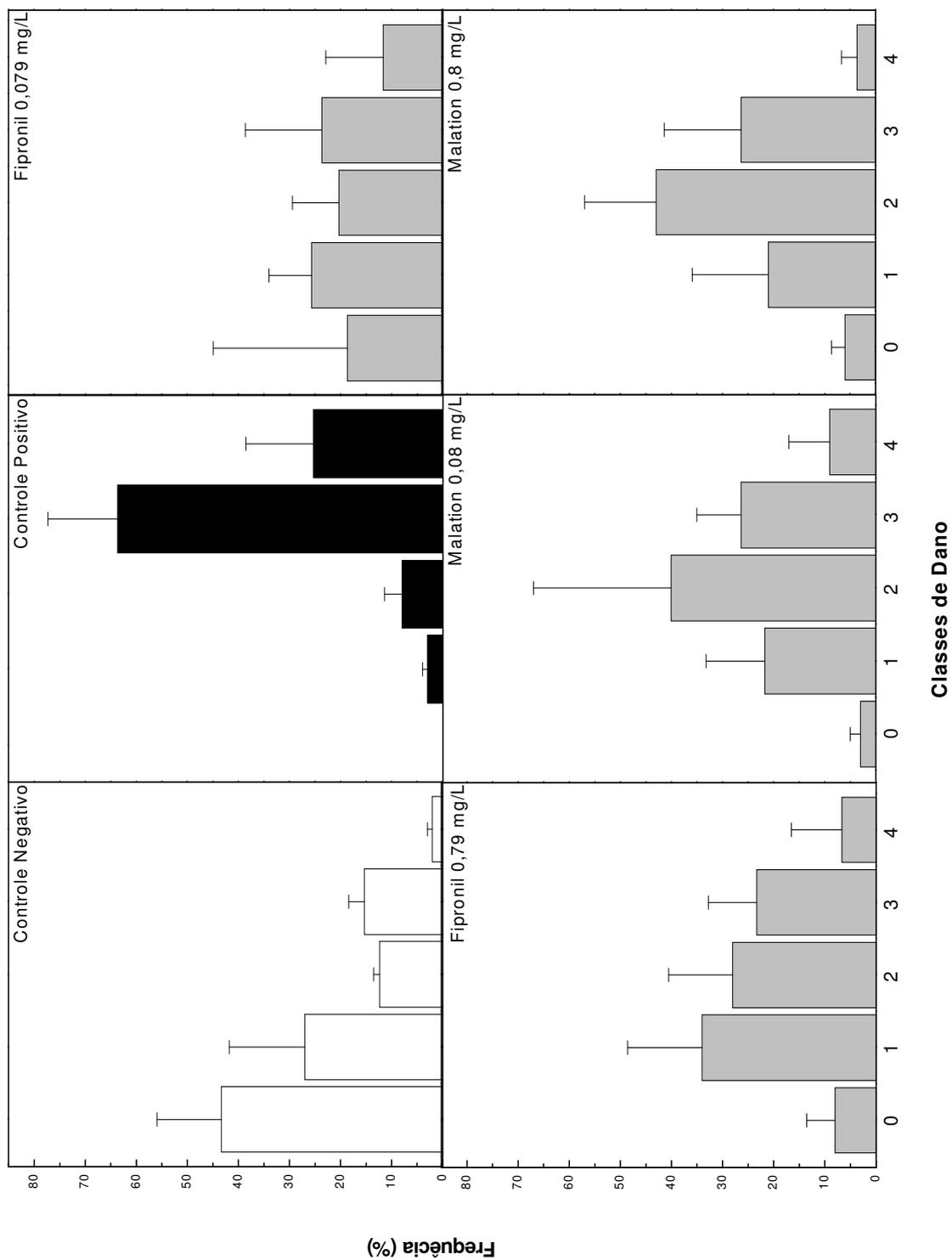


Figura 47: Gráficos representando a distribuição das classes de dano no DNA observadas nos controles positivo e negativo e nos tratamentos (malation 0,08 e 0,8 mg/L ; fipronil 0,079 e 0,79 mg/L), por meio do ensaio do cometa.

6. Referências Bibliográficas

ALVAREZ, L. *Contribuição à Biologia e à Cariologia de Sete Espécies de Planárias Terrestres Pertencentes às Famílias Geoplanidae e Rhyncodemidae*. Dissertação (Mestrado) – Dpto. de Biologia, Instituto de Biociências, Univ. São Paulo, São Paulo, 1996.

BAGUÑA, J.; ROMERO, R. *Quantitative analysis of cell types during growth, degrowth and regeneration in the planarians Dugesia mediterranea and Dugesia tigrina*. *Hydrobiologia*, v. 84, p. 181-194, 1981.

BAIRD, C. *Química Ambiental*. Porto Alegre. Bookman, 2002.

BALL, I.R. *A contribution to the phylogeny and biogeography of the freshwater tricladas (Platyhelminthes: Tubellaria)*. In: RISER, N.W. & MORSE, M.P. *Biology of the Tubellaria*, New York: Mc Graw-Hill, p.339-401, 1974.

BENYA, E.; LEAL-ZANCHET, A.M.; SANTOS, W.H.; HAUSER, J.; ERDTMANN, B. *Chromosome polymorphism and complements in populations of Girardia species (Platyhelminthes, Tricladida, Paludicola) from Southern Brazil*. *Braz. J. Bio.*, v. 67(4, suppl.), p. 951-955, 2007.

BLOOMQUIST, J.R. *Insecticides: chemistries and characteristics*. University of Minnesota: 1999. Dispõe sobre características químicas de inseticidas. Disponível em: <<http://ipmworld.umn.edu/chapters/bloomq.htm>>. Acesso em: 10 out. 2006.

BRONSTED, A.V. *Planarian regeneration*. London: Pergamon, 1969.

BUENO, D.; BAGUÑA, J.; ROMERO, R. *Cell-, tissue-, and position specific monoclonal antibodies against the planarian Dugesia (Girardia) tigrina*. *Histochem. Cell Biol.*, v.107, p.139-149, 1997.

COTELLE, S.; FÉRARD, J.F. *Comet assay in genetic ecotoxicology: a review*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 34, p. 246-255, 1999.

CRESTANA, S. *Harmonia e Respeito entre Homens e Natureza: uma questão de vida – contribuição da agricultura*. In: Castellano, E.G., Chaidhry, F.H. *Desenvolvimento sustentado: problemas e estratégias*. EESC-USP, São Carlos, São Paulo, p. 169-180. 2000.

EDWARDS, C.A. *Persistent pesticides in the environment*. 2. ed. USA: CRS Press, 170 p., 1973.

EDWIN, D.O. *Control of water pollution from agriculture*. *Irrigation and Drainage*, New York, v.55, p.1-101. 1996.

ENRICH-PRAST, A. *Effect of pesticides on nitrification in aquatic sediment*. Braz. J. Biol., v.66(2A), p. 405-412, 2006.

FAIRBAIRN, D.W.; OLIVE, P.L.; O'NEILL, K.L. *The comet assay: a comprehensive review*. Mutation Research, v. 339, p. 37-59, 1995.

GREGORY, T.R.; HEBERT, P.D.N.; KOLASA, J. *Evolutionary implications of the relationship between genome size and body size in flatworms and copepods*. Heredity, v. 84, p. 201-208, 2000.

GRISOLIA, S.K. *Agrotóxicos; mutações, câncer e reprodução*. Brasília: ELBRA, 394p., 2005.

GUECHEVA, T.; HENRIQUES, J.A.P.; 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.

HORVAT, T.; KALAFATIC, M.; KOPJAR, N.; KOVACEVIC, G. *Toxicity Testing of Herbicide Norflurazon on an Aquatic Bioindicator Species – the Planarian Polycelis felina (Daly)*. Aquatic Toxicology, v.73, p. 342-352, 2005.

HYMAN, L.H. *The invertebrates – Platyhelminthes and Rhynchocoela*. New York: Mc Graw-hill Book company, p.54-163, 1951.

JHA, A.N. *Ecotoxicological applications and significance of the comet assay*. Mutagenesis, v. 23 (3), p.207-221, 2008.

KALAFATIC, 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, 2003.

LORENZI, H. *Manual de Identificação e controle de plantas daninhas*. 3ªed. Editora Plantarum, Nova Odessa, SP, 1990.

LOURIVAL, L. *Toxicologia dos Praguicidas*. 1ªed. Editora Manole Ltda, 230p., 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Relatório de Assessoria Técnica concedida à Coordenação Regional da Bahia (CORE-BA) no Município de Feira de Santana*. BA, 2003.

NIMMO, D.R. Pesticides. In RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. *Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications*. New York: Chemosphere, p. 35-373, 1985.

OYHAMA, T.; JIN, K.; KATAH, Y.; CHIPA, Y.; INOVE, K. *1,3,5-trichloro-2-(4-nitrophenoxy)-benzene (CNP) in water, sediments and shellfish of the Ishikari river*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., New York, v. 37, p. 344-349, 1986.

PARSON, B; WITT, J.M. *Pesticides in groundurater in the USA*. A report of a 1988 survery of US States. Em8406, Oregon Satc. University Extension Service. Arch, Environ. Contam. Toxicol., [S.I.], v. 18, p. 734-747. 1989.

PEDRO, J. *Detecção da Citotoxicidade, Genotoxicidade e Mutagenicidade do Inseticida fipronil no Organismo Teste Allium cepa*. Dissertação (Mestrado) – Dpto. de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2008.

PRÁ, D.; GUECHEVA, T.; FRANKE, S.I.R.; KNAKIEVICZ, T.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. *Toxicidade e Genotoxicidade do Sulfato de Cobre em Planárias de Água Doce e Camundongos*. J. Braz. Soc. Ecotoxicol., v.1(2), p.171-175, 2006.

REDDIEN, P.W.; SÁNCHEZ-ALVARADO, A. *Fundamentals of Planarian Regeneration*. Annu. Rev. Cell Dev. Biol., v.20, p.725–757, 2004.

SÁNCHEZ-ALVARADO, A. *Planarian regeneration: its end is its beginning*. Cell, v. 124, p. 241-245, 2006.

TESHIROGI, W. *On the origin of neoblasts in freshwater planarians (Tubellaria)*. *Hydrobiologia*, v.132, p-207-216, 1986.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. *Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing*. Environmental and Molecular Mutagenesis, v.35, p. 206-221, 2000.

TINGLE, C.C.D.; ROTHER, J.A.; DEWHURST, C.F.; LAUER, S.; KING, W.J. *Health and Environmental Effects of fipronil*. Briefing, 2000.

TUNDISI, H.S.F. *Estudo dos possíveis efeitos dos resíduos do herbicida Dual-720 Ce (Metoachlor) sobre a população de Copépodos Ciclopóides, no açude do Sítio São José, Município de Embu-Guaçu, Estado de São Paulo*. Dissertação (Mestrado) – Dpto. de Ecologia Geral, Instituto de Biociências, Univ. São Paulo, São Paulo, 1990.

WATERMOLEN, D.J. *Aquatic and Terrestrial Flatworms*. Bureau of Integrated Science Sevices, Wisconsin Dp. Of Natural Resources, v. 55, 2005.

YAMAGISHI, T.; MIYAZAKI, K.; AKIYAMA, K.; MORITA, M.; NAKAGAWA, J.; HORI, S.; KANEKO, S. *Polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in comercial diphenyl ether herbicides, and in fresh fish collected from the aplicacion área*. Chemosphere. Oxford, v. 10, p. 1137-1144. 1981.

ZAGATTO, P.A. *Ecotoxicologia Aquática*. 1ª ed. Editora Rima, 2006, São Carlos.

Aluno: Davi Butturi Gomes

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Marin-Morales