

Tolerância da planária de água doce *Girardia schubarti* (Platyhelminthes, Turbellaria, Tricladida) ao fungicida Dithane (M-45)

ALEXSANDER DOS SANTOS LACERDA¹
GRAZIANE DE FREITAS ANTUNES¹
ANAPAUOLA SOMMER - VINAGRE²
DENISE HEIDRICH FARIA²
JANICE BRANDÃO GÜNTZEL²
NÁDIA TERESINHA SCHRÖDER²
ELENIR DE FÁTIMA WILLAND³

RESUMO

O efeito tóxico do dithane para *Girardia schubarti* foi investigado uma vez que estes animais são bioindicadores da qualidade da água e este fungicida possui toxicidade moderada para o homem. Para isto, os animais foram expostos à água contaminada em diferentes concentrações, por 72h. Os resultados mostram que o dithane causa mortalidade dose-dependente; distúrbios na locomoção e na morfologia externa dos animais tratados quando comparados ao grupo controle. Os valores de glicogênio não apresentaram variações significativas, mas, os valores de proteínas totais apresentaram-se 25% menores que os obtidos no grupo controle. O presente estudo demonstra que a exposição da planária de água doce *G. schubarti* ao dithane acarreta diferentes respostas toxicológicas.

Palavras-chave: toxicidade, planária, dithane, morfologia, alterações metabólicas.

¹ Acadêmicos do Curso de Biologia/ULBRA – Bolsistas PROICT/ULBRA

³ Professora - Orientadora do Curso de Biologia/ULBRA (elenir.willand@terra.com.br)

² Professoras do Curso de Biologia/ULBRA

ABSTRACT

The toxic effect of dithane for *Girardia schubarti* was investigated since that these animals are bioindicators of clean water and this fungicide has demonstrated moderate poisonous for man. For this, the animals have been exposed to contaminated water in different concentrations, for 72h. The results showed that dithane causes dose-dependent mortality like as: disturbances on locomotion and in the external morphology from the treated animals when compared to the controls. The values of glycogen had not presented significant variations, but the values of total proteins were 25% smaller as the obtained into the control group. The present study demonstrates that the exposition of fresh water planarian *G. schubarti* to dithane causes different toxicological answers.

Key words: cytotoxicity, planarian, dithane, morphology, metabolic alterations.

INTRODUÇÃO

A contaminação dos recursos hídricos tem aumentado nos últimos anos e entre os principais agentes causadores destacam-se o uso indiscriminado de pesticidas, que contaminam os solos e o ar e atingem os cursos d'água através da chuva, por lixiviação. Estes são classificados de acordo com seu uso em inseticidas, fungicidas, herbicidas, raticidas ou pela família química em organoclorados, organofosforados, carbamatos, bupiridílios, dentre outros.

O dithane é um fungicida/acaricida pertencente ao grupo químico dos ditiocarbamatos, um produto de coordenação iônica de manganês e íon zinco, amplamente utilizado nos cultivos em geral. Não apresenta toxicidade aguda para o homem, mas pode causar dermatites, obstrução nasal, náuseas, diarreia, hipotermia, debilidade muscular e paralisia respiratória (LARINI, 1979; KOCH, 1996; PENAGOS, 2002). Nos organismos aquáticos, minhocas e microrganismos do solo, o dithane é considerado altamente tóxico possuindo atividade carcinogênica, teratogênica e mutagênica, sendo incluído na classe toxicológica II. Em *Bombix mori* foi relatado efeito letal (VASUDEV et al.,

1994) e em *Drosophila melanogaster* afetou a fertilidade (MARCHAL-SÉGAULT, 1993; MARCHAL-SÉGAULT & LAUGÉ, 1997).

As planárias de água doce têm sido freqüentemente empregadas para avaliar a toxicidade do meio ambiente pela alta sensibilidade que possuem às baixas concentrações de poluentes ambientais (NANO et al., 2002). Os bioensaios com planárias têm determinado vários tipos de respostas toxicológicas, incluindo mortalidade, carcinogênese e respostas neurocomportamentais (BALDWIN & WELLS, 1978; BEST et al., 1981a, 1981b; LIMA, 1981, 1982; HANSEN et al., 1993; SCHAEFFER, 1993; JOHNSON et al., 1994; NELSON et al., 1994; HUTCHINSON et al., 1997; INDEHERBERG et al., 1999; GUECHEVA et al., 2001; GUECHEVA et al., 2003; HORVAT et al., 2005).

A preservação das populações de planárias de água doce em seu ambiente natural é vital para o equilíbrio deste ecossistema, pois são predadoras de larvas, pupas e ovos de mosquitos como *Aedes aegypti* (GEORGE, 1979; PERICH & BOOBAR, 1990), *Aedes albopictus* e *Culex quinquefasciatus* (MELO & ANDRADE, 2001).

Desta forma, as planárias podem ser consideradas agentes de controle biológico de mosquitos.

Assim, o presente estudo objetiva verificar a tolerância (DL_{50}) da planária *G. schubarti* ao dithane, investigar a mortalidade, os distúrbios locomotores e morfológicos externos e avaliar seu efeito sobre o metabolismo de carboidratos e de proteínas, visando estabelecer novos parâmetros para monitoramento de ambientes expostos a agroquímicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas planárias da espécie *G. schubarti* (Figura 1), coletadas em riacho de água corrente e limpa no município de Morro Reuter, RS.

No laboratório, os animais foram acondicionados em recipientes de plástico com água do local de coleta, mantidos a temperatura de $18 \pm 1^\circ\text{C}$ e alimentados semanalmente com moluscos da espécie *Cantareus aspersus* (Müller, 1774).

Durante os ensaios toxicológicos os indivíduos sexualmente maduros, com morfologia externa normal, medindo 10 – 20 mm de comprimento e em jejum alimentar de uma semana, foram separados em lotes constituídos por dez exemplares e armazenados nas condições acima citadas.

Durante o preparo das soluções para os testes, o agrotóxico em pó foi pesado e diluído diretamente na água onde se encontravam as planárias. A exposição durou 72h, conforme sugerido pelo método de Standart (1965).

Para a determinação da DL_{50} foram utilizadas concentrações crescentes a partir de 0 (grupo controle) até 34mg/l. Os resíduos de animais

necrosados foram removidos para evitar a putrefação da água.

O acompanhamento da mortalidade e dos distúrbios locomotores e morfológicos externos foi realizado mediante observações diárias sob estereomicroscópio Leica. A fotodocumentação foi feita com máquina fotográfica digital (Sony DSC-W1) acoplada à ocular da lupa.

Ao final do período experimental, foram determinados os valores de glicogênio (GEARY et al., 1981) e de proteínas totais (LOWRY et al., 1951) dos animais. Os resultados foram analisados pelo teste *t* de Student e $p < 0,05$ foi usado como critério de significância.

RESULTADOS

Mortalidade

Os resultados dos experimentos mostraram que a dose que mata 50% dos animais (DL_{50}) foi alcançada na concentração 34mg/l ao final das 72h de tratamento.

A taxa de mortalidade dos indivíduos tratados variou conforme a concentração utilizada e o tempo de exposição, sendo o segundo dia do tratamento o que registrou maior incidência de mortos, permanecendo no terceiro dia, os animais ou fragmentos daqueles que sobreviveram.

Distúrbios locomotores

Os distúrbios locomotores apresentados pelos animais expostos variaram de acordo com o tempo de exposição e a concentração utilizada.

Em 24h, foram observados movimentos em círculo, torções em hélice (= espiral) e enrolamento cefálico-caudal. A seguir, tornaram-se predominantes movimentos desorientados e lentos em todas as concentrações.

Ao analisar estes mesmos animais após 48h de exposição, vimos que o movimento lento ainda predominava, mas começou a haver uma diminuição na locomoção até a total falta de movimento (imobilidade).

Ao final do período do experimento de 72h, muitos animais já haviam morrido e os sobreviventes demonstravam imobilidade total, mantendo-se no fundo dos recipientes.

Distúrbios morfológicos externos

Os animais do grupo controle (Figura 1) não mostraram distúrbios morfológicos durante o experimento, mantendo corpo filamentososo, achatado dorso-ventralmente e com extremidades afiladas. A cabeça é triangular com um par de aurículas laterais, um ápice do rostró frontal e um par de olhos na região mediano-dorsal. A colora-

ção na face dorsal é preta, com ou sem listra dorsal e as laterais e o ventre do corpo são cinza, sendo visível nesse, as aberturas faríngeal e genital.

Em 24h de exposição, os animais submetidos às concentrações = 18mg/l do agrotóxico mostravam ausência de ápice do rostró (Figura 2) ou rostró unido, manchas brancas perto da cauda, retração corporal, ondulações laterais e, em alguns, visualizou-se manchas escuras nas laterais da cabeça e no ápice do rostró.

No entanto, os animais após 48h em contato com o dithane, em concentrações maiores que a metade da DL_{50} , iniciaram processo de morte, aparecimento de tumores, degeneração caudal e cefálica (total, só do ápice do rostró com os olhos (Figura 3) ou todo rostró incluindo as aurículas (Figura 4) e processos de hipopigmentação caudal (Figura 5).

Deformações na cabeça (formato rombudo ou de bigorna (Figuras 5, 6)) seguidas de acefalia, tumores laterais ao corpo, ocorrência de feridas necróticas em diferentes regiões corporais, marcas de hipopigmentação no corpo e na taça de pigmento dos olhos (Figura 7) e até mesmo extravasamento de mesênquima nos animais mais lesionados, foram encontradas em 72h de exposição.



Figura 1 - Exemplar de *G. schubarti* do grupo controle.

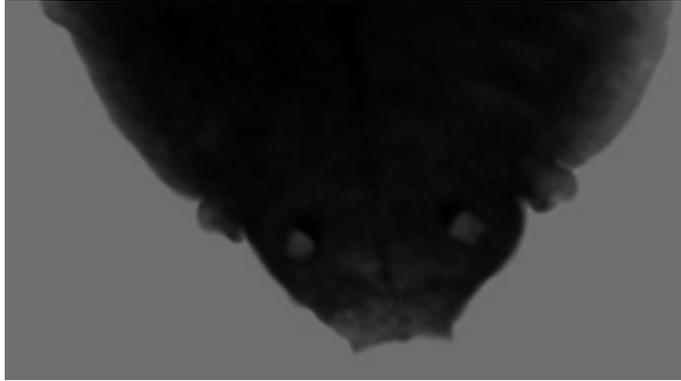


Figura 2 - Ausência de ápice no rosto e deformações auriculares em região cefálica de *G. schubarti*. Dithane: 18 mg/l, 24h de exposição.

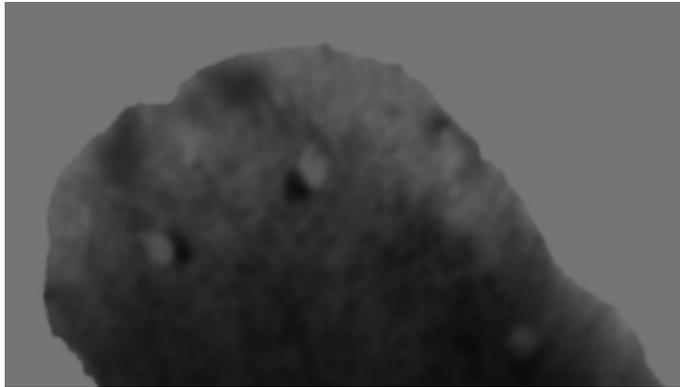


Figura 3 - *G. schubarti* apresentando manchas escuras (= hiperpigmentadas) na região cefálica lateral e ausência de rosto e aurículas. Dithane: 24 mg/l, 72h de exposição.

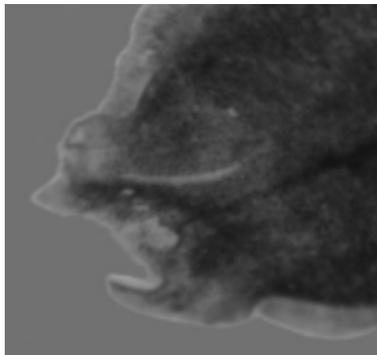


Figura 4 - Degeneração do ápice do rosto, olhos e aurículas em exemplar de *G. schubarti*. Dithane: 24 mg/l, 72h de exposição.



Figura 5 - *G. schubarti* exibindo cabeça sem ápice do rostró e com constrição, necrose e hipopigmentação da região caudal. Dithane: 34 mg/l, 72h de exposição.

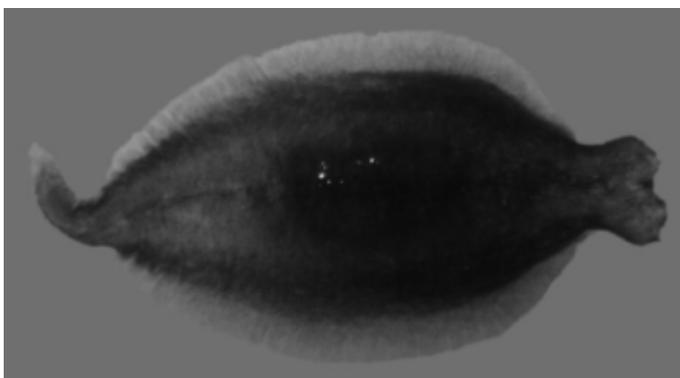


Figura 6 - Deformação cefálica tipo bigorna e contração corporal. *G. schubarti*. Dithane: 22 mg/l, 72h de exposição.

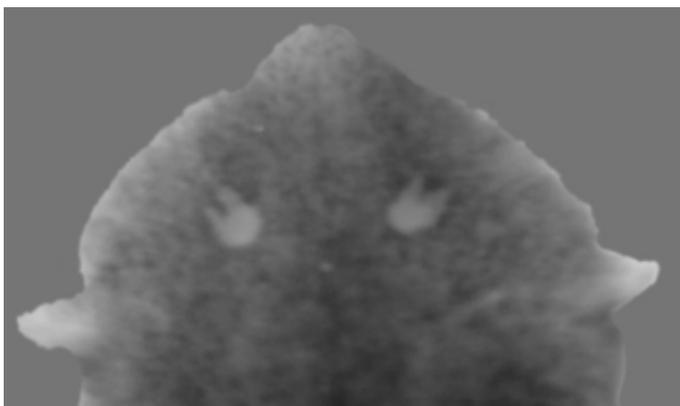


Figura 7 - *G. schubarti* mostrando olho hipopigmentado com ausência da taça pigmentar. Dithane: 18 mg/l, 72h de exposição.

Alterações Metabólicas

Os valores de glicogênio não apresentaram variações significativas entre os dois grupos de animais (Figura 8), porém, no grupo tratado com dithane, os valores de proteínas totais apresentaram-se 25% menores que os obtidos no grupo controle (Figura 9). Esta queda na con-

centração de proteínas totais provavelmente contribuiu com as alterações morfológicas observadas.

Não foram observados distúrbios locomotores e morfológicos externos, alterações metabólicas e mortalidade nos animais do grupo controle, durante as 72h de experimento.

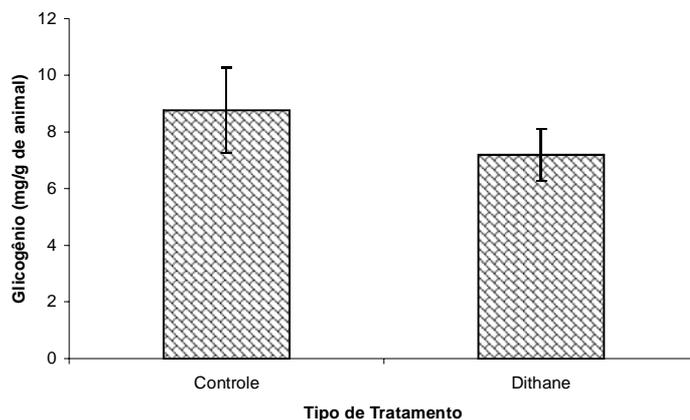


Figura 8 - Concentração de glicogênio em planárias *Girardia schubarti* após 72h de tratamento com Dithane M45 (34mg/L). As colunas representam as médias e as barras verticais representam os erros padrões.

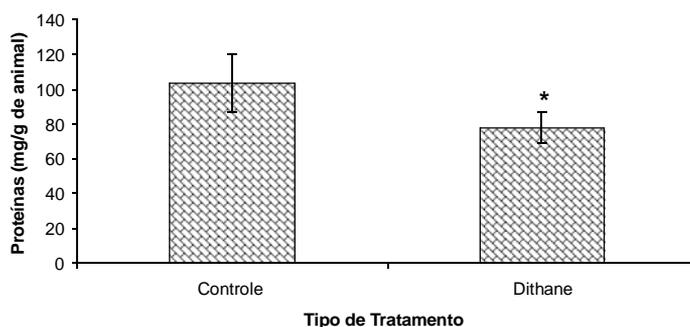


Figura 9 - Concentração de proteínas totais em planárias *Girardia schubarti* após 72h de tratamento com Dithane M45 (34mg/L). As colunas representam as médias e as barras verticais representam os erros padrões.*: diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

O efeito tóxico do fungicida dithane para a planária de água doce *Girardia schubarti*, foi constatado pela diversidade de respostas encontradas.

A taxa de mortalidade dos indivíduos expostos ao dithane mostrou variação conforme a concentração utilizada e o tempo de exposição. Este aspecto também foi referido por HORVAT et al. (2005) para *Polycelis felina* exposta ao herbicida norflurazon. Provavelmente a autólise dos animais está relacionada à destruição das estruturas teciduais pelo efeito citotóxico do fungicida, que aliado ao rompimento da parede do corpo, acarreta perda dos componentes celulares. A combinação destes fatores pode resultar na incapacidade de reparo, que é uma característica bem desenvolvida na espécie. O aparecimento de lesões necróticas que antecedem a autólise e a morte dos animais também foram constatados por Hankenson e Schaeffer apud SCHAEFFER (1993) em *Dugesia dorotocephala*, após exposição à dinitro-4-metilnilina.

Os distúrbios locomotores induzidos pelo tratamento com dithane foram dose-dependentes. Resultados similares foram obtidos por VILLAR et al. (1993) para a planária *Dugesia dorotocephala* tratada com pesticida organofosforado e por HORVAT et al. (2005) para a planária *Polycelis felina* exposta ao herbicida norflurazon tendo atribuído tais distúrbios às altas concentrações observadas no sistema nervoso desses animais. Os distúrbios evidenciados em *G. schubarti* no primeiro dia de tratamento (movimento em círculo, movimento desorientado e lento) possivelmente estão aliados a danos no sistema nervoso, mas estudos preliminares mostram a ocorrência de inchaço, rompimento e desestruturação dos tecidos

musculares, que provavelmente sejam os principais responsáveis pelas contrações fortes (torções em hélice e enrolamento cefálico-caudal). No terceiro dia, a falta de movimento pode ser resultado da destruição dos elementos nervosos e musculares.

Os distúrbios de pigmentação (hipopigmentação, hiperpigmentação e albinidade) visualizados em diferentes regiões corporais -cabeça, corpo e cauda- variaram conforme a concentração utilizada. Despigmentações na cabeça e em diferentes regiões corporais também foram encontradas no tratamento de planárias com o pesticida organofosforado (VILLAR et al., 1993) e durante exposição ao herbicida norflurazon (HORVAT et al., 2005). Áreas hipo e hiperpigmentadas em tumores desenvolvidos por *Dugesia dorotocephala* após exposição a 1,2-benzantraceno e metilcolantrene foram referidas e comparadas por FOSTER (1969) aos tumores melanóticos dos vertebrados. Hipopigmentação causada por agentes tóxicos tem sido constatada em outros invertebrados. SANCHEZ et al. (2004) relataram para larvas de crustáceo *C. granulatus*, após exposição ao zinco, prata e mercúrio, uma significativa diminuição de pigmento corporal. A redução de pigmentação nesse caso foi atribuída a alterações do controle endócrino da migração de pigmento (FINGERMAN et al., 1998) ou à distribuição de cálcio nas células (RAINBOW & DALLINGER, 1993), que é essencial para a migração normal de pigmento (FINGERMAN, 1983). Nas planárias não existem relatos de controle endócrino para a distribuição de pigmento e, portanto, distúrbios na síntese desse pigmento podem estar relacionados à destruição das células produtoras, os melanóforos, e/ou alteração nos mecanismos bioquímicos da melanogênese, como a manutenção da tirosinase ativa, que segundo SPEARMAN (1973) está presente nos pré-melanossomos não pigmentados.

Os resultados encontrados neste estudo indicam que o segundo dia de exposição ao dithane é aquele em que ocorre o maior índice de mortalidade e onde se acentuam os distúrbios locomotores, possivelmente devido aos efeitos decorrentes da exposição ao fungicida que acaba lesando as estruturas celulares e teciduais desses animais.

CONCLUSÕES

O presente estudo demonstra que o fungicida dithane é letal para a planária de água doce *G. schubarti* e acarreta vários distúrbios morfológicos e alterações metabólicas subletais. A evolução dos distúrbios é dose e tempo-dependente. As alterações de ordem locomotora foram de irritabilidade ao toque até perda de sensibilidade, movimentos em círculos e desorientados, contrações corporais generalizadas seguidas de diminuição da capacidade de locomoção até a imobilidade total. Já os distúrbios morfológicos externos evidenciam mudança na forma do corpo, constrição nas laterais e rompimento das extremidades, encurtamento do rostro e das aurículas seguida de acefalia parcial ou total, distúrbios nos olhos, hipopigmentação regional ou total e ocorrência de feridas necróticas em diferentes áreas corporais.

Os testes metabólicos revelam uma diminuição significativa na concentração de proteínas totais dos animais expostos ao fungicida em relação aos do grupo controle.

Assim, devido as diferentes respostas toxicológicas encontradas, sugere-se a viabilidade da utilização de *G. schubarti* como animal modelo em programas de monitoramento ambiental.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Universidade Luterana do Brasil – ULBRA, o apoio financeiro concedido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALDWIN, R. L.; WELLS, M. R. Effect of DDT on NADH-cytochrome b5 reductase activity in the freshwater planarian *Phagocata velata*. **Bulletin of Environmental Contamination Toxicology**, v.19, n.4, p.428-430, 1978.

BEST, J. B.; MORITA, M.; ABBOTTS, B. Acute toxic responses of the freshwater planarian, *Dugesia dorotocephala*, to chlordane. **Bulletin of Environmental Contamination Toxicology**, v.26, p.502-507, 1981.

BEST, J. B. et al. Acute toxic responses of the freshwater planarian *Dugesia dorotocephala*, to methylmercury. **Bulletin of Environmental Contamination Toxicology**, v.27, p.49-54, 1981.

FINGERMAN, M. Regulation of release and mode of action of crustacean chromatophorotropins. **American Zoologist**, v.23, p.517-527, 1983.

FINGERMAN, M.; JACKSON, N.; NAGABHUSHANAM, R. Hormonally regulated functions in crustaceans as biomarkers of environmental pollution. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.120C, p.343-350, 1998.

FOSTER, J. A. Malformations and lethal growths in planaria treated with carcinogens. **National Cancer Institute Monographs**, v.31, p.683-691, 1969.

- GEARY, N.; LANGHANS, W.; SCHARRER, E. Metabolic concomitants of glucagon-induced suppression of feeding in the rat. **American Journal of Physiology**, v.241, n.10, p.330-335, 1981.
- GEORGE, J. A. The potential of a local planarian *Dugesia tigrina* (Tricladida: Turbellaria) for the control of mosquitoes in Ontario. **Proceedings of the Entomological Society of Ontario**, v.109, 1979.
- 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, n.1-2, p.19-27, 2001.
- GUECHEVA, T. et al. Stress protein response and catalase activity in freshwater planarian *Dugesia* (*Girardia*) *schubarti* exposed to copper. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.56, n.3, p.351-357, 2003.
- HANSEN, L. G. et al. Modification by polychlorinated biphenyls (PCBs) of cadmium induced lesions in the planarian model, *Dugesia dorotocephala*. **Biomedical Environmental Science**, v.6, n.4, p.367-384, 1993.
- HORVAT, T. et al. Toxicity testing of herbicide norflurazon on an aquatic bioindicator species – the planarian *Polycelis felina* (Daly.). **Aquatic Toxicology**, v.73, p.342-352, 2005.
- HUTCHINSON, T. H.; HUTCHINGS, M. J.; MOORE, K. W. A review of the effects of bromate on aquatic organisms and toxicity of bromate to oyster (*Crassostrea gigas*) embryos. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.38, n.3, p.238-243, 1997.
- INDEHERBERG, M. B.; VAN STRAALEN, N. M.; SCHOCKAERT, E. R. Combining life-history and toxicokinetic parameters to interpret differences in sensitivity to cadmium between populations of *Polycelis tenuis* (Platyhelminthes). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.44, n.1, p.1-11, 1999.
- JOHNSON, L. R. et al. Phototoxicology. 3. Comparative toxicity of trinitrotoluene and aminodinitrotoluenes to *Daphnia magna*, *Dugesia dorotocephala*, and sheep erythrocytes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.27, n.1, p.34-49, 1994.
- KOCH, P. Occupational allergic contact dermatitis and airborne contact dermatitis from 5 fungicides in a vineyard worker. Cross-reactions between fungicides of the dithiocarbamate group? **Contact Dermatitis**, v.34, n.5, p.324-329, 1996.
- LARINI, L. **Toxicologia dos inseticidas**. São Paulo: Ed. Sarvier, 1979.
- LIMA, O. S. Toxicidade do inseticida ENDRIN para *Dugesia tigrina* (Turbellaria, Tricladida). **Ciência e Cultura**, v.3, n.33, p.392-394, 1981.
- LIMA, O. S. Efeitos do inseticida organoclorado Endrin sobre a regeneração de planária (*Dugesia tigrina*). Nota preliminar. **Ciência e Cultura**, v.2, n.34, p.219-222, 1982.
- LOWRY, O. H. et al. Protein Measurements with the Folin Phenol Reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.
- MARCHAL-SÉGAULT, D. The effect of commercial preparation of benlate, dithane M-45, copper sulfate and Dichlofluanid on

- the fertility of *Drosophila melanogaster* Meigen. **Journal Environmental Science Health B.**, v.28, n.4, p.397-411, 1993.
- MARCHAL-SÉGAULT, D.; LAUGÉ, G. Ovarian activity of *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera), during a chronic intoxication with four fungicides: anatomical and cytological study. **Journal Environmental Science Health B.**, v.32, n.3, p.411-428, 1997.
- MELO, A. S.; ANDRADE, C. F. Differential predation os the planarian *Dugesia tigrina* on two mosquito species under laboratory conditions, **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.17, n.1, p.81-83, 2001.
- NANO, G. M. et al. *In vivo* tests to evaluate potencial biological activity in natural substances. **Fitoterapia**, v.73, p.140-146, 2002.
- NELSON, F. R. J.; AIKHIONBARE, F. Tolerance of the planarian *Dugesia tigrina* (Tricladida:Turbellaria) to presticides and insect growth regulators in a small-scale field study. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.10, n.1, p.104-105, 1994.
- PENAGOS, H. G. Contact dermatitis caused by pesticides among banana plantation workers in Panama. **International Journal of Occupational and Environmental Health**, v.8, n.1, p.14-18, 2002.
- PERICH, M. J.; BOOBAR, L. R. Effects of the predator *Dugesia dorotocephala* (Tricladida:Turbellaria) on selected nontarget aquatic organisms: laboratory bioassay. **Entomophoga**, v.35, n.1, p.79-83, 1990.
- RAINBOW, P. S.; DALLINGER, R. Metal uptake, regulation and excretion in freshwater invertebrates. **Ecotoxicology of Metals in Invertebrates**, p.119-131, 1993.
- SANCHEZ, M. V. et al. Toxicity of mercury during the embryonic development of *Chasmagnathus granulatus* (Brachyura, Varunidae). **Environmental Research**, v.2, p.1-7, 2004.
- SCHAEFFER, D. J. Planarians as a model system for in vivo tumorigenesis studies. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.25, n.10, p.1-18, 1993.
- SPEARMAN, R. I. C. **The integument**. London: Cambridge University Press, 1973. 208p.
- STANDART methods for the examination of water and wastewater. New York: American Public Health Association, 1965.
- VASUDEV, V.; SUBRAMANYA, G.; KRISHNAMURTHY, M. B. Dominant lethals induced by Dithane M-45 in silkworm *Bombyx mori*. **Environmental Research**, v.65, n.1, p.145-148, 1994.
- VILLAR, D.; LI, M. H.; SCHAEFFER, D. J. Toxicity of organophosphorus pesticides to *Dugesia dorotocephala*. **Bulletin of Environmental Contamination Toxicology**, v.51, p.80-87, 1993.