



SETAC – Brazil

Utilização de Planárias da Espécie *Dugesia (Girardia) tigrina* em Testes de Toxicidade de Efluente de Refinaria de Petróleo

G. S. BARROS,^{1*} D. F. ANGELIS,¹ L. T. FURLAN² & B. CORRÊA-JUNIOR²

¹Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, SP

²PETROBRAS, Refinaria de Paulínia, Paulínia, SP

RESUMO

A ação do efluente da Refinaria Petróleo de Paulínia (REPLAN) foi testada em planárias de água doce da espécie *Dugesia (Girardia) tigrina* em estado de regeneração. Este teste de toxicidade crônica foi realizado com o intuito de estabelecer condições para utilizá-las no monitoramento da eficácia do tratamento aplicado pela refinaria. Foram testadas as amostras coletadas de seis pontos: rio Jaguari (captação da REPLAN); entrada de tratamento biológico (após tratamento físico); entrada da Lagoa de Estabilização (última etapa do tratamento); saída da Lagoa de Estabilização; montante à descarga de efluente no rio Atibaia; e jusante à descarga de efluente. Água mineral foi utilizada como controle. Cinco ou oito planárias adultas em regeneração para cada ponto foram testadas. Espécimes adultos foram selecionados e não foram alimentados durante o experimento. O teste foi iniciado imediatamente após a remoção das cabeças das planárias (corte com lâmina) e finalizado quando a regeneração estava completa. Detectou-se efeito altamente tóxico apenas para os indivíduos testados na amostra referente ao término do tratamento primário, antes da aeração e do tratamento biológico aplicado pela refinaria. Pode-se concluir que o efluente da REPLAN, ao final do processo de tratamento, não ocasionou nenhum efeito na regeneração cefálica.

Palavras-chave: toxicidade crônica, planárias, efluente de petróleo, água, *Dugesia (Girardia) tigrina*.

ABSTRACT

Use of freshwater planarians *Dugesia (Girardia) tigrina* testing toxicity of a petroleum refinery wastewater

The action of wastewater from Paulínia Petroleum Refinery (REPLAN) was tested in freshwater planarian regeneration, from the species *Dugesia (Girardia) tigrina*. This chronic toxicity test was realized to establish conditions to use them as a monitoring species of the refinery treatment efficiency. The tested samples were collected at six points: rio Jaguari (REPLAN water intake); wastewater beginning biological treatment (after physical treatment); wastewater entering stabilization lagoon (last stage of treatment); discharge of stabilization lagoon; upstream from effluent discharge at rio Atibaia; downstream from the effluent discharge. Drinking water was used as control. Five or eight adult planarian at regeneration stage was tested in each point. The adult tested specimens were selected and weren't feed during the experiment. The test was initiated immediately after the removal of planarian's head (cut with blade) and finalized when the regeneration was complete. It was detected high toxic effect only at the sample from the primary treatment discharge, before realizing the aeration and biological treatment. We can conclude that REPLAN effluent, at the end of the treatment process don't cause any effect in *Dugesia (Girardia) tigrina* cephalic regeneration.

Key word: chronic toxicity, freshwater planarians, petroleum's effluent, water, *Dugesia (Girardia) tigrina*.

*Corresponding author: Gislaíne Silva Barros, e-mail: gsbarros@gmail.com.

INTRODUÇÃO

O meio aquático há muito tempo tem sido utilizado para lançamento de efluentes, tanto industriais como domésticos. Atualmente, para o monitoramento da qualidade dos corpos hídricos, análises químicas e físicas são consideradas insuficientes para prever a possível toxicidade. O uso de bioindicadores permite a comprovação de que determinado composto ou suas misturas exerçam algum efeito. As refinarias utilizam grande volume de água nos processos de refino. Cada etapa do processo de refino pode acrescentar ao efluente final complexas misturas de substâncias químicas. Esta pesquisa é parte de um convênio da Refinaria de Petróleo de Paulínia (REPLAN) e FUNDUNESP, que analisa diferentes partes do tratamento do efluente da refinaria e sua influência no rio Atibaia, antes e após o lançamento. São avaliados seus principais parâmetros: físicos, químicos e biológicos e toxicológicos.

O monitoramento permite que a empresa obtenha controle ambiental atualizado, capaz de sinalizar com antecedência os ajustes industriais, quando necessários; estabelece condições para que possam capitalizar os aspectos positivos do monitoramento diante da opinião pública, órgãos de governo, imprensa e mercados de atuação; possibilita se adequar às normas ISO 14000; bem como proporciona condições para que a empresa possa se adaptar às exigências da legislação ambiental, segundo o Ministério do Meio Ambiente.

Os comitês internacionais de regulamentação na área de toxicologia genética recomendam a aplicação de mais de uma centena de testes para a determinação dos potenciais mutagênicos, carcinogênicos e genotóxicos.

Os testes de toxicidade buscam detectar efeito subletal em planária sob condições de regeneração. Planárias são importantes componentes de ecossistemas límnicos, têm ampla distribuição geográfica, são sensíveis a poluentes e possuem alta capacidade de regeneração, além de fácil criação e manutenção em laboratório.

Graças a sua hierarquia relativamente simples de organização, os invertebrados representam um modelo apropriado para investigação funcional da interação neural em animais simples. A este respeito, a planária, um verme chato considerado ancestral de todo Bilateria, incluindo Chordata, é de particular relevância por ser o maior exemplo primitivo de centralização do sistema nervoso (Caronti *et al.*, 1999).

Planárias de água doce têm sido estudadas para avaliar os efeitos biológicos de poluentes em testes de toxicidade de curto prazo. Esses organismos são particularmente utilizados no campo da toxicologia aquática, porque são sensíveis a uma variedade de agentes farmacológicos e toxicológicos, indicando que podem ser feitas analogias bioquímicas e fisiológicas com a suscetibilidade de animais superiores aos poluentes. E mais, o alto poder de regeneração faz deles um apropriado sistema para testar o efeito teratogênico em organismos adultos (Calevro *et al.*, 1998).

Por serem saprófagas, as planárias têm função muito importante nos ecossistemas aquáticos. Nenhuma espécie de saprófaga sozinha consegue decompor completamente um cadáver. Contudo, as comunidades de decompositores existentes na biosfera consistem em muitas espécies que, pela sua ação sequencial, conseguem decompô-lo completamente. A decomposição ocorre através de transformações de energia dentro de e entre os organismos, sendo uma função absolutamente vital. Se não ocorresse, todos os nutrientes ficariam retidos em cadáveres e nenhuma vida nova poderia ser produzida (Odum, 2001).

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e regime de manutenção

Os espécimes utilizados pertencem à população de *Dugesia (Girardia) tigrina* (Platyhelminthes, Turbellaria, Tricladida) identificada pela Dra. Eudóxia M. Froehlich (USP – São Paulo, SP). As planárias foram coletadas no tanque de criação de plantas e invertebrados para aulas práticas, do Jardim Experimental no Instituto de Biociências da Unesp, Campus de Rio Claro, e transportadas para aquários no laboratório de toxicidade, onde os animais são mantidos em aquários com água potável (mineral) e alimentados semanalmente com fígado bovino fresco. O alimento é colocado no aquário para que se alimentem e após doze horas é retirado; em seguida é realizada a limpeza dos aquários. Os casulos são separados e mantidos em recipientes separados até a eclosão. São mantidos nos aquários separados pelo mês de eclosão.

Amostras testadas

Foram testadas as amostras coletadas de seis pontos: rio Jaguari (captação da REPLAN para uso social e industrial); entrada no tratamento biológico (efluente bruto com remoção física de óleos e graxas); entrada da Lagoa de Estabilização (efluente tratado); saída da Lagoa de Estabilização; montante à descarga de efluente no rio Atibaia; e jusante à descarga de efluente.

Tratamento experimental

Ao todo foram realizados cinco testes, nas seguintes datas: 15 de dezembro de 2003, 5 de maio de 2004, 16 de junho de 2004, 14 de julho de 2004 e 1 de setembro de 2004.

Para os ensaios biológicos de toxicidade empregando as planárias foram utilizados: vermes de mesmo comprimento, nascidos no mesmo mês, tendo em média 15 mm, visível abertura do gonóporo e postura de casulo na população em que estavam inseridos. De acordo com a metodologia empregada por Calevro *et al.* (1998), são transferidas para placas de petri com água e no movimento de alongação são cortadas com uma lâmina na altura abaixo das aurículas. A seguir as partes posteriores dos animais são transferidas para as placas do ensaio (controle e amostras).

Durante o ensaio, os animais são mantidos sob iluminação natural, temperatura constante de 22°C e não são alimentados. As observações são feitas a cada 24 horas. Após nove ou dez dias, o ensaio é finalizado. O teste limitou-se a observar a regeneração e a locomoção; a mudança de comportamento (imobilidade) é um parâmetro de fácil medição diária, mostrando efeito subletal.

Em cada placa do ensaio foram testadas cinco ou oito planárias (cinco no primeiro experimento e oito nos demais) em 75 ml de solução-problema, observando uma densidade de 0,094 indivíduos/ml. A densidade ideal de manutenção das planárias é de 0,04 indivíduo por mililitro, ou seja, dez planárias para cada 250 ml de água, segundo estudos comportamentais realizados por Reynoldson *et al.* (1965), mas isso não foi seguido devido à necessidade de um número mínimo de planárias para o teste, tendo, assim, que submetê-las a um ambiente estressante durante o experimento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos cinco experimentos realizados, no ponto referente ao efluente bruto observou-se a mortalidade de todos os indivíduos no primeiro dia do teste, o qual foi realizado sem diluição (Tabela 1). Também não houve em nenhuma das planárias sobreviventes mudanças na locomoção que possam ser consideradas significativas. Foram realizados cinco testes, nos quais foi observado certo padrão: ao final de nove dias o teste estava finalizado, no entanto, ainda foi observado por mais um dia, totalizando 240 horas de observação. Todos os pontos, com exceção do ponto 6, tiveram regeneração similar à do controle: com 48 horas houve a formação do blastema, com sua constituição/crescimento normal até 120 horas; com 144 horas de experimento houve a formação inicial do ocelo, com sua formação completa em 192 horas; com 144 horas observou-se o início da formação das aurículas e finalização em 216 horas. Pôde-se, assim, considerar a regeneração completa. A densidade variou entre 0,7 e 0,11 indivíduo/mililitro, com a média de 0,094, o que não parece ter afetado as populações em teste.

Não houve diferença detectável em quase todas as amostras, tanto na regeneração quanto na diminuição ou modificação da locomoção dos animais observados. Apenas em um dos testes realizado houve alteração: um indivíduo de apenas duas amostras e em um experimento não se regenerou; somente o blastema foi formado até o décimo dia de observação. No entanto, não podemos inferir se foi algum componente do efluente que causou a diferença, pois parece ser um caso isolado, e isso ocorreu tanto no ponto de captação de água no rio Jaguari, que não sofre interferência do efluente da Refinaria, quanto no ponto do lançamento do efluente no rio Atibaia.

O presente trabalho sugere que planárias da espécie *Dugesia (Girardia) tigrina* constituem os organismos que podem ser utilizados para testes de toxicidade de corpos d'água que sofrem influência de efluentes de refinaria de petróleo para a verificação da eficácia do tratamento aplicado. Especificamente para as amostras dos rios Jaguari, Atibaia e efluente tratado da REPLAN, as planárias não detectaram toxicidade para o mecanismo de regeneração.

Agradecimentos — Agradecimentos à Dra. Eudóxia M. Froehlich (USP), que identificou a espécie em estudo e forneceu gentilmente o material e conhecimento que possuía sobre esta; a Gisela de Aragão Umbuzeiro (CETESB), pelas críticas e pelo incentivo; e a Valdenilson José Alves de Oliveira (Unesp, Rio Claro, SP), pela coleta do material e auxílio na manutenção das planárias. Esta pesquisa foi financiada por um convênio entre FUNDUNESP X REPLAN/PETROBRAS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CALEVRO, F., FILIPI, C., DERI, P., ALBERTOSI, C. & BATISTONE, R., 1998, Toxic effects of aluminium, chromium and cadmium in intact and regenerating freshwater planarians. *Chemosphere*, 37(4): 651-659.
- CARONTI, B., MARGOTTA, V., MERANTE, A., PONTIERI, F. E. & PALLADINI, G., 1999, Treatment with 6-hidroxydopamine in planaria (*Dugesia gonocephala s.l.*): morphological and behavioral study. *Comp. Bioch. and Phys., Part C*, 123: 201-207.
- ODUM, E. P., 2001, *Fundamentos de ecologia*. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 6ª ed., 927p.
- REYNOLDSON, T. B., YOUNG, J. O. & TAYLOR, M. C., 1965, The effect of temperature on the life-cycle of four species of lake-dwelling triclads. *Journal of Animal Ecology*, Oxford, 34(1): 23-43.

ANEXO 1

Tabela 1 — Média porcentual dos testes de toxicidade crônica em *Dugesia (Girardia) tigrina* no que se refere à mortalidade, motilidade e regeneração com cinco amostras coletadas em diferentes pontos do município de Paulínia, SP.

Amostra	Fase	Controle		Rio Jaguari		Entrada Lagoa de Estabilização		Saída Lagoa de Estabilização		Montante rio Atibaia		Juzante rio Atibaia		Entrada tratamento	
		Morta- lidade	Rege- neração	Morta- lidade	Rege- neração	Morta- lidade	Rege- neração	Morta- lidade	Rege- neração	Morta- lidade	Rege- neração	Morta- lidade	Rege- neração	Morta- lidade	Rege- neração
T ₀	A	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
T _{24h}	A	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
T _{48h}	B	0	95	0	100	0	100	0	100	0	95	0	97	0	97
T _{72h}	B'	0	97	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
T _{96h}	C	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
T _{120h}	C	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
T _{144h}	C'D	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
T _{168h}	C'D	0	100	0	100	0	100	0	97	0	100	0	100	0	100
T _{192h}	C'D	0	100	0	100	0	100	0	97	0	100	0	100	0	100
T _{216h}	C'D'	0	100	0	97	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
T _{240h}	C'D'	0	100	3	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
T (°C)		22		22		22		22		22		22		22	
Dens. (Ind./ml)		0,094		0,094		0,094		0,094		0,094		0,094		0,094	

A – corpos acéfalos; B – formação de blastema; B' – constituição normal do blastema; C – início da formação de ocelo; C' – formação completa dos ocelos; D – início da formação das aurículas; D' – formação completa das aurículas.