

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
AMBIENTAL**

**MONIKE FELIPE GOMES**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE TRICLOSAN, TRICLOCARBAN E  
SUAS MISTURAS EM DIFERENTES BIOINDICADORES**

**DISSERTAÇÃO**

**CURITIBA**

**2019**

MONIKE FELIPE GOMES

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE TRICLOSAN, TRICLOCARBAN E  
SUAS MISTURAS EM DIFERENTES BIOINDICADORES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental

Orientadora: Profa. Dra. Adriane Martins de Freitas

Coorientadora: Profa. Dra. Lucia Regina Rocha Martins

Profa. Dra. Flavia Yoshie Yamamoto

**CURITIBA**

**2019**

---

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

---

Gomes, Monike Felipe

Avaliação dos efeitos de triclosan, triclocarban e suas misturas em diferentes bioindicadores / Monike Felipe Gomes.-- 2019.

1 arquivo de texto : PDF ; 1,48 MB

Disponível em World Wide Web

Texto em português com resumo em inglês

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Curitiba, 2019

Bibliografia: p. 74-83

1. Tecnologia ambiental - Dissertações. 2. Agentes anti-infecciosos. 3. Produtos cosméticos. 4. Testes de toxicidade. I. Freitas, Adriane Martins de, orient. II. Martins, Lúcia Regina Rocha, coorient. III. Yamamoto, Flávia Yoshie, coorient. IV. Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, inst. V. Título.

CDD: Ed. 22 -- 363.7

---

Biblioteca Ecoville da UTFPR, Câmpus  
Curitiba Lucia Ferreira Littiere -  
CRB 9/1271

## TERMO DE APROVAÇÃO DE DISSERTAÇÃO Nº 114

A Dissertação de Mestrado intitulada: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE TRICLOSAN, TRICLOCARBAN E SUAS MISTURAS EM DIFERENTES BIOINDICADORES, defendida em sessão pública pelo(a) candidato(a) **Monike Felipe Gomes**, no dia 25 de fevereiro de 2019, foi julgada para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental, área de concentração Tecnologias e Processos Ambientais, e aprovada em sua forma final, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental.

### BANCA EXAMINADORA:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Adriane Martins de Freitas – Presidente - UTFPR

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Giselle Maria Maciel - UTFPR

Prof. Dr. William Gerson Matias - UFSC

A via original deste documento encontra-se arquivada na Secretaria do Programa, contendo a assinatura da Coordenação após a entrega da versão corrigida do trabalho.

Curitiba, 25 de fevereiro de 2019.

## AGRADECIMENTOS

Obrigada a Deus por ter me dado força, saúde, perseverança e por ter colocado tantas pessoas maravilhosas no meu caminho. Sem essas pessoas eu jamais teria chegado tão longe.

Obrigada a minha família pelo apoio em todos os momentos, mesmo sem saber muito bem o que eu faço vocês sempre me deram força para correr atrás dos meus sonhos e nunca me deixaram desanimar. Obrigada especialmente as duas mulheres mais fortes que eu conheço, minha avó por ter me criado e me apoiado em todas as minhas escolhas e a minha mãe que me ensinou que eu tenho capacidade de alcançar todos os meus objetivos. Obrigada vô, pai, tias, sogros e cunhada, sem vocês esse caminho não teria tido significado. E em especial ao meu namorado Guilherme que a 6 anos está me apoiando incondicionalmente.

Obrigada a todos os meus amigos, desde os que estiveram comigo antes da loucura da faculdade (Ângela e Ber), aos que eu conheci ao logo desses anos de UTFPR, Fer, Lili, Cami, Raquel, Fred, Kah e a todos os outros amigos que tornaram os dias difíceis em risadas e os dias felizes em festa.

Tenho muito a agradecer a todos do laboratório, a professora Adriane, que desde 2012 deixa eu fazer as minhas “sandices” no laboratório. A professora Wanessa, que sempre me ajudou muito. As minha coorientadoras, prof<sup>a</sup> Lucia que sempre esteve disponível e a prof<sup>a</sup> Flávia que topou entrar nos meus projetos mirabolantes. E a todos que já passaram e os que ainda irão continuar. Rhai, Eli, Vini, Yo, Regi, Luis, Fer, Luis e todos os anexos que sempre estavam lá para um café, vocês tornaram a ECOTOX o melhor laboratório da UTFPR. Tenho um agradecimento especial ao meu amigo e “irmão científico” Vinícius, que topou encarar essa jornada comigo, sem você esse trabalho não teria sido tão divertido e não teria metade das análises que tem.

Agradeço à CAPES pela bolsa e a UTFPR pela estrutura.

Agradeço a internet por existir! O NETFLIX pelos seriados! A minha cachorrinha Valla por ser tão fofa! E a Vida por todos os momentos vividos!

## RESUMO

GOMES, Monike Felipe. **Avaliação dos efeitos de triclosan, triclocarban e suas misturas em diferentes bioindicadores**. 85 f. Dissertação. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2019.

Triclosan (TCS) e triclocarban (TCC) são agentes antimicrobianos amplamente utilizados em produtos de higiene pessoal como sabonetes, xampus, desodorantes, cosméticos, entre outros. Quando no ambiente, esses compostos entram em contato com os organismos podendo causar toxicidade além de estarem sujeitos a diversos fatores químicos e físicos que podem alterar sua estrutura química e levar a um aumento da toxicidade. Nesse trabalho a ecotoxicidade desses compostos foi abordada de duas formas, a primeira levando em consideração concentrações encontradas ambientalmente de acordo com a literatura dos compostos TCS, TCC e mistura de ambos. As concentrações ambientais foram avaliadas para embriões de *Rahmdia quelen*, avaliando biomarcadores morfológicos e bioquímicos; ensaio crônico multigeracional para *Daphnia magna* juntamente com avaliação de biomarcadores bioquímicos; e ensaio crônico com *Desmodesmus subspicatus*. A segunda abordagem avaliou a ecotoxicidade da mistura binária de TCS e TCC em ensaios agudos de toxicidade com *Daphnia magna* através da utilização dos modelos de referência de adição de concentração e ação independente juntamente com os desvios desses modelos utilizando a ferramenta MIXTOX. No estudo de concentrações ambientais para os embriões foi possível observar alterações morfológicas nas nadadeiras e alterações bioquímicas. Para *D. magna* nos ensaios crônicos multigeracionais onde houve atraso na primípara de daphnias expostas a TCC, além de alterações em biomarcadores bioquímicos. Através dos resultados obtidos para o ensaio agudo com *D. magna* foi possível estudar os padrões de interação entre TCS e TCC em que a mistura mostrou comportamento dentro do modelo de referência de adição de concentração (CA), devido a sua estrutura e modo de ação similares, com desvios de razão (DR) e interação antagônica na toxicidade para o organismo estudado. Com os resultados obtidos nesse estudo foi possível verificar que TCS e TCC mesmo em concentrações baixas, como as ambientais, apresentaram efeitos tóxicos em biomarcadores que comprometem o desenvolvimento dos organismos podendo ocasionar efeitos ecológicos a longo prazo. Dentro do contexto de mistura desses compostos, tanto as concentrações ambientais quanto as concentrações mais altas utilizadas na aplicação dos modelos de interação de misturas, TCS e TCC apresentaram efeitos antagônicos. Contudo, a presença desses compostos é preocupante, uma vez que seus mecanismos de ação ainda não são completamente elucidados.

**Palavras- chave:** Ecotoxicidade de misturas; antimicrobianos; efeitos multigeracionais

## ABSTRACT

GOMES, Monike Felipe. **Effects of triclosan, triclocarban and mixtures in different bioindicators**. 86 p. Dissertations. Environmental Science and Technology Program. Federal University of Technology - Paraná. Curitiba, 2019.

Triclosan (TCS) and triclocarban TCC are common antimicrobials applied in personal care products such as soaps, shampoos and toothpastes. These products are largely used worldwide and introduced to aquatic environments, reaching concentrations of  $\text{ng L}^{-1}$  and  $\mu\text{g L}^{-1}$ . According to the literature, TCS and TCC can be harmful to aquatic organisms, showing acute effects under  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , however few studies show their effects at environmental concentrations. In this study ecotoxicity of triclosan and triclocarban were analyzed in two different approaches. One considering environmental concentrations of TCS, TCC and their mixture using three trophic levels (*D. subspicatus*, *D. magna* and *R. quelen*) and the other considering mixture interactions between these compounds through reference models evaluating acute endpoints to *D. magna*. At environmental concentrations, *R. quelen* embryos presented morphological effects and enzyme alterations to catalase, acetylcholinesterase and superoxide dismutase. To *D. magna*, it was evaluated reproduction and biochemical endpoints in multigenerational exposure. To this organism late reproduction and biochemical alterations related to oxidative stress were observed. On the second part of this work TCS and TCC mixtures were evaluated through acute assay where it was possible to fit its interactions on CA reference model with DR deviation through MIXTOX tool.

**Key words:** Mixture ecotoxicity; antimicrobials; multigenerational effects

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estrutura química do triclosan.....	16
<b>Figura 2</b> - Estrutura química do triclocarban.....	19
<b>Figura 3</b> - Efeitos biológicos de contaminantes em diversos níveis considerando tempo de resposta e relevância ecológica.....	22
<b>Figura 4</b> - <i>Daphnia magna</i> .....	27
<b>Figura 5</b> - Exemplo de <i>R. quelen</i> adulto.....	29
<b>Figura 6</b> - Exemplo da microalga <i>D. subspicatus</i> .....	30

### CAPÍTULO I

<b>Figura 1</b> - Número médio de filhotes de <i>Daphnia magna</i> gerados após 21 dias de exposição.....	43
<b>Figura 2</b> - Comparação entre as gerações estudadas do número médio de filhotes de <i>Daphnia magna</i> gerados após 21 dias de exposição.....	44
<b>Figura 3</b> - Média de dias necessários para <i>Daphnia magna</i> gerar a primeira prole para os grupos expostos.....	44
<b>Figura 4</b> - Comparação entre a média de dias necessários para <i>Daphnia magna</i> gerar a primeira prole.....	45
<b>Figura 5</b> - Atividade da enzima Glutathione-S-Transferase para <i>Daphnia magna</i> .....	45
<b>Figura 6</b> - Atividade da enzima catalase para <i>Daphnia magna</i> .....	46
<b>Figura 7</b> - Atividade da enzima superóxido dismutase para <i>Daphnia magna</i> .....	46
<b>Figura 8</b> - Sobrevivência de embriões/larvas de <i>Rhamdia quelen</i> após a exposição.....	50
<b>Figura 9</b> - Índice de deformidade das larvas de <i>Rhamdia quelen</i> apresentadas durante 96h de ensaio.....	51
<b>Figura 10</b> - Anomalias encontradas nos embriões/larvas de <i>Ramdia quelen</i> durante o ensaio de 96h.....	52
<b>Figura 11</b> - Biomarcadores bioquímicos relacionados ao estresse oxidativo para larvas de <i>Rhamdia quelen</i> .....	55
<b>Figura 12</b> - Atividade da acetilcolinesterase para larvas de <i>Rhamdia quelen</i> após 96 horas de exposição.....	56

### CAPÍTULO II

<b>Figura 1</b> - Exemplo de curvatura das isoboles que podem ocorrer nos modelos de toxicidade de mistura de compostos.....	61
<b>Figura 2</b> - Gráfico do modelo fatorial completo de combinação das concentrações utilizadas para realizar ensaios de curto prazo de misturas.....	64



**Figura 3** – Gráficos sigmóides de dose-respostas da mobilidade dos neonatos de *D. Magna* expostos por 48h para os compostos (A) TCS e (B) TCC .....66

**Figura 4** -. Gráfico isobole dos efeitos das misturas de sinergismo e antagonismo de acordo com a dose de acordo com o modelo de referência IA e desvios de DL.....68

**Figura 5** - Gráfico isobole dos efeitos das misturas de sinergismo e antagonismo de acordo com a dose de acordo com o modelo de referência CA e desvios de DR.....69

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

**Tabela 1** - Porcentagem de inibição do crescimento de biomassa de *Desmodesmus subspicatus* em relação ao controle negativo após 72 h de exposição..... 42

**Tabela 2** - Porcentagem de embriões de *Rhamdia quelen* que apresentaram danos morfológicos após 96 horas de exposição a triclosan, triclocarban e mistura..... 53

### CAPÍTULO II

**Tabela 1** - Descrição dos resultados estatísticos obtidos dos modelos de referência CA e IA e seus respectivos desvios S/A, DR e DL..... 67

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Propriedades físico-químicas do triclosan.....	16
<b>Quadro 2</b> - Estudos encontrados na literatura da presença de triclosan em diversas matrizes levando em consideração diferentes localizações geográficas.....	17
<b>Quadro 3</b> - Estudos de avaliação da ecotoxicidade do triclosan.....	18
<b>Quadro 4</b> - Propriedades físico-químicas do triclocarban.....	19
<b>Quadro 5</b> - Demonstrativo de alguns estudos da presença de triclocarban em diversas matrizes levando em consideração diferentes localizações geográficas.....	20
<b>Quadro 6</b> - Estudos de avaliação da ecotoxicidade do triclocarban.....	20

### CAPÍTULO I

<b>Quadro 1</b> - Concentrações utilizadas no trabalho e suas referências na literatura.....	33
<b>Quadro 2</b> - Composição da água reconstituída usada no ensaio.....	37
<b>Quadro 3</b> - Imagens de referências de normalidade deformidades encontradas nas larvas de <i>R. quelen</i> sendo os danos encontrados categorizados em axial, danos nas nadadeiras, danos cefálicos e danos no tórax/abdômen.....	38
<b>Quadro 4</b> - Escores atribuídos a cada categoria de dano de acordo com as anomalias observadas.....	39

### CAPÍTULO II

<b>Quadro 1</b> - Concentrações de TCS e TCC utilizadas para realização do ensaio agudo e determinação da CE50.....	63
<b>Quadro 2</b> - Descrição dos parâmetros “a” e “b” adicionados nos cálculos de desvios de comportamento das misturas S/A, DR e DL dos modelos de referência CA e IA.....	65

## SUMÁRIO

<b>1-</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	13
<b>2-</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	15
<b>2.1</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	15
<b>3-</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	16
<b>3.1</b>	<b>Compostos de estudo</b> .....	16
3.1.1	Triclosan .....	16
3.1.2	Triclocarban .....	19
<b>3.2</b>	<b>Ecotoxicologia</b> .....	21
<b>3.3</b>	<b>Biomarcadores</b> .....	23
3.3.1	Biomarcadores bioquímicos.....	24
3.4	Modelos de Toxicidade de Misturas .....	25
3.5	Organismos de Ensaio ecotoxicológicos.....	27
3.5.1	<i>Daphnia magna</i> .....	27
3.5.2	<i>Rhamdia quelen</i> (jundiá).....	28
3.5.3	<i>Desmodesmus subspicatus</i> .....	30

### CAPÍTULO I – AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE DO TRICLOSAN, TRICLOCARBAN E SUAS MISTURAS EM CONCENTRAÇÕES AMBIENTALMENTE RELEVANTES

<b>1-</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	31
<b>2-</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	32
<b>2.1</b>	Reagentes .....	32
2.2	Ecotoxicidade crônica em <i>Desmodesmus subspicatus</i> .....	33
2.3	Determinação da ecotoxicidade crônica multigeracional em <i>D. magna</i> . 33	
2.3.1	Cultivo de <i>Daphnia magna</i> .....	33
2.3.2	Ecotoxicidade crônica multigeracional .....	34
2.3.2.1	Determinação de proteínas totais (PT).....	34
2.3.2.2	Atividade da Catalase (CAT) .....	35
2.3.2.3	Atividade da glutathione-S-transferase (GST).....	35
2.3.2.4	Atividade da superóxido dismutase (SOD).....	36
2.4	Determinação da ecotoxicidade em embriões de <i>Rhamdia quelen</i> .....	36
2.4.2	Biomarcadores morfológicos .....	37
2.4.3	Biomarcadores bioquímicos.....	39

2.4.3.1	Determinação de proteínas totais.....	39
2.4.3.2	Atividade da acetilcolinesterase (AChE) .....	39
2.4.3.3	Atividade da Catalase .....	40
2.4.3.4	Atividade Glutathiona-S-Transferase .....	40
2.4.3.5	Carbonilação de Proteínas (PCO).....	40
<b>3-</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>41</b>
<b>3.1</b>	<b><i>Desmosdesmus subspicatus</i></b> .....	<b>41</b>
3.2	Ecotoxicidade crônica multigeracional.....	42
3.3	Determinação da ecotoxicidade em embriões de <i>Rhamdia quelen</i> .....	50
<b>4-</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>58</b>

## CAPITULO II - TOXICIDADE DE MISTURAS DO TRICLOSAN E TRICLOCARBAN USANDO A FERRAMENTA MIXTOX

<b>1-</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>60</b>
<b>2-</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>62</b>
<b>2.3</b>	<b>Cultivo de <i>Daphnia magna</i></b> .....	<b>62</b>
2.3.2	Teste de ecotoxicidade aguda com <i>Daphnia magna</i> .....	62
2.3.3	Cálculo da concentração efetiva a 50% dos organismos (CE <sub>50</sub> ).....	62
2.3.4	Ensaio agudo para exposição de mistura .....	63
2.3.5	Análise Estatística .....	64
<b>3-</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>66</b>
<b>4-</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>70</b>
<b>4-</b>	<b>CONCLUSÃO GERAL</b> .....	<b>72</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>74</b>
	APÊNDICE A.....	84
	APÊNDICE B.....	86

## 1- INTRODUÇÃO GERAL

O triclosan (TCS) e o triclocarban (TCC) são bifenilas policloradas utilizadas como antimicrobianos de amplo espectro e estão presentes em produtos de higiene pessoal. Estes compostos são principalmente utilizados em sabonetes e pasta de dentes, além de diversos outros produtos como fármacos, xampus e desodorantes devido a sua ação biocida atuando no combate de bactérias e fungos sendo usado principalmente como conservante (USEPA, 2002; VINGSKES; SPANN, 2018). Em 2016 o Food and Drug Administration (FDA) proibiu estes compostos em sabonetes com ação antibacteriana por não apresentarem grande eficácia com relação aos sabonetes comuns (Wolf; FDA, 2016). No Brasil esses compostos são liberados para serem utilizados em produtos de higiene pessoal sem exceder a concentração de 0,30 % (Resolução 79/2000) (BRASIL, 2000).

Diversos estudos já detectaram a presença TCS e TCC em matrizes ambientais. No compartimento aquático esses compostos são frequentemente encontrados em rios, mar e sedimentos, principalmente próximo a ambientes urbanos, onde as concentrações variam de  $\text{ng L}^{-1}$  e  $\mu\text{g L}^{-1}$  (CHALEW; HALDEN, 2009; HALDEN ; PAULL, 2005; TIBURTIUS; SCHEFFER, 2014). O triclosan já se mostrou tóxico para diversos organismos aquáticos afetando biomarcadores ligados ao estresse oxidativo e genotoxicidade e possuindo ecotoxicidade aguda e crônica especialmente a microalgas e microcrustáceos (LIANG et al., 2013; ORVOS et al., 2002; PUSCEDDU, 2016). Além da sua toxicidade, o TCS é fotodegradável tendo como produtos dioxinas e principalmente o 2,8-diclorodibenzeno-p-dioxina, reconhecidamente carcinogênico (MEZCUA et al., 2004). O triclocarban possui uma literatura mais restrita com relação a toxicidade, contudo já foram reportados danos agudos e crônicos para microcrustáceos, algas, rotíferos, larvas e peixes (BRAUSCH; RAND, 2011; COOGAN et al., 2007; GAO et al., 2015; SATYRO et al., 2017). Assim como o triclosan, o triclocarban também causa preocupação com os produtos da sua degradação podendo gerar clorobenzenos e cloroanilinas (DING et al., 2013; SATYRO et al., 2017). Em baixas doses essas substâncias podem causar perturbação endócrina, problemas de desenvolvimento,

metabolismo, comportamento e afetando taxas de reprodução dos organismos expostos (HALDEN, 2015; VINGSKES; SPANN, 2018)

Para avaliar a toxicidade desses compostos no ambiente é necessário um estudo aprofundado utilizando organismos de diferentes níveis tróficos unindo espécies padrão e organismos representativos da fauna local, além da utilização de diferentes biomarcadores englobando ensaios de curta e longa exposição (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). Outra variável que deve ser levada em consideração é que quando estes compostos estão presentes no meio ambiente se tornam misturas complexas tornando os organismos vulneráveis (FIGUEIREDO, 2013). Dentro deste contexto outro parâmetro deve ser levado em consideração que é a previsão dos efeitos da interação desses compostos, que pode ser realizado através de modelos matemáticos.

Este estudo está dividido em dois momentos, o primeiro teve como objetivo avaliar os efeitos do triclosan e do triclocarban e de suas misturas para organismos de diferentes níveis tróficos e em concentrações ambientalmente relevantes encontradas na literatura (abaixo de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ) para essa avaliação foram utilizados ensaios crônicos multigeracionais com o microcrustáceo *Daphnia magna* e avaliação de seus biomarcadores bioquímicos (catalase, GST, SOD), avaliação crônica com microalga *Desmodesmus subspicatus* e avaliação com peixe *Rhamdia quelen* em estágio embrio-larval, estudando biomarcadores bioquímicos (CAT, GST, SOD, AChE, carbonilação de proteínas). No segundo momento desse trabalho foi realizada a avaliação da toxicidade de misturas de TCS e TCC em concentrações próximas a  $CE_{50}$  para *D. magna* utilizando como parâmetro o efeito agudo e analisando esses resultados utilizando os modelos de referência de concentração de adição (CA) e ação independente (IA) e seus desvios através da ferramenta MIXTOX.

## 2- OBJETIVOS

Avaliar a toxicidade do triclosan, do triclocarban e de sua mistura para diferentes bioindicadores (embriões/larvas de *Rhamdia quelen*, *Daphnia magna* e *Desmodesmus subspicatus*) bem como avaliação da interação da mistura desses compostos utilizando o modelo MIXTOX.

### 2.1 Objetivos Específicos

- Avaliar o desenvolvimento de embriões/larvas de *R. quelen* expostos a concentrações ambientalmente relevantes de triclosan, triclocarban e misturas verificando biomarcadores morfológicos e biomarcadores bioquímicos relacionados ao estresse oxidativo e neurotoxicidade;
- Avaliar parâmetros de reprodução multigeracional e biomarcadores bioquímicos ligados ao estresse oxidativo em *D. magna* expostas a concentrações ambientalmente relevantes de triclosan, triclocarban e misturas
- Verificar toxicidade crônica de *D. subspicatus* para concentrações ambientais de triclosan, triclocarban e misturas;
- Avaliar a toxicidade da mistura de triclosan e triclocarban frente aos modelos de referência de ação de adição de concentração e ação independente juntamente com os desvios dos modelos de referência utilizando o modelo MIXTOX.



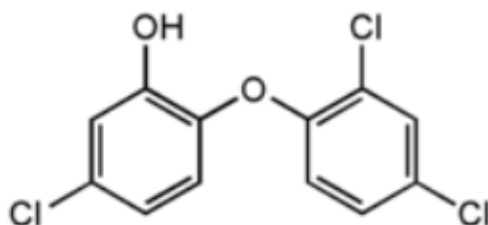
### 3- FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 Compostos de estudo

##### 3.1.1 Triclosan

O triclosan (2,4,4'-tricloro- 2'-hidroxidifenol éter - TCS) é um composto amplamente utilizado em produtos de higiene pessoal, produtos têxteis, fármacos e plásticos. Ele é um biocida de amplo espectro tendo atividade antibacteriana e antifúngica. Seu mecanismo de ação em bactérias ocorre através da inibição da enzima enoil redutase, impedindo a síntese de ácidos graxos (TIBURTIUS; SCHEFFER, 2014; USEPA, 2006). Ele é um bifenil éter clorado (Figura 1) altamente lipofílico vendido comercialmente como Irgasan DP300<sup>®</sup> ou Irgacore MP sendo primeiramente registrado como pesticida em 1969 e introduzido na indústria de cuidados pessoais em 1972 (BHARGAVA; LEONARD, 1996). Suas propriedades físico-químicas estão apresentadas no Quadro 1.

Figura 1- .Estrutura química do triclosan



Fonte: USEPA, 2006

Quadro 1- Propriedades físico-químicas do triclosan

Propriedade	Valor
Massa Molar	289,55 g mol <sup>-1</sup>
Solubilidade (20°C)	0,01 g L <sup>-1</sup>
Pka	8,14
Pressão de vapor (20°C)	5.10 <sup>-4</sup> Pa
Coefficiente de partição água/octanol	Log Pow: 4,76
Ponto de fusão	55 – 60°C

Fonte: USEPA, 2006

Uma das grandes preocupações relacionadas ao TCS está na sua presença em ecossistemas aquáticos, uma vez que os sistemas de tratamento de efluentes convencionais não possuem a capacidade de remover este composto por completo. Em geral, ele fica apenas retido na matéria orgânica das estações de tratamento, gerando assim um lodo contaminado com material não biodegradável (TEIXEIRA; JARDIM, 2004; TIBURTIUS; SCHEFFER, 2014). Diversos estudos de quantificação do TCS em matrizes ambientais já foram realizados. Em geral, sua concentração no ambiente aquático está na ordem de  $\text{ng L}^{-1}$  a  $\mu\text{g L}^{-1}$ , tanto em águas superficiais quanto no sedimento em diversos países, incluindo o Brasil. No Quadro 2 estão presentes alguns estudos de quantificação deste composto.

**Quadro 2 - Estudos encontrados na literatura da presença de triclosan em diversas matrizes levando em consideração diferentes localizações geográficas.**

Localização	Matriz Ambiental	Concentração	Referência
China	Água superficial	ND - $64 \text{ ng.L}^{-1}$	LV et al., 2014
Brasil (Região metropolitana de Curitiba)	Água superficial	$415 \text{ ng.L}^{-1}$	SANTOS et al., 2016
Estados Unidos	Água superficial	$2,3 \mu\text{g.L}^{-1}$	KOLPIN et al., 2002
Suíça	Sedimento	$53 \mu\text{g.kg}^{-1}$	SINGER et al., 2002
Japão	Estações de Tratamento (afluente)	$2.7 - 11.9 \mu\text{g.L}^{-1}$	NAKADA et al., 2010
Japão	Estações de Tratamento (efluente)	$0.26-0.27 \mu\text{g.L}^{-1}$	NAKADA et al., 2010
França	Lodo ETE	$410000 \mu\text{g.kg}^{-1}$	PASQUINI et al., 2014
Brasil (São Paulo)	Água superficial	$2,2- 66 \text{ ng.L}^{-1}$	MONTAGNER et al., 2014

Com relação aos possíveis efeitos nos organismos pelo TCS são relatados estudos que reportam efeitos tóxicos agudos, crônicos, alteração de biomarcadores bioquímicos, estresse oxidativo genotoxicidade, citotoxicidade, entre outros. No quadro 3 estão presentes alguns estudos de ecotoxicidade realizados.

**Quadro 3 - Estudos de avaliação da ecotoxicidade do triclosan**

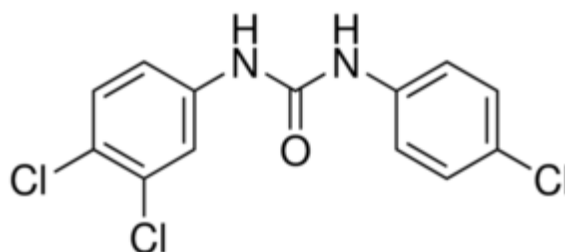
<b>Organismo/Exposição</b>	<b>Efeito</b>	<b>Referência</b>
<i>S. subspicatus</i> /crônico	CE <sub>50</sub> 1,4 µg L <sup>-1</sup>	ORVOS et al., 2002
<i>Chironomus riparius</i> /agudo	Alteração na expressão de genes relacionados ao sistema endócrino	MARTÍNEZ-PAZ et al., 2017
<i>D. magna</i> /agudo	CE <sub>50</sub> 390 µg L <sup>-1</sup>	ORVOS et al., 2002
<i>D. magna</i> /agudo	Estresse oxidativo, diminuição nos níveis de aminoácidos	KOVACEVIC; SIMPSON; SIMPSON, 2016
<i>C. dubia</i> /agudo	CE <sub>50</sub> 80 µg L <sup>-1</sup>	LAMEIRA., 2008
<i>Tigriopus japonicus</i> /crônico	Redução de fecundidade e estresse oxidativo	PARK et al., 2017
<i>D. rerio</i> (embriões) /agudo e crônico	LC <sub>50</sub> =0.42 mg L <sup>-1</sup> Efeitos teratogênicos	OLIVEIRA et al., 2009
<i>Paracentrotus lividus</i> (larvas) /agudo e crônico	Alterações no desenvolvimento	MACEDO, 2015
<i>Pimephales promela</i> /agudo	CL <sub>50</sub> 260 µg L <sup>-1</sup>	ORVOS et al., 2002
<i>Perna perna</i> /crônico	Diminuição da estabilidade da membrana lisossomal, peroxidação lipídica e danos ao DNA	PUSCEDDU, 2009
<i>Xiphophorus helleri</i> /agudo	Indução de enzimas e genes de fase I e II (EROD, ERND, GST, CYP1A, CYP3A)	LIANG et al., 2013

A preocupação com a presença deste composto no ambiente não está só relacionada a sua toxicidade, mas também a toxicidade de seus produtos de degradação, principalmente por ação de radiação. Um dos principais produtos formados é o 2,8-diclorodibenzeno-p-dioxina (2,8-DCDD), reconhecidamente carcinogênico, além da formação de fenóis clorados e outras dioxinas (LATCH et al., 2003; SANCHEZ-PRADO et al., 2006). Outras rotas de degradação do TSC também podem ocorrer, gerando metil-triclosan (biodegradação), 2,4-dicloro e 2,3,4- triclorofenol, bifenilas policloradas, e derivados hidroxilados (ARANAMI; READMAN, 2007; INABA et al., 2006; LATCH et al., 2003; LIMA, 2009; MELO; HEPP, 2008; SUAREZ et al., 2007; TIBURTIUS; SCHEFFER, 2014).

### 3.1.2 Triclocarban

Triclocarban (Figura 2) (3,4,4'-trichlorocarbanilide—TCC) é um composto com propriedades antibacterianas e antifúngicas utilizado em produtos de higiene pessoal. Ele está presente em sabonetes, cosméticos e desodorantes sendo comercializado desde 1964 e tem como alvo bactérias gram-positivas. Se apresenta na forma de pó branco, com baixa solubilidade em água (QUADRO 4) e estável a luz (AHN et. al., 2008; HALDEN 2014).

**Figura 2 - Estrutura química do triclocarban**



Fonte: SIGMA-ALDRICH, 2018

**Quadro 4 - Propriedades físico-químicas do triclocarban**

Propriedade	Valor
Massa Molar	315,58 g mol <sup>-1</sup>
Solubilidade em água (20°C)	0,11 mg L <sup>-1</sup>
Pka (30°C)	0,24 x 10 <sup>-13</sup>
Pressão de vapor (50°C)	1 hPa
Coefficiente de partição água/octanol (Log Pow)	4,2-6
Ponto de fusão	255,2 - 256°C

Fonte: ECHA, 2014

O TCC é um dos compostos mais frequentemente encontrados em estudos de detecção de fármacos e produtos de higiene pessoal no ambiente e, assim como o triclosan, é encontrado em vários compartimentos ambientais como água superficial, sedimento e lodo de esgoto (QUADRO 5) (CHUNG et al., 2011; MOLINS-DELGADO; DÍAZ-CRUZ; BARCELÓ, 2015). Além da sua presença, há uma preocupação também com sua transformação no ambiente. Algumas das moléculas resultantes da degradação do TCC são 3,4-

dicloroanilina, 4-cloroisocianatobenzeno, 4-cloronitrobenzeno e 4-cloroanilina (DING et al., 2013)

**Quadro 5 - Demonstrativo de alguns estudos da presença de triclocarban em diversas matrizes levando em consideração diferentes localizações geográficas**

Localização	Matriz Ambiental	Concentração	Referência
Illinois – EUA	Aquífero	< 3,70 ng L <sup>-1</sup>	DODGEN et al., 2017
Salto do Lontra – PR- Brasil	Água superficial	>190 ng L <sup>-1</sup>	KOERICH, 2015
Canadá	WWTP	>8,9 µg g <sup>-1</sup>	GUERRA et al, 2014
China	Estuários	5,76 ng L <sup>-1</sup>	LV et al, 2014
USA	Córregos urbanos	6.75 µg L <sup>-1</sup>	HALDEN; PAULL, 2005
China	Rio	478 ng L <sup>-1</sup>	ZHAO et al., 2010

Devido a sua baixa solubilidade em água o TCC se liga fortemente ao sedimento e, principalmente, ao lodo das estações de tratamento sendo aplicado nas lavouras e conseqüentemente atingindo animais e plantas podendo ser bioacumulado (CHALEW e HALDEN, 2009). Estudos toxicológicos de TCC são menos frequentes na literatura em comparação ao TCS, porém assim como o TCS, o TCC tem potencial para perturbação endócrina. No quadro 6 estão descritos alguns estudos toxicológicos realizados com o TCC.

**Quadro 6. Estudos de avaliação da toxicidade do triclocarban.**

Organismo	Efeito	Referência
<i>S. subspicatus</i> /Crônico	CE <sub>50</sub> 20-30 µg L <sup>-1</sup>	CONSORTIUM., 2002
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> /Crônico	CE <sub>50</sub> 319 µg L <sup>-1</sup>	SATYRO et al. 2017
<i>Tetrahymena thermophila</i> /Agudo	Danos ao DNA CE <sub>50</sub> 295 µg L <sup>-1</sup>	GAO et al., 2015
<i>Brachionus koreanus</i> /Agudo	CL <sub>50</sub> 388,1 µg L <sup>-1</sup>	HAN et al. 2016
<i>D. magna</i> /Crônico	CEO <sub>50</sub> 2,9 µg L <sup>-1</sup>	CONSORTIUM., 2002
<i>Daphnia similis</i> /Agudo	CE <sub>50</sub> 13,9 µg L <sup>-1</sup>	SATYRO et al. 2017
<i>Danio rerio</i> (embriões)	Potencial de elevação de aromatases	CHUNG et al. 2011
<i>Oryzias latipes</i> /Crônico	CL <sub>50</sub> 85 µg L <sup>-1</sup>	TAMURA et al. 2013

### 3.2 Ecotoxicologia

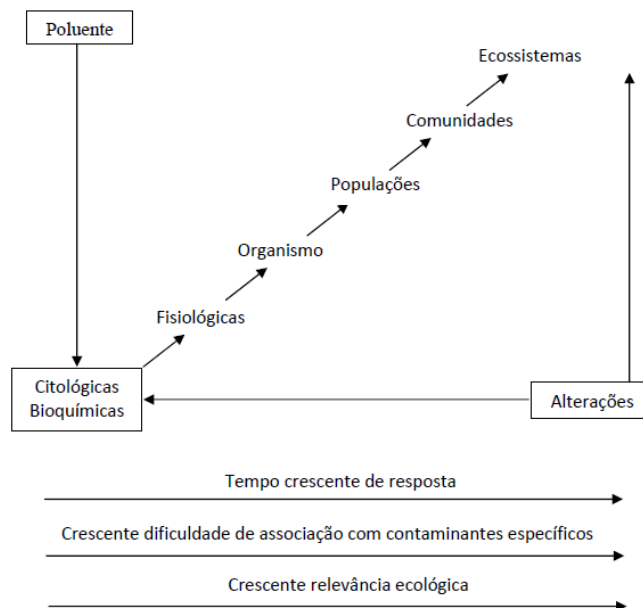
A Ecotoxicologia é a ciência que estuda os mecanismos observados nos ecossistemas resultantes da combinação de um infinito número de processos que podem ser observados desde os níveis de estrutura atômica e molecular até níveis mais altos de organização biológica integrando os princípios de várias ciências como a Ecologia, Toxicologia, Estatística, Química, dentre outras (AZEVEDO; CHASIN, 2004; ZAGATO, 2015). O termo Ecotoxicologia foi sugerido pela primeira vez em junho de 1969 durante uma reunião do Committee of the International Council of Scientific Unions (ICSU), em Estocolmo, pelo toxicologista francês René Truhaut e após muitas discussões foi definido como:

Ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos, que constituem a biosfera, incluindo assim a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem num contexto integrado (ZAGATO; BERTOLETTI, 2008).

Através da interação entre os organismos vivos e os compostos tóxicos no ambiente, podemos determinar efeitos biológicos em diferentes níveis, desde moleculares até comunidades e ecossistemas (Figura 3).

.

**Figura 3.- Efeitos biológicos de contaminantes em diversos níveis considerando tempo de resposta e relevância ecológica**



Fonte: Adaptado de WALKER et al., 1996

Os estudos ecotoxicológicos se dividem em agudos e crônicos. Os ensaios agudos avaliam uma resposta rápida dos organismos frente ao contaminante de estudo onde é observada a letalidade ou outro fator que anteceda a mortalidade, como a imobilidade (MAGALHÃES; FERRÃO, 2008; WRIGHT; WELBOURN, 2002). Essa resposta rápida é chamada de efeito agudo e pode ser interpretada por resultados como  $CL_{50}$  que significa a dose letal para 50% dos organismos e  $CE_{50}$  que é a concentração efetiva para 50% dos organismos (ex: imobilização) em um curto período de tempo (24h - 96h). Embora os ensaios agudos sejam diretos e de baixo custo eles ignoram fatores fisiológicos e ecológicos.

Os ensaios crônicos costumam ter um período maior de duração que vai de 1/10 a um ciclo de vida do organismo com doses ou concentrações subletais. Os efeitos observados nesses organismos são alterações biológicas que interferem em mecanismos de reprodução, desenvolvimento de ovos, crescimento, etc (MAGALHÃES; FERRÃO, 2008; RAND; PETROCELLI, 1995). Estes estudos permitem ainda a quantificação dos efeitos da exposição dos organismos aos compostos tóxicos utilizando técnicas como a avaliação nas mudanças de atividades de enzima, modificações estruturais nas células, quantificação das alterações no comportamento ou reprodução dos organismos

e alterações fisiológicas básicas, como respiração, fotossíntese, locomoção e alimentação (CONNELL, 1999; WALKER et al, 1996). É possível expressar resultados crônicos em função de CEO (Concentração de efeito observado) e CENO (Concentração de efeito não observado) entre outras formas (KNIE; LOPES, 2004; SANTOS, 2009).

### **3.3 Biomarcadores**

Biomarcadores, em ecotoxicologia, podem ser definidos como alterações em uma resposta biológica que refletem efeitos tóxicos de contaminantes no meio ambiente (ISLAS-FLORES et al., 2013). Essas alterações nas respostas biológicas podem ocorrer no nível de sub organismo, desde moleculares, celulares, fisiológicas ou comportamentais, relacionadas à exposição e efeitos tóxicos dos poluentes ambientais (CONNELL, 2009; WRIGHT; WELBOURN, 2002; GUPTA 2014). Os biomarcadores de exposições químicas incluem enzimas, proteínas e outras macromoléculas associadas a funções fisiológicas e podem ser classificados em: a) biomarcadores de exposição, onde se pode estabelecer uma ligação entre a exposição externa e a quantificação da exposição interna; b) biomarcadores de efeito, que permite relacionar a ligação dos biomarcadores entre exposição e efeitos contribui para uma relação dose-resposta; e c) biomarcadores de suscetibilidade, que indicam a capacidade inerente ou adquirida de um organismo responder a uma substância xenobiótica específica (Andr, 2003). Podem ser considerados bons biomarcadores aqueles que são sensíveis tanto à biodisponibilidade do contaminante quanto aos efeitos precoces no organismo fornecendo informações sobre os efeitos biológicos dos poluentes; são intermediários entre a fonte de poluição e maiores níveis de efeito (DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Ao estudar os efeitos de um contaminante ambiental em um organismo é interessante abranger diversos possíveis efeitos utilizando diferentes biomarcadores, como os biomarcadores bioquímicos que envolvem enzimas de biotransformação de fase I e fase II, estresse oxidativo e parâmetros neuromusculares; biomarcadores genéticos, biomarcadores de reprodução e morfologia, entre outros (DER OOST, 2003)



### 3.3.1 Biomarcadores bioquímicos

Em geral, as enzimas de biotransformação dos xenobióticos são bons biomarcadores bioquímicos que apresentam grande sensibilidade. Estas enzimas podem ter sua atividade inibida ou induzida de acordo com a sua função e de acordo com o contaminante a que o organismo foi exposto. Dentro deste contexto dois tipos de enzimas de biotransformação podem ser caracterizados, as enzimas de Fase I e de Fase II que são muito utilizadas em estudos ambientais por participarem na manutenção da homeostase celular. Os processos de Fase I introduzem grupos funcionais ( $\text{OH}^-$ ,  $\text{SH}^-$ ,  $\text{NH}_2$ ,  $\text{COOH}^-$ ) à molécula do xenobiótico fazendo com que se torne mais polar tornando-os mais solúveis em água. Na Fase II ocorre a conjugação do xenobiótico não transformado ou dos metabólitos oriundos da Fase I, tornando-os mais solúveis em água e facilitando a excreção. (BOELSTERLI, 2003; DER OOST, 2003; PUSCEDDO, 2016; SANTOS, 2004). Como exemplo de enzimas de Fase II podemos citar a glutathione-S-transferase (GST), que é uma superfamília de catalisadores de enzimas de transferência de glutathione (GSH- tripeptídeo endógeno) para uma ampla variedade de xenobióticos através do cisteína tiol (BOELSTERLI, 2003).

Muitos contaminantes ambientais (ou seus metabólitos) tem seus efeitos tóxicos relacionados ao estresse oxidativo (efeitos prejudiciais causados ao organismo devido a espécies reativas de oxigênio (ROS) e podem levar a inativação de enzimas, peroxidação lipídica, danos ao DNA e morte celular. Para evitar danos provenientes das ROS, as enzimas antioxidantes são de extrema importância para a detoxificação dos organismos. Alguns exemplos dessas enzimas são catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD). A atividade da CAT está, em sua maioria, nos peroxissomos e sua função é converter  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$ . Já a SOD tem como função converter radicais superóxido em  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2$  e é dividida em três tipos, manganês-SOD (localizada nas mitocôndrias), cobre e zinco-SOD (localizada no citoplasma e núcleo) e extracelular-SOD (DER OOST, 2003; WEYDERT; CULLEN, 2010). Como consequência do estresse oxidativo, a maior geração de espécies reativas de oxigênio pode aumentar a

oxidação de macromoléculas, como os lipídeos, proteínas e DNA, causando danos às células, dentre esses danos pode ser citada a carbonilação de proteínas (PCO) onde o aparecimento de carbonilas podem ocasionar danos celulares devidos as alterações químicas. (BARRERA, 2013; WONG et al., 2008; SUZUKI et al., 2010).

Com relação aos biomarcadores de neurotoxicidade, as enzimas colinesterases, principalmente a acetilcolinesterase (AChE), são de interessante uma vez que o sistema nervoso também apresenta potencial alvo para a ação dos xenobióticos (DER OOST, 2003).

### **3.4 Modelos de Toxicidade de Misturas**

A atividade humana faz com que umas infinidades de compostos sintéticos acabem no ambiente, dentre esses compostos estão pesticidas, fármacos e diversos outros contaminantes orgânicos (Dietrich et al., 2010). Estes compostos quando presentes no meio ambiente se tornam misturas complexas multicomponentes podendo apresentar toxicidade diferente aos organismos quando comparado aos compostos isolados (FIGUEIREDO, 2013). Entretanto, a maioria dos estudos ecotoxicológicos e métodos de regulação preveem apenas a exposição dos organismos aos compostos individualmente (FERREIRA; LOUREIRO; SOARES, 2008). Dentro deste contexto percebeu-se a necessidade de prever o efeito dessas misturas através de modelos matemáticos. Em geral, os modelos são baseados em duas referências, sendo a primeira o modelo de adição de concentração (CA) proposto por BLISS (1939), e o segundo o da ação independente (IA) proposto por LOEWE e MUISCHENEK (1926), ambos baseados no modo de ação (MoA) de cada composto separadamente.

O modelo de adição de concentração (CA) assume que os componentes da mistura diferem apenas nas concentrações necessárias para provocar um efeito tóxico. Quando corrigido pela sua potência relativa, cada componente pode ser substituído por concentrações equivalentes de outro produto químico sem alterar a toxicidade geral da mistura. Sendo assim, CA descreve a articulação da ação de componentes que possuem um modo ou

mecanismo de ação semelhante (BACKHAUS e FAUST, 2010). A equação 1 demonstra a expressão matemática de CA:

$$\sum_{i=1}^n \frac{c_i}{EC_{xi}} = 1 \quad (1)$$

Onde  $n$  é o número de misturas do componente,  $EC_{xi}$  é a concentração do  $i$ ésimo componente da mistura que causa  $x\%$  de efeito quando aplicado separadamente e  $c_i$  é a concentração do respectivo componente na mistura.

O modelo de ação independente (IA) é baseado na atuação independente dos compostos de uma dada mistura através de uma abordagem estatística. Nesse sentido, em termos ecotoxicológicos, IA entende que compostos com diferentes receptores moleculares podem agir em diferentes sistemas fisiológicos dentro dos organismos expostos (BACKHAUS, SCHOLZE e GRIMME, 2000; FAUST et al., 2001). A equação 2 demonstra a forma matemática de IA.

$$E(c_{mix}) = E(c_1 + \dots + c_n) = 1 - \prod_{i=1}^n [1 - E(c_i)] \quad (2)$$

Onde  $E(c_{mix})$  é o efeito previsto (em escala de 0 até 1) de um  $n$ -componente da mistura,  $c_i$  é a concentração do  $i$ ésimo componente e  $E(c_i)$  é o efeito dessa concentração.

Ambos os modelos são conceitos válidos que permitem prever efeitos combinados de misturas baseado na informação de suas toxicidades separadas (Faust et al., 2001). Contudo, misturas menos complexas podem ter desvios dos modelos padrões (PAVLAKI et al., 2010). Esses desvios podem ser sinérgicos ou antagônicos (S/A), onde os efeitos da mistura podem ser mais ou menos tóxicos com relação a toxicidade das substâncias isoladas (CORNELIS et al., 2011). Dentro de S/A podemos citar os desvios de dependência das doses isoladas (DL), quando a toxicidade da mistura depende das concentrações de cada químico na mistura; e, ainda, dependência da razão das doses (DR), que ocorre quando a toxicidade da mistura depende dos componentes da mistura (LOUREIRO et al., 2010; FIGUEIRÊDO, 2013). Para facilitar o uso desses desvios dos modelos de referência JONKER et al (2005) desenvolveram um

modelo de análise de dados chamado MIXTOX. Esse modelo permite avaliar se e como os dados observados se desviam dos modelos de CA e IA e permite testar se esses dados se diferenciam entre sinergismo e antagonismo, juntamente com desvios baseados em DL e DR (LOUREIRO et al., 2010).

### 3.5 Organismos de Ensaio ecotoxicológicos

Para a realização de ensaios ecotoxicológicos, os organismos indicadores utilizados idealmente devem apresentar como característica sensibilidade, ampla distribuição geográfica, relevância ecológica e/ ou (SCHVARTSMAN, 1991).

#### 3.5.1 *Daphnia magna*

*Daphnia magna* (Figura 4) é um microcrustáceo planctônico de água doce com tamanho médio de 5 a 6 mm. Atua na cadeia alimentar aquática como consumidor primário, alimentando-se por filtração de material orgânico particulado, principalmente de algas unicelulares. Em condições ambientais favoráveis reproduz-se assexuadamente por partenogênese, originando apenas fêmeas. São vulgarmente conhecidas como pulgas d'água (KNIE; LOPES, 2004).

Figura 4 -: *Daphnia magna*



Fonte: <http://www.aquarium-kosmos.de/inhalt/57> (2015)

O microcrustáceo *D. magna* é um dos organismos zooplanctônicos mais usados em testes ecotoxicológicos em vários países atualmente e reage sensivelmente a uma variedade de agentes tóxicos (ALVES; SILVANO, 2006).

Segundo Knie e Lopes (2004), a escolha da *Daphnia magna* como organismo-teste fundamenta-se principalmente nos seguintes critérios:

- os descendentes são geneticamente idênticos, o que assegura uma uniformidade de respostas nos ensaios;
- a cultura em laboratório sob condições controladas é fácil;
- o manuseio é simples, devido ao tamanho relativamente grande da espécie, em comparação a outros microcrustáceos;
- a espécie reage sensivelmente à ampla gama de agentes nocivos;
- a espécie é adequada para testes estáticos, semiestáticos ou de fluxo contínuo;
- o ciclo de vida e de reprodução é suficientemente curto, o que permite usar as daphnias em testes crônicos;
- *Daphnia magna* é internacionalmente reconhecida como organismo-teste e vem sendo utilizada há décadas em estudos laboratoriais.

### 3.5.2 *Rhamdia quelen* (jundiá)

O jundiá (FIGURA 5) é um bagre pertencente à família Pimelodidae e gênero *Rhamdia* le se distribui por toda América do Sul e Central, sendo encontrado preferencialmente em rios com pouca corrente e lagos cobertos com vegetação. Seus hábitos são noturnos, se desenvolvem em água doce sendo encontrados, em geral, entre 2 m e 3 m de profundidade. No hemisfério sul sua reprodução ocorre entre os meses de setembro a fevereiro, tendo sua maturidade sexual no primeiro ano de vida. Em cada ciclo reprodutivo são gerados aproximadamente 100.000 ovos por kg de peixe e eclodem entre 18 h-20 h após a fertilização. As larvas são transparentes tendo entre 1 mm a

1,3 mm com 3 a 5 dias para absorção do saco vitelínico (NAVA-FLORES E BROWN, 2010).

**Figura 5 - Exemplo de *Rhamdia quelen* adulto**



**FONTE: APTA REGIONAL: [www.aptaregional.sp.gov.br/.../jundia1.jpg](http://www.aptaregional.sp.gov.br/.../jundia1.jpg).**

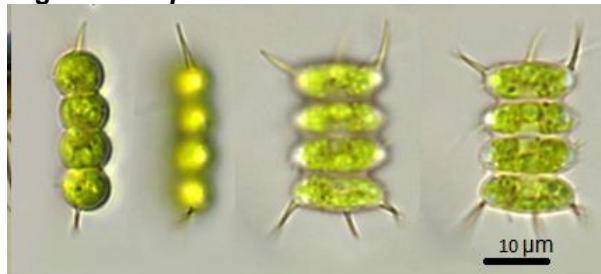
O jundiá (FIGURA 5) é um bagre pertencente à família Pimelodidae e gênero *Rhamdia* le se distribui por toda América do Sul e Central, sendo encontrado preferencialmente em rios com pouca corrente e lagos cobertos com vegetação. Seus hábitos são noturnos, se desenvolvem em água doce sendo encontrados, em geral, entre 2 m e 3 m de profundidade. No hemisfério sul sua reprodução ocorre entre os meses de setembro a fevereiro, tendo sua maturidade sexual no primeiro ano de vida. Em cada ciclo reprodutivo são gerados aproximadamente 100.000 ovos por kg de peixe e eclodem entre 18 h-20 h após a fertilização. As larvas são transparentes tendo entre 1mm a 1,3 mm com 3 a 5 dias para absorção do saco vitelínico (NAVA-FLORES E BROWN, 2010).

Esse peixe é de fácil cultivo, apresentando altas taxas de fecundidade, chegando a uma produção anual de 7,72 milhões de alevinos na região sul do Brasil em 2010 (AZEVEDO, 2016). Devido a sua facilidade de cultivo e relevância ecológica o jundiá tem sido utilizado tanto na sua forma adulta como no estágio embriolarval em estudos ecotoxicológicos em diversas áreas do país (BARRERA, 2013; NETA et al., 2017; SANCHES, 2006). Estudos do desenvolvimento embrionário permitem observar alterações em um período crítico do desenvolvimento de um organismo, uma vez que há alta taxa de proliferação de células e de diferenciação celular, além de um sistema de desintoxicação imaturo tornado o embrião/larva mais vulnerável a agentes externos (GUPTA, 2011)

### 3.5.3 *Desmodesmus subspicatus*

*Desmodesmus subspicatus* (FIGURA 6) é uma microalga verde planctônica comum em águas continentais em ambientes ricos em nutrientes e pertence ao filo/classe Chlorophyta/Chlorophyceae. Tem importante papel nos ecossistemas de água doce sendo produtor primário participando dos ciclos biogeoquímicos de carbono, oxigênio nitrogênio, fósforo e silício. (HEGEWALD; SCHIMIDT; SCHNEPF, 2000; KNIE; LOPES, 2004).

Figura 6.- Exemplo da microalga *D. subspicatus*



FONTE: ALGAE BASES:

[http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species\\_id=42443](http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=42443)

O ensaio com microalgas é muito bem consolidado dentro da ecotoxicologia por ser um organismo facilmente cultivado em laboratório e que apresenta respostas fisiológicas rápidas provocadas por compostos tóxicos., podendo ser usados como bioindicadores de qualidade da água e impacto ambiental (AN et al. 1999; SICKO-GOAD e STOERMER, 1988). Outro fator importante dos ensaios ecotoxicológicos com este organismo é a resposta crônica fornecida em um curto prazo de tempo. Por ser um organismo unicelular, *D. subspicatus* tem proliferação rápida e ao realizar os testes com esse organismo, através da curva de crescimento de população por 72h, avalia-se várias gerações de células, fornecendo respostas mais concisas sobre o contaminante (RATTE et al., 2003).

# CAPÍTULO I – AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE DO TRICLOSAN, TRICLOCARBAN E SUAS MISTURAS EM CONCENTRAÇÕES AMBIENTALMENTE RELEVANTES

## 1- INTRODUÇÃO

Triclosan (TCS) e triclocarban (TCC) são antimicrobianos de amplo espectro utilizados em diversos produtos de higiene pessoal, como sabonetes, pastas de dente, xampus e desodorantes, além de estarem presentes na formulação de alguns fármacos, plástico e tecidos (ORVOS et al., 2002). Devido a ampla utilização de produtos contendo TCS e TCC, esses compostos se encontram presentes em diversas matrizes ambientais principalmente em água e sedimentos (BRAUSCH; RAND, 2011; HALDEN; PAULL, 2005). A presença desses compostos em água pode variar de  $\text{ng L}^{-1}$  a  $\mu\text{g L}^{-1}$  em algumas regiões (BRAUSCH; RAND, 2011; TIBURTIUS; SCHEFFER, 2014).

A toxicidade desses compostos isolados é mais abordada na literatura, sendo TCS amplamente estudado enquanto TCC possui menos estudos e mecanismos de ação menos definidos (VINGSKES; SPANN, 2018). TCS se mostrou tóxico para diversos organismos como algas, bactérias, crustáceos, rotíferos e peixes (CHALEW; HALDEN, 2009b; HAN et al., 2016; HIGGINS et al., 2009; HO et al., 2016; ORVOS et al., 2002). TCC também apresentou toxicidade para diversos organismos como crustáceos, peixes e rotíferos (HAN et al., 2016; RABY, 2013; SATYRO et al., 2017). Contudo uma das maiores preocupações com relação a estes compostos está no seu potencial de perturbação endócrina em baixas doses, causando desordens de desenvolvimento, metabolismo, comportamento e reprodução em populações (CHEN et al., 2008; COOGAN et al., 2007; RAUTY e ANGUS, 2010; SCHULTZ; BARTELL; SCHOENFUSS, 2012; VINGSKES; SPANN, 2018). A toxicidade da mistura desses compostos é pouco explorada, ainda mais quando levamos em consideração concentrações ambientais.

Neste sentido, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar toxicidade de TCS e TCC, de forma isolada e em mistura, expondo organismos



de diferentes níveis tróficos (microalga, microcrustáceo e peixe) a concentrações ambientalmente relevantes dos compostos. Foram avaliados efeitos crônicos de reprodução para *D. subspicatus*, efeitos crônicos de reprodução multigeracional e biomarcadores bioquímicos de estresse oxidativo para *D. magna*. E para *R. quelen* foram analisados biomarcadores morfológicos e bioquímicos em seu estágio embriolarval.

## 2- MATERIAIS E MÉTODOS

### 1.1 Reagentes

Triclosan (TCC) e triclocarban (TCC) (padrões farmacêuticos secundários, 99% – Sigma-Aldrich) foram solubilizados em dimetil sulfóxido (DMSO, Synth) – 200 mg.L<sup>-1</sup> para TCS e 400 mg.L<sup>-1</sup> para TCC e mantidas à 2-8°C em frasco âmbar para evitar a degradação dos compostos.

As concentrações relevantes ambientalmente utilizadas nesse estudo correspondem àquelas encontradas na literatura (QUADRO 1), tendo sido escolhidas duas concentrações de estudo para cada composto, uma referente a concentração mais alta e outra a concentração mais baixa encontrada na literatura. Além dos compostos isolados, foram analisadas as misturas desses compostos utilizando as concentrações mais altas (TCS 2,5 µg L<sup>-1</sup> + TCC 6,3 µg L<sup>-1</sup>) encontradas na literatura.

**Quadro 1 - Concentrações utilizadas no trabalho e suas referências na literatura.**

<b>Composto</b>	<b>Concentração</b>	<b>Referência</b>
Triclosan	0,5 µg L <sup>-1</sup>	SANTOS et al, 2016
Triclosan	2,5 µg L <sup>-1</sup>	KOLPIN et al, 2002
Triclocarban	0,1 µg L <sup>-1</sup>	BRAUSCH; RAND, 2011
Triclocarban	6,3 µg L <sup>-1</sup>	HALDEN; PAULL, 2005

## 1.2 Toxicidade crônica em *Desmosdesmus subspicatus*

O ensaio de toxicidade crônica com *Desmosdesmus subspicatus* foi realizado de acordo com a metodologia descrita na norma NBR 12648 (ABNT, 2018) e consistiu na exposição da microalga *D. subspicatus* (proveniente de um cultivo axênico) ao contaminante com temperatura e luminosidade controlada por  $72 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ .

Para a realização do teste, primeiramente foi realizado o crescimento da biomassa de algas em meio de pré-cultivo DIN (ANEXO C) por três dias em frasco lavador de gases, temperatura de aproximadamente  $24^{\circ}\text{C}$  e luminosidade e aeração constantes. Após o período de crescimento em meio DIN, foi realizada a exposição das microalgas em Erlenmeyers de 125 mL contendo 5 mL de inóculo de algas com densidade celular de  $10^5$  células/mL, 5 mL de meio de cultivo para ensaio (ANEXO C) e 40 mL de água de osmose + solução de amostra. As condições do ensaio foram de luminosidade constante, agitação de 145 rpm utilizando “shaker”, temperatura de aproximadamente  $24^{\circ}\text{C}$  e sem aeração. Após o período de exposição foi avaliada a viabilidade das células em microscópio ótico e o crescimento da biomassa através de comparação de curva analítica utilizando espectroscopia de UV-VIS (Fluostar Omega) em 685 nm. Para avaliar os resultados de = crescimento da biomassa foi realizado o teste de ANOVA seguido de teste de Tuckey utilizando software GraphPad 5.

## 1.3 Determinação da toxicidade crônica multigeracional em *Daphnia magna*

### 1.3.1 Cultivo de *Daphnia magna*

O cultivo de *D. magna* foi mantido segundo a norma NBR 12713/2016 (ABNT, 2016). Os organismos adultos foram mantidos em incubadora tipo BOD com controle de temperatura ( $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e fotoperíodo (16 horas de claridade e 8 horas escuro) dentro de béqueres de 2000 mL com 50

organismos por recipiente em água de cultivo (APÊNDICE B) previamente preparada e aerada durante pelo menos 24 horas. A manutenção do cultivo foi feita através da retirada de filhotes, troca da água de cultivo, e alimentação com *Desmosdesmus subspicatus* ( $10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) mantidas através da norma NBR 12648/2018 (ABNT, 2018).

### 1.3.2 Toxicidade crônica multigeracional

Para avaliar os efeitos multigeracionais, 12 neonatos (2h – 26h) foram expostos individualmente por 21 dias em béqueres de 50 mL contendo 30 mL de solução (TCS,  $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $6,3 \mu\text{g L}^{-1}$ ; mistura TCS  $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$  + TCC  $6,3 \mu\text{g L}^{-1}$ ) preparada em meio de cultivo de daphnias (ANEXO B), mantidos em incubadora tipo BOD com controle de temperatura ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e fotoperíodo (16 horas claro e 8 horas escuro). A troca de soluções e alimentação com *D. subspicatus* ( $10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) foi realizada diariamente, exceto aos fins de semana, sendo contabilizada a quantidade de filhotes por béquer em cada troca. Ao fim do ensaio os organismos adultos (F0) foram retirados para realizar análises de biomarcadores bioquímicos. Os neonatos gerados no último dia (F1) foram expostos por mais 21 dias nas mesmas condições e ao fim do tempo de exposição os organismos adultos foram retirados para realizar análises de biomarcadores bioquímicos.

Para a análise de biomarcadores bioquímicos, os organismos com 21 dias foram coletados em tubos do tipo “eppendorf” e homogeneizados em 250  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato (0,1 M, pH 7,2) utilizando homogeneizador de tecidos rotativo a 14.000 rpm. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 8000 g por 10 minutos e a  $4^\circ\text{C}$ . O sobrenadante obtido foi utilizado no mesmo dia para a análise dos biomarcadores bioquímicos glutationa-S-transferase, catalase e superóxido-dismutase e quantificação de proteínas.

#### 1.3.2.1 Determinação de proteínas totais (PT)

Para a quantificação de proteínas totais foi utilizado o método espectrofotométrico de Bradford (1976) adaptado para microplacas de 96 poços

(Guilhermino et al, 1996), onde uma curva analítica foi preparada para cada ensaio utilizando albumina de soro bovina (BSA) como padrão para quantificação de proteínas totais em concentrações que variaram de 0,250 mg mL<sup>-1</sup> a 1 mg mL<sup>-1</sup>. No procedimento foram utilizados 10 µL de amostra 250 µl de reagente de Bradford (Sigma-Aldrich) em cada poço e realizada leitura em leitor de microplaca em 595 nm. Os resultados foram expressos em mg mL<sup>-1</sup> de proteína.

#### 1.3.2.2 Atividade da Catalase (CAT)

A atividade da enzima catalase foi baseada na metodologia descrita por AEBI (1984) onde é determinado o decréscimo de absorbância a 240 nm devido à degradação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. Neste procedimento 30 µL de amostra normalizada para 1 mg.mL<sup>-1</sup> de proteínas e 70 µL de tampão Tris-HCl (20 mM, EDTA 1,0 mM, pH 7,6) foram pipetados em microplaca de 96 poços, em seguida 150 µL de meio reacional (Tampão Tris-HCl 1,0 M, EDTA 5,0 mM, pH 8,0; água de osmose; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 mM) foi pipetado e realizada a leitura imediatamente por 2 min com leituras a cada 20 segundos em 240 nm. O resultado foi expresso em mmoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> degradado x min<sup>-1</sup> x mg de proteína<sup>-1</sup>.

#### 1.3.2.3 Atividade da glutathiona-S-transferase (GST)

Para verificar a atividade da glutathiona-S-transferase (GST) foi utilizado o método espectrofotométrico descrito por Habig et al. (1974). As GSTs formam um tioéter através da conjugação do substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com a glutathiona reduzida (GSH) sendo a leitura realizada em 340 nm. Para este biomarcador foram utilizados 20 µL de amostra homogeneizada e normalizada para 1 mg mL<sup>-1</sup> de proteínas com 180 µL de meio reacional (GSH 1,5 mM; CDNB 2 mM; tampão fosfato de potássio 0,1M pH 6,5) em triplicata em placas de 96 poços. Foi realizada a leitura em um tempo total

de 300 segundos com leituras de 20-50 segundos, os resultados foram expressos em nmol de tio éter produzido por minuto, por miligrama de proteína.

#### 1.3.2.4 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da enzima superóxido dismutase foi baseada no método de autoxidação do pirogalol com modificações (MARKLUND & MARKLUND, 1974; MACIEL et al., 2013). Foram adicionados 1,4 mL de tampão Tris-HCl (50 mM, EDTA 1 mM, pH 9) e 50 µL de amostra em tubos tipo “ependorf” e em seguida os tubos foram incubados em banho-maria a 25°C por 25 minutos. Após o período de incubação, foram transferidos 200 µL da amostra para microplaca de 96 poços e foram adicionados 34 µL de pirogalol (1mM, HCl 1 mM) e imediatamente foi realizada a leitura em 320 nm por 5 minutos. A atividade da SOD foi calculada através da porcentagem de inibição da autoxidação do pirogalol (1 unidade (1U) = 50% de inibição) e expressa em U por mg de proteína.

### 1.4 Determinação da ecotoxicidade em embriões de *Rhamdia quelen*

Este procedimento passou por aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UTFPR) de acordo com parecer favorável (APÊNDICE A) SEI nº 0432717, PARECER: 2018-029, PROCESSO Nº: 23064.024491/2018-72).

Os embriões foram obtidos na piscicultura Panamá localizada em Paulo Lopes – SC a partir da fertilização induzida de um único casal de peixes, para evitar grande variabilidade genética. Após a fertilização os embriões foram levados ao Laboratório de Ecotoxicologia da UTFPR por transporte automotivo com auxílio de caixas de isopor para manter as condições de temperatura. Após 8 horas da fertilização os embriões saudáveis foram separados dos óvulos coagulados antes do início da exposição com auxílio de uma pipeta de Pasteur.

#### 1.4.1 Exposição

A exposição foi realizada com base no protocolo 236 da OECD (OECD, 2013), onde os embriões em estágio de gástrula com 8 horas pós fertilização (hpf) foram expostos por 96 horas em microplacas de 96 poços (um organismo por poço) em quadruplicatas. As microplacas foram incubadas a  $24 \pm 0,5^\circ\text{C}$  com fotoperíodo 12h claro/12h escuro em incubadora do tipo BOD. As soluções (TCS:  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ; TCC:  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $6,3 \mu\text{g.L}^{-1}$ ; mistura: TCS  $2,5 \mu\text{g.L}^{-1}$  + TCC  $6,3 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) e o controles (negativo e DMSO 0,03%) foram preparados com água reconstituída (ASTM, 1993) (QUADRO 2) em água de osmose.

**Quadro 2 - Composição da água reconstituída usada no ensaio**

<b>Composto</b>	<b>Concentração (g L)</b>
CaCl	0,0065
MgSO <sub>4</sub>	0,1335
KCl	0,0004
NaHCO <sub>3</sub>	0,0105


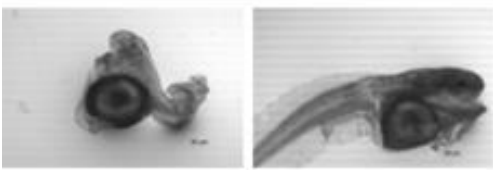


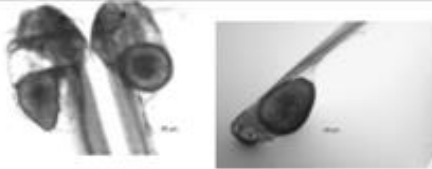
Os organismos foram expostos a 250  $\mu\text{L}$  de solução com troca diária de 125  $\mu\text{L}$  para manter as condições de exposição dos organismos.

#### 1.4.2 Biomarcadores morfológicos

Durante o período de exposição foram avaliados a cada 24h os seguintes parâmetros de desenvolvimento: coagulação, formação de somitos, desprendimento de cauda e presença de batimento cardíaco através de estereoscópio. A observação destes parâmetros permite verificar se os organismos estão se desenvolvendo normalmente, além da mortalidade dos indivíduos.

Também foram avaliadas através de observação em estereoscópio a presença de anomalias e má formações craniais/faciais, torácicas, nas nadadeiras e enrolamento de cauda (QUADRO 3). Cada anomalia teve um escore atribuído (QUADRO 4) variando de 1 a 4 de acordo com a severidade do dano (BARRERA, 2013; POWERS et al, 2011)

**Quadro 3 - Imagens de referências de normalidade deformidades encontradas nas larvas de *R. quelen* sendo os danos encontrados categorizados em axial, danos nas nadadeiras, danos cefálicos e danos no tórax/abdômen.**

Categoria	Exemplos de deformidades
Normal	
Axial	
Nadadeiras	
Cefálica	
Tórax/Abdômen	

Adaptado de BARRERA, 2003 e PEREIRA 2006

**Quadro 4. Escores atribuídos a cada categoria de dano de acordo com as anomalias observadas**

Anomalia	Escore
Axial (esqueleto/cauda)	4
Nadadeiras atrofiadas danificadas	2
Lesão na estrutura da nadadeira	1
Deformidades faciais	3
Ausência de olhos	4
Edema ocular	4
Deformidades na estrutura bucal	4
Distensão e/ou atrofia corporal	2
Edema cardíaco	4

#### 1.4.3 Biomarcadores bioquímicos

Após 96 horas de exposição os organismos foram coletados em tubos do tipo “ependorf” e congelados em ultrafreezer (-80°C), sendo que cada tubo corresponde a uma placa (aproximadamente 88 organismos). Para as análises bioquímicas o material congelado foi homogeneizado em 500 µL de tampão fosfato Tampão Tris-HCl (20 mM, EDTA 1,0 mM, pH 7,6), utilizando homogeneizador de tecidos rotativo a 14.000 rpm e mantendo em gelo durante a homogeneização. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10000 G por 10 minutos e a 4°C e o sobrenadante foi coletado para a realização dos ensaios posteriores.

##### 1.4.3.1 Determinação de proteínas totais

A determinação de proteínas totais foi realizada de acordo com a metodologia descrita no item 1.3.2.1 deste capítulo.

##### 1.4.3.2 Atividade da acetilcolinesterase (AChE)

A atividade total da acetilcolinesterase foi medida através do método descrito por Ellman et al. (1961) com adaptações para microplaca por



Guilhermino et al (1996). O método é baseado na degradação da acetiltiocolina (análogo estrutural da acetilcolina) pela atividade de acetilcolinesterase presente na amostra, formando tiocolina. Sua atividade é medida em espectrofotômetro a 412 nm, com leituras a cada 40 segundos, totalizando 5 minutos. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mols}$  de acetitiocolina hidrolisada  $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg}$  de proteína<sup>-1</sup>.

#### 1.4.3.3 Atividade da Catalase

A atividade da catalase foi realizada de acordo com a metodologia descrita no 1.3.2.2 deste capítulo.

#### 1.4.3.4 Atividade Glutathione-S-Transferase

A atividade da GST foi realizada de acordo com a metodologia descrita no item 1.3.2.3 deste capítulo.

#### 1.4.3.5 Carbonilação de Proteínas (PCO)

A carbonilação de proteínas foi determinada através do método descrito por LEVINE et al (1994) onde a carbonilação pode ser medida através da reação de 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) com proteínas carboniladas (apenas do tipo aldeído e cetona) formando dinitrofenil hidrazonas que podem ser detectadas a 358-370 nm. Neste método, 200  $\mu\text{L}$  de sobrenadante da amostra (normalizados para  $2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de proteínas) foram separados em dois tubos de 2 mL por amostra (uma para o teste e outra para o branco). Ao tubo branco foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de HCl (2 M) no tubo de reação foi adicionado 500  $\mu\text{L}$  meio reacional (2,4-dinitrofenil-hidrazina 10 mM – Sigma-Aldrich) e incubados a 37 °C por 90 min. Após o período de incubação foi adicionado 700  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético 28% e realizada mistura através de *vortex*. O material foi centrifugado a 9.000 G, 4°C, por 10 min e em seguida o sobrenadante descartado. O *pellet* formado foi ressuscendido em 1 mL de etanol-acetato de etila (1:1) (NEON) e misturado em *vortex*. Foi realizada centrifugação e ressuspensão do material por 3 vezes, até o sobrenadante não apresentar mais

coloração. Após esse processo o material foi ressuspendido em hidrocloreto de guanidina (6 M), homogeneizado e centrifugado (9.000 G, 4°C, 3 min). Ao final da preparação da amostra 200 µL do sobrenadante foi pipetado em microplaca de 96 poços e a leitura realizada em 370 nm. Os resultados foram expressos em micromoles de carbonilas x mg de proteína<sup>-1</sup>.

#### 1.4.4 Análise Estatística

Para todos os resultados obtidos foi realizado teste de normalidade (Kolmogorov Smirnov). Para avaliar os resultados obtidos nos ensaios morfológicos de *R. quelen*, biomarcadores bioquímicos (*R. quelen* e *D. magna*), efeitos de reprodução de uma geração de *D. magna* e crescimento da biomassa de *D. subspicatus* foi feita análise por ANOVA (uma via), seguida de teste de Dunnett, com nível de confiança com  $p < 0,05$ , utilizando software estatístico GraphPad Prism® 5.0. Para verificar a significância entre as gerações do ensaios multigeracionais foi realizado ANOVA (duas vias) com nível de confiança com  $p < 0,05$ , utilizando software estatístico GraphPad Prism® 5.0

### 3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 *Desmosdesmus subspicatus*

O ensaio realizado com a microalga teve como objetivo avaliar se em concentrações ambientais os compostos triclosan e triclocarban podem afetar o crescimento da biomassa de *D. subspicatus*. Nenhuma inibição significativa foi observada após as 72 h de exposição (TABELA 1) contudo é possível perceber que na mistura em concentrações mais altas houve maior efeito atingindo praticamente 16% de inibição com relação ao controle.

**Tabela 1 - Porcentagem de inibição do crescimento de biomassa de *Desmodesmus subspicatus* em relação ao controle negativo após 72 h de exposição**

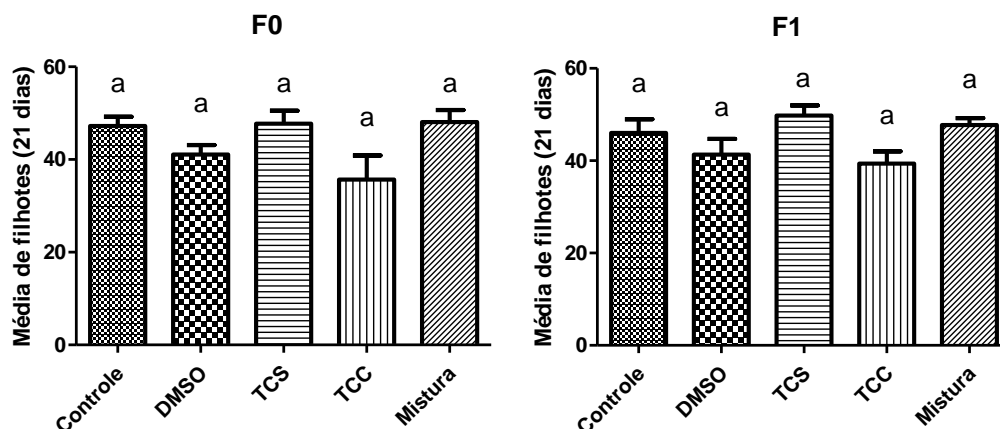
Amostra	% de inibição do crescimento	Desvio Padrão
DMSO 0,03%	0	4,40
TCS 0,5 µg L <sup>-1</sup>	7,53	6,22
TCS 2,5 µg L <sup>-1</sup>	6,98	6,51
TCC 0,1 µg L <sup>-1</sup>	9,56	5,92
TCC 6,3 µg L <sup>-1</sup>	7,35	2,03
TCS 0,5 µg L <sup>-1</sup> + TCC 0,1 µg L <sup>-1</sup>	11,76	7,74
TCS 2,5 µg L <sup>-1</sup> + TCC 6,3 µg L <sup>-1</sup>	15,99	3,60

Em diversos estudos as microalgas se apresentaram mais sensíveis ao TCS e TCC do que outros organismos, sendo que na literatura foram encontrados dados de CE<sub>50</sub> que variaram de 0,2 - 2,8 µg L<sup>-1</sup> para o TCS e concentrações efetivas mais elevadas de 10 - 30 µg L<sup>-1</sup> para TCC (CONSORTIUM, 2002; ORVOS et al., 2002; REISS et al., 2002; SAMOSOE-PETERSEN et al., 2003; YANG et al., 2008). No presente estudo a não inibição da biomassa pode estar relacionada ao tempo de exposição curto das células. Algumas espécies de algas podem ter sensibilidade bem mais elevada a esses compostos, para a microalga *Chlamydomonas reinhardtii* onde apresentou efeitos para o TCS entre 20 µg.L<sup>-1</sup>, a 500 µg.L<sup>-1</sup> sendo que foram observados efeitos na sínteses de clorofila, inibição do crescimento, respostas a estresse oxidativo e alterações em biomarcadores bioquímicos (PAN et al., 2018). Em estudos comparativos, microalgas são os organismos mais sensíveis ao TCS, uma vez que esse organismo possui estrutura similar à de bactérias e acaba se tornando alvo da ação desse antimicrobiano (ORVOS et al., 2002; RUSZKIEWICZ et al., 2017). A ação de TCC para esses organismos é menor quando comparado ao TCS, contudo ainda há uma elevada toxicidade, uma vez que TCC também é um antimicrobiano (TAMURA et al., 2013). Além da toxicidade desses compostos a algas, foi comprovado um potencial de bioacumulação onde TCC (200 - 400 ppb) se mostrou mais bioacumulativo que TCS (100 - 150 ppb) (COOGAN et al., 2007).

### 3.2 Ecotoxicidade crônica multigeracional

O primeiro parâmetro avaliado no ensaio crônico foi a reprodução dos organismos ao longo de 21 dias. Durante esse período não houve alterações significativas no padrão de reprodução dos organismos expostos em F0 e F1 (FIGURA 1). Ambos tiveram média de natalidade próximas tanto para os controles quanto para as amostras, também não foram verificadas anormalidades ou alto índice de mortalidade nas gerações estudadas.

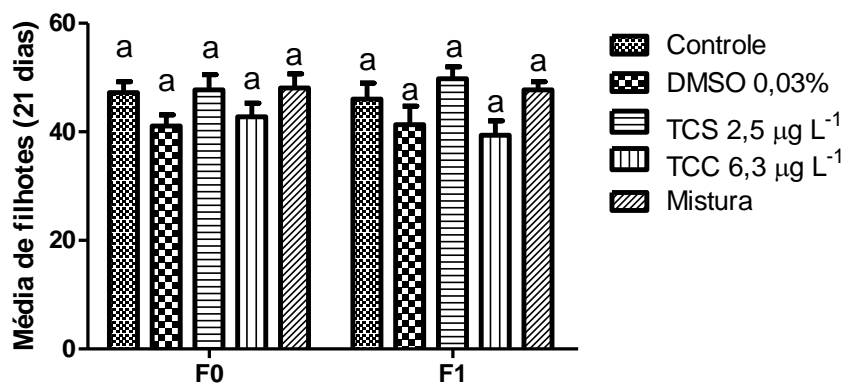
Figura 1 - Número médio de filhotes de *Daphnia magna* gerados após 21 dias de exposição



Concentrações de TCS  $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ , TCC  $6,3 \mu\text{g L}^{-1}$  e mistura (TCS  $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ , TCC  $6,3 \mu\text{g L}^{-1}$ ) em que F0 corresponde a geração parental e F1 corresponde a geração filha. Letras semelhantes indicam falta de diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ )

Comparando a quantidade de filhotes gerados durante os experimentos, não houve diferenças significativas entre as médias de organismos gerados comparando as amostras de cada geração.

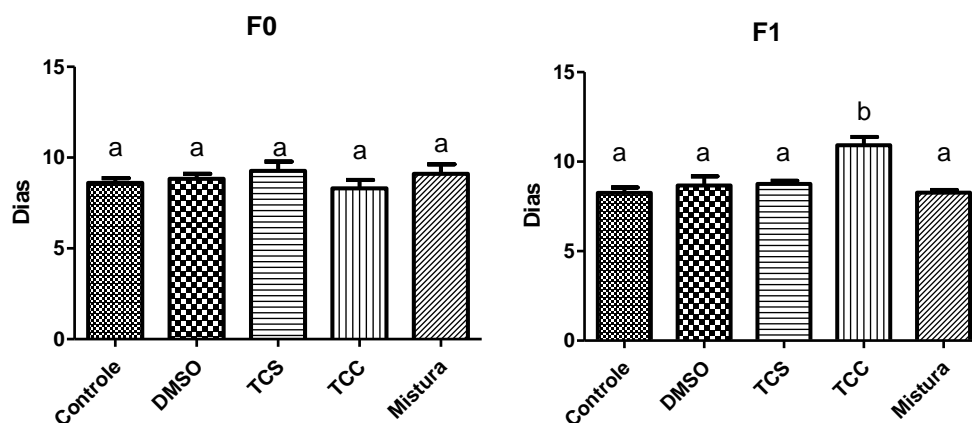
Figura 2 - Comparação entre as gerações estudadas do número médio de filhotes de *Daphnia magna* gerados após 21 dias de exposição



Concentrações de TCS 2,5 µg L<sup>-1</sup>, TCC 6,3 µg L<sup>-1</sup> e mistura (TCS 2,5 µg L<sup>-1</sup>, TCC 6,3 µg L<sup>-1</sup>) em que F0 corresponde a geração parental e F1 corresponde a geração filha. Letras semelhantes indicam falta de diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ )

Ao avaliar a quantidade de dias para a geração da primeira prole (FIGURA 3), nenhuma das amostras de F0 apresentou alterações em relação ao controle. Em F1 o TCC apresentou retardamento de tempo de reprodução significativo levando em média 10,9 dias para as matrizes gerarem os primeiros filhotes enquanto o controle teve média de 8,2 dias ter a primeira prole.

Figura 3 - Média de dias necessários para *Daphnia magna* gerar a primeira prole para os grupos expostos

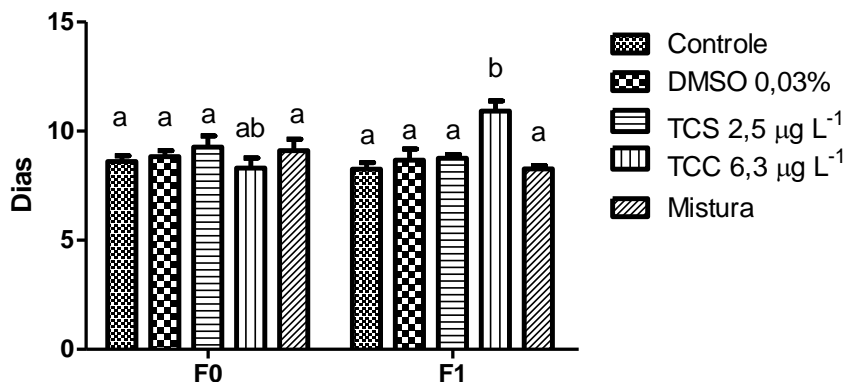


Concentrações de TCS 2,5 µg L<sup>-1</sup>, TCC 6,3 µg L<sup>-1</sup> e mistura (TCS 2,5 µg L<sup>-1</sup>, TCC 6,3 µg L<sup>-1</sup>) em que F0 é a geração parental e F1 é a geração filha. Letras iguais correspondem a falta de diferença estatisticamente significativa e letras diferentes correspondem a diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ )

Além da alteração ocasionada pelo TCC em F1, a média de dias para a geração da primeira prole entre F0 e F1 também foi afetada (FIGURA 4).

Em F0 a média de dias para os organismos se reproduzirem foi de 8,3 dias enquanto em F1 esse tempo foi de 10,9 dias.

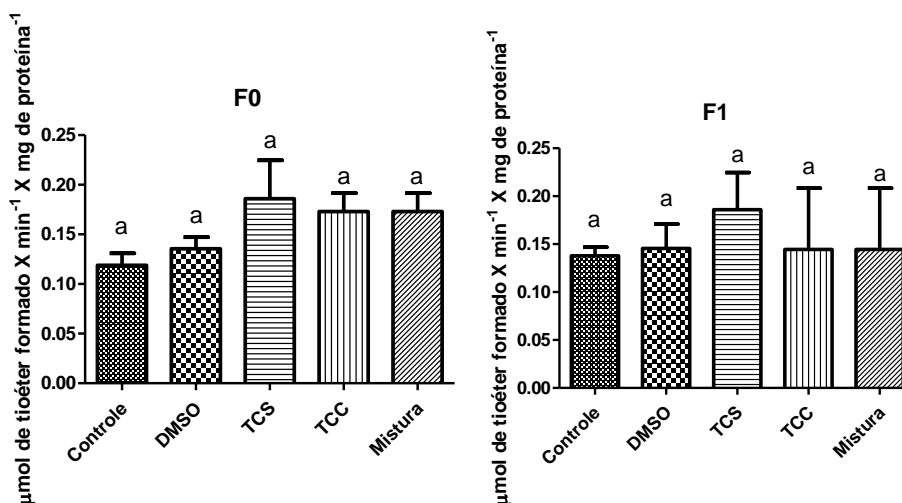
**Figura 4 - Comparação entre a média de dias necessários para *Daphnia magna* gerar a primeira prole para os grupos expostos**



Concentrações de TCS 2,5 µg L<sup>-1</sup>, TCC 6,3 µg L<sup>-1</sup> e mistura (TCS 2,5 µg L<sup>-1</sup>, TCC 6,3 µg L<sup>-1</sup>) em que F0 é a geração parental e F1 é a geração filha. Letras iguais correspondem a falta de diferença estatisticamente significativa e letras diferentes correspondem a diferença estatística significativa (p<0,05)

Ao 21º dia de exposição os organismos adultos foram retirados para realizar as análises de biomarcadores bioquímicos. Nenhuma alteração significativa da glutiona-S- transferase (FIGURA 5) foi verificada para as amostras expostas, mas é possível verificar que tanto em F0 e F1 as amostras expostas ao TCS apresentaram uma atividade maior quando comparado aos outros grupos.

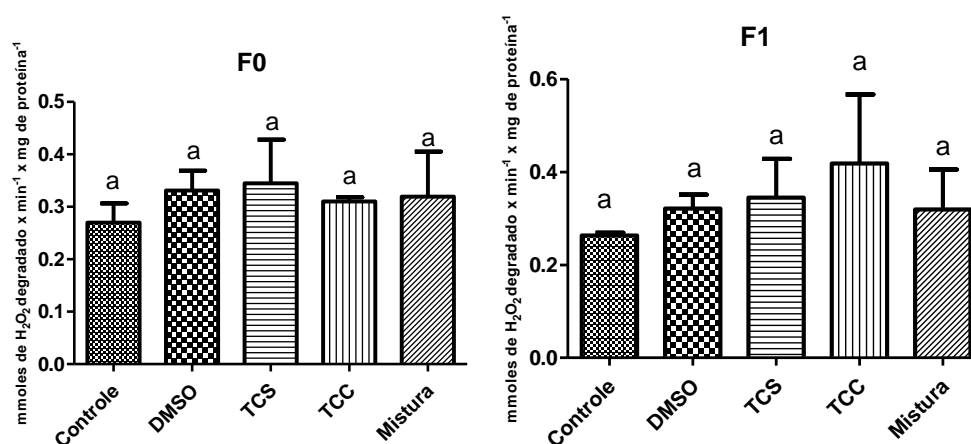
**Figura 5 - Atividade da enzima glutiona-S-transferase para *Daphnia***



Concentrações de TCS  $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ , TCC  $6,3 \mu\text{g L}^{-1}$  e mistura (TCS  $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ , TCC  $6,3 \mu\text{g L}^{-1}$ ) em que F0 corresponde a geração parental e F1 corresponde a geração filha. Letras semelhantes indicam falta de diferença estatística significativa ( $p>0,05$ )

Da mesma forma foi avaliada a atividade da enzima catalase (FIGURA 6), que também não apresentou diferenças significativas de atividade dos grupos expostos com relação ao controle. Embora não exista diferença significativa estatisticamente, em F1 é possível verificar um aumento da atividade para o grupo exposto ao TCC.

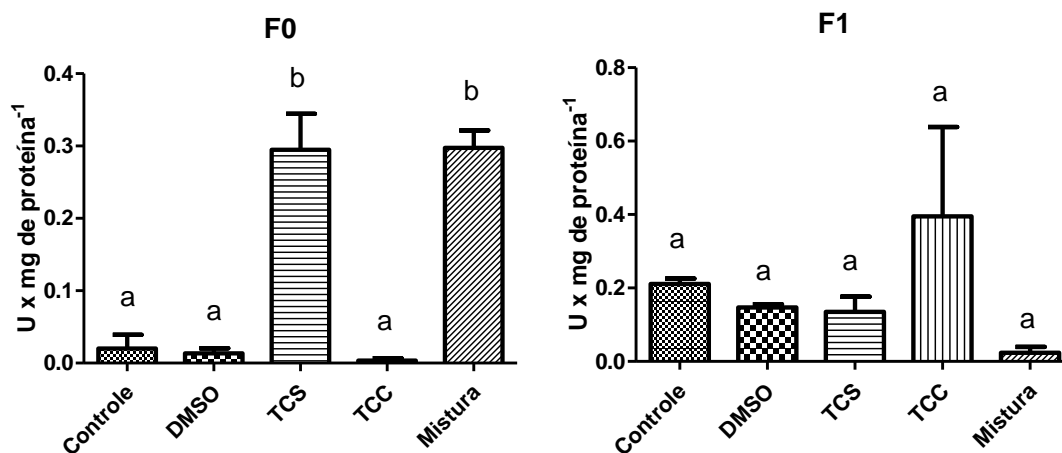
Figura 6 - Atividade da enzima catalase para *Daphnia magna*



Concentrações de TCS  $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ , TCC  $6,3 \mu\text{g L}^{-1}$  e mistura (TCS  $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ , TCC  $6,3 \mu\text{g L}^{-1}$ ) em que F0 corresponde a geração parental e F1 corresponde a geração filha. Letras semelhantes indicam falta de diferença estatística significativa ( $p>0,05$ )

Realizando as análises de SOD (FIGURA 7) foi possível verificar alta atividade da enzima para TCS e mistura em F0 enquanto F1 não apresentou diferenças significativas de atividade para nenhuma das amostras estudadas.

Figura 7 - Atividade da enzima superóxido dismutase para *Daphnia magna*



Concentrações de TCS  $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ , TCC  $6,3 \mu\text{g L}^{-1}$  e mistura (TCS  $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ , TCC  $6,3 \mu\text{g L}^{-1}$ ) em que F0 é a geração parental e F1 é a geração filha. Letras iguais correspondem a falta de diferença estatisticamente significativa e letras diferentes correspondem a diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ )

O principal efeito avaliando parâmetros de reprodução e desenvolvimento obtido neste estudo foi o atraso no início da reprodução dos organismos em F1 ocasionado pelo TCC. Este composto tem potencial de perturbação endócrina onde podem ocorrer mudanças diretas no desenvolvimento do ovo ou alterações indiretas através de efeitos fisiológicos do TCC na matriz (RABY, 2016; SCHMIDT et al., 2005). O atraso na primeira geração de filhotes corrobora com o estudo realizado RABY (2016), onde ao expor *D. magna* por 14 dias a uma concentração de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de TCC gerou atraso na reprodução, contudo este estudo avaliou apenas uma geração e por um período menor de tempo. Porém em estudo realizado por DANG et al (2012) onde o objetivo foi avaliar o teste de reprodução com *D. magna* para identificar perturbadores endócrinos nenhum dos parâmetros tradicionais avaliados nesse teste foi conclusivo, incluindo o teste de idade da primípara. Com relação ao TCS não houve diferença significativa entre o controle e o TCS, embora é possível verificar um leve aumento na quantidade de neonatos gerados tanto em F0 quanto em F1. PENG et al (2013) avaliou efeitos do TCS em concentrações ambientalmente relevantes e verificou aumento de reprodução em concentrações que variaram de  $1$  a  $16 \mu\text{g L}^{-1}$ . O efeito de aumento na reprodução também foi observado por VINGSKES e SPANN (2018) em estudo com o nematoda *C. elegans*. Outro estudo considerando concentrações ambientalmente relevantes de TCS e TCC com o molusco *Potamopyrgus*



*antipodarum* (GEIß et al., 2016) verificou alterações na reprodução para organismos expostos onde em concentrações mais baixas houve efeito de hormese (TCC < 1,01 µg L<sup>-1</sup>; TCS < 6,26 µg L<sup>-1</sup>) e em concentrações mais elevadas (8,85 µg L<sup>-1</sup>) TCC apresentou inibição de reprodução. Tanto o TCS quanto TCC possuem potencial de perturbação endócrina; TCS tem sido considerado um potencial agente androgênico (FORAN et al., 2000), enquanto TCC age como amplificador de hormônios esteroides (CHEN et al., 2008).

A mistura de TCS e TCC também não apresentou nenhum efeito de reprodução mesmo com TCC ocasionando retardamento na geração da prole. Esse fenômeno pode ser explicado por ação antagônica dos compostos, assim como o estudo realizado por VINGSKES e SPANN (2018) onde *C. elegans* exposto a mistura de TCS e TCC apresentou efeito de antagônico.

Os biomarcadores de estresse oxidativo GST e CAT não apresentaram alterações de atividade significativas para os compostos estudados. A atividade da enzima GST é utilizada como biomarcador para efeitos adversos de xenobióticos que são detoxificados através de reações de Fase II. A GST previne dano oxidativo gerando moléculas menos tóxicas e mais hidrofílicas (BARATA et al., 2005; DOURADO et al., 2008; LEMAIRE e LIVINGSTONE, 1993; PARK et al., 2017). Em estudos em concentrações ambientalmente relevantes, o TCS não alterou a atividade da GST para *D. magna* (PENG et al., 2013) porém para o mexilhão *Dreissena polymorpha* (BINELLI et al., 2011) houve alteração da GST. O TCC em baixas concentrações também causou efeito na atividade GST para *Gammarus locusta* (BARROS et al., 2017), já em concentrações mais altas (>100 µg L<sup>-1</sup>) TCS e TCC provocaram aumento da atividade de GST para organismos como *Brachionus koreanus* e *Tigriopus japonicus* e *Danio rerio* (HAN et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2009; PARK et al., 2017). CAT é responsável pela degradação de moléculas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em água e oxigênio estando presente principalmente nos peroxissomos (WEYDERT e CULLEN, 2010), nas concentrações estudadas não foi verificado alteração na atividade da catalase, contudo na literatura há evidências da alteração deste biomarcador pelo TCS para *D. magna*, *Eisenia andrei* e *Dreissena polymorpha* em concentrações relevantes ambientalmente (BINELLI et al., 2011; SATYRO et al., 2017; PENG et al., 2013) contudo para *Ruditapes philippinarum* CAT não apresentou alteração em baixas concentrações (MATOZZO et al., 2012). O TCC

em concentrações ambientais apresentou efeito na CAT para o organismo *Gammarus locusta* exposto a concentrações de 100 ng L<sup>-1</sup> a 2500 ng L<sup>-1</sup> (BARROS et al., 2017).

A SOD tem um papel importante na detoxificação dos organismos realizando a dismutação do ânion superóxido. Neste estudo a atividade da SOD foi elevada para TCS e Mistura em F0. Em estudo realizado por PENG et al., (2013) neonatos de *D. magna* expostos por 48h ao TCS (1 e 4 µg L<sup>-1</sup>) apresentaram aumento na atividade da SOD, assim como *Ruditapes philippinarum* expostos a 600 ng L<sup>-1</sup> e 900 ng L<sup>-1</sup> (MATOZZO et al., 2012) e *Dreissena polymorpha* expostos a 900 ng L<sup>-1</sup> (BINELLI et al., 2011) apresentaram alterações. Esse aumento sugere que o aumento da atividade da SOD pode ser um efeito de hormese em resposta ao TCS em baixas concentrações para proteção contra estresse oxidativo, em contrário ao decréscimo da atividade da SOD, que pode estar relacionada ao dano da membrana causada pelo TCS (PENG et al., 2013). Em F1 não houve alteração na atividade da SOD, este fator pode estar ligado ao fato de que a segunda geração não apresenta mais sensibilidade ao composto ou de que o TCS, quando presente entre duas moléculas de SOD, pode se ligar aos microambientes da enzima e diminuir sua atividade nos organismos, como descreveu o estudo de MI et al (2018).

Com relação ao estudo da mistura dos compostos TCS e TCC não foi verificada potencialização de efeitos tóxicos e em nenhum dos marcadores estudados foi possível observar que a mistura foi mais tóxica do que os compostos isolados. O efeito deletério mais significativo que pode ser ressaltado para a mistura foi a estimulação da atividade da SOD que pode ser atribuída ao TCS que também apresentou elevada atividade para este marcador. O efeito antagônico da mistura foi observado no marcador de idade para a primípara onde o TCC isolado ocasionou atraso para a primeira reprodução dos organismos enquanto a mistura não apresentou efeitos. VINGSKES e SPANN (2018) reportaram esse efeito em um estudo de misturas de TCS e TCC com o organismo *Caenorhabditis elegans* onde foi verificado que as duas substâncias, quando misturadas, agem de forma antagônica e sua toxicidade é menor do que a dos compostos isolados.

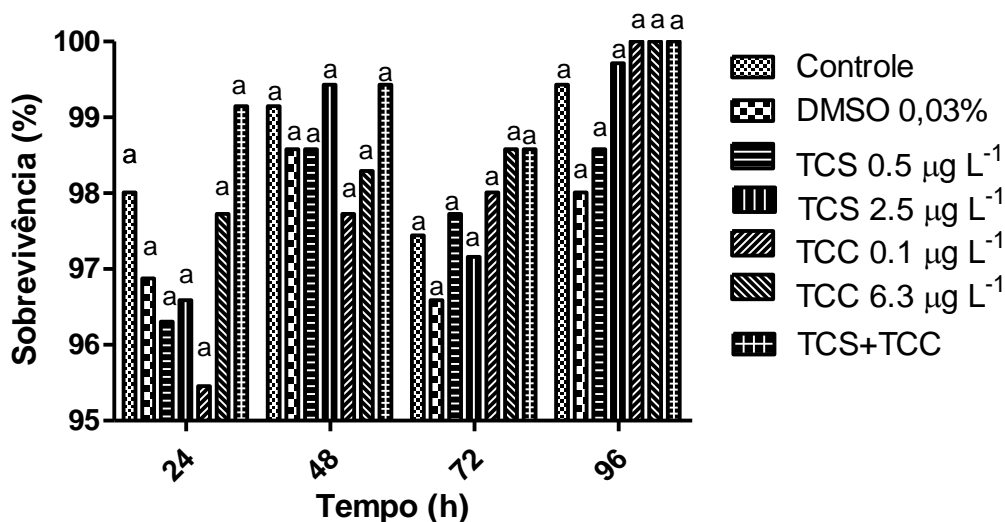
Estudos ecotoxicológicos com concentrações ambientalmente relevantes ainda são menos encontrados na literatura, para o triclosan essa

literatura é mais robusta (BINELLI et al., 2011; CORTEZ et al., 2012; GONZÁLEZ-PÉREZ et al., 2018; KU et al., 2014; MARLATT et al., 2013; MATOZZO et al., 2012; PENG et al., 2013; MACEDO, 2015), contudo, estudos com triclocarban são mais escassos (BARROS et al., 2017; CHUNG et al., 2011; RABY, 2013). O estudo desses efeitos permite uma avaliação mais precisa do risco ecológico relacionado a presença desses compostos no ambiente (BRAUCH & RAND, 2011). Aliado aos estudos realizados utilizando baixas concentrações a avaliação de mais de uma geração de organismos permite melhorar a relevância ecológica da avaliação de risco, uma vez que as populações podem ser expostas por várias gerações no meio ambiente (CHEN et al., 2013).

### 3.3 Determinação da ecotoxicidade em embriões de *Rhamdia quelen*

O primeiro parâmetro avaliado no ensaio com embriões foi a taxa de sobrevivência (FIGURA 8).

Figura 8 - Sobrevivência de embriões/larvas de *Rhamdia quelen* após a exposição de 96h



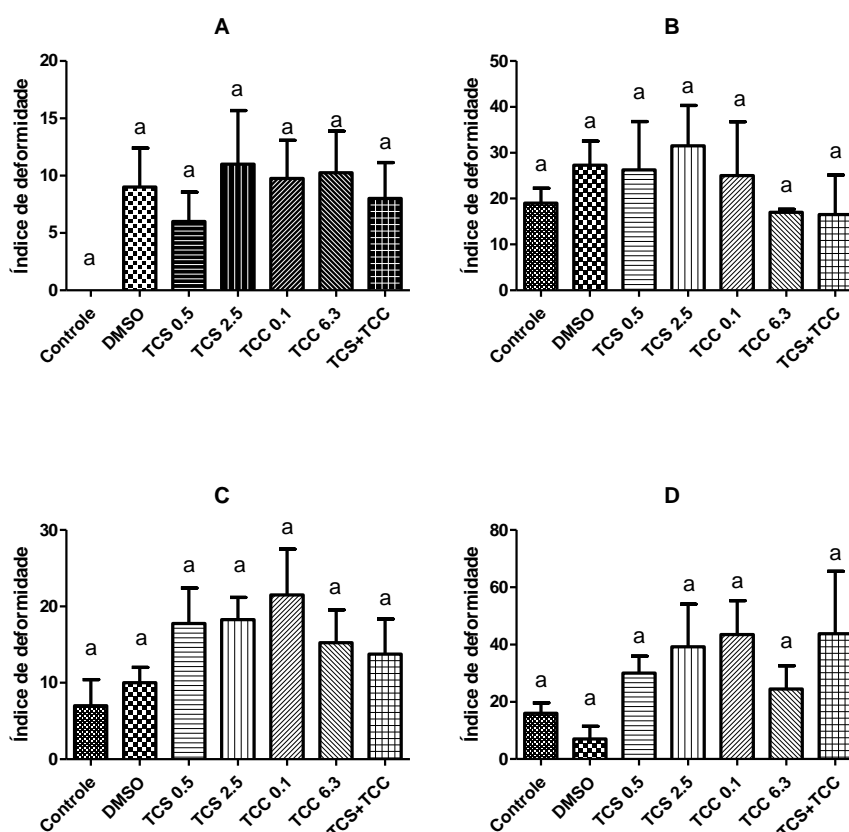
Triclosan nas concentrações de 0,5 µg L<sup>-1</sup> e 2,5 µg L<sup>-1</sup>, triclocarban nas concentrações de 0,1 µg L<sup>-1</sup> e 6,3 µg L<sup>-1</sup> e mistura na concentração de 2,5 µg L<sup>-1</sup> de triclosan e 6,3 µg L<sup>-1</sup> de triclocarban nos tempos de 24 h, 48 h, 72 h e 96 h. Letras iguais indicam falta de diferença estatística significativa (p>0,05)

Avaliando a sobrevivência dos organismos não houve diferenças estatisticamente significativas. Neste parâmetro não era esperado haver uma grande quantidade de mortalidade devido as baixas concentrações dos

compostos. Estudos realizados com embriões/larvas encontraram para o triclosan  $CL_{50}$   $0.42 \text{ mg L}^{-1}$  (*D. rerio*) (OLIVEIRA et al., 2009),  $CL_{50}$   $0,602 \text{ mg L}^{-1}$  (*Oryzias latipes*) (ISHIBASHI et al., 2004),  $CENO_{9d}$   $26 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  (*D. rerio*) (TAMURA et al, 2013),  $CENO$   $40 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  (*D. rerio*) (MACEDO, 2015) e para o triclocarban  $CENO_{9d}$   $24 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  (*D. rerio*) (TAMURA et al, 2013) . Esses dados demonstram que, mesmo para espécies diferentes das estudadas, as doses letais desses compostos estão dezenas de vezes acima das concentrações ambientais.

O índice de deformidades foi analisado a cada 24 horas (FIGURA 9). Dentro deste índice estão incluídas todas as anomalias estudadas gerando um índice único e demonstrando quais compostos apresentaram mais anomalias no geral. Em nenhum dos tempos avaliados foi verificado índice de deformidades com diferença estatística significativa.

Figura 9 - Índice de deformidade das larvas de *Rhamdia quelen* expostas por 96h

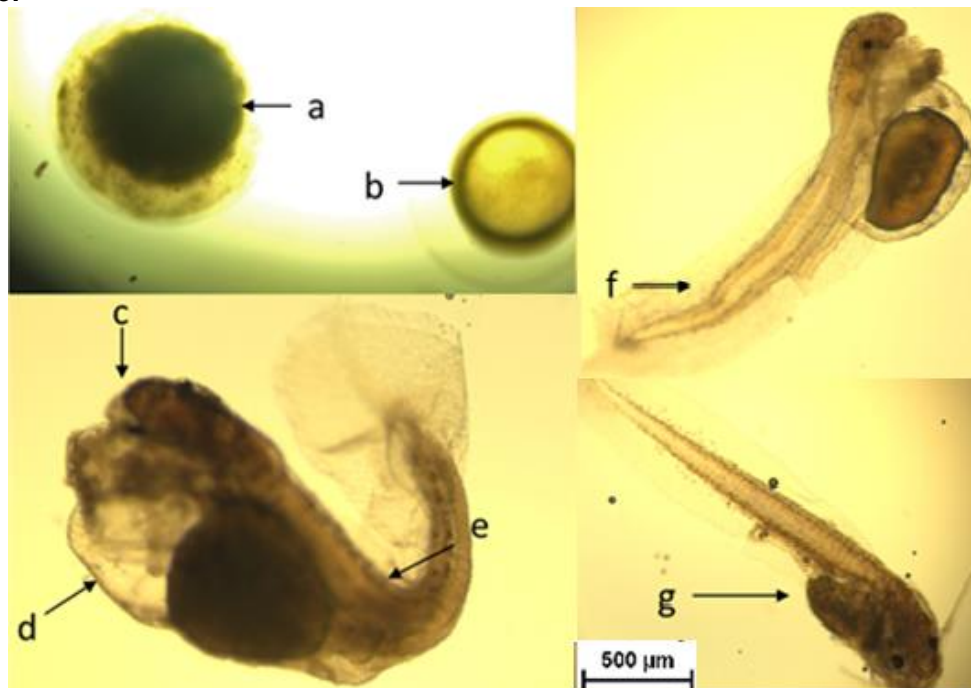


Controle solvente DMSO 0,03%, triclosan( $0,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  e  $2,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ), triclocarban ( $0,1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  e  $6,3 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ) e mistura (triclosan  $2,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  + triclocarban  $6,3 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ) onde (A) 24 horas de exposição; (B) 48 horas de exposição; (C) 72 horas de exposição; (D) 96 horas de exposição. Letras iguais indicam falta de diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ )

O fato do índice de deformidades não ter apresentado diferenças significativas está associado as baixas concentrações utilizadas nesse estudo. Esse resultado está de acordo com MACEDO (2015) que realizou um estudo de com embriões de *Danio rerio* estudando anomalias morfológicas frente ao TCS, em baixas concentrações esse estudo também não verificou índice de deformação estatisticamente diferente do controle, anomalias nos embriões ocorreram apenas em concentrações acima de  $64 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Alguns embriões foram retirados para observação em microscópico óptico e documentação com fotos. Nas imagens (FIGURA 10) é possível verificar alguns dos danos encontrados nos organismos durante o ensaio, dentre eles destacam-se embriões coagulados, má formação cefálica, deformações torácicas, axiais e na cauda. Durante o experimento realizado diversos organismos apresentaram mais de uma anomalia. Quando essas anomalias foram muito severas, como edemas cardíacos e má formação cefálica, os organismos morreram. Contudo alguns que apresentaram danos moderados, como deformações na cauda, tiveram o dano reparado antes do final do ensaio em 96h.

**Figura 10. Anomalias encontradas nos embriões/larvas de *Ramdia quelen* durante o ensaio.**



(a) embrião coagulado; (b) embrião normal; (c) deformação cefálica; (d) deformação torácica; (e) deformação axial; (f) deformação na cauda; (g) embrião com desenvolvimento normal.

Ao categorizar a frequência de organismos que apresentaram cada tipo de anomalia observada durante o período de exposição (TABELA 2), é possível notar que não houve diferença significativa entre os grupos para os danos axiais, cefálicos e torácicos. Com relação aos danos nas nadadeiras, os organismos expostos ao TCS 2,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  apresentaram uma frequência maior significativa de incidência de danos desse tipo.

**Tabela 2 - Porcentagem de embriões de *Rhamdia quelen* que apresentaram danos morfológicos após 96 horas de exposição a triclosan, triclocarban e mistura.**

<b>Amostra</b>	<b>Axial (%)</b>	<b>Cefálica (%)</b>	<b>Tórax/ Abdômen (%)</b>	<b>Nadadeiras (%)</b>
<b>Controle</b>	3,13	1,42	5,97	0,00 <sup>a</sup>
<b>DMSO 0,03%</b>	4,26	0,85	3,98	0,00 <sup>a</sup>
<b>TCS 0,5 <math>\mu\text{g L}^{-1}</math></b>	4,26	5,11	5,97	0,28 <sup>a</sup>
<b>TCS 2,5 <math>\mu\text{g L}^{-1}</math></b>	5,40	6,53	3,98	7,10 <sup>b</sup>
<b>TCC 0,1 <math>\mu\text{g L}^{-1}</math></b>	6,53	6,25	6,53	0,57 <sup>a</sup>
<b>TCC 6,3 <math>\mu\text{g L}^{-1}</math></b>	4,26	3,98	4,26	3,13 <sup>a</sup>
<b>Mistura (TCS 2,5 <math>\mu\text{g L}^{-1}</math> + TCC 6,3 <math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	5,11	3,98	5,97	1,14 <sup>a</sup>

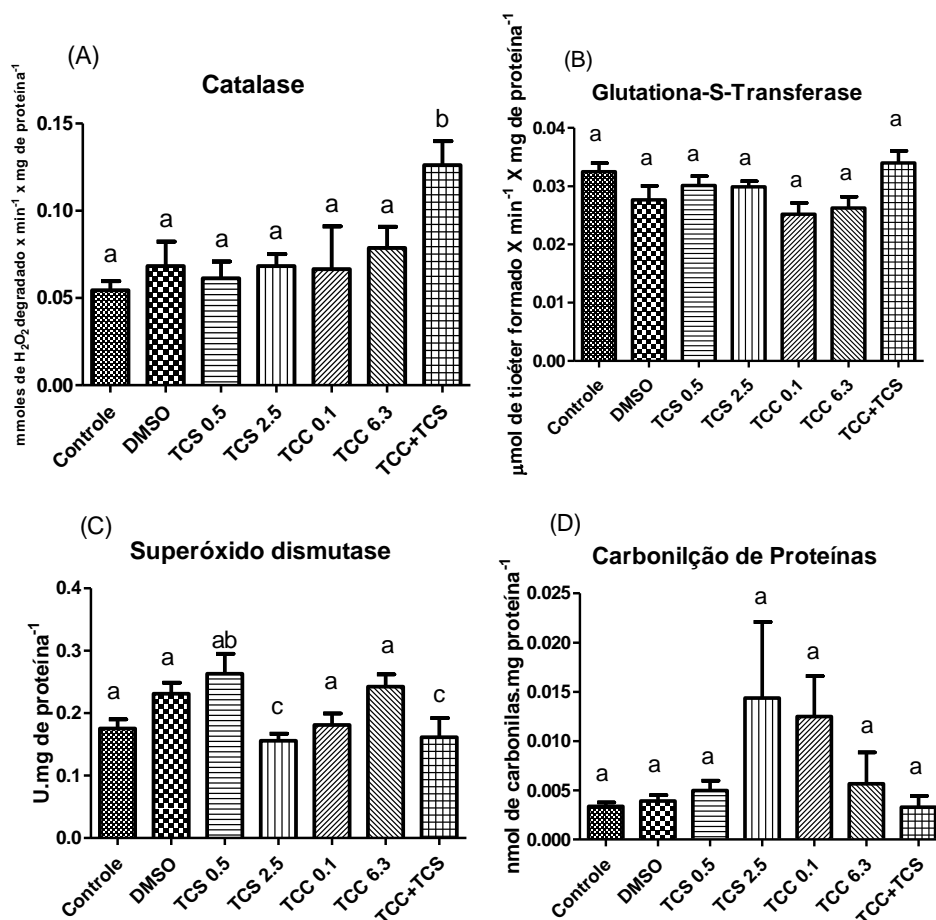
A nadadeira é uma estrutura fundamental para o equilíbrio corporal e o direcionamento na coluna d'água, danos nesse órgão podem comprometer a habilidade de fuga e a capacidade natatória que acontece nos estádios iniciais de desenvolvimento (PINDER, 2004). Dentro do contexto ambiental essa alteração morfológica poderia levar a perda de autonomia na movimentação e aumento da suscetibilidade desses organismos à predação (NAGAMATSU, 2003).

Estudos similares utilizando embriões de *Danio rerio* detectaram alta incidência de edemas cardíacos e má formação na coluna para concentração de 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  de TCS (OLIVEIRA et al., 2009). MACEDO (2015)

também avaliou os efeitos do TCS para embriões/larvas de *D. rerio* e verificou a ocorrência de anomalias relacionadas ao saco vitelínico das larvas para amostras de TCS em elevadas concentrações ( $> 400 \mu\text{g L}^{-1}$ ), contudo em concentrações mais baixas não foram observadas alterações morfológicas significativas. SCHULTZ; BARTELL; SCHOENFUSS (2012) avaliou os efeitos de TCS, TCC e suas misturas em concentrações ambientalmente relevantes para embriões/larvas de *Pimephales promelas* onde encontrou alterações significativas na diminuição do tamanho dos embriões para o TCC, aumento do tamanho corporal para TCS após 12 dias de exposição.

Os biomarcadores bioquímicos relacionados ao estresse oxidativo apresentaram poucas alterações. A enzima catalase (FIGURA 11A) apresentou alterações significativas na amostra exposta a mistura de TCS  $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$  e TCC  $6,3 \mu\text{g L}^{-1}$  enquanto as amostras expostas aos compostos isolados mantiveram sua média próxima ao controle. A atividade da SOD (FIGURA 11C) não apresentou diferença significativa com relação ao controle, contudo, ao comparar com TCS  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$  as amostras TCS  $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$  e de mistura houve uma queda significativa de atividade. A atividade da GST (FIGURA 11B) não foi afetada significativamente nos tratamentos utilizados, contudo, é possível perceber uma leve queda na atividade das amostras expostas ao triclocarban. A quantidade de PCO (FIGURA 11D) também não apresentou diferenças significativas nos tratamentos estudados.

Figura 11. Biomarcadores bioquímicos relacionados ao estresse oxidativo para larvas de *Rhamdia quelen* após 96 horas de exposição.



Controle solvente DMSO 0,03%, triclosan(0,5 µg L<sup>-1</sup> e 2,5 µg L<sup>-1</sup>), triclocarban (0,1 µg L<sup>-1</sup> e 6,3 µg L<sup>-1</sup>) e mistura (triclosan 2,5 µg L<sup>-1</sup> + triclocarban 6,3 µg L<sup>-1</sup>) onde (A) atividade da enzima catalase (CAT); (B) atividade da enzima glutathione-S-transferase (GST) ; (C) atividade da enzima superóxido dismutase (SOD); (D) quantidade de carbonilação de proteínas (PCO). Letras iguais indicam falta de diferença estatística significativa e letras diferentes indicam diferença estatística significativa (p<0,05)

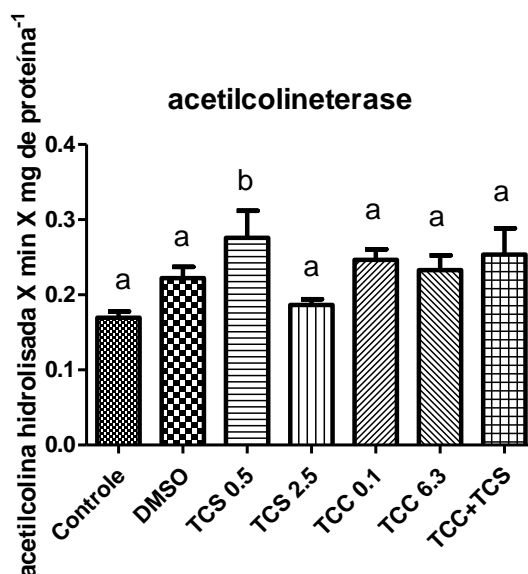
A exposição dos organismos a contaminantes podem gerar espécies reativas de oxigênio, bem como induzir ou inibir a atividade das enzimas ligadas ao estresse oxidativo (SOD, CAT e GST) (PENG et al., 2013) Tanto o triclosan quanto o triclocarban podem afetar a atividade destas enzimas. O aumento significativo da atividade da catalase na mistura sugere que há uma forte resposta do sistema antioxidante para detoxificação dos organismos expostos, o que é reforçado pela baixa quantidade de proteínas carboniladas para esse grupo. A atividade da GST sem alterações significativas em relação ao controle mostra que esse sistema de detoxificação não está totalmente ativo para metabolizar os contaminantes estudados. A atividade da SOD inibida para



o grupo TCS 2,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  juntamente com a tendência de elevada concentração de PCO nesse grupo sugere que esse sistema possivelmente se encontra menos eficiente. Diversos estudos já pontuaram a alteração atividade destas enzimas em diferentes organismos expostos ao TCS e TCC (BARROS et al., 2017; BINELLI et al., 2011; GEIß et al., 2016; HAN et al., 2016; KU et al., 2014; PAN et al., 2018; PENG et al., 2013) Em geral, as alterações enzimáticas ocorrem com aumento significativo das concentrações dos compostos como o aumento da atividade da GST em sapos da espécie *Pelophylax perezi* expostos a 1,4 mg  $\text{L}^{-1}$  de TCS (MARTINS et al., 2017); rotíferos *Brachionus koreanus* expostos a TCC e a TCS a 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  (HAN et al., 2016) e aumento da CAT em *Pelteobagrus fulvidraco* expostos a TCS 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

O último parâmetro avaliado neste estudo foi a atividade da acetilcolinesterase (FIGURA 12) que apresentou um aumento significativo em sua atividade em TCS 0,5  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

**Figura 12 - Atividade da acetilcolinesterase para larvas de *Rhamdia quelen* após 96 horas de exposição.**



Controle solvente DMSO 0,03%, triclosan (0,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 2,5  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), triclocarban (0,1  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 6,3  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e mistura (triclosan 2,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  + triclocarban 6,3  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) Letras iguais indicam falta de diferença estatística significativa e letras diferentes indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,5$ )

Poucos trabalhos relacionam a alterações da atividade da acetilcolinesterase ao TCS e TCC. Contudo um estudo realizado com o molusco *Ruditapes philippinarum* evidenciou queda na atividade na AChE nas concentrações de 0,3  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 0,9  $\mu\text{g L}^{-1}$  de TCS (MATOZZO et al, 2012).

RUSZKIEWICZ et al., 2017 em sua revisão sobre a neurotoxicidade de TCS chamou a atenção para a pequena quantidade de estudos voltada para esses biomarcadores o que impossibilita afirmar se TCS é, de fato, um agente neurotóxico.

Avaliando os três níveis tróficos estudados tanto *D.magna* quanto *R. quelen* apresentaram sensibilidade diferente aos compostos, onde foram encontrados efeitos significativos em biomarcadores que podem alterar sua sobrevivência e equilíbrio populacional. *D. magna* apresentou danos em ensaio multigeracional para a concentração mais alta do composto TCC com relação ao seu tempo de reprodução. É importante ressaltar que esse dano foi encontrado em uma segunda geração, necessitando de estudos mais prolongados para verificar se esse dano pode ser reparado pelo organismo ou poderá ser magnificado em próximas gerações ocasionando problemas mais severos para os organismos. Já *R. quelen* apresentou danos morfológicos em sua estrutura natatória quando exposto a concentração mais alta de TCS, esse tipo de dano pode ocasionar problemas a mais curto prazo e a nível de população, uma vez que ao ter sua capacidade natatória prejudicada, o organismo fica mais suscetível a predação e com maior dificuldade de alimentação, comprometendo sua longevidade. Para biomarcadores precoces de efeito avaliando estresse oxidativo, *D. magna* e *R. quelen* apresentaram sensibilidade semelhante onde as enzimas que tiveram alterações em suas atividades corresponderam aos grupos expostos ao TCS e Mistura evidenciando a atividade do sistema de defesa a oxidação para metabolizar esses compostos. A microalga *D. Subspicaus* não apresentou alterações de crescimento de biomassa, sendo o organismo menos sensível nesse estudo, mesmo tendo estrutura semelhante aos organismos alvo desses compostos. Contudo, não foram analisados biomarcadores mais sensíveis nem gerações prolongadas desse organismo para verificar possíveis impactos a longo prazo. Ao comparar a sensibilidade desses organismos com a literatura, em geral, algas e crustáceos são mais sensíveis ao TCS e TCC (CHALEW; HALDEN, 2009), contudo espécies com níveis tróficos mais elevados, mas em estágios iniciais de vida também podem ser muito sensíveis levando em consideração diversos biomarcadores (CHUNG et al., 2011; CORTEZ et al., 2012; HO et al., 2016; MARTINS et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2009; MACEDO, 2015). Outro mecanismo que pode ocasionar

a toxicidade desses compostos é sua degradação no ambiente uma vez que TCS pode gerar dioxinas e metil-triclosan (Tiburtius e Scheffer, 2014) que são conhecidamente mais tóxicos que TCS e o TCC pode gerar cloroanilinas (Ding *et al.*, 2015) a degradação de ambos compostos podem gerar moléculas cloradas no ambiente tornando o risco ambiental associado a essas moléculas ainda maior.

#### 4- CONCLUSÃO

A presença de TCS e TCC no ambiente é resultado da atividade antropogênica fazendo com que esses compostos sejam constantemente encontrados em baixas concentrações. Nesse trabalho foi possível verificar efeitos significativos do TCS, TCC e misturas em concentrações ambientalmente relevantes para os organismos estudados. Para *D. magna* efeitos multigeracionais foram observados, sendo que houve alterações na quantidade de dias para a primeira prole para TCC na concentração de  $6,3 \mu\text{g L}^{-1}$  e indução da SOD para TCS  $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$  e mistura. Para os embriões/larvas de *R. quelen* foi possível verificar alterações morfológicas nas nadadeiras para o TCC  $6,3 \mu\text{g L}^{-1}$  e alterações nos biomarcadores bioquímicos SOD (TCS  $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$  e Mistura) e AchE (TCS  $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ). No estudo da mistura o único biomarcador que apresentou alterações diferentes das encontradas nos compostos isolados foi a catalase, que apresentou elevação da sua atividade quando comparado com os grupos dos compostos isolados. Os efeitos observados evidenciam possíveis danos para esses organismos em períodos de exposição mais longos e contínuos, colocando em risco o equilíbrio dessas populações. Os efeitos mais agressivos se encontram na alteração do desenvolvimento da nadadeira de *R. quelen*, que dificulta seus movimentos natatórios o tornando mais suscetível a predação. E o atraso para reprodução de *D. magna* após uma geração que pode, ao longo do tempo, interferir no equilíbrio populacional. A presença de alterações enzimáticas significativas também evidencia interferência desses compostos nos organismos em um nível anterior ao possível dano. Existem na literatura diversas evidências de que esses compostos possuam uma série de efeitos tóxicos aos organismos expostos a eles, assim como os dados apresentados neste estudo.

Contudo, em concentrações ambientais, ainda são necessários estudos mais aprofundados para a melhor avaliação do risco ecológico destes compostos.

## CAPITULO II – TOXICIDADE DE MISTURAS DO TRICLOSAN E TRICLOCARBAN USANDO A FERRAMENTA MIXTOX

### 1- INTRODUÇÃO

A atividade antropogênica resulta em uma diversidade de compostos lançados no meio ambiente sendo a descarga de efluentes industriais e urbanos um dos principais meios de poluição dos corpos hídricos. O despejo desses efluentes resulta na inserção de misturas complexas de contaminantes que podem ocorrer em diversas concentrações.

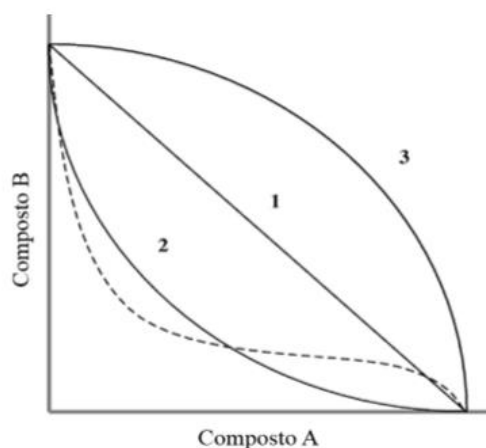
TCS e TCC são dois agentes antimicrobianos comumente encontrados em produtos de higiene pessoal presentes em diversas matrizes ambientais e principalmente na água (SCHULTZ; BARTELL e SCHOENFUSS, 2012). Estudos tem demonstrado que o TCS em diferentes concentrações é tóxico para diversos organismos aquáticos (HAN et al., 2016; HERRERO et al., 2012; KU et al., 2014; MARTINS et al., 2017; PUSCEDDU, 2009), sendo algas e crustáceos os grupos mais sensíveis (FRANZ et al., 2008; ORVOS et al., 2002; VINGSKES E SPANN, 2018). O TCC possui menos dados na literatura, contudo, sua toxicidade já foi comprovada para diversos organismos aquáticos sendo em alguns casos mais tóxico que TCC (BARROS et al., 2017; CHALEW e HALDEN, 2009; HAN et al., 2016; SATYRO et al., 2017; XU et al., 2015). TCS e TCC são normalmente combinados em formulações de diversos produtos, além de possuírem emprego industrial, rotas de transferência e comportamento no meio ambiente semelhantes (HALDEN; PAULL, 2005). O estudo da toxicidade da mistura binária dentro de modelos matemáticos desses compostos ainda não é explorado e a maior parte dos mecanismos de ação nos organismos continua desconhecido.

Modelos matemáticos podem descrever as interações dos contaminantes a partir do modo de ação (MoA) e da avaliação da toxicidade dos compostos isolados (PÉREZ et al., 2011). Os modelos de referência mais utilizados para descrever o comportamento de misturas são o modelo de Adição de Concentração (CA), baseado no conceito de que os químicos possuem o mesmo MoA e o modelo de Ação Independente (IA), em que MoA dos químicos são diferentes (BLISS, 1939). Além dos modelos de referência, desvios de

comportamento ainda podem ocorrer, sendo eles sinergismo (efeito mais tóxico do que as toxicidades dos compostos isolados) ou antagonismo (efeito tóxico abaixo da toxicidade dos compostos isolados). E ainda interações com desvios de nível dependente (DL) quando o efeito em baixas concentrações é diferente dos efeitos com relação às altas concentrações na mistura; e os desvios de razão das doses (DR) que descreve o efeito que depende da proporção dos compostos na mistura, onde um dos contaminantes é o principal responsável pelo desvio (JONKER et al., 2005; PÉREZ et al., 2011).

A avaliação dos efeitos da mistura de compostos não é algo simples. Para avaliar esses desvios de respostas que ocorrem nos modelos tradicionais de concentração de adição e adição independente o modelo MIXTOX (JONKER et al., 2005) foi desenvolvido. A partir dos dados obtidos nessa ferramenta é possível criar um gráfico isobole, através dos dados gerados pelo modelo matemático mais adequado. Esse gráfico (FIGURA 1) ilustra o comportamento dessas misturas de acordo com a dose estudada de ambos compostos. De modo geral, isoboles linear, côncava e convexa representam não interação, sinergismo e antagonismo, respectivamente (Ryall; Tan, 2015).

**Figura 1 - Exemplo de curvatura das isoboles que podem ocorrer nos modelos de toxicidade de mistura de compostos**



Onde curvas lineares indicam a não interação dos compostos, linhas côncavas indicam sinergismos e linhas convexas representam antagonismo

Fonte: Ryall; Tan, 2015

A utilização desses modelos se mostra interessante na avaliação do risco de compostos como TCC e TCC, principalmente para ensaios bem

estabelecidos como o ensaio agudo com *D. magna*, que possui respostas rápidas e sensíveis aos compostos estudados. Dentro desse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o padrão de interação entre TCS e TCC em misturas usando o modelo MIXTOX em ensaios agudos com *Daphnia magna* para definir o modelo de interação que mais se encaixa para esses compostos.

## 2- MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.3 Cultivo de *Daphnia magna*

O cultivo de *Daphnia magna* para a realização dos ensaios de ecotoxicidade aguda foi realizado de acordo com a norma NBR 12713/2016 (ABNT, 2016), no laboratório de Ecotoxicologia/DAQBI/UTFPR.

Os organismos adultos foram mantidos em incubadora tipo BOD com controle de temperatura ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e fotoperíodo (16 horas de claridade e 8 horas escuro) dentro de béqueres de 2000 mL com 50 organismos por recipiente em água de cultivo previamente preparada e aerada durante pelo menos 24 horas. A manutenção do cultivo é feita através da retirada de filhotes e a troca da água de cultivo. Como alimentação para *D. magna* é utilizada microalga *Desmodesmus subspicatus*, cultivada conforme metodologia descrita na NBR 12648/2018 (ABNT, 2018).

#### 2.3.2 Teste de ecotoxicidade aguda com *Daphnia magna*

Os ensaios de ecotoxicidade aguda foram realizados de acordo com metodologia descrita na NBR 12713/2016. No ensaio, 10 organismos neonatos (2-26 h), obtidos de fêmeas com idade entre 10 e 60 dias, foram expostos em béqueres de 50 mL contendo 20 mL de amostra, em triplicata para cada concentração e os organismos expostos pelo período de 48h (temperatura  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) ao abrigo de luz. Após o tempo de exposição foi quantificado o número organismos imóveis presentes em cada réplica.

#### 2.3.3 Cálculo da concentração efetiva a 50% dos organismos ( $CE_{50}$ )

Ensaio preliminares foram realizados com a finalidade de encontrar a melhor faixa de concentração para determinar a concentração efetiva a 50% dos organismos -  $CE_{50}$  de TCS ( $50 \mu\text{g L}^{-1}$  –  $500 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e TCC ( $1 \mu\text{g L}^{-1}$  –  $45 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Ambas as soluções-teste foram preparadas a partir de uma solução mãe de  $400 \text{ mg L}^{-1}$  dissolvida em DMSO. Todos os ensaios foram realizados com controle negativo e controle DMSO 0,03%. Com os resultados obtidos no ensaio preliminar, um novo ensaio foi realizado para o cálculo definitivo da  $CE_{50}$  utilizando os valores apresentados na tabela 1.

**Quadro 1. Concentrações de TCS e TCC utilizadas para realização do ensaio agudo e determinação da  $CE_{50}$ .**

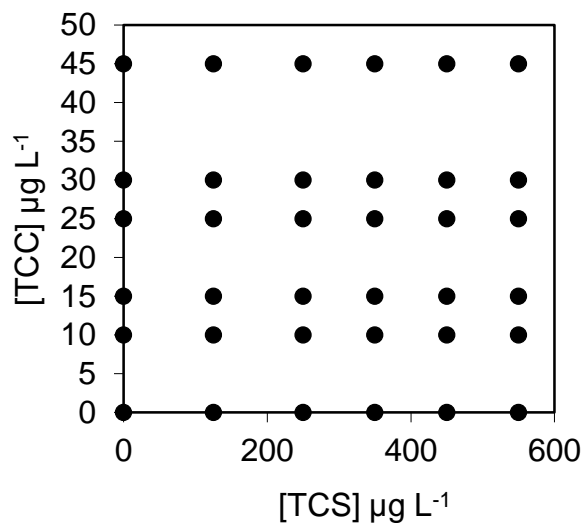
TCS ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	TCC ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
125	10
250	15
350	25
450	30
550	45

#### 2.3.4 Ensaio agudos para exposição de mistura

O ensaio agudo para exposição dos organismos às misturas foi realizado de acordo metodologia descrita no item 2.1.2 deste capítulo. O desenho experimental foi baseado na  $CE_{50}$  dos compostos isolados obedecendo o modelo fatorial completo (FIGURA 2).



**Figura 2 - Gráfico do modelo fatorial completo de combinação das concentrações utilizadas para realizar ensaios de curto prazo de misturas,**



Onde os eixos representam as concentrações em  $\mu\text{g L}^{-1}$  utilizadas para determinação da  $\text{CE}_{50}$  e os pontos representam a combinação dessas concentrações.

Para evitar desvios relacionados a sensibilidade dos organismos os ensaios para determinação da  $\text{CE}_{50}$  foram realizados em conjunto com a exposição das misturas.

### 2.3.5 Análise Estatística

Para realizar o cálculo de  $\text{CE}_{50}$  e obter os valores de coeficiente angular ( $\beta$ ) foi utilizada curva logística de três parâmetros. Para comparação,  $\text{CE}_{50}$  também foi comparada com o método de probitos através dos softwares Sigmaplot 12<sup>®</sup> e BioStat 5<sup>®</sup>.

Os gráficos sigmoidais para os compostos isolados foram realizados através do software estatístico Graphpad<sup>®</sup> e o isoblograma da resposta de toxicidade dos compostos foi realizada através do software Sigmaplot<sup>®</sup>.

### 2.3.6 Utilização da ferramenta MIXTOX

Os dados da exposição da mistura, assim como os dados de toxicidade das substâncias separadas e os valores referentes a curva de dose

resposta e  $CE_{50}$  foram colocados na planilha MIXTOX (JONKER et al., 2005) verificando os efeitos tanto para os modelos CA e IA. Também foram avaliados os desvios dentro desses modelos para sinergismo/antagonismo, DR e DL. Para os desvios são calculados dois parâmetros (“a” e “b”), o parâmetro “a” se torna negativo ou positivo em desvios de sinergismo e antagonismo, o parâmetro “b” é adicionado para avaliar os desvios de dependência das doses isoladas e razão das doses. Os detalhes desses parâmetros estão descritos no quadro 1.

**Quadro 2 - Descrição dos parâmetros “a” e “b” adicionados nos cálculos de desvios de comportamento das misturas S/A, DR e DL dos modelos de referência CA e IA**

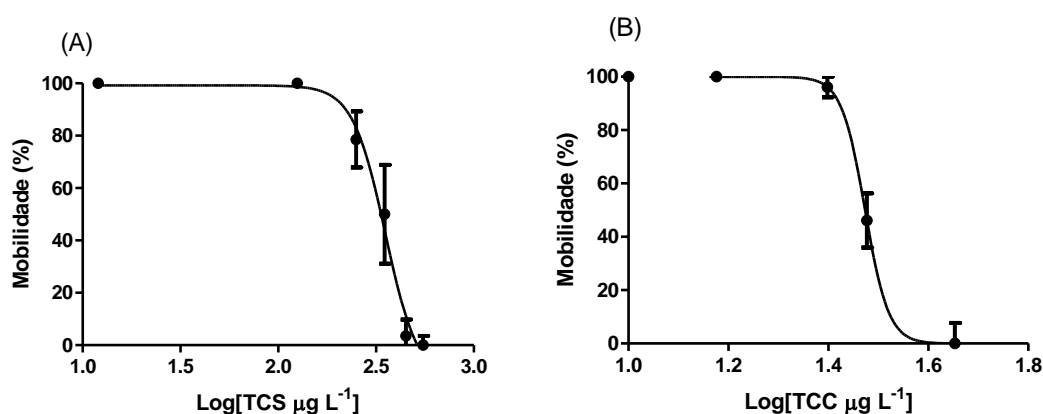
<b>Desvio</b>	<b>Parâmetro “a”</b>	<b>Parâmetro “b”</b>
Sinergismo/Antagonismo (S/A)	a > 0 – antagonismo a < 0 - sinergismo	
Dependência da razão das doses (DR)	a > 0 – antagonismo, exceto para aqueles valores que “b” indica sinergismo a < 0 – sinergismo, exceto para aqueles valores que “b” indica antagonismo	$b_i > 0$ – antagonismo onde a toxicidade da mistura é causada, majoritariamente, pelo agente i $b_i < 0$ – sinergismo onde a toxicidade da mistura é causada, majoritariamente, pelo agente i
Dependência das doses isoladas (DL)	a > 0 – baixas doses indicam antagonismo e altas doses indicam sinergismo a < 0 – baixas doses indicam sinergismo e altas doses indicam antagonismo	$b_{DL} > 2$ mudança do nível de dose abaixo da $CE_{50}$ $b_{DL} = 2$ mudança na $CE_{50}$ $1 < b_{DL} < 2$ mudança do nível de dose maior que $CE_{50}$ $b_{DL} < 1$ sem mudança, mas a magnitude de S/A é dependente do nível do efeito.

A escolha do melhor modelo de referência Concentração de Adição (CA) ou Adição independente (IA) e seus desvios de sinergismo/antagonismo (S/A), nível dependente (DL) e razão das doses (DR) foi dada através da análise de verossimilhança e dispersão dos resíduos, fornecidos pela ferramenta MIXTOX.

### 3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos dados de imobilidade obtidos da exposição dos neonatos de *D. magna* ao TCS e TCC foi possível obter a curva sigmoide de dose-resposta desses compostos (FIGURA 3).

Figura 3 – Gráficos sigmoides de dose-respostas da mobilidade dos neonatos de *D. magna* expostos por 48h para os compostos (A) TCS e (B) TCC onde as concentrações estão na forma de Log [concentração] em  $\mu\text{g L}^{-1}$



O teste de imobilização das substâncias isoladas permitiu o cálculo da  $CE_{50}$  e o coeficiente angular da curva para utilização desses valores na planilha MIXTOX. TCS apresentou  $CE_{50(48h)} = 348,67 \mu\text{g L}^{-1} \pm 23,10 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $\beta = 6,25$ ,  $r^2 = 0,8678$  e TCC  $CE_{50(48h)} = 30,2815 \mu\text{g L}^{-1} \pm 0,5439 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $\beta = 14,86$ ,  $r^2 = 0,9293$ . Analisando os valores de  $CE_{50}$  TCC apresentou toxicidade aproximadamente 11 vezes mais elevada que TCS. Estudos anteriores mostram que as concentrações efetivas obtidas nesse estudo estão de acordo com o que está descrito na literatura. Estudos de toxicidade aguda com *D. magna* para TCS demonstraram valores de  $CE_{50(48h)}$  iguais a  $390 \mu\text{g L}^{-1}$  (ORVOS et al., 2002),  $330 \mu\text{g L}^{-1}$  (PENG et al., 2013) e  $180 \mu\text{g L}^{-1}$  (TAMURA et al., 2013) e para TCC  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $40 \mu\text{g L}^{-1}$  (CONSORTIUM, 2002).

Para avaliar qual modelo descreve melhor os dados de toxicidade da mistura de TCS e TCC tanto os modelos de CA quanto de IA foram aplicados e os desvios dentro dos modelos de referência avaliados. A tabela 2 resume os resultados obtidos nos modelos de referência CA e IA com os desvios de S/A DL e DR aplicados através da ferramenta MIXTOX.

**Tabela 1. Descrição dos resultados estatísticos obtidos dos modelos de referência CA e IA e seus respectivos desvios S/A, DR e DL**

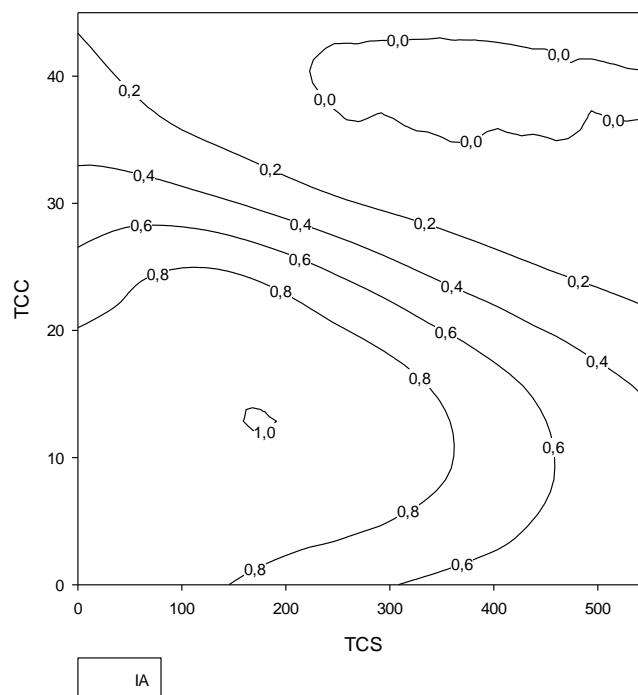
	CONCENTRAÇÃO DE ADIÇÃO				AÇÃO INDEPENDENTE			
	CA	S/A	DR	DL	IA	S/A	DR	DL
<b>Max</b>	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98
<b><math>\beta_{TCS}</math></b>	2,28	4,15	6,02	4,77	3,40	3,36	5,32	1,32
<b><math>\beta_{TCC}</math></b>	9,40	13,74	8,56	166,19	6,87	6,89	1757,3	3,75
<b>CE<sub>50</sub> TCS</b>	652,15	441,53	385,46	459,99	425,06	410,38	366,51	419,96
<b>CE<sub>50</sub> TCC</b>	34,97	29,74	32,06	30,03	28,23	27,69	30,02	29,58
<b>a</b>	-	1,62	-0,33	-0,09	-	0,49	-17,24	14,48
<b>b<sub>DR/DL</sub></b>	-	-	4,01	12,05	-	-	29,37	1,61
<b>SS</b>	238,75	167,55	125,05	198,18	200,70	199,84	-	153,63
<b>r<sup>2</sup></b>	0,71	0,79	0,85	0,76	0,75	0,76	-	0,81
<b><math>\chi^2</math> ou teste F</b>	581,53	71,20	113,25	40,57	619,57	0,86	-	46,21
<b>Df</b>	-	1	1	1	-	1	1	1
<b>p (<math>\chi^2/F</math>)</b>	1,54E-124	3,20E-17	8,90E-11	-	-	0,35	-	1,06E-11

Max é o valor máximo de resposta;  $\beta$  é a inclinação da curva de resposta da dose individual; CE50 é a concentração letal mediana; a, b<sub>DR</sub> e b<sub>DL</sub> são parâmetros da função; SS é a soma de resíduos quadrados; r<sup>2</sup> é o coeficiente de regressão; o teste de  $\chi^2$  ou de F é a estatística do teste; df é o grau de liberdade; e p ( $\chi^2/F$ ) é o nível de significância da estatística de teste. IA é modelo de ação independente, S/A é o desvio do sinergismo ou antagonismo, DR é o desvio dependente da proporção da dose e DL é o desvio dependente do nível da dose.

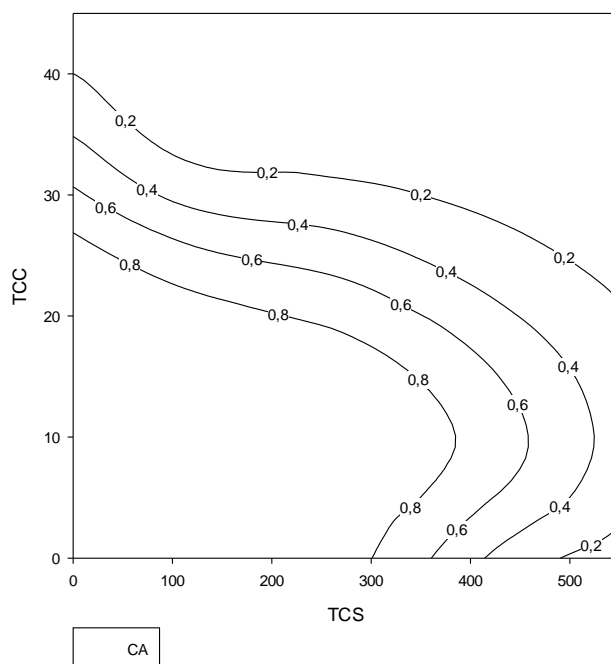
Avaliando os dados obtidos na tabela 1 é possível perceber que com relação ao modelo de referência, o modelo que obteve o melhor ajuste foi IA ( $SS=200,70$ ;  $r^2=0,75$ ) e dentro desse modelo o desvio que explica melhor os dados é DL ( $SS=153,63$ ;  $r^2=0,81$ ), contudo esse modelo apresentou divergências de cálculos com os dados apresentados tornando o uso desse modelo duvidoso. Ao plotar o isoblograma para IA com desvio de DL (FIGURA 4) é possível perceber antagonismo dos compostos.

Para o modelo CA os dados apresentaram respostas para todos os desvios, contudo com ajuste um pouco menor que em IA. Dentro de CA ( $SS=238,75$ ;  $r^2=0,71$ ;  $p<0,5$ ) o desvio que apresentou melhor ajuste foi DR ( $SS=125,50$ ;  $r^2=0,85$ ;  $p<0,5$ ) tendo comportamento de antagonismo uma vez que  $a>0$ . O isoblograma referente ao modelo CA (FIGURA 5) descreve o comportamento das misturas de acordo com a concentração. As curvas apresentadas na isobola tem como característica principal a presença de curvas convexas que indica mais uma vez o antagonismo da mistura.

**Figura 4 - Gráfico isobole dos efeitos das misturas de sinergismo e antagonismo de acordo com a dose de acordo com o modelo de referência IA e desvios de DL, onde a presença de curva convexas indica antagonismo e curvas côncavas indicam o sinergismo da mistura de acordo com as doses estudadas.**



**Figura 5 - Gráfico isobole dos efeitos das misturas de sinergismo e antagonismo de acordo com a dose de acordo com o modelo de referência CA e desvios de DR, onde a presença de curva convexas indica antagonismo da mistura de acordo com as doses estudadas.**



O ajuste do modelo em CA tem mais sentido, uma vez que ambos compostos têm mecanismos de ação semelhante nos organismos alvo. TCS e TCC atuam na inibição da síntese de ácidos graxos impedindo as bactérias de produzirem membrana celular. (MCMURRY et al., 1998; LEVY et al., 1999). A ocorrência de antagonismo na interação dessas moléculas pode estar associada a competição de ambos compostos pelo mesmo sítio ativo de atuação nas células.

Estudos de interação de TCS e TCC utilizando ferramentas de modelagem para prever os efeitos desses compostos são pouco encontrados na literatura. TAMURA et al., (2013) avaliou os efeitos agudos e crônicos de TCS e TCC para *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Ceriodaphnia dubia*, *Daphnia magna* e *Danio rerio* e realizou a avaliação de risco ecológico para esses compostos tendo risco significativo com efeitos de 2 a 5 vezes mais tóxicos do que parabenos avaliados no mesmo estudo, alertando que ensaios mais significativos devem ser realizados com relação a mistura desses compostos uma vez que eles são comumente usados em conjunto e possuem mecanismos de ação

similares podendo ter risco ecológico mais significativo em comparação a suas ações isoladas. Em estudo mais recente, VINGSKES e SPANN (2018) avaliaram os efeitos de TCS, TCC e misturas na reprodução e crescimento do organismo *C. elegans* utilizando os modelos de referência e comparando com os efeitos previstos pelo modelo CA. Nesse estudo foi concluído que as misturas apresentaram efeitos menos tóxicos do que previa o modelo sendo a mistura desses compostos antagônica. Esses resultados estão de acordo com o que foi observado no presente estudo, mesmo com biomarcadores diferentes utilizados a mistura de TCS e TCC mostrou antagonismo frente a toxicidade de seus compostos isolados, esse efeito é difícil de explicar uma vez que os compostos possuem estrutura similar e efeitos fisiológicos parecidos (TAMURA et al., 2013)

Outros estudos de mistura binárias para o TCS em combinação com outros compostos foram realizadas. SILVA et al., 2015 realizou um estudo com TCS e carbendazina utilizando *Daphnia magna* avaliando parâmetros como imobilidade (48h), reprodução (21 dias) e alimentação. Para os parâmetros de imobilidade e reprodução as misturas se mostraram antagônicas, enquanto para o parâmetro de alimentação ocorreu majoritariamente sinergismo, sendo que todos os parâmetros se encaixaram no modelo de referência IA, uma vez que os compostos não possuem mecanismos similares de ação. Já no estudo realizado por DELORENZO e FLEMING (2008) utilizando misturas de TCS e Fluoxetina para a alga *Dunaliella tertiolecta* onde o modelo de interação mais adequado foi CA obtendo como resposta sinergismo desses compostos.

#### **4- CONCLUSÃO**

Os mecanismos de ação em sistemas biológicos do triclosan e triclocarban ainda não são completamente elucidados e seus efeitos em níveis ecológicos ainda estão em processo de estudo. Ambos compostos estão presentes no dia-a-dia da população através da utilização de diversos produtos de higiene pessoal, fármacos entre outros produtos sendo o triclosan um dos compostos mais frequentemente detectados em matrizes ambientais. Para avaliar e tentar prever com mais clareza os efeitos desses compostos em conjunto no ambiente, as avaliações das misturas usando ensaios agudos em modelos de referência como o CA e IA se tornam ferramentas interessantes para

avaliar os riscos ambientais desses compostos. Com o presente estudo de misturas de TCS e TCC foi possível verificar que, em conjunto, esses compostos possuem ação antagônica, ao contrário do que alertavam alguns estudos e seu modelo de toxicidade se adequa ao modelo de referência de adição de concentração com desvios de dependência da razão das doses. O encaixe no modelo de concentração de adição e antagonismo da mistura dessas moléculas pode estar relacionada a estrutura e ação similar desses compostos fazendo com que eles ajam independentemente e possivelmente competindo pelo mesmo sítio de ação. Além da identificação do modo de ação desses compostos, foi possível observar que a utilização do organismo padrão *D. magna* traz respostas rápidas e confiáveis na avaliação da toxicidade de misturas.

Esses dados, aliados com outros dados da literatura contribuem para o melhor entendimento dos possíveis efeitos desses compostos a fim de adequar a sua utilização e presença no meio ambiente.



#### 4. CONCLUSÃO GERAL

A presença do triclosan e triclocarban no ambiente é notória, estes compostos são frequentemente detectados em estudos de quantificação de contaminantes em matrizes ambientais, principalmente água e sedimentos. Diversos estudos comprovam a toxicidade desses compostos nos mais diversos marcadores biológicos (estresse oxidativo, morfológico, comportamental, reprodutivo, endócrino, etc.). A maioria dos estudos presentes avalia concentrações elevadas desses compostos, contudo já é possível encontrar efeitos em concentrações ambientalmente relevantes utilizando biomarcadores mais sensíveis.

Para os estudos utilizando concentrações ambientalmente relevantes de TCS e TCC os diferentes níveis tróficos estudados apresentaram sensibilidades diferentes. *D. subspicatus*, foi o organismo que não apresentou nenhum efeito para as concentrações estudadas, mesmo sendo um organismo suscetível ao mecanismo de ação de ambos compostos. *D. magna* apresentou efeitos de reprodução e em biomarcadores bioquímicos de estresse oxidativo. A utilização do ensaio multigeracional permitiu avaliar os efeitos desses compostos em baixas concentrações sendo um ensaio com maior relevância na avaliação de efeitos que podem ocorrer no ambiente. Para este organismo os principais efeitos foram o retardamento da primeira geração de filhotes para a geração filha estudada pelo composto TCC  $6,3 \mu\text{g L}^{-1}$ . Com relação ao estresse oxidativo a enzima SOD apresentou alterações significativas em sua atividade para TCS e Mistura. O estudo com embriões de *R. quelen* também apresentou boa sensibilidade aos compostos estudados sendo que efeitos morfológicos foram encontrados. Este organismo apresentou danos significativos nas nadadeiras quando exposto ao TCS  $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ , além de apresentar efeitos para os biomarcadores enzimáticos. As enzimas CAT e SOD apresentaram alterações quando expostas a mistura dos compostos, SOD também apresentou alterações quando os organismos foram expostos a TCS  $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ . A atividade da AchE também foi alterada para os organismos expostos a TCS  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ . Os efeitos observados para esses organismos de diferentes níveis tróficos levam a concluir que mesmo em concentrações baixas, como as ambientais, esses compostos podem apresentar riscos ao equilíbrio do ecossistema. Além da presença desses

compostos afetarem os organismos, as misturas também devem ser levadas em consideração. Nesse estudo o resultado mais expressivo para os organismos expostos a mistura foi a alteração da atividade da catalase para *D. magna*, evidenciando a interferência desses compostos no organismo e ativando o sistema de antioxidante do organismo.

Em um segundo momento desse trabalho também foi avaliada a interação do TCS e TCC em misturas binárias. Neste estudo o organismo *D. magna* se mostrou sensível aos compostos estudados tornando possível verificar os mecanismos de interação entre TCS e TCC. A ferramenta MIXTOX foi eficiente para avaliar o melhor modelo de interação entre os compostos. Através dos resultados obtidos e a ferramenta MIXTOX foi possível verificar que o modelo de referência que mais se encaixa para esses compostos é o modelo de ação independente, uma vez que essas substâncias possuem estrutura e ação similares. Foi possível avaliar também que houve desvio do modelo de referência sendo o desvio de razão das doses o mais apropriado para explicar as interações entre TCS e TCC. Com esses resultados foi possível verificar matematicamente e graficamente que esses compostos interagem de forma antagônica.

Os dados obtidos nesse trabalho, como um todo, permitem avaliar melhor os possíveis riscos ecológicos da presença de TCS e TCC no meio ambiente, permitindo somar esses resultados a literatura já existente e avaliar os impactos desses compostos nos organismos.

## REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Method Enzymol.**, v. 105, n. 2, p. 121-126, 1984.
- ANH, K. C. et al. In Vitro Biologic Activities of the Antimicrobials Triclocarban, Its Analogs, and Triclosan in Bioassay Screens: Receptor-Based Bioassay Screens. **Environmental Health Perspectives**. Davis, Califórnia, v. 119, n.9, p. 1203-1210.2008.
- ALVES, A. C; SILVANO, J. Avaliação da sensibilidade de *Daphnia magna* Straus, 1820 (Cladocera, Crustácea) ao dicromato de potássio, **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, vol. 65, p. 59-61, 2006.
- ANDR, L. C. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais Biomarkers for evaluating exposure. v. 6, p. 158–170, 2003.
- ARANAMI, K.; READMAN, J. W. Photolytic degradation of triclosan in freshwater and seawater. **Chemosphere**, v. 66, n. 6, p. 1052–1056, 2007.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12713: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia spp* (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, 2016.
- AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. M. As bases toxicológicas da Ecotoxicologia. Cap. 3, p.100. 1, ed. São Paulo: **RiMa**, 2003. São Paulo: Intertox, 2003
- BACKHAUS, T.; FAUST, M. Hazard and Risk Assessment of Chemical Mixtures under REACH Hazard and Risk Assessment of Chemical Mixtures under REACH State of the Art , Gaps and Options for Improvement. **Swedish Chemicals Agency**, p. 581, 2010.
- BACKHAUS, T.; SCHOLZE, M.; GRIMME, L. H. The single substance and mixture toxicity of quinolones to the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri*. **Aquatic Toxicology**, v. 49, n. 1–2, p. 49–61, 2000.
- BARRERA, E. A. L. Avaliação dos efeitos da exposição de nanopartículas de prata em larvas de *Rhamdia quelen* e da coexposição com Benzo(a)pireno em indivíduos adultos. Tese de Doutorado. **Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação**. Univerisdade Federal do Paraná. 160.p, 2013.
- BARROS, S. et al. Chronic effects of triclocarban in the amphipod *Gammarus locusta*: Behavioural and biochemical impairment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 135, n. September 2016, p. 276–283, 2017.
- BHARGAVA, H. N.; LEONARD, P. A. Triclosan: Applications and safety. **American Journal of Infection Control**, v. 24, n. 3, p. 209–218, 1996.

BINELLI, A. et al. Antioxidant activity in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in response to triclosan exposure. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 217, n. 1–4, p. 421–430, 2011.

BLISS, C. I. The Toxicity of Poisons Applied Jointly. **Annals of Applied Biology**, v. 26, n. 3, p. 585–615, 1939.

BRASIL. Resolução RDC nº 79, de 28 de agosto de 2000. v. 2000, p. 1–73, 2000.

BRAUSCH, J. M.; RAND, G. M. A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity. **Chemosphere**, v. 82, n. 11, p. 1518–1532, 2011.

CHALEW, T. E. A.; HALDEN, R. U. Environmental exposure of aquatic and terrestrial biota to triclosan and triclocarban. **Journal of the American Water Resources Association**, 2009a.

CHEN, J. et al. Triclocarban enhances testosterone action: A new type of endocrine disruptor? **Endocrinology**, 2008.

CHUNG, E. et al. Effects of bisphenol A and triclocarban on brain-specific expression of aromatase in early zebrafish embryos. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 43, p. 17732–17737, 2011.

COOGAN, M. A. et al. Algal bioaccumulation of triclocarban, triclosan, and methyl-triclosan in a North Texas wastewater treatment plant receiving stream. **Chemosphere**, v. 67, n. 10, p. 1911–1918, 2007.

CONNEL, D. Introduction to ecotoxicology. **Blackwell Publishing**. 1999

CONSORTIUM.. High production volume (HPV) chemical challenge program data availability and screening level assessment for triclocarban CAS 101-20-2. U.S. **Environmental Protection Agency**, Washington, DC, 2002

CORNELIS A.M. et al. (eds). Mixture toxicity: linking approaches from ecological and human toxicology. New York: **SETAC Books**. p. 302, 2011

CORTEZ, F. S. et al. Biological effects of environmentally relevant concentrations of the pharmaceutical Triclosan in the marine mussel *Perna perna* (Linnaeus, 1758). **Environmental Pollution**, v. 168, p. 145–150, 2012

DELORENZO, M.E., FLEMING, J., Individual and mixture effects of selected pharmaceuticals and personal care products on the marine phytoplankton species *Dunaliella tertiolecta*. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** v 54, p. 203–210, 2008.

DER OOST, R. V.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 57-149, 2003

DIETRICH, S. et al. Single and combined toxicity of pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations in *Daphnia magna* - A multigenerational study. **Chemosphere**, v. 79, n. 1, p. 60–66, 2010.

DING, S. L. et al. Photodegradation of the antimicrobial triclocarban in aqueous systems under ultraviolet radiation. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 5, p. 3195–3201, 2013.

\_\_\_\_\_. Influence of pH, inorganic anions, and dissolved organic matter on the photolysis of antimicrobial triclocarban in aqueous systems under simulated sunlight irradiation. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 7, p. 5204–5211, 2015.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88–95, 1961.

FAUST, M. et al. Predicting the joint algal toxicity of multi-component. **Aquatic Toxicology**, v. 56, p. 13–32, 2001.

FORAN, C.M.; BENNETT, E.R.; BENSON, W.H. Developmental evaluation of a potential non-steroidal estrogen: triclosan. **Mar. Environ. Res.** 50, 153–156, 2000

FRANZ, S. et al. What contributes to the sensitivity of microalgae to triclosan? **Aquatic Toxicology**, v. 90, n. 2, p. 102–108, 2008.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 114–120, 1984.

GAO, L. et al. Effects of triclosan and triclocarban on the growth inhibition, cell viability, genotoxicity and multixenobiotic resistance responses of *Tetrahymena thermophila*. **Chemosphere**, v. 139, p. 434–440, 2015

GEISS, C. *et al.* The antimicrobial agents triclocarban and triclosan as potent modulators of reproduction in *Potamopyrgus antipodarum* (Mollusca: Hydrobiidae). **Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, v. 51, n. 13, p. 1173–1179, 2016.

GONZÁLEZ-PÉREZ, B. K. et al. Multigenerational effects of triclosan on the demography of *Platyonus patulus* and *Brachionus havanaensis* (ROTIFERA). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 147, p. 275–282, 2018.

GUILHERMINO, L. et al. Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with juvenile *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v. 32, n. 4, p. 727–738, 1996.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of biological chemistry**, v. 249, n. 8, p. 7130–7139, 1974.

HALDEN, R. U. On the Need and Speed of Regulating Triclosan and Triclocarban in the United States. 2015.

HALDEN, R. U.; PAULL, D. H. Co-occurrence of triclocarban and triclosan in U.S. water resources. **Environmental Science and Technology**, v. 39, n. 6, p. 1420–1426, 2005.

HAN, J. et al. Triclosan (TCS) and Triclocarban (TCC) cause lifespan reduction and reproductive impairment through oxidative stress-mediated expression of the defensome in the monogonont rotifer (*Brachionus koreanus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**. v. 185, p. 131-137, 2016.

HEWLETT, P.; PLACKETT, R. A unified theory for quantal responses to mixtures of drugs: non-interactive action. **Biometrics**, v.15, n.4, p. 591–610, 1959

HERRERO, O. *et al.* Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 743, n. 1–2, p. 20–24, 2012.

HIGGINS, C. P. *et al.* Bioaccumulation of triclocarban in *Lumbriculus variegatus*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 2009.

HO, J. C. H. *et al.* Triclosan (TCS) exposure impairs lipid metabolism in zebrafish embryos. **Aquatic Toxicology**, v. 173, p. 29–35, 2016.

INABA, K. et al. Formation of bromo-substituted triclosan during chlorination by chlorine in the presence of trace levels of bromide. **Water Research**, v. 40, n. 15, p. 2931–2937, 2006.

JONKER, M. J. *et al.* Significance Testing of Synergistic/Antagonistic, Dose Level–Dependent, or Dose Ratio–Dependent Effects in Mixture Dose–Response Analysis. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 10, p. 2701, 2005.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações. Florianópolis, SC; **FATMA**, 288 p., 2004

KOERICH, P. Contaminantes emergentes no Rio Lontra (Salto do Lontra-PR) - Trabalho de Conclusão de Curso- Universidade Federal da Fronteira do Sul, 64 p. 2015.

- KOLPIN, D. W. et al. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance. **Environmental Science and Technology**, v. 36, n. 6, p. 1202–1211, 2002.
- KOVACEVIC, V.; SIMPSON, A. J.; SIMPSON, M. J. <sup>1</sup>H NMR-based metabolomics of *Daphnia magna* responses after sub-lethal exposure to triclosan, carbamazepine and ibuprofen. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics**, v. 19, p. 199–210, 2016.
- KU, P. et al. Effects of triclosan on the detoxification system in the yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*): Expressions of CYP and GST genes and corresponding enzyme activity in phase I, II and antioxidant system. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 166, p. 105–114, 2014.
- LAMEIRA, V. Estudo dos efeitos letais e subletais (reprodução e teratogênese) do fármaco triclosan para *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia*, *Ceriodaphnia silvestrii* (Cladocera, Crustacea). p. 1–225, 2008.
- LATCH, D. E. et al. Photochemical conversion of triclosan to 2,8-dichlorodibenzo-p-dioxin in aqueous solution. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 158, n. 1, p. 63–66, 2003.
- LEVINE, R.L., WILLIAMS, J.A., STADTMAN, E.P., SHACTER, E. 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol.** V.233, p.346–357
- LEVY, C.W. et al. Molecular basis of triclosan activity. **Nature**. v. 398, p. 383-4, 1999
- LIANG, X. et al. Assessment of toxic effects of triclosan on the swordtail fish (*Xiphophorus helleri*) by a multi-biomarker approach. **Chemosphere**, v. 90, n. 3, p. 1281–1288, 2013.
- LOUREIRO, S. et al. Toxicity of three binary mixtures to *daphnia magna*: Comparing chemical modes of action and deviations from conceptual models. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 8, p. 1716–1726, 2010.
- LV, M. et al. Occurrence and fate of triclosan and triclocarban in a subtropical river and its estuary. **Marine Pollution Bulletin**, v. 88, n. 1–2, p. 383–388, 2014.
- MACEDO, A. S. D. Screening the effects of emerging pollutants using embryo bioassays: triclosan, methyl-triclosan and perfluoroalkyls chemicals. Tese de Mestrado. **Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar**. Universidade do Porto. 115 p, 2015.

MACIEL, G. M. *et al.* Response of *Ganoderma lucidum* and *Trametes* sp. to the herbicide picloram: Tolerance, antioxidants and production of ligninolytic enzymes. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 105, n. 2, p. 84–92, 2013.

MAGALHÃES, D. D. P.; FERRÃO, S. A Ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Australis**, v. 12, n. 3, p. 355–381, 2008.

MARKLUND, S., & MARKLUND, G.. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. **European Journal of Biochemistry**, 47(3), 469–474, 1974

MARLATT, V. L. *et al.* Triclosan exposure alters postembryonic development in a Pacific tree frog (*Pseudacris regilla*) Amphibian Metamorphosis Assay (TREEMA). **Aquatic Toxicology**, v. 126, p. 85–94, 2013.

MARTÍNEZ-PAZ, P. *et al.* Endocrine-related genes are altered by antibacterial agent triclosan in *Chironomus riparius* aquatic larvae. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 140, p. 185–190, 2017.

MARTINS, D. *et al.* Effects of 4-MBC and triclosan in embryos of the frog *Pelophylax perezi*. **Chemosphere**, v. 178, p. 325-332, 2017.

MATOZZO, V. *et al.* A multi-biomarker approach to assess effects of Triclosan in the clam *Ruditapes philippinarum*. **Marine Environmental Research**, v. 74, p. 40–46, 2012.

MCMURRY, L. M.; OETHINGER, M.; LEVY S. B. Triclosan targets lipid synthesis. **Nature**, v.394, p. 531-532, 1998.

MELO, A. S.; HEPP, L. U. Ferramentas Estatísticas Para Análises De Dados Provenientes De Biomonitoramento. **Oecologia Australis**, v. 12, n. 3, p. 463–486, 2008.

MEZCUA, M. *et al.* Evidence of 2,7/2,8-dibenzodichloro-p-dioxin as a photodegradation product of triclosan in water and wastewater samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 524, n. 1–2 SPEC. ISS., p. 241–247, 2004.

MI, C. *et al.* Molecular interaction of triclosan with superoxide dismutase (SOD) reveals a potentially toxic mechanism of the antimicrobial agent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 153, n. January, p. 78–83, 2018.

MOLINS-DELGADO, D.; DÍAZ-CRUZ, M. S.; BARCELÓ, D. Personal Care Products in the Aquatic Environment. v. 83, n. 10, p. 1-34, 2015

MONTAGNER, C. C. *et al.* Occurrence and potential risk of triclosan in freshwaters of São Paulo, Brazil-the need for regulatory actions.



**Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 3, p. 1850–1858, 2014.

NAGAMATSU, P.C. Efeitos de metais neurotóxicos em larvas de *Rahmdia quelen* expostas em fases iniciais de desenvolvimento. Dissertação. Universidade Federal do Paraná. p. 85, 2013.

NAKADA, N. et al. Mass balance analysis of triclosan, diethyltoluamide, crotamiton and carbamazepine in sewage treatment plants. **Water Science and Technology**, v. 61, n. 7, p. 1739–1747, 2010.

OLIVEIRA, L. L. D. et al. Evaluation of ecotoxicological effects of drugs on *Daphnia magna* using different enzymatic biomarkers. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 119, p. 123–131, 2015.

OLIVEIRA, L. L. D. Biomarcadores enzimáticos e testes ecotoxicológicos na avaliação da toxicidade de fármacos em invertebrados aquáticos. Tese de Doutorado. Escola de Engenharia de São Carlos. **Universidade de São Paulo**. 279. p, 2014.

OLIVEIRA, R. et al. Effects of triclosan on zebrafish early-life stages and adults. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 16, n. 6, p. 679–688, 2009.

ORVOS, D. R. et al. Aquatic toxicity of triclosan. **Environmental toxicology and chemistry / SETAC**, v. 21, n. 7, p. 1338–1349, 2002.

PAN, C. *et al.* Ecotoxicology and Environmental Safety Triclosan-induced transcriptional and biochemical alterations in the freshwater green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 148, n. September 2017, p. 393–401, 2018.

PARK, J. C. *et al.* Effects of triclosan (TCS) on fecundity, the antioxidant system, and oxidative stress-mediated gene expression in the copepod *Tigriopus japonicus*. **Aquatic Toxicology**, v. 189, n. April, p. 16–24, 2017.

PASQUINI, L. et al. Occurrence of eight household micropollutants in urban wastewater and their fate in a wastewater treatment plant. Statistical evaluation. **Science of the Total Environment**, v. 481, n. 1, p. 459–448, 2014.

PAVLAKI, M. D., et al. Effects of binary mixtures on the life traits of *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 1, p. 99-110, 2010

PENG, Y. et al. Toxic effects of Triclosan on the detoxification system and breeding of *Daphnia magna*. **Ecotoxicology**, v. 22, n. 9, p. 1384–1394, 2013.

PÉREZ, J. et al. Growth rate of *Pseudokirchneriella subcapitata* exposed to herbicides found in surface waters in the Alqueva reservoir (Portugal): A

bottom-up approach using binary mixtures. **Ecotoxicology**. n. 20, v.6, p. 1167–1175, 2011

PINDER, A. C. et al. Early ontogeny of sunbleak. **J. Fish Biol.** v. 64, p. 762-775, 2004.

PUSCEDDU, F. H. Avaliação Ecotoxicológica do Fármaco Triclosan para Invertebrados de Água Doce com Ênfase em Ensaio com Sedimento Marcado ('spiked sediment'). p. 126, 2009.

PUSCEDDU, F. H. Avaliação do risco ambiental de sedimentos contaminados com triclosan, ibuprofeno e 17 $\alpha$ -etinilestradiol empregando invertebrados marinhos bentônicos. Tese de Doutorado. **Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares**. Universidade de São Paulo. 149. p, 2016.

RABY, M. Toxicity Assessment Of The Antimicrobial Triclocarban Using Sub-Lethal Behaviour And Reproduction Endpoints. **Theses and dissertations. Paper 2017.**, n. 2013, 2013.

RAND, G. M. Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment. 2<sup>o</sup> ed. Washington: Taylor & Francis, 1995. 1125p

RAUTY, S. A.; ANGUS, R. A. Triclosan has endocrine-disrupting effects in male western mosquitofish, *Gambusia affinis*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 2010.

RUSZKIEWICZ, J. A. *et al.* Is Triclosan a neurotoxic agent? **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews**, v. 20, n. 2, p. 104–117, 2017.

RYALL, K.A. and TAN, A.C. Systems Biology Approaches for Advancing the Discovery Of Effective Drug Combinations. **Journal of Cheminformatics**, v.7, n.7, 2015

SANCHEZ-PRADO, L. et al. Monitoring the photochemical degradation of triclosan in wastewater by UV light and sunlight using solid-phase microextraction. **Chemosphere**, v. 65, n. 8, p. 1338–1347, 2006.

SANTOS, M. M. DOS et al. Occurrence and risk assessment of parabens and triclosan in surface waters of southern Brazil: a problem of emerging compounds in an emerging country. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 21, n. 3, p. 603–617, 2016.

SATYRO, S. *et al.* Triclocarban: UV photolysis, wastewater disinfection, and ecotoxicity assessment using molecular biomarkers. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 19, p. 16077–16085, 2017.

SCHULTZ, M. M.; BARTELL, S. E.; SCHOENFUSS, H. L. Effects of triclosan and triclocarban, two ubiquitous environmental contaminants, on anatomy, physiology, and behavior of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 63, n. 1, p. 114–124, 2012.

SCHVARTSMAN, S. Intoxicações agudas. **Sarvier**, São Paulo, 4 ed, 355 p, 1991

SILVA, A. R. R. et al. Ecotoxicity and genotoxicity of a binary combination of triclosan and carbendazim to *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 115, p. 279–290, 2015.

SINGER, H. et al. Triclosan: Occurrence and Fate of a Widely Used Biocide in the Aquatic Environment: Field Measurements in Wastewater Treatment Plants, Surface Waters, and Lake Sediments. **Environ. Sci. Technol.**, v. 36, n. 23, p. 4998–5004, 2002.

SUAREZ, S. et al. Kinetics of triclosan oxidation by aqueous ozone and consequent loss of antibacterial activity: Relevance to municipal wastewater ozonation. **Water Research**, v. 41, n. 12, p. 2481–2490, 2007.

SUZUKI, Y. J.; CARINI, M.; BUTTERFIELD, D. A. 2010. Protein carbonylation. **Antioxidants & Redox Signaling**. v. 12, n. 3.

TAMURA, I. et al. Ecotoxicity and screening level ecotoxicological risk assessment of five antimicrobial agents: Triclosan, triclocarban, resorcinol, phenoxyethanol and p-thymol. **Journal of Applied Toxicology**, v. 33, n. 11, p. 1222–1229, 2013.

TEIXEIRA, C. P. D. A. B.; JARDIM, W. D. F. Processos Oxidativos Avançados: conceitos teóricos. Campinas, SP: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 2004, v. 3, 83 p. **Caderno Temático**, v. 3, p. 83, 2004.

TIBURTIUS, E. R. L.; SCHEFFER, E. W. O. Triclosan: Fate in the Environment and Perspectives in the Treatment of Public Water Supply. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 5, p. 1144–1159, 2014.

USEPA. Reregistration Eligibility Decision for Triclosan. **United States Environmental Protection Agency**, n. July, p. 259, 2006.

VINGSKES, A. K.; SPANN, N. The toxicity of a mixture of two antiseptics, triclosan and triclocarban, on reproduction and growth of the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Ecotoxicology**, v. 27, n. 4, p. 420–429, 2018.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 57–149, 2003.

- WEYDERT, C. J.; CULLEN, J. J. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. **Nature Protocols**, v. 5, n. 1, p. 51–66, 2010.
- WOLF, K. J.; FDA. Safety and Effectiveness of Consumer Response Antiseptics- Topical Antimicrobial Drug Products for Over-the-Counter Human Use. **Federal Register**, v. 81, n. 172, p. 61106–61130, 2016.
- WALKER, C. M.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M.; PEAKALL, D. B. Principles of Ecotoxicology. Bristol, PA: Taylor & Francis, 1996.
- WONG, C. M.; CHEEMA, A. K.; ZHANG, L.; SUZUKI, Y. J. 2008. Protein Carbonylation as a Novel Mechanism in Redox Signaling. *Circ. Res.* v. 102, p. 310- 318.
- WRIGHT, D. A.; WELBOURN, P. Environmental toxicology. **Cambridge University Press**. 2002
- XU, X. *et al.* Toxic assessment of triclosan and triclocarban on *Artemia salina*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 2015.
- ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia aquática – Princípios e Aplicações. **Editora Rima**, São Carlos. 464 p., 2008.
- ZHAO, J. L. *et al.* Occurrence and risks of triclosan and triclocarban in the Pearl River system, South China: From source to the receiving environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 179, n. 1–3, p. 215–222, 2010.



## APÊNDICE A

Ministério da Educação  
**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**  
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS



PARECER: 2018-029 (APROVADO)/2018 - CEUA  
 PROCESSO Nº: 23064.024491/2018-72  
 INTERESSADO: ADRIANE MARTINS DE FREITAS

### PROJETO DE PESQUISA / AULA PRÁTICA

<b>Título:</b>	AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE DE TRICLOSAN E TRICLOCARBAN EM EMBRIÕES DE <i>Rhamdia quelen</i>
<b>Área Temática:</b>	Toxicologia
<b>Pesquisador / Professor:</b>	Adriane Martins de Freitas
<b>Instituição:</b>	UTFPR/Curitiba
<b>Financiamento:</b>	CAPES e Fundação Araucária (Edital 09/2016)
<b>Versão:</b>	02

PARECER CONSUBSTANCIADO DA CEUA	Protocolo nº 2018-029
<p><b>Apresentação do Projeto:</b></p> <p>Os resíduos de produtos de higiene pessoal (PHPs) são contaminantes emergentes de presença global oriundos de fragrâncias, cosméticos e filtros solares, por exemplo. Dentre os PHPs, destacam-se compostos bacteriostáticos como o triclosan (TCS) e o triclocarban (TCB). O descarte inadequado de embalagens desses produtos pode contaminar ambientes aquáticos, com potencial de causar efeitos deletérios e bioacumulação em populações e comunidades naturais. Desta forma, conhecer os efeitos causados por TCS e TCB a organismos representantes dos ecossistemas aquáticos é de fundamental importância para quantificar e qualificar os efeitos ocorridos nos organismos expostos em corpos hídricos. Com os ensaios de ecotoxicidade utilizando embriões de <i>Rhamdia quelen</i> espera-se obter respostas satisfatórias que demonstrem formas de manifestação desses efeitos e o quanto esses organismos são afetados.</p>	
<p><b>Objetivo:</b></p> <p>O projeto visa avaliar a ecotoxicidade de triclosan e triclocarban em embriões (<i>Rhamdia quelen</i>), através de alterações morfológicas e biomarcadores bioquímicos. Para tanto elenca os seguintes objetivos específicos:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1- Avaliar <b>mortalidade</b> em embriões de <i>Rhamdia quelen</i> expostos aos antissépticos triclosan, triclocarban e suas misturas;</li> <li>2- Avaliar <b>alterações morfológicas</b> em embriões de <i>Rhamdia quelen</i> expostos a triclosan, triclocarban e suas misturas.</li> </ol> <p>- Avaliar a <b>toxicidade dos compostos</b> triclosan, triclocarban e suas misturas <b>através análise de biomarcadores bioquímicos</b> (proteínas totais, acetilcolinesterase, glutathione reduzida e glutathione-S transferase) em embriões de <i>Rhamdia quelen</i>.</p>	
<p><b>Avaliação dos Riscos e Benefícios:</b></p> <p>Os proponentes listam como o principal risco que pode comprometer a execução da pesquisa, eventuais problemas no fornecimento de energia elétrica, o que implicaria em impossibilidade de funcionamento dos equipamentos laboratoriais.</p>	
<p><b>Comentários e Considerações sobre a Pesquisa / Aula Prática:</b></p> <p>A pesquisa é atual e pertinente. Os objetivos estão claros e os procedimentos metodológicos são adequados a responder as perguntas.</p>	
<p><b>Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:</b></p> <p>Foram apresentados os seguintes termos e documentos:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Requerimento preenchido completamente e assinado pelo pesquisador responsável pelo projeto/aula prática; Ok</li> <li>2) formulário unificado de encaminhamento do CEUA/UTFPR/DV; Ok</li> <li>3) projeto de pesquisa completo no modelo da PROPPG-CEUA; Ok</li> <li>4) declaração de não início do projeto (com assinatura e data). Ok</li> <li>5) registro de projeto junto a Diretoria responsável (anuência da DIRPPG). Ok</li> <li>6) Médico Veterinário - Carolina Luiza Macedo - CRMV-12307</li> </ol>	
<p><b>Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:</b></p> <p>Não há.</p>	
<p><b>Situação do Parecer:</b></p> <p>APROVADO</p>	
<p><b>Considerações Finais a Critério da CEUA:</b></p> <p>Todos os procedimentos devem seguir a lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008.</p>	

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE DE TRICLOSAN E TRICLOCARBAN EM EMBRIÕES DE *Rhamdia quelen*", protocolo nº 2018/029, sob a responsabilidade de **ADRIANE MARTINS DE FREITAS** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA- UTFPR) da UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ, em reunião de 10/09/2018.

## CERTIFICATION

The Ethics Commission on Animal Use (CEUA) of Federal University of Technology – Paraná (UTFPR), CERTIFIES that the request herein identified by the protocol number 2018/ 029, coordinated and under the responsibility of **ADRIANE MARTINS DE FREITAS**, which involves the production, maintenance and / or use of animals belonging to the phylum Chordata, sub-phylum Vertebrata (except human species), for the purposes of scientific research (or teaching), is in accordance with provisions of the Brazilian Law no. 11794 (October 8th, 2008), the Decree nº 6.899 (July 15th, 2009) and with further regulations published by the Brazilian National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA).

Vigência do projeto:	20 de Setembro/2018 – Fevereiro/2019
Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Espécie/linhagem:	<i>Rhamdia quelen</i>
Número de animais:	3000
Peso/Idade:	Embriões
Sexo:	N/A
Origem:	Aquisição comercial

Dois Vizinhos, 13 de setembro de 2018.

Assinado por:

Nédia de Castilhos Ghisi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade  
Tecnológica Federal do Paraná



Documento assinado eletronicamente por **NEDIA DE CASTILHOS GHISI, PRESIDENTE DA COMISSÃO**, em 13/09/2018, às 19:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.uVpr.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.uVpr.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0432717** e o código CRC **6E914707**.

## APÊNDICE B

Soluções utilizadas no meio de cultivo da *Daphnia magna*

Solução	Reagente	Quantidade (mg)	Preparo
1	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	73500	Dissolver e diluir a 1000 mL com água processada
2	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	123300	Dissolver e diluir a 1000 mL com água processada
3	KCl	5800	Dissolver e diluir a 1000 mL com água processada
4	NaHCO <sub>3</sub>	64800	Dissolver e diluir a 1000 mL com água processada
	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	7210	
	LiCl	6120	
	RbCl	1420	
5	SrCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	3040	Dissolver e diluir a 1000 mL com água processada
	CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	335	
	ZnCl <sub>2</sub>	260	
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	200	
	NaNO <sub>3</sub>	548	
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5719	
	NaBr	32	
6	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	126	Dissolver e diluir a 1000 mL com água processada
	NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	1,15	
	KI	6,5	
	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	4,38	
7	NaSiO <sub>3</sub>	21465	Dissolver e diluir a 1000 mL com água processada, deixando em agitação até o clareamento da solução
	Na <sub>2</sub> EDTA.7H <sub>2</sub> O	500 mg	Dissolver e diluir a 1000 mL com água processada. Preparar as soluções separadamente, cada uma em 500 mL de água processada. Misturar as duas soluções e autoclavar imediatamente a 121 °C por 15 min
8	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	199,1 mg	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	286 mg	
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	368 mg	
9	Hidrocloreto de tiamina	750 mg	Dissolver e diluir a 1000 mL com água processada
	Cianocobalamina (vitamina B12)	10 mg	
10	D (+) Biotina	7,5 mg	Dissolver e diluir a 1000 mL com água processada. Congelar em volume adequado para uso

Adaptado de ABNT NBR 12713:2016