

## AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DO FÁRMACO TRICLOSAN NO DESENVOLVIMENTO EMBRIOLARVAL DO MEXILHÃO *PERNA PERNA* (LINNAEUS, 1758)

Carvalho, Mariana<sup>1\*</sup>; Andrade, Débora Cancian<sup>1\*</sup>; Cortez, Fernando Sanzi<sup>1,2</sup>; Cesar, Augusto<sup>1</sup>; Santos, Aldo Ramos<sup>1</sup>; Boher-Morel, Maria Beatriz<sup>2</sup>; Pereira, Camilo Dias Seabra<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ecotoxicologia da Universidade Santa Cecília (UNISANTA)

<sup>2</sup>Instituto de Pesquisa Energética e Nucleares-USP

\*Acadêmicas da Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade Santa Cecília (UNISANTA)

\*\*Professor orientador

[mariana.decarvalho@hotmail.com](mailto:mariana.decarvalho@hotmail.com)

### RESUMO

Com a crescente utilização de produtos de higiene e cuidados pessoais, especial atenção vem sendo dada ao fármaco Triclosan, um composto de ação antimicrobiana amplamente utilizado por indústrias farmacêuticas. A presença desse xenobiótico no ambiente aquático pode causar efeitos adversos em diferentes níveis de organização biológica (indivíduo, população, comunidade) e estudos ecotoxicológicos são capazes de detectar tais alterações, identificar o mecanismo de ação e avaliar concentrações seguras para a emissão desse composto. O presente estudo avaliou a toxicidade crônica do Triclosan a partir da avaliação de anomalias e retardos no desenvolvimento embriolarval do mexilhão *Perna perna* expostos a diferentes concentrações do composto. Os ensaios foram realizados de acordo com o procedimento descrito por Zaroni (2002). Os resultados indicaram que o Triclosan pode interferir significativamente no potencial reprodutivo de mexilhões. Diante desse contexto, se faz necessário o desenvolvimento de estudos ecotoxicológicos, com o intuito de gerar um conhecimento mais profundo sobre os possíveis riscos desse composto e sua regulação.

*Palavras-chave:* Triclosan, Desenvolvimento embriolarval, Toxicidade

### 1. Introdução

Os ecossistemas aquáticos têm sofrido alterações significativas devido a diversos fatores antropogênicos tais como atividades industriais, agrícolas e urbanas, poluição e degradação ambiental e lançamento de efluentes domésticos e industriais. Essas alterações representam uma queda acentuada da biodiversidade aquática, em função de desestruturação do ambiente físico, químico e na dinâmica e estrutura das comunidades biológicas (CALLISTO et al., 2001). Além disso, novas substâncias químicas são sintetizadas a cada ano sendo que a maior parte destas alcança, direta ou indiretamente, os ecossistemas marinhos e de água doce (SOUSA, 2002). Os fármacos são produzidos com a característica de manter suas propriedades químicas inalteradas e persistentes. De acordo com Stumpf et al. (1999), o monitoramento de fármacos residuais no ambiente aquático vem demonstrando concentrações que variam de µg/L a ng/L em Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) e águas naturais. O

Triclosan é um composto bactericida utilizado por indústrias farmacêuticas na fabricação de xampus, sabonetes, desodorantes, loções para o corpo, protetores solares e anti-sépticos bucais. Além dessas aplicações, o produto pode ser utilizado como um aditivo em plásticos, polímeros e roupas esportistas, dando a estes materiais propriedades antibacterianas (KALYON & OLUGUM, 2001). Esse composto tem efeito de longa duração (Long-lasting) e amplo espectro de atividades sobre bactérias Gram positivas e a maior parte das Gram negativas. Considerando a eminente possibilidade da presença de Triclosan em ambientes costeiros no Brasil, esse estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade crônica do Triclosan a partir da avaliação dos efeitos adversos causados sobre o desenvolvimento embriolarval do mexilhão *P. perna*.

### 2. Materiais e Métodos

Nos experimentos o organismo-teste selecionado foi o mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758), que é um molusco filtrador da classe Bivalvia que se alimenta de microorganismos (fitoplâncton e detritos) presente na corrente de água. Eles habitam a região do mesolitoral de costões rochosos, podendo estender-se até o infralitoral. Seu ciclo sexual, na região sudeste, é praticamente contínuo durante todo o ano, havendo períodos de reprodução mais acentuados no outono e primavera e menos intensos no verão e inverno (LUNNETA, 1969). As coletas para o método de ensaio de desenvolvimento embriolarval foram realizadas na Ilha das Palmas (23°59'59.59"S 46°20'00.43"O) situada na porção leste da baía de Santos, na costa central de São Paulo. Foram coletados 50 organismos para a realização dos experimentos, o tamanho médio compreendeu de 4 a 5 cm. A coleta foi realizada no mês maio. Sendo o Triclosan um composto hidrofóbico e de baixa volatilidade, foi necessário utilizar o solvente Dimethyl sulfoxide (DMSO) na diluição. Ambos os compostos foram adquiridos na Merck S.A.. Paralelamente foi realizado testes com controle de água, DMSO na maior concentração utilizada e Dodecil Sulfato de Sódio (DSS) que avaliou a sensibilidade dos organismos. A água do mar utilizada na diluição do Triclosan, como também no controle e fecundação dos ovos, foi filtrada a 0,45µm e 0,22µm (Millipore) e mantida por aproximadamente 4 horas aerando. Nos testes de toxicidade embriolarval foram usadas diferentes concentrações de Triclosan, determinadas a partir de estudos pretéritos sobre o composto (PUSCEDDU *et al.* 2007 e CORTEZ *et al.* 2008).

**Ensaio de desenvolvimento embriolarval** - O mexilhão *P. perna* (Linnaeus, 1758), espécie comum do litoral brasileiro (RIOS, 1994), tem potencial para ser usado em testes de toxicidade de efeito crônico de curta duração, pois os gametas podem ser facilmente obtidos e seu desenvolvimento embriolarval ocorre em curto período de tempo, dando origem a uma larva de fácil identificação morfológica (ZARONI, 2002).

O teste de toxicidade com embriões de mexilhão *P. perna* consiste em expor ovos recém fertilizados a concentrações de Triclosan, por um período de 48 horas, na temperatura de 25°C e salinidade de 35. Após o período de incubação, é determinada a porcentagem de embriões normais e/ou anormais nas concentrações utilizadas em relação ao controle. O ensaio foi desenvolvido seguindo a adequação do método realizada por Zaroni (2002). Após a limpeza das conchas, os organismos foram lavados com água do mar e colocados em placas de Petri dentro de uma bandeja plástica com água resfriada a uma temperatura de 10°C por cerca de 1 hora, posteriormente os organismos foram mantidos por 20 minutos fora d'água e em seguida, foram emersos sob um sistema de fluxo contínuo com água do mar filtrada à temperatura ambiente. Esse sistema visa à estimulação da liberação dos gametas por estímulo físico (indução termal) que é considerada satisfatória (ZARONI, 2002). Os gametas foram retirados do fluxo de água, juntamente com a placa de Petri e lavados com água do mar filtrada a 0,22µm. Os ovócitos foram coletados com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, transferidos para um béquer contendo água do mar filtrada e posteriormente foram lavados com uma peneira de 75 µm. Já o líquido espermático foi coletado com o mínimo possível de água e mantido separadamente em um béquer, imerso em gelo a temperatura próxima de 4°C para diminuir a sua atividade até o momento da fecundação (CHERR *et al.*, 1990).

A fecundação foi efetuada com a adição de 1 mL de solução espermática na solução dos ovócitos, até que 90% dos ovócitos tenham sido fecundados. Em seguida foi estimada a densidade dos ovos, e cerca de 500 embriões foram colocados em cada frasco. O teste iniciou-se com período de incubação de 48 horas e o ensaio foi concluído quando mais de 70% dos embriões do controle atingiram o estágio de larva-D (Vélinger). Para a fixação dos organismos adicionou-se em cada frasco-teste (tubo de ensaio) 0,5 mL de formol tamponado com bórax. A leitura foi realizada com o auxílio de um microscópio, empregando câmaras do tipo *Sedgwick-Rafter* levando-se em consideração os 100 primeiros organismos encontrados. É importante salientar que os embriões normais são os que atingem o estágio de larva-D, com valvas assimétricas fechadas e massa visceral presente na porção interna da concha, e os embriões que se desenvolveram somente até a fase trocófora, ou seja, não formaram concha desenvolvida simetricamente, devem ser considerados anormais ou retardados, conchas vazias também não são consideradas normais (ASTM, 1992; HIS & BEIRAS, 1995). A média de larvas de cada frasco é comparada com o controle, permitindo verificar em quais concentrações o Triclosan afetou o desenvolvimento embrionário do *P. perna*.

### 3. Resultados

Com os testes de toxicidade, foram realizados ensaios de sensibilidade com a substância de referência Dodecil Sulfato de Sódio (DSS). Os resultados da CI(I)50;48H, dos ensaios de sensibilidade (n=5) com os lotes de mexilhão variaram de 0,7831 mg.L<sup>-1</sup> (0,6205 mg.L<sup>-1</sup> - 0,8909 mg.L<sup>-1</sup>) a 0,9570 mg.L<sup>-1</sup> (0,9341 - 0,9749) de Dodecil Sulfato de Sódio. Os resultados encontrados nos ensaios de sensibilidade ao DSS realizados no estudo estão dentro dos intervalos de concentrações citadas na literatura (ZARONI, 2000). Os resultados obtidos (CI(I)50;48h) nos ensaios de sensibilidade (n=5) com mexilhão *Perna perna*, a média, o desvio-padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV) estão disponíveis na Tabela I. Para os zigotos expostos ao Triclosan, os valores das concentrações de efeito não observado (CENO(I)) e as concentrações de efeito observado (CEO(I)) variaram de 0,03 mg.L<sup>-1</sup> a 0,08 mg.L<sup>-1</sup> e 0,06 mg.L<sup>-1</sup> a 0,10 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Os valores das concentrações de Triclosan que inibiram o desenvolvimento embriolarval do mexilhão (CI(I)50; 48H) variaram de 0, 1010 mg.L<sup>-1</sup> a 0, 1704 mg.L<sup>-1</sup>. Os resultados dos ensaios expressos em CENO(I), CEO(I) e CI(I)50; 48H e as respectivas médias, desvios padrão (DP) e coeficientes de variação (CV) estão representados na Tabela II.

### 4. Discussão

De acordo com Aguera *et al.* (2003), encontrou-se o composto Triclosan (TCS) em concentrações de 22 µg.L<sup>-1</sup> em efluentes tratados e acima de 130 mg.L<sup>-1</sup> em sedimentos marinhos. Recentemente o TCS foi avaliado em amostras de água superficial marinha em Tai Po e no Porto de Victoria, em Hong Kong, e as concentrações variaram de 15ng/L a 110ng/L (WU *et al.*, 2007).

Nos resultados do trabalho desenvolvido por Cortez (2008) o bactericida Triclosan causou efeitos

adversos significativos na taxa de desenvolvimento embriolarval de ouriços-do-mar (*Lytechinus variegatus*) em concentrações médias de 0,14 mg.L<sup>-1</sup>. Esse resultado é semelhante ao encontrado no presente estudo CI(I) 50, 48h média de 0,1281 mg.L<sup>-1</sup>, demonstrando a capacidade do composto causar efeitos adversos nos primeiros estágios de desenvolvimento de invertebrados marinhos. O estudo propiciou subsídios para uma futura regulamentação do descarte seguro do composto em ambiente aquático. É importante ressaltar a similaridade da estrutura molecular do Triclosan com a de compostos altamente tóxicos e sua conversão através da fotodegradação para dioxinas e furanos que são cancerígenos, persistentes e representam um grande risco à saúde e ao meio ambiente. Diante da crescente utilização desse fármaco, se faz necessário o desenvolvimento de estudos ecotoxicológicos de resposta rápida e eficiente, com o intuito de gerar um conhecimento mais profundo sobre os possíveis riscos desse composto e sua regulação.

## 5. Conclusão

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que o bactericida Triclosan pode causar efeitos adversos significativos em baixas concentrações (mg/L), as quais já foram determinadas em efluentes domésticos e sedimentos marinhos. Os retardos e anomalias no desenvolvimento embriolarval de mexilhões indicam a capacidade do composto em causar alterações significativas na dinâmica populacional de invertebrados marinhos, demonstrando o risco ecológico da introdução desse composto no ambiente aquático.

## 6. Referências Bibliográficas

- AGUERA, A.; ALBA-FERNÁNDEZ, A. R.; PIEDRA, L.; MÉZCUA, M.; GÓMEZ, M, J. Evaluation of triclosan and biphenylol in marine sediments and urban wastewaters by pressurized liquid extraction and solid phase extraction followed by gas chromatography mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 480: 193-205. 2003.
- ASTM – AMERICAN SOCIETY OF TESTING AND MATERIALS. 1992. E 724-89 Standard guide for conducting static toxicity tests starting with embryos of four species of saltwater bivalve molluscs. In: *Annual Book of ASTM Standards: water and environmental technology*. Philadelphia, section 11, p.377-394.
- CALLISTO, M., MORETTI, M., GOULART, M. D. C. 2001. Macroinvertebrados bentônicos como ferramenta para avaliar a saúde de riachos. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos*, 6 (1)71-82.
- CHERR, G.N.; SHOFFNER-MC GEE, J.; SHENKER, J.M. 1990. Methods for assessing fertilization and embryonic/larval development in toxicity tests using the califormia mussel (*Mytilus californianus*). *Environ. Toxicol. Chem.*, v.9, p.1137-1145.
- CORTEZ, F. S.; PUSCEDDU, F. H.; SANTOS, A. R.; Santos, A. R.; Cesar, A.; PEREIRA, C. D. S.; BOHER-MOREL, M. B. Avaliação do fármaco Triclosan através de ensaio crônico de curta duração com ouriço do mar *Lytechinus variegatus*. 2008.
- HIS, E.; BEIRAS, R. 1995. Monitoring fresh and brackish water quality around shellfish farming areas with a bivalve embryo and larval simplified bioassay method. *Oceanologica Acta*, v.18, n.5, p.591-595.
- KALYON, B. D. & U. OLGUM. Controlled release of antimicrobial substances from polymer matrices. *Infect. Control*. p. 124-125. 2001.
- LUNETTA, J.E. (1969). Fisiologia da reprodução de mexilhões (*Mytilus pema* L. Molusca Lamellibranchia). *Bol. Zoo. Bio. Mar.*, 26:33-111.
- PONEZI, A. N.; DUARTE, M. C. T.; CLAUDINO, M. C. 2006. Fármacos em matrizes ambientais – Revisão. Disponível em: <<http://www.cori.unicamp.br/CT2006/trabalhos/FÁRMACOS%20EM%20matrizes%20ambientais.doc>>, acesso em: 11/01/2008.
- PUSCEDDU, F. H.; LAMEIRA, V.; BOHRER, M. B. Estudo dos Efeitos Crônicos do Fármaco Triclosan Sobre *Ceriodaphnia dubia* Através de Ensaio de Toxicidade. In: VIII Congresso SETAC LA - Ecotoxicologia y Desarrollo Sustentable, 2007, Montevideo. Livro de Resumos - VIII Congresso SETAC LA. Montevideo, 2007. v. VIII. p. 116-116.
- RIOS, E. C. SEASHELLS OF BRAZIL. 2. ed. Rio Grande: Ed. da FURG, 1994. 492 p.
- SOUSA, E. C. P. M. 2002. MÉTODOS EM ECOTOXICOLOGIA MARINHA. IN: NASCIMENTO, I.; E. C. P. M. SOUSA; M. G. NIPPER (EDS.). *Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil*. Editora Artes Gráficas, Salvador/BA. Cap.I, p.09-14.
- STUMPF, M., TERNES, T., A., ROLF-DIETER W., RODRIGUES, S., V., BAUMANN, W.; Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *The Science of the Environment*, 22, 135-141. 1999.
- WU, J.L.; LAM, N.P.; MARTEN, D.; KETTRUP, A.; CAI, Z.W. 2007. Triclosan determination in water related to wastewater treatment. *Talanta* 72, 1650-1654.
- ZARONI, L. P. 2000, Testes de toxicidade com a utilização de embriões do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758): uma adequação do método. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico, São Paulo. 47 pp.
- ZARONI, L. P. 2002. Testes de toxicidade com embriões do mexilhão *Perna perna*. In: Nascimento, I.; E. C. P. M. Sousa; M. G. Nipper (Eds.). *Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil*. Editora Artes Gráficas, Salvador/BA. Cap.VII, pp.83-90.

## Tabelas

TABELA I - Sensibilidade (CI(I)50;48h) de *Perna perna* ao Dodecil Sulfato de Sódio (DSS).

Experimentos	CI(I)50; 48h (*IC) mg.L <sup>-1</sup>
1	0,9570 (0,9341 – 0,9749)
2	0,7831 (0,6205 – 0,8909)
3	1,0148 (0,9677 – 1,0740)
4	0,9101 (0,8902 – 0,9262)
5	0,8649 (0,8583 – 0,8738)
Média	0,9060
DP	0,088
CV (%)	9,75

\* IC – Intervalo de confiança

TABELA II – Toxicidade crônica de Triclosan (CENO(I), CEO(I), CI(I)50; 48h) para *Perna perna*.

Experimentos	CENO mg.L <sup>-1</sup>	CEO mg. L <sup>-1</sup>	CI(I)50;48h (*IC) mg.L <sup>-1</sup>
<b>1</b>	0,03	0,06	0,1305 (0,1268 – 0, 1324)
<b>2</b>	0,04	0,08	0,1010 (0,0939 – 0, 1059)
<b>3</b>	0,065	0,08	0,1373 (0,1301 – 0, 1423)
<b>4</b>	0,08	0,10	0,1704 (0,1673 – 0, 1738)
<b>5</b>	0,05	0,065	0,1013 (0,0965 – 0, 1054)
<b>Média</b>	0,053	0,077	0,1281
<b>DP</b>	0,020	0,016	0,029
<b>CV (%)</b>	37,73	20,77	22,63

\* IC – Intervalo de confiança