



AVALIAÇÃO CLÍNICA E MORTALIDADE DE LAMBARIS SUBMETIDOS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES RESIDUAIS DO TRICLOSAN NA ÁGUA

Natália Franciele da Silva de **Souza**¹, Juliana Augusta **Gil**², Julio Ferraz de **Queiroz**³, Vera Lucia Scherholz Salgado de **Castro**³, Márcia Mayumi **Ishikawa**⁴

Nº 22409

RESUMO - O Triclosan é um antimicrobiano de amplo espectro que apresenta atividades contra bactérias gram positivas, gram negativas, fungos e vírus, sendo utilizado em formulações de produtos de higiene pessoal como cremes dentais, xampus e sabonetes. Estudos demonstram sua presença em efluentes urbanos, industriais e relatam a detecção de resíduos em águas superficiais e sedimentos de ambientes dulcícolas. O objetivo deste estudo é avaliar o efeito de concentrações residuais do triclosan em lambaris de rabo amarelo (*Astyanax altiparanae*), por meio da resposta fisiológica, como sinais clínicos e mortalidade. Realizaram-se dois ensaios, o primeiro nas concentrações de 5mg/L, 10mg/L, 15mg/L, 25mg/L e dois controles. No segundo ensaio utilizaram-se as concentrações de 4mg/L, 3mg/L, 2mg/L, 1mg/L, 0,5 mg/L e dois controles. Em ambos, cada peixe foi considerado como unidade amostral sendo três repetições. No primeiro ensaio, todos os peixes expostos ao triclosan morreram em 30 minutos. No segundo ensaio, os peixes apresentaram sinais clínicos de intoxicação e mortalidades entre 4h e 24h nas concentrações mais altas e, na concentração de 0,5 mg/L, permaneceram vivos por 96 h sem nenhuma alteração clínica. Dessa forma, estabeleceu-se o intervalo entre 1mg/L e 0,5mg/L como referência para os experimentos subletais. Os sinais clínicos observados foram neurológicos, como natação errática e rodopio, culminando na morte dos peixes; além de sinais clínicos de hemorragias, principalmente nas brânquias. Com os resultados obtidos conclui-se que os lambaris decorrentes da exposição aguda ao triclosan apresentaram a saúde comprometida com sinais clínicos de intoxicação e alta mortalidade.

Palavras-chaves: *Astyanax altiparanae*, Antimicrobiano, Toxicologia aquática, Poluentes emergentes, Saúde animal, Saúde ambiental

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Ciências Biológicas, UNIP, Campinas-SP; na.franciele@outlook.com

2 Colaborador, Bolsista CAPES: Pós-Graduação em Biologia Animal, UNICAMP, Campinas-SP.

3 Colaborador Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP.

4 Orientador: Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; marcia.ishikawa@embrapa.br



ABSTRACT - *Triclosan is a broad-spectrum antimicrobial that has activities against gram positive and gram negative bacteria, fungi and viruses, being used in personal hygiene product formulations such as toothpastes, shampoos and soaps. Studies demonstrate its presence in urban and industrial effluents and report the detection of residues in surface waters and sediments from freshwater environments. In this study, the effect of residual concentrations of triclosan in yellowtail lambaris (Astyanax altiparanae) was evaluated through the physiological response, such as clinical signs and mortality. Two tests were carried out, the first at concentrations of 5mg/L, 10mg/L, 15mg/L, 25mg/L and two controls. In the second assay, concentrations of 4mg/L, 3mg/L, 2mg/L, 1mg/L, 0.5 mg/L and two controls were used. In both, each fish was considered as a sampling unit with three replications. In the first trial, all fish exposed to triclosan died within 30 minutes. In the second trial, the fish showed clinical signs of intoxication and mortalities between 4h and 24h at the highest concentrations and, at the concentration of 0.5 mg/L, they remained alive for 96 h without any clinical change. Thus, the range between 1mg/L and 0.5mg/L was established as a reference for sublethal experiments. The clinical signs observed were neurological, such as erratic swimming and spinning, culminating in the death of the fish, in addition to clinical signs of hemorrhage, mainly in the gills. With the results obtained, it is concluded that the lambaris resulting from acute exposure to triclosan showed compromised health with clinical signs of intoxication and high mortality.*

Keywords: *Astyanax altiparanae*, Antimicrobial, Aquatic Toxicology, Emerging Pollutants, Animal Health, Environmental Health

1. INTRODUÇÃO

O estudo dos contaminantes presentes nos ecossistemas aquáticos tem despertado grande interesse científico, principalmente, devido ao crescente aumento da quantidade de poluentes oriundos das atividades antrópicas, que são lançados no ar, no solo ou diretamente nos ambientes aquáticos, ocasionando impactos resultantes das ações sinérgicas ou antagonistas dos diversos contaminantes presentes no ambiente (CARACCIOLO *et al.*, 2015; YOU *et al.*, 2015; COSTA *et al.*, 2008).

Os trabalhos recentes de avaliações dos poluentes de ecossistemas aquáticos têm relatados a contaminação das águas por contaminantes emergentes, entre estes, os produtos farmacêuticos, cosméticos e de higiene pessoal (PPCPs) (PETRIE *et al.*, 2015).



A ocorrência de PPCPs tem sido relatada em diferentes países e diversos ambientes como solo, sedimento, e em águas superficiais (MARTINS, 2018; MATAMOROS *et al.*, 2009). Os antimicrobianos estão entre os mais detectados nos estudos de avaliação e biomonitoramento (BRAUSCH; RAND, 2011). O Triclosan (TCS) (5-cloro-2- (2,4-diclorofenoxi) fenol) se destaca entre os PPCPs, e possui a capacidade de permear a membrana celular e tendo como alvos múltiplos locais no citoplasma e a membrana, incluindo aqueles relacionados à síntese de RNA e a produção de macromoléculas (SALEH *et al.* 2010), exercendo efeitos tóxicos nos organismos aquáticos.

A atividade tóxica do TCS em organismos não alvo ainda não foi bem compreendida, entretanto pode ocasionar narcose em alguns organismos (LYNDALL *et al.*, 2010) e a inibição de componentes do sistema enzimático do tipo II (McMURRAY *et al.*, 1998; LU; ARCHER, 2005).

No Brasil poucos são os trabalhos disponíveis sobre a avaliação dos efeitos do TCS em organismos aquáticos. Cortez (2011) observaram anomalias no desenvolvimento embrio-larval do ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* através de ensaios de ecotoxicidade crônica de curta duração e avaliaram a toxicidade aguda e crônica para *Nitokra sp.* (Crustacea), *Lytechinus variegatus* (Equinodermata) e *Perna perna* (Mollusca).

Alguns estudos têm utilizado espécies nativas de peixes com potencial bioindicador e os seus biomarcadores fisiológicos para avaliar os efeitos da contaminação do ecossistema aquático (BERTIN *et al.*, 2009). O uso de espécies bioindicadoras de contaminação aquática consiste em uma eficiente ferramenta para o biomonitoramento tanto de ambientes naturais em rios, lagos e riachos como também nos ambientes de produção comercial de pisciculturas e demais produções rurais.

O lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*) (GARUTTI, 1995) é um peixe nativo da América do Sul com ampla distribuição geográfica, de importância ecológica, valor econômico tanto como isca viva ou petisco na culinária (FÁVARO, 2002); e se enquadra nos critérios descritos por Beeby (2001), como espécie sentinela, além de possuir capacidade de se adaptar a diversos tipos de ambientes, inclusive em biotérios e aquários.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de concentrações residuais do triclosan em lambaris de rabo amarelo, por meio da resposta fisiológica, como sinais clínicos e mortalidade.



2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local experimental

O experimento foi realizado no laboratório de Ecossistemas Aquáticos (LEA) da Embrapa Meio Ambiente.

2.2 Aquisição dos animais, manutenção e aclimação

Foram utilizados peixes da espécie *Astyanax altiparanae* (lambari-do-rabo-amarelo), que foram adquiridos, de uma piscicultura registrada e cadastrada na CEUA da Embrapa Meio Ambiente. No total foram utilizados 39 lambaris adultos nos dois ensaios, sendo 18 peixes no primeiro ensaio e 21 peixes no segundo ensaio.

Os ensaios foram aprovados pela CEUA da Embrapa Meio Ambiente Protocolo nº010/2019 e fazem parte da dissertação de mestrado da aluna Juliana Augusta Gil sob orientação da Pesquisadora Márcia Mayumi Ishikawa e co-orientação da Pesquisadora Vera Lúcia Scherholz de Castro.

Os peixes foram inicialmente aclimatados no laboratório em tanque rede instalado dentro de um tanque de fibra de vidro de 2.000L com sistema de recirculação de água até o momento do início do experimento. Foram alimentados duas vezes por dia com ração comercial e oxigenação constante.

2.3 Ensaios e Delineamento Experimental

Após o período de sete dias de aclimação os peixes foram distribuídos nos aquários de vidro com 100L de volume útil sem recirculação de água e oxigenação constante.

O triclosan não é solúvel em água por isso inicialmente, foi diluído em álcool comum. A diluição no álcool foi determinado em um teste prévio para obtenção do menor volume de álcool para sua completa diluição. A diluição foi realizada na proporção de 1mg/5mL de álcool. As concentrações do triclosan foram determinadas de acordo com o encontrado na literatura em estudo com tilápias (*Oreochromis niloticus*). Utilizou-se três peixes por tratamento sendo considerado cada peixe como unidade amostral, ou seja, três repetições.

No primeiro ensaio utilizaram-se quatro concentrações de triclosan, sendo 5mg/L, 10mg/L, 15mg/L e 25mg/L e dois controles, sendo um com álcool e outro sem álcool (Figura 1).

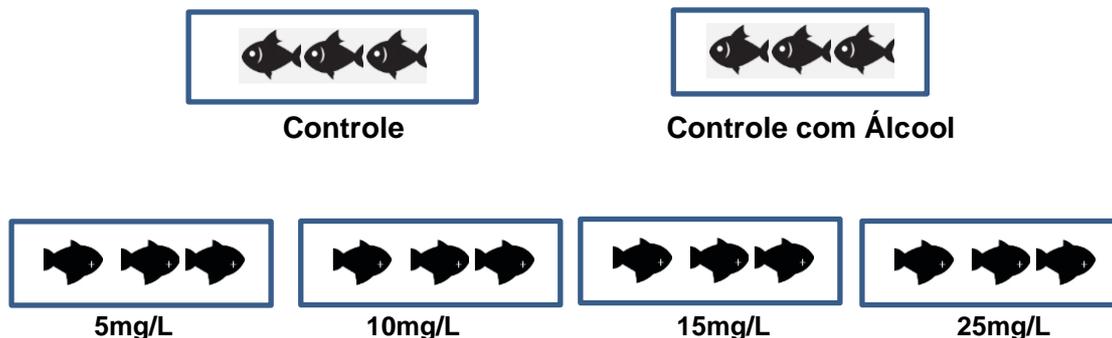


Figura 1. Representação do delineamento do primeiro ensaio

No segundo ensaio utilizou-se cinco concentrações de triclosan, sendo 4mg/L, 3mg/L, 2mg/L, 1mg/L e 0,5 mg/L e dois controles, sendo um com álcool e outro sem álcool (Figura 2).

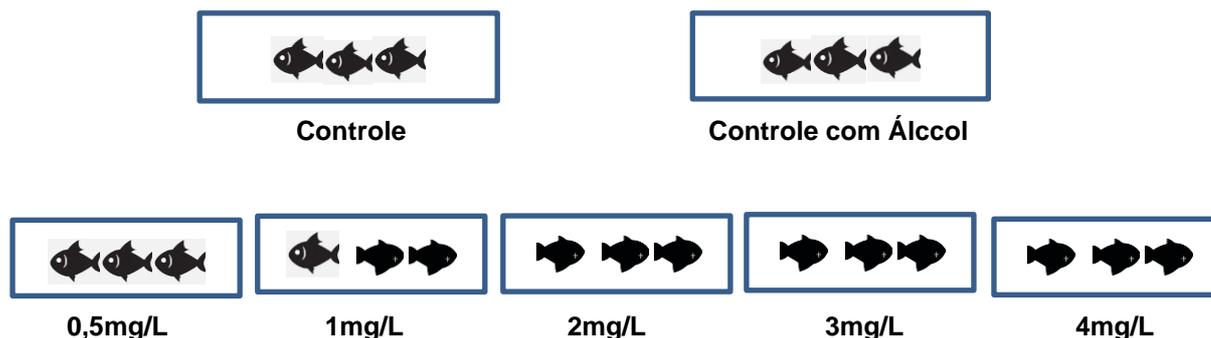


Figura 2. Representação do delineamento do segundo ensaio

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro ensaio observou-se alteração dos peixes logo após a adição do Triclosan na água. Os peixes apresentaram agitação, dificuldade respiratória, espasmos musculares, hemorragias pelo corpo, principalmente nas brânquias, natação errática e rodopios que culminaram na morte de todos os peixes em menos de 30 minutos (Figura 3). Os três peixes do tratamento controle sem álcool e os três do grupo controle com álcool permaneceram vivos sem apresentar nenhum sinal clínico durante todo o experimento.



Figura 3. Lambari apresentando agitação e natação errática no tratamento de 10mg/L

No segundo ensaio observaram-se as mesmas alterações clínicas e a morte de todos os peixes em 30 minutos nos tratamentos de 4 e 3mg/L. Os peixes do tratamento de 2mg/L morreram em um intervalo de 4h, os do tratamento de 1mg/L morreram em um intervalo de 24h com sinais clínicos menos intensos e os três peixes do tratamento de 0,5mg/L permaneceram vivos por 96h, ou seja, até o final do experimento sem apresentar nenhum sinal clínico de intoxicação. Dessa forma pôde-se estabelecer o intervalo de concentrações de 0,5mg/L a 1mg/L para os experimentos subletais com lambaris adultos. No entanto, observa-se a importância de estudos mais específicos e detalhados sobre a toxicologia do triclosan em lambaris e principalmente, os seus efeitos nas diferentes fases de vida do lambari e no ecossistema aquático.

De acordo com Dube e Hosetti (2010), a atividade respiratória dos peixes é uma das primeiras variáveis fisiológicas que é afetada em virtude da contaminação aquática. Consequentemente, parâmetros intimamente associados à demanda respiratória, tais como o consumo de oxigênio, frequência ventilatória e a irritação/lesão branquiais são indicadores sugestivos de intoxicação desses animais e, conseqüentemente, da contaminação da água.

Em estudo conduzido por Martins (2018), avaliaram-se os efeitos do Triclosan sobre a resposta cardiorrespiratória do *Brycon amazonicus*, encontrando resultados semelhantes aos observados neste trabalho. O autor verificou perda de equilíbrio temporária, movimentação lenta ou confusa e olhos com coloração opaca após, aproximadamente 8h de exposição do TCS nas concentrações de 1,3 e 13 mg/L.

Priyatha e Chitra (2018) também descreveram alterações comportamentais semelhantes em *Anabas testudineus* na concentração de 1,4 mg/L; e Çelebi e Gök (2018) observaram que *Danio rerio* e *Poecilia reticulata* quando expostos ao TCS, em diferentes concentrações (0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 mg/L), também relataram mudanças comportamentais do animal, como natação rápida



e descontrolada, movimento errático, muitas vezes tentando escapar do respirômetro, perda de equilíbrio, dificuldade respiratória e produção de muco pelo corpo.

4. CONCLUSÃO

Altas concentrações de resíduos do triclosan na água causaram alterações neurológicas nos lambaris como natação errática e rodopio, além de hemorragias, principalmente nas brânquias. Os lambaris avaliados neste estudo apresentaram comprometimento da sua saúde com sinais clínicos de intoxicação e alta mortalidade.

5. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela bolsa concedida para bolsista Natalia de Souza, à CAPES pela bolsa concedida para mestranda Juliana Gil e ao projeto BRS Aqua pelo apoio financeiro.

6. REFERÊNCIAS

BEEBY, A. What do sentinels stand for? **Environmental Pollution**, v. 112, n. 2, p. 285–298, 2001.

BERTIN, A., INOSTROZA, P. A., QUIÑONES, R. A. A theoretical estimation of the concentration of steroid estrogens in effluents released from municipal sewage treatment plants into aquatic ecosystems of central-southern Chile. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 4965-4971, 2009.

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

CARACCILOLO, A. B.; TOPP, E.; GRENNI, P. Pharmaceuticals in the environment: biodegradation and effects on natural microbial communities. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 106, p. 25–36, 2015.

ÇELEBI, H.; GÖK, O. Effect of triclosan exposure on mortality and behavioral changes of *Poecilia reticulata* and *Danio rerio*. **Human and Ecological Risk Assessment**, v. 24, n. 5, p. 1327–1341, 2018.

CORTEZ, F. S. **Avaliação ecotoxicológica do fármaco Triclosan para invertebrados marinhos**. 2011. 198 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

COSTA, C. R. *et al.* A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, p. 1820-1830, 2008.

DUBE, P. N.; HOSETTI, B. B. Behaviour surveillance and oxygen consumption in the freshwater fish *Labeo rohita* (Hamilton) exposed to sodium cyanide. **Biotechnology in Animal Husbandry**, v. 26, n. 1-2, p 91-103, 2010.



FÁVARO, T. Lambari ganha mercado, na pesca e na mesa: de isca viva a petisco, peixe deixa de ser praga em tanques para se tornar fonte de renda. **Estadão. Suplemento Agrícola**, 15 de maio de 2002.

GARUTTI, V. **Revisão taxonômica dos *Astyanax* (Pisces, Characidae), com mancha umeral ovalada e mancha no pedúnculo caudal, estendendo-se à extremidade dos raios caudais medianos, das bacias do Paraná, São Francisco e Amazônica**. São José do Rio Preto, 286p. 1995. (Tese de Livre-Docência. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

LU, S., ARCHER, M. Fatty acid synthase is a potential molecular target for the chemoprevention of breast cancer. **Carcinogenesis**, v. 26, p. 153–157, 2005.

LYNDALL, J. *et al.* Probabilistic risk evaluation for triclosan in surface water, sediments, and aquatic biota tissues. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 6, n. 3, p. 419–440, 2010.

MARTINS, N.F. **Efeitos do contaminante emergente triclosan sobre a função cardiorespiratória do matrinxã, *Brycon amazonicus*, em normóxia e durante hipóxia gradual**. 2018. 84f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

MATAMOROS, R. *et al.* Preliminary screening of smallscale domestic wastewater treatment systems for removal of pharmaceutical and personal care products. **Water Research**, v. 43, p. 55–62, 2009.

McMURRAY, L.; OETHINGER, M.; LEVU, S. Triclosan targets lipid synthesis. **Nature**, v. 94, p. 531–532, 1998.

PETRIE, B.; BARDEN, R.; KASPRZYK-HORDERN, B. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. **Water Research**, v. 72, p. 3-27, 2015.

PRIYATHA, C. V.; CHITRA, K. C. Acute toxicity of triclosan on the native freshwater fish, *Anabas testudineus* (Bloch, 1792): behavioral alterations and histopathological lesions. **International Journal of Life Science**, v. 6, p. 7, 2018.

SALEH, S. *et al.* Triclosan: an update. **Letters in Applied Microbiology**, v. 52, p. 87–95, 2010.

YOU, L. *et al.* Science of the total environment investigation of pharmaceuticals, personal care products and endocrine disrupting chemicals in a tropical urban catchment and the influence of environmental factors. **Science of the Total Environment**, v. 536, p. 955–963, 2015.