



**CAPTAR**  
ciência e ambiente para todos

volume 1 • número 2 • p 193-204

## Produtos de higiene pessoal: perigo à espreita para o ambiente?

O Triclosão (TCS) é um biocida componente de vários produtos de higiene pessoal (ex. pasta de dentes), sendo descartado juntamente com o efluente doméstico, e chegando às estações de tratamento. Contudo, há estudos que indicam a sua presença em águas superficiais, o que suscita alguma preocupação na comunidade científica, na medida em que os efeitos adversos em ecossistemas aquáticos são ainda parcialmente desconhecidos. Neste estudo, a toxicidade do TCS foi investigada usando o peixe-zebra (*Danio rerio*). Realizaram-se dois testes de toxicidade distintos, um com embriões e larvas e outro com peixes adultos, expondo-os a diferentes concentrações de TCS. Registou-se a sobrevivência e as alterações no comportamento e no desenvolvimento embrionário. A concentração de TCS letal para 50% dos indivíduos expostos ( $CL_{50}$  às 96 horas) foi similar para larvas e adultos (0,42 e 0,34 mg L<sup>-1</sup> respectivamente). No entanto, o teste com embriões mostrou-se muito mais informativo, permitindo assim uma análise integrada e uma melhor perspectiva do modo de acção do TCS. Trabalhos futuros com cenários mais realistas e que estimem os efeitos do TCS a longo prazo são essenciais para uma correcta avaliação de risco ambiental.

### Palavras-chave

triclosão  
peixe-zebra  
embriotoxicidade  
toxicidade aguda  
ecotoxicologia

Rhaul Oliveira<sup>1\*</sup>

Inês Domingues<sup>1</sup>

Cesar Koppe Grisolia<sup>2</sup>

Amadeu MVM Soares<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CESAM e Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

<sup>2</sup>Departamento de Genética e Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília.

\* rhaul.oliveira@ua.pt

## INTRODUÇÃO

Os No dia-a-dia são utilizados diversos produtos de higiene pessoal e do lar tais como detergentes, champôs, desodorizantes, cosméticos, creme para pele, pasta de dentes e sabonetes (Figura 1). No decurso do seu uso estes produtos acabam por ser drenados para o esgoto. Apesar do tratamento dos efluentes, diversos químicos usados na composição dos produtos de higiene são encontrados nos ecossistemas aquáticos e podem pôr em risco organismos aquáticos (Breton e Alistair, 2003).

De acordo com Kolpin et al. (2002), o triclosão (TCS) é um dos químicos mais frequentemente detectado nos efluentes domésticos do EUA. O TCS é um antibacteriano desenvolvido na década de 60 e desde então tem sido utilizado no fabrico de vários produtos de higiene. Na Europa são utilizadas aproximadamente 350 toneladas de TCS e em todo o mundo são produzidas 1,500 toneladas por ano (Singer et al., 2002). Com mais de 30 anos de uso na elaboração de produtos de higiene, actualmente o TCS é empregue na superfície de materiais plásticos e acrílicos, em loções para aplicação na pele e, principalmente, em pasta de dentes (Glaser, 2004). O uso do TCS em produtos de higiene e outros materiais é avaliado e aprovado por autoridades reguladoras na Inglaterra, Canadá, USA, União Europeia e muitos outros países (Dayan, 2007).



FIGURA 1: Produtos de higiene de uso diário que contém triclosão nas suas formulações (url: <http://www.voiceoffreedom.com/archives/health/images/triclosan>).

No entanto, vários estudos apontam os efeitos nefastos do TCS sobre organismos aquáticos, nomeadamente sobre algas, moluscos, crustáceos e peixes (Tabela 1). Reiss et al. (2002) defende que o TCS pode causar graves problemas ao atingir os corpos hídricos pequenos por meio de descargas de efluentes tratados em estações de baixa tecnologia. Neste caso, são observadas mudanças na estrutura da comunidade de algas devido à exposição contínua aos efluentes que contêm o TCS (Wilson, 2006). Os efeitos negativos do TCS sobre as algas causam uma preocupação especial, pois estas, como produtoras primárias, são a base da cadeia alimentar e influenciam todo o ecossistema (Tatarazako et al., 2003).

Recentemente, num estudo realizado por Coogan e La Point, (2008) foi observada a capacidade de algas (*Cladophora* spp.) e caracóis (*Helisoma trivolis*) acumularem nos seus tecidos TCS (bioacumulação). Além deste, outros estudos apontavam já para a existência de bioacumulação de TCS em peixes (Adolfsson-Erici et al., 2002; Balmer et al., 2004). Desta forma, apesar do TCS aparecer em concentrações na água superficial que raramente excedem  $1,55 \mu\text{g L}^{-1}$ , a bioacumulação pode levar ao aumento das doses internas de exposição ao longo da cadeia trófica. Outros estudos mostram ainda que exposição ao TCS acelera a metamorfose em rã (*Rana catesbeiana*) (Veldhoen et al., 2006) e pode masculinizar peixes (Foran et al., 2000).

O peixe-zebra, *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan 1822), é um peixe da família dos ciprinídeos usado como modelo em estudos de desenvolvimento embrionário, fisiologia, genética e toxicologia. É também um organismo modelo na avaliação de risco ecotoxicológico de químicos. Com o objectivo de aprofundar o

conhecimento sobre os efeitos do TCS e seu modo de acção em organismos não alvo<sup>1</sup>, foram realizados vários testes em diferentes estádios de vida do peixe-zebra. Os efeitos da exposição ao TCS foram avaliados através de parâmetros como a mortalidade, o comportamento e o desenvolvimento embrionário. Por fim, foi realizada uma análise comparativa dos parâmetros de ecotoxicidade na tentativa de elucidar o modo de acção do TCS no peixe-zebra e assim, compreender melhor o seu risco para ecossistemas aquáticos.

TABELA I: Efeitos do TCS em diversos organismos aquáticos.

| Espécies                               | Valores de TCS (µg L <sup>-1</sup> ) | Parâmetros avaliados*         | Tempo do teste (dias) | Referências bibliográficas       |
|--|--------------------------------------|-------------------------------|-----------------------|----------------------------------|
| <b>Algas</b>                           |                                      |                               |                       |                                  |
| <i>Anabaena</i>                        | 1,6                                  | CL <sub>50</sub>              | 4                     | (Orvos <i>et al.</i> , 2002)     |
| <i>Closterium ehrenbergii</i>          | 620                                  | <sup>1</sup> CE <sub>50</sub> | 4                     | (Ciniglia <i>et al.</i> , 2005)  |
| <i>Navicula</i>                        | 19,1                                 | CL <sub>50</sub>              | 4                     | (Orvos <i>et al.</i> , 2002)     |
| <i>Scenedesmus subspicatus</i>         | 1,4                                  | CL <sub>50</sub>              | 4                     | (Orvos <i>et al.</i> , 2002)     |
| <i>Selenastrum capricornutum</i>       | 4,46                                 | CL <sub>50</sub>              | 4                     | (Orvos <i>et al.</i> , 2002)     |
| <i>Skeletonema</i>                     | >66                                  | CL <sub>50</sub>              | 4                     | (Orvos <i>et al.</i> , 2002)     |
| <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> | 0,53                                 | <sup>2</sup> CL <sub>50</sub> | 3                     | (Yang <i>et al.</i> , 2008)      |
| <b>Macrófita</b>                       |                                      |                               |                       |                                  |
| <i>Lemna gibba</i>                     | >62,5                                | CL <sub>50</sub>              | 10                    | (Orvos <i>et al.</i> , 2002)     |
| <b>Crustáceos</b>                      |                                      |                               |                       |                                  |
| <i>Ceriodaphnia dubia</i>              | 184,7                                | CE <sub>50</sub>              | 2                     | (Orvos <i>et al.</i> , 2002)     |
| <i>Daphnia magna</i>                   | 343,8                                | CE <sub>50</sub>              | 2                     | (Orvos <i>et al.</i> , 2002)     |
| <i>Hyalella azteca</i>                 | 200                                  | CL <sub>50</sub>              | 10                    | (Dussault <i>et al.</i> , 2008)  |
| <b>Insecto</b>                         |                                      |                               |                       |                                  |
| <i>Chironomus tetans</i>               | 400                                  | CL <sub>50</sub>              | 10                    | (Dussault <i>et al.</i> , 2008)  |
| <b>Molusco</b>                         |                                      |                               |                       |                                  |
| <i>Mytilus galloprovincialis</i>       | ≈2895                                | <sup>3</sup> CE <sub>50</sub> | 30 min                | (Canesi <i>et al.</i> , 2007)    |
| <b>Anfíbios</b>                        |                                      |                               |                       |                                  |
| <i>Bufo americanus</i>                 | 2,3                                  | <sup>4</sup> CEO              | 14                    | (Smith e Burgett, 2005)          |
| <i>Rana pipiens</i>                    | 0,23                                 | <sup>5</sup> CEO              | 14                    | (Fraker e Smith, 2004)           |
| <i>Xenopus laevis</i>                  | 23                                   | <sup>6</sup> CEO              | 14                    | (Fraker e Smith, 2005)           |
| <b>Peixes</b>                          |                                      |                               |                       |                                  |
| <i>Lepomis macrochirus</i>             | 370                                  | CL <sub>50</sub>              | 4                     | (Orvos <i>et al.</i> , 2002)     |
| <i>Oryzias latipes</i>                 | 399                                  | CL <sub>50</sub>              | 4                     | (Ishibashi <i>et al.</i> , 2004) |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i>             | 34,1                                 | <sup>7</sup> CENO             | 61                    | (Orvos <i>et al.</i> , 2002)     |
| <i>Pimephales promelas</i>             | 260                                  | CL <sub>50</sub>              | 4                     | (Orvos <i>et al.</i> , 2002)     |

<sup>1</sup> Efeito observado - Inibição da reprodução assexuada; <sup>2</sup> Efeito observado - Inibição do crescimento; <sup>3</sup> Efeito observado - Desestabilização de membranas lisossomais; <sup>4</sup> Efeito observado - Mortalidade; <sup>5</sup> Efeito observado - Alteração de comportamento; <sup>6</sup> Efeito observado - Mortalidade; <sup>7</sup> Efeito observado - Eclosão e sobrevivência das larvas.

\*Definições:  
**CL<sub>50</sub>** é a concentração que, num dado período de tempo, causa 50% de mortalidade dos organismos teste.  
**CE<sub>50</sub>** é a concentração que causa um determinado efeito subletal (ex. inibição da reprodução e/ou crescimento) a 50% dos organismos.  
**CEO** é a concentração de efeito observado, definida como a menor das concentrações testadas onde se observam efeitos significativos, quando comparados com um controlo sem TCS.  
**CENO** é a concentração de efeito não observado, definida como a concentração testada mais elevada para a qual não se observam quaisquer efeitos significativos, quando comparados com um controlo sem TCS.

<sup>1</sup> Diversos organismos, por prejudicarem as actividades humanas, são sujeitos a controlo através da aplicação de químicos como pesticidas, antibióticos, parasiticidas. Contudo, a utilização desses químicos podem atingir outros organismos de populações naturais que são também sensíveis. Esses seres vivos que sofrem impacto indirecto designam-se de organismos não alvo.



## MATERIAL E MÉTODOS

### Químico

O TCS [Irgasan, 5-Chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenol,  $\geq 97,0\%$  pureza (HPCL)] foi comprado na companhia Sigma – Aldrich.

### Organismo teste

Os peixes e ovos utilizados nos diversos testes deste estudo foram obtidos directamente da cultura estabelecida no Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro ([www.ua.pt/bio](http://www.ua.pt/bio)). Os peixes-zebra são mantidos em água filtrada por carvão activado e membrana de osmose reversa a uma temperatura de  $28,0 \pm 1^\circ\text{C}$ . Periodicamente são adicionados sais minerais à água para manter a condutividade do meio a  $550 \pm 50 \mu\text{S cm}^{-1}$ , pH a  $7,5 \pm 0,5$ . Bombas de oxigenação são utilizadas para manter o conteúdo de oxigénio dissolvido a 95% de saturação. A sala da cultura tem o fotoperíodo controlado de 16 h de luz e 8 h de escuro. Os peixes-zebra não são muito exigentes em termos nutricionais, contudo uma dieta equilibrada é essencial para saúde e obtenção de bons ovos para experimento. Os peixes-zebra adultos são alimentados duas vezes por dia com ração comercial facilmente obtida em lojas de animais (neste caso, ZM 400 Granular). Uma vez por dia os organismos são alimentados com *Artemia salina* cultivada em laboratório ou comprada sob a forma congelada.

Para obtenção dos ovos para testes devem ser preparados aquários de desova com o fundo preenchido por berlines, os quais abrigam os ovos dos adultos que podem comê-los. Cada aquário deve conter a proporção de 1 fêmea para cada 2 machos. As fêmeas que apresentam ventres roliços estão prontas para desovar. A desova ocorre pela manhã com os primeiros raios de luz, após algumas horas os adultos e berlines podem ser retirados com cuidado e os ovos podem ser colectados com auxílio de um coador ou uma pipeta de pasteur. Os peixes-zebra são ovíparos e têm ovos transparentes e esféricos. O tempo de eclosão dos ovos depende da temperatura na qual os ovos estão condicionados. A  $25^\circ\text{C}$  a eclosão ocorre as 48 horas, nas próximas 24 horas os alevins ainda não têm controlo do movimento e alimentam-se do saco vitelino, após esse período podem ser alimentados com *Artemia salina* recém eclodida ou ração comercial em pó.

### Teste com embriões

O ensaio com embriões seguiu o protocolo padrão para avaliação de toxicidade: *Fish Embryo Toxicity - FET - Test* (OECD, 2006). O procedimento seguido para a exposição os ovos de peixe-zebra é descrito na Figura 2.

Os ovos foram recolhidos dos aquários de cruzamento 30 minutos após a desova, lavados, distribuídos imediatamente em placas com solução de reacção, para garantir o início da exposição nos estágios iniciais. Nas horas seguintes os ovos são inspeccionados individualmente no estereomicroscópio (*Stereoscopic Zoom Microscope – SMZ 1500, Nikon Corporation*), sendo descartados os que apresentavam danos ou irregularidades na clivagem<sup>2</sup>. Foram usados 72 ovos por tratamento, distribuídos em microplacas de 24 poços. Em cada poço foram colocados 2 ml de solução teste e um ovo. Foram usados sete tratamentos:

---

<sup>2</sup> Clivagem é o processo de divisão celular que se dá no início do desenvolvimento embrionário, logo após a fertilização do óvulo pelo espermatozóide. Informações e ilustrações da clivagem e das restantes fases do desenvolvimento do peixe-zebra podem ser consultadas on-line no sítio: [http://zfin.org/zf\\_info/zfbook/stages/stages.html](http://zfin.org/zf_info/zfbook/stages/stages.html)

controlo<sup>3</sup>, controlo com solvente<sup>4</sup> (contendo 250  $\mu\text{L L}^{-1}$  de acetona) e as concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 0,7 e 0,9  $\text{mg L}^{-1}$  de TCS. As várias concentrações de TCS foram obtidas por diluições sucessivas de uma solução stock de TCS feita em acetona. O uso do controlo com solvente (acetona) garante que os efeitos encontrados no teste não são causados pelo solvente utilizado. Todas as soluções teste foram feitas em meio sintético com pH de  $7,00 \pm 0,5$  e condutividade de  $500 \pm 50 \mu\text{S cm}^{-1}$

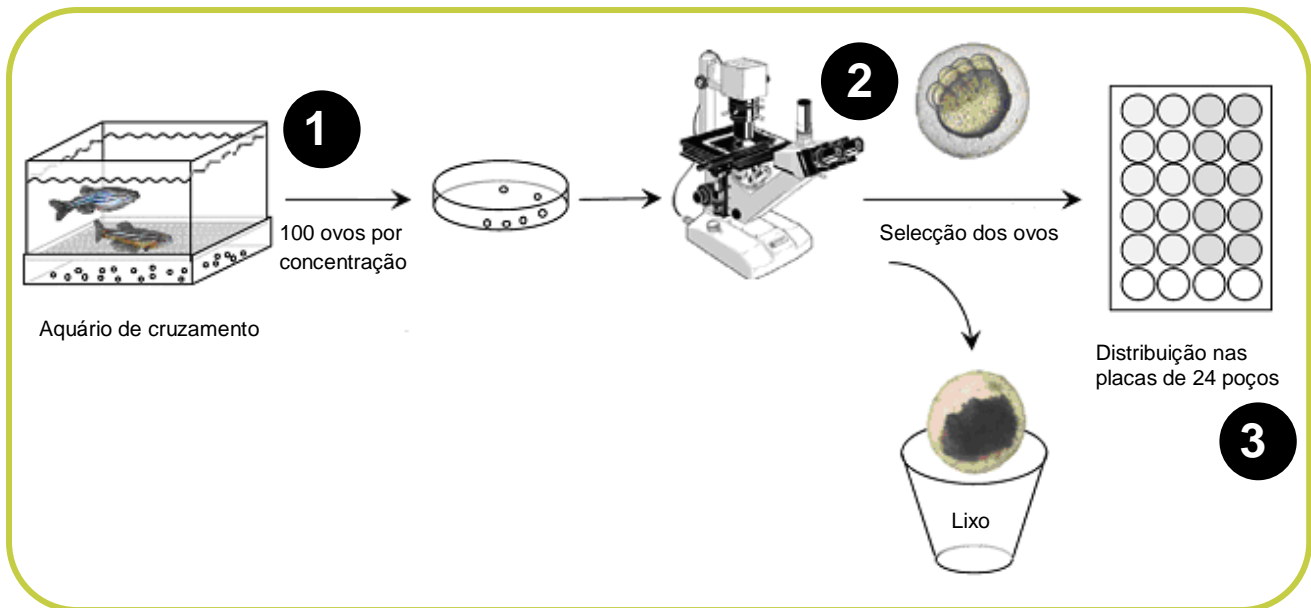


FIGURA 2: Esquema dos testes de toxicidade com embriões de peixe-zebra. Da esquerda para a direita: (1) os ovos são recolhidos dos aquários de cruzamento; (2) Os ovos são seleccionados ao estereomicroscópio e os ovos não fertilizados ou defeituosos são descartados; (3) os ovos são distribuídos em placas de 24 poços. Adaptado de (Lammer et al., 2009).

A temperatura foi mantida a  $28,0 \pm 2^\circ\text{C}$ . Os embriões e larvas foram observados diariamente com a ajuda do estereomicroscópio usando uma ampliação de 70x para ovos e 40x para larvas. O teste teve a duração de seis dias. Na fase de embrião foram avaliados os seguintes parâmetros: coagulação dos ovos, formação do otólito, pigmentação do corpo e olhos, formação dos somitos, batimento cardíaco, separação da cauda do saco vitelino e eclosão. Após a eclosão foram avaliados: edemas, deformações na coluna vertebral e mortalidade das larvas. As estruturas normais de embriões e larvas são descritas na Figura 3.

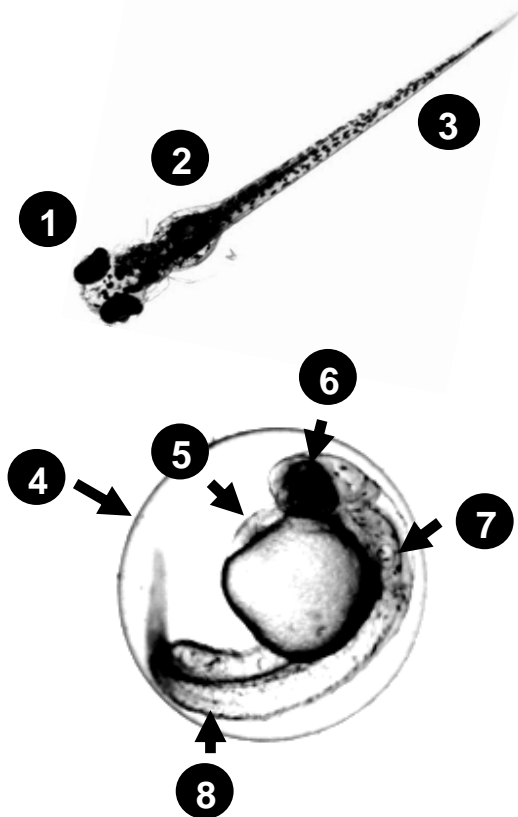
#### Testes com adultos

Os testes com peixes-zebra adultos seguiram o protocolo (OECD, 1992), tendo a duração de 96 h em condições semi-estáticas, ou seja, com renovação do meio para que as concentrações do tóxico e a qualidade da água pudessem ser mantidas. Os adultos de peixe-zebra tinham idade e tamanho similares ( $2,0 \pm 1,0$  cm, 6 meses de idade). Todas as soluções teste contendo TCS foram feitas em meio sintético com pH de  $7,00 \pm 0,5$  e condutividade de  $500 \pm 50 \mu\text{S cm}^{-1}$ . Ao longo do teste, as condições de oxigénio

<sup>3</sup> Controlo é o grupo de organismos seleccionados que estão em contacto somente com o meio sintético das soluções, sem tóxico. Os controlos são mantidos ao longo do ensaio nas mesmas condições dos organismos expostos ao tóxico. No final do teste, a comparação entre os grupos expostos e o controlo permite concluir que os efeitos encontrados são somente devidos à exposição ao tóxico.

<sup>4</sup> Um Controlo solvente é utilizado quando o tóxico testado não é solúvel em água e necessita de um solvente. Neste caso uma solução que contenha a concentração de solvente utilizada é preparada e avaliada ao longo do teste. Assim garante-se que os efeitos encontrados não são devidos ao solvente usado.

dissolvido foram mantidas acima de 80% de saturação, o fotoperíodo usado foi 16 h de luz e 8 h de escuro, e a temperatura foi de  $21,0 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Foram utilizados sete tratamentos: controlo, controlo com solvente e cinco soluções de TCS nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ . Foram utilizados 8 peixes, expostos individualmente, por tratamento. Os peixes não foram alimentados ao longo do teste. A mortalidade foi anotada diariamente.



1. Vista superior dos olhos de uma larva 96 h após a fertilização.
2. Saco vitelino parcialmente absorvido. Este constitui a reserva energética das larvas até que comecem a procurar alimento dois dias depois da eclosão.
3. Cauda da larva vista de cima. Tem um importante papel na natação e equilíbrio das larvas. Defeitos na cauda podem levar a dificuldades na procura de alimento.
4. Córion é a membrana que protege o embrião nos estádios iniciais de desenvolvimento.
5. Coração e pericárdio podem ser vistos com facilidade a partir das 48 h, podendo o batimento cardíaco ser monitorizado.
6. Visão lateral do olho de embrião 48 h após a fertilização. O olho já bem desenvolvido apresenta forte pigmentação.
7. O otólito é uma estrutura similar ao ouvido dos restantes vertebrados. Tem, nos peixes, a função de manter o equilíbrio.
8. Vista lateral da cauda do embrião já bem desenvolvida e separada do saco vitelino.

FIGURA 3: Algumas das estruturas observadas ao longo do desenvolvimento em embriões e larvas de peixe-zebra.

#### Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram utilizados para o cálculo de médias  $\pm$  erros padrão, para o número de animais de cada grupo de tratamento. Para avaliar as diferenças entre os diferentes tratamentos foram efectuadas Análises de Variância (ANOVAs) de uma via ou o teste Kruskal-Wallis (Sigma Stat 3,1 (SPSS, 2004)). No caso de serem detectadas diferenças significativas, os testes Dunnett ou Dunn's foram usados para verificar as diferenças entre os diferentes tratamentos e o controlo. O cálculo dos valores de  $CL_{50}$  às 96 horas foi efectuado recorrendo ao programa MINITAB 13 (Minitab, 2000). Todas as análises estatísticas foram realizadas com um nível de significância de 0,05.



## RESULTADOS

### Embriotoxicidade do TCS

No presente estudo, ovos fertilizados de peixes-zebra foram expostos durante seis dias a várias concentrações de TCS. A Figura 4 mostra a percentagem de ovos inviáveis, embriões e larvas mortas até 96 h do teste. O grupo controlo apresentou baixa mortalidade (8,3% às 96 h) cumprindo os requisitos de validação do teste. O desenvolvimento embrionário do grupo controlo também decorreu normalmente como é descrito por (Kimmel et al., 1995).

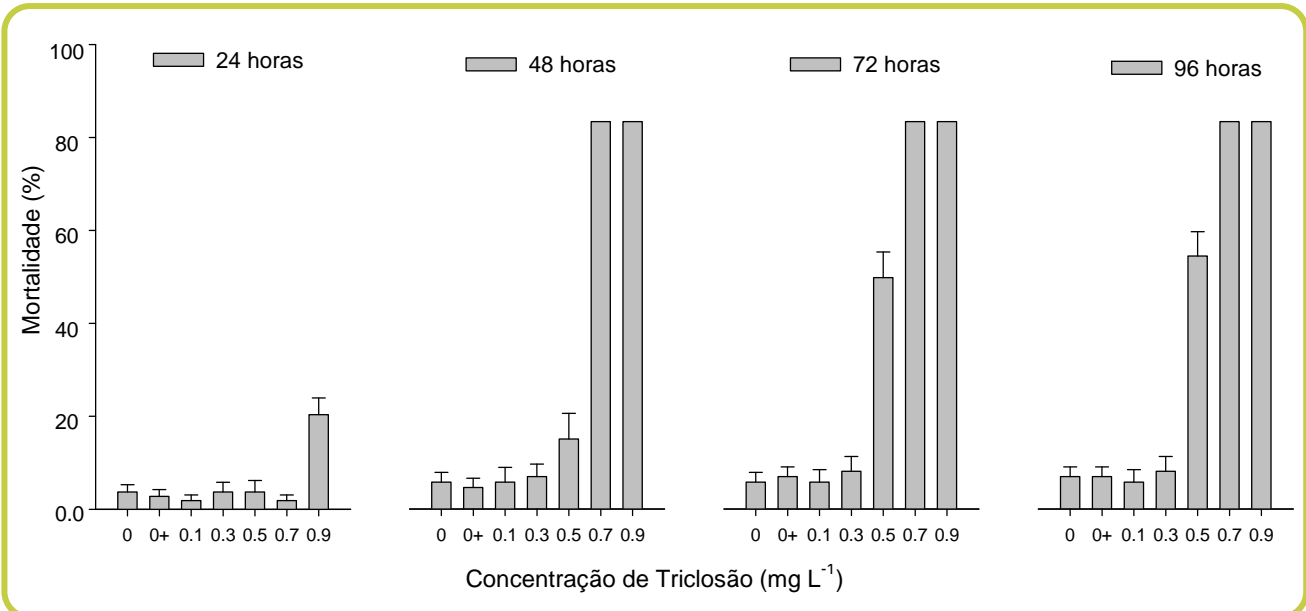


FIGURA 4: Mortalidade dos indivíduos (ovos inviáveis, embriões e larvas) expostos as diversas concentrações de TCS ao longo de 96 horas de exposição (valores médios  $\pm$  erro padrão). "0 +" representa o controlo com o solvente acetona.

O TCS mostrou toxicidade aguda para os embriões e larvas com um  $CL_{50}$  às 96 horas de 0,42  $mg L^{-1}$  (intervalo de confiança a 95% de 0,38 – 0,45  $mg L^{-1}$ ). Nas primeiras 48 h, todos os embriões expostos as concentrações de 0,7 e 0,9  $mg L^{-1}$  estavam mortos, e após 72 h 60% dos embriões expostos a 0,5  $mg L^{-1}$  estavam mortos também (Figura 4).

O TCS também teve efeitos sobre a eclosão dos ovos expostos. A eclosão começa às 48 horas (48% dos embriões estavam eclodidos no controlo) em todas as concentrações com indivíduos vivos excepto na concentração de 0,5  $mg L^{-1}$ . A maioria dos embriões da concentração de 0,5  $mg L^{-1}$  continuaram dentro dos ovos até as 72 horas e somente 9% eclodiram, enquanto nas concentrações mais baixas e controlo quase todos haviam já eclodido (Figura 5). Às 96 horas, o

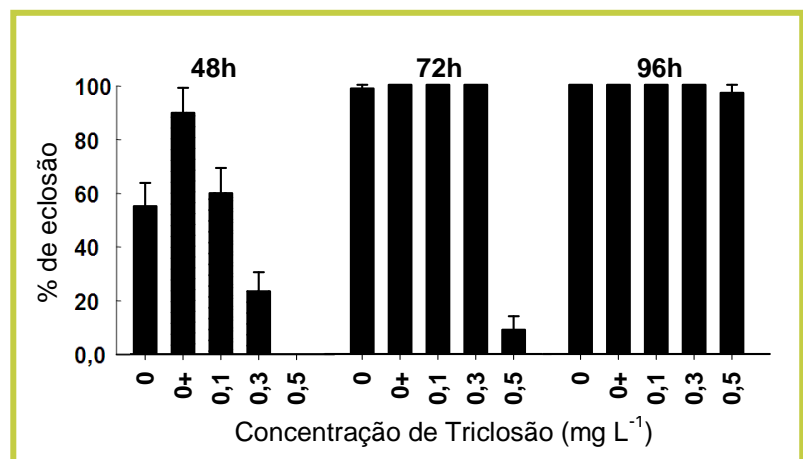


FIGURA 5: Eclosão dos ovos viáveis expostos a TCS ao longo de 96 horas de exposição. Nas concentrações mais altas de 0,9 e 0,7  $mg L^{-1}$  de TCS morreram todos os indivíduos (ver Figura 4). Valores médios  $\pm$  erro padrão. "0 +" Representa o controlo com o solvente acetona.

restante dos embriões eclodiram na concentração de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ , contudo morreram todos no dia seguinte (120 horas, dados não apresentados).

Os parâmetros observados ao longo do desenvolvimento embrionário e larvar (após eclosão) mostraram-se excelentes indicadores da toxicidade do TCS. Na Figura 6 são exemplificadas as principais anomalias no desenvolvimento causadas pelo TCS. Às 24 h no controlo, controlo solvente e na concentração mais baixa de  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ , os embriões tinham um desenvolvimento normal com cabeça, corpo e cauda bem desenvolvidos como é descrito por Kimmel et al. (1995). Nas concentrações restantes foram observados efeitos do TCS, apesar de apenas na concentração de  $0,9 \text{ mg L}^{-1}$  estes serem estatisticamente significativos. Nesta concentração, os embriões apresentavam um considerável atraso no desenvolvimento, nomeadamente a nível dos otólitos, pigmentação do corpo e do olho às 24 h (Figura 6 A). Após 96 h, as larvas expostas a  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de TCS apresentaram anomalias estatisticamente significativas no desenvolvimento, incluindo deformações na coluna vertebral, edemas pericardíacos e também um tamanho corporal diminuído (Figura 6 C).

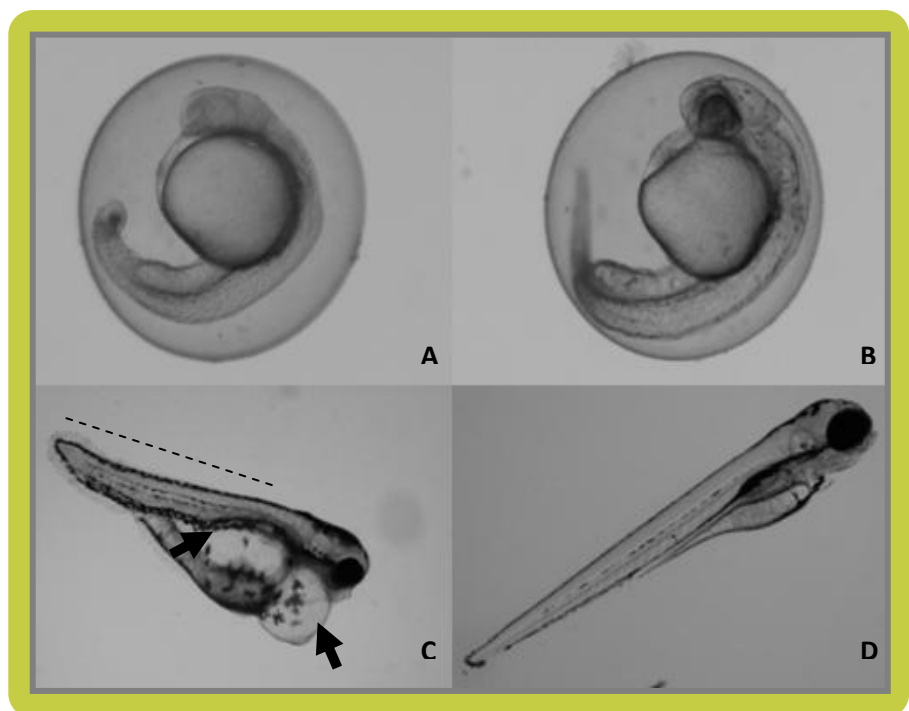


FIGURA 6: Exemplos de anomalias no desenvolvimento embrionário e larvar durante a exposição ao TCS: (A) embrião após 24 h de exposição a  $0,9 \text{ mg L}^{-1}$  de TCS com fraca pigmentação dos olhos e corpo; (B) embrião normal 24 h após a fertilização, com corpo e olho com pigmentação adequada; (C) larva após 96 h de exposição a  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de TCS com tamanho anormal, deformação na coluna vertebral, e edemas pericardíaco e do saco vitelínico; (D) larva normal às 96 h com cauda bem desenvolvida e estrutura corporal normal.

#### Toxicidade do TCS nos peixes-zebra adultos

O valor do  $CL_{50}$  às 96 horas para os peixes-zebra adultos depois de 96 h de exposição ao TCS foi de  $0,34 \text{ mg L}^{-1}$  (Figura 7). Foram também observadas alterações no comportamento dos peixes-zebra ao longo das 96 h de exposição ao TCS, especialmente nas concentrações mais altas nas quais os indivíduos apresentavam natação errática, perda de equilíbrio e movimento anormal do opérculo.

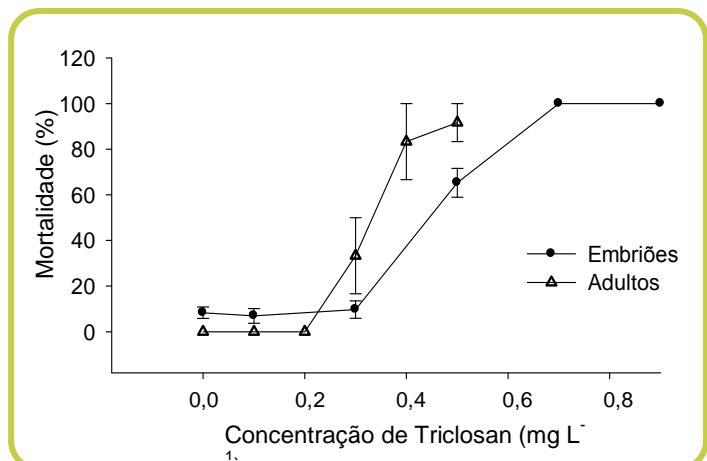


FIGURA 7: Mortalidade de embriões e larvas (círculos) e adultos (triângulos) após 96 h de exposição ao TCS (valores médios  $\pm$  erro padrão).



## POTENCIAL ECOTOXICOLÓGICO

Os produtos de higiene pessoal e do lar são cada vez mais utilizados, e os químicos que estão presentes na sua composição muitas das vezes podem chegar a rios e lagos, afectando os organismos aquáticos através de modos de acção inesperados. Neste estudo, o teste com embriões/larvas de peixe-zebra foi mais informativo que o teste agudo com adultos. A mortalidade dos embriões foi dependente da concentração de TCS e o  $CL_{50}$  às 96 horas de  $0,42 \text{ mg L}^{-1}$  é similar aos valores de  $CL_{50}$  às 96 horas  $=0,40 \text{ mg L}^{-1}$  encontrados por Ishibashi et al. (2004) para embriões do peixe-do-arroz (*Oryzias latipes*). Noutro estudo conduzido por (Orvos et al., 2002), os embriões e larvas da truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) mostraram-se muito mais sensíveis ao TCS registando-se efeitos significativos na sobrevivência a partir de  $0,071 \text{ mg L}^{-1}$  de TCS. Para alguns tóxicos, o córion dos ovos pode agir como uma barreira protectora (Braunbeck et al., 2005). Contudo, a alta mortalidade dos embriões observada neste estudo e nos estudos supracitados sugere que o TCS é incorporado dentro dos ovos, o que pode ser explicado pela sua alta afinidade com lípidos, os principais componentes das membranas biológicas (Hallare et al., 2006).

O tempo de eclosão dos ovos de peixe tem sido largamente usado como um parâmetro nos testes com estádios iniciais de desenvolvimento de peixes. No presente estudo, foi observado um atraso significativo da eclosão, às 48h e 72 horas, nos embriões expostos a  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ . Efeito similar também foi observado por Ishibashi et al. (2004) em *O. latipes* exposto a  $0,31 \text{ mg L}^{-1}$  de TCS. Vários mecanismos podem justificar a falha na eclosão das larvas expostas a TCS, como por exemplo a disfunção da enzima corionase que é necessária para a rompimento do córion, ou o facto de o tóxico ter efeitos demasiado severos sobre o embrião deixando-o inabilitado para romper o córion (Hallare et al., 2005).

Neste estudo, foram observados sérios efeitos do TCS nos estádios iniciais do *D. rerio*. Os resultados indicam alta toxicidade do TCS com efeitos significativo na sobrevivência, desenvolvimento embrionário e eclosão. Não foram encontrados outros estudos na literatura científica que possam corroborar os dados obtidos para as anomalias no desenvolvimento do *D. rerio* observadas neste estudo. Os embriões expostos a  $0,7$  e  $0,9 \text{ mg L}^{-1}$  que apresentaram pigmentação anormal dos olhos e corpo e atraso na formação do otólito morreram às 48 horas. Os embriões expostos a  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  tiveram um atraso significativo na eclosão e apresentaram alta incidência de edemas pericárdiacos e deformações na coluna vertebral, morrendo nas 48 horas subsequentes. O mecanismo de embriotoxicidade do TCS em organismos aquáticos não é conhecido, contudo os edemas pericárdiacos têm sido muitas vezes associados ao vazamento dos vasos endoteliais do pericárdio e podem resultar em disfunções cardiovasculares graves (Hallare et al. 2005). Deformações na coluna vertebral podem estar relacionada com a depleção ou desregulação de iões como cálcio ou fósforo, ou ainda de outras moléculas essenciais para o correcto desenvolvimento do organismo, como a miosina (Muramoto, 1981; Cheng et al., 2000).

A toxicidade do TCS para adultos de peixe-zebra foi também estudada por meio de testes agudos de toxicidade. O  $CL_{50}$  às 96 horas obtido neste estudo ( $0,34 \text{ mg L}^{-1}$ ) foi muito similar aos valores de toxicidade do TCS encontrados por (Orvos et al., 2002) para outros peixes, nomeadamente *Lepomis macrochirus* ( $0,37 \text{ mg L}^{-1}$ ) e *Pimephales promelas* ( $0,26 \text{ mg L}^{-1}$ ). Apesar dos testes de embriões e adultos terem sido conduzidos em diferentes temperaturas, comprometendo uma comparação mais directa entre os valores de  $CL_{50}$  às 96 horas, é assinalável a semelhança entre os valores encontrados ( $0,42$  e  $0,34 \text{ mg L}^{-1}$  para embriões/larvas e adultos, respectivamente; ver Figura 6), sugerindo uma sensibilidade similar entre os

diferentes estádios de vida do peixe-zebra. No entanto, o teste com embriões foi mais informativo, na medida em que permitiu a análise de diversos parâmetros sub-letais como as teratologias<sup>5</sup> e a eclosão, os quais contribuem para entender a toxicidade do TCS para o peixe-zebra. Os parâmetros de ecotoxicidade usados no teste com embriões permitiram uma análise mais completa e integrada dos efeitos do TCS, o que contribuiu para um melhor entendimento do seu modo de acção e potenciais efeitos no ecossistema. Este trabalho vai de encontro a outros estudos recentes que realçam as várias aplicações dos embriões de peixe em estudos ambientais (Scholz et al., 2008), concordando com a actual tendência de substituição do teste com adultos por testes com embriões (Nagel, 2002).



## APLICAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Trabalhos futuros deveriam aprofundar a investigação sobre os modos de acção TCS no peixe-zebra, especialmente nos estádios iniciais de desenvolvimento, nos quais é observada acção teratogénica do TCS. O teste com embriões mostrou-se mais informativo, contribuindo para um melhor entendimento dos possíveis efeitos do TCS em organismos não alvo e, deste modo, permitindo contribuir com maior precisão para a determinação do risco ecológico do TCS. Em trabalhos futuros, o uso de outras técnicas de avaliação ecotoxicológica como biomarcadores e/ou *microarrays* (técnica que permite verificar se os genes são diferencialmente expressos devido à acção de tóxicos) podem ser utilizadas para avaliar os efeitos do TCS no peixe-zebra a nível celular. Os potenciais efeitos adversos do triclosão em ecossistemas aquáticos deveriam ser considerados e a sua inclusão nos produtos de higiene pessoal equacionada para que seja feita apenas nos produtos em que é imprescindível (assim fomentando a sua utilização controlada).

---

**agradecimentos** • Os autores deste trabalho agradecem à Fundação para Ciência e Tecnologia (FCT – Portugal) pelo financiamento da bolsa SFRH/BPD/31752/2006 e à Universidade de Aveiro.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adolfsson-Erici M, Pettersson M, Parkkonen J, Sturve J (2002). Triclosan, a commonly used bactericide found in human milk and in the aquatic environment in Sweden. *Chemosphere* 46: 1485-1489.
- Balmer ME, Poiger T, Droz C, Romanin K, Bergqvist PA, Muller MD, Buser HR (2004). Occurrence of methyl triclosan, a transformation product of the bactericide triclosan, in fish from various lakes in Switzerland. *Environmental Science & Technology* 38: 390-395.
- Braunbeck T, Bottcher M, Hollert H, Kosmehl T, Lammer E, Leist E, Rudolf M, Seitz N (2005). Towards an alternative for the acute fish LC<sub>50</sub> test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species - an update. *Altex-Alternativen zu Tierexperimenten* 22: 87-102.
- Bretona R, Alistair B (2003). Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Regulatory Drivers and Research Needs. *QSAR & Combinatorial Science* 399 - 499.

---

<sup>5</sup> Teratologias são distúrbios, com causa genética ou ambiental, no desenvolvimento embrionário os quais resultam em mal formações dos organismos. Alguns compostos químicos podem induzir o surgimento de teratologias sendo chamados de agente teratogénicos.

- Canesi L, Ciacci C, Lorusso LC, Betti M, Gallo G, Pojana G, Marcomini A (2007). Effects of Triclosan on *Mytilus galloprovincialis* hemocyte function and digestive gland enzyme activities: Possible modes of action on non target organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 145: 464-472.
- Cheng SH, Wai AWK, So CH, Wu RSS (2000). Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 3024-3031.
- Ciniglia C, Cascone C, Lo Giudice R, Pinto G, Pollio A (2005). Application of methods for assessing the geno- and cytotoxicity of Triclosan to *C. ehrenbergii*. *Journal of Hazardous Materials* 122: 227-232.
- Coogan MA, La Point TW (2008). Snail bioaccumulation of triclocarban, triclosan, and methyltriclosan in a North Texas, USA, stream affected by wastewater treatment plant runoff. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27: 1788-1793.
- Dayan AD (2007). Risk assessment of triclosan [Irgasan (R)] in human breast milk. *Food and Chemical Toxicology* 45: 125-129.
- Dussault EB, Balakrishnan VK, Sverko E, Solomon KR, Sibley PK (2008). Toxicity of human pharmaceuticals and personal care products to benthic invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27: 425-432.
- Foran CM, Bennett ER, Benson WH (2000). Developmental evaluation of a potential non-steroidal estrogen: triclosan. *Marine Environmental Research* 50: 153-156.
- Fraker SL, Smith GR (2004). Direct and interactive effects of ecologically relevant concentrations of organic wastewater contaminants on *Rana pipiens* tadpoles. *Environmental Toxicology* 19: 250-256.
- Fraker SL, Smith GR (2005). Effects of two organic wastewater contaminants on *Xenopus laevis* tadpoles. *Applied Herpetology* 2: 381-388.
- Glaser A (2004). The ubiquitous triclosan. *Pesticides and You* 24: 12-17.
- Hallare A, Nagel K, Kohler HR, Triebkorn R (2006). Comparative embryotoxicity and proteotoxicity of three carrier solvents to zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63: 378-388.
- Hallare AV, Schirling M, Luckenbach T, Kohler HR, Triebkorn R (2005). Combined effects of temperature and cadmium on developmental parameters and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Journal of Thermal Biology* 30: 7-17.
- Ishibashi H, Matsumura N, Hirano M, Matsuoka M, Shiratsuchi H, Ishibashi Y, Takao Y, Arizono K (2004). Effects of triclosan on the early life stages and reproduction of medaka *Oryzias latipes* and induction of hepatic vitellogenin. *Aquatic Toxicology* 67: 167-179.
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF (1995). Stages of embryonic-development of the zebrafish. *Developmental Dynamics* 203: 253-310.
- Kolpin DW, F. ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, Buxton HT (2002). Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance. *Environmental Science & Technology* 36: 1202-1211.
- Lammer E, Carr GJ, Wendler K, Rawlings JM, Belanger SE, Braunbeck T (2009). Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 149: 196-209.
- Minitab (2000). Minitab Statistical Software. Minitab Inc., USA, <http://www.minitab.com>.
- Muramoto S (1981). Vertebral column damage and decrease of calcium-concentration in fish exposed experimentally to cadmium. *Environmental Pollution Series a-Ecological and Biological* 24: 125-133.
- Nagel R (2002). DarT: The embryo test with the zebrafish *Danio rerio* -a general model in ecotoxicology and toxicology. *Altex-Alternativen zu Tierexperimenten* 19: 38-48.
- OECD (1992). Fish Acute Toxicity Test. Organization for Economic Co-Operation and Development, Paris.
- OECD (2006). Fish Embryo Toxicity Test. Organization for Economic Co-Operation and Development, Paris.
- Orvos DR, Versteeg DJ, Inauen J, Capdevielle M, Rodethenstein A, cunningham V (2002). Aquatic toxicity of triclosan. *Environmental Toxicology Chemistry* 21: 1338-1349.

- Reiss R, Mackay N, Habig C, Griffin J (2002). An ecological risk assessment for triclosan in lotic systems following discharge from wastewater treatment plants in the United States. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 2483-2492.
- Scholz S, Fischer S, Gundel U, Kuster E, Luckenbach T, Voelker D (2008). The zebrafish embryo model in environmental risk assessment - applications beyond acute toxicity testing. *Environmental Science and Pollution Research* 15: 394-404.
- Singer H, Müller S, Tixier C, Pillonel L (2002). Triclosan: occurrence and fate of a widely used biocide in the aquatic environment: field measurements in wastewater treatment plants, surface waters, and lake sediments. *Environmental Science & Technology* 36: 4998-5004.
- Smith GR, Burgett AA (2005). Effects of three organic wastewater contaminants on American toad, *Bufo americanus*, tadpoles. *Ecotoxicology* 14: 477-482.
- SPSS (2004). Sigma Stat for Windows (version 3.10). SPSS Inc., Chicago.
- Tatarazako N, Ishibashi H, Teshima K, Kishi K, Arizono K (2003). Effects of triclosan on various aquatic organisms. *Environmental Science & Technology* 11: 133-140.
- Veldhoen N, Skirrow RC, Osachoff H, Wigmore H, Clapson DJ, Gunderson MP, Van Aggelen G, Helbing CC (2006). The bactericidal agent triclosan modulates thyroid hormone-associated gene expression and disrupts postembryonic anuran development. *Aquatic Toxicology* 80: 217-227.
- Wilson B (2006). The effects of acute exposure to Triclosan on estuarine algal communities. *Integrative and Comparative Biology* 46: E266-E266.
- Yang LH, Ying GG, Su HC, Stauber JL, Adams MS, Binet MT (2008). Growth-inhibiting effects of 12 antibacterial agents and their mixtures on the freshwater microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27: 1201-1208.