

Avaliação da genotoxicidade do triclocarban usando o ensaio cometa em *Daphnia magna*

Evaluation of genotoxic effects of triclocarban by using comet assay in *Daphnia magna*

RESUMO

O triclocarban (TCC) é um contaminante emergente presente em diversos produtos de higiene pessoal, como sabonetes, xampus, cremes, etc. O uso destes produtos gera um aporte desse composto no ambiente aquático, podendo ser encontrado em concentrações que variam de ng L^{-1} e $\mu\text{g L}^{-1}$. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial genotóxico do poluente prioritário TCC através do ensaio cometa com *Daphnia magna*. O ensaio cometa foi realizado segundo metodologia descrita por Singh, com modificações. Os neonatos foram expostos por 48 h à solução de TCC ($6,3 \mu\text{g L}^{-1}$), controle negativo (água de diluição) e controle de solvente (DMSO 0,03%). Os organismos foram homogeneizados, transferidos para lâminas e foi realizada a eletroforese alcalina. As lâminas foram analisadas em microscópio de epifluorescência em relação ao nível dos danos no DNA. As análises estatísticas, não revelaram efeito significativo da amostra de TCC em relação ao controle. Porém, os escores obtidos para o TCC e DMSO foram maiores do que do controle negativo.

PALAVRAS-CHAVE: Contaminante emergente. Material genético. Poluentes prioritários.

ABSTRACT

Triclocarban (TCC) is an emerging contaminant present in various personal care products such as soaps, shampoos, creams, etc. The use of these products generates a contribution of this compound in the aquatic environment and can be found in concentrations ranging from ng L^{-1} and $\mu\text{g L}^{-1}$. The aim of the present study was to evaluate the genotoxic potential of the TCC priority pollutant using comet assay with *Daphnia magna*. The comet assay was performed according to the methodology described by Singh, with modifications. Newborns were exposed for 48 h to TCC solution ($6,3 \mu\text{g L}^{-1}$), negative control (dilution water) and solvent control (DMSO 0,03%). The organisms was homogenized and transferred to slides. Afterwards, alkaline electrophoresis is performed. The slides were analyzed by epifluorescence microscope for the level of DNA damage. Statistical analyzes did not reveal significant effect of TCC in relation to control. However, the scores obtained for TCC and DMSO were higher than the negative control.

KEYWORDS: Emerging contaminant. Genetic material. Priority pollutants.

Renan César Munhoz
Renan_tzy@hotmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

Adriane Martins de Freitas
Afreitas_27@yahoo.com.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

Direito autorial: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.

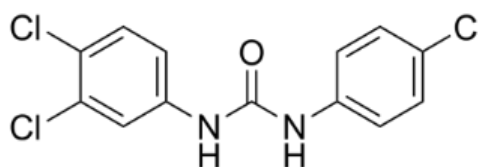


INTRODUÇÃO

A crescente demanda por novos compostos com diferentes funções e o conseqüente aporte destas substâncias nas matrizes ambientais fez com que uma nova classe de contaminantes surgisse, os contaminantes emergentes. Alguns dos contaminantes emergentes são encontrados em produtos de higiene pessoal (PCPs) utilizados diariamente pela população dentre eles pastas de dentes, sabonetes e cosméticos em geral.

O triclocarban (TCC, Figura 1) é uma bifenila policlorada presente em produtos de higiene pessoal, como sabonetes, cremes, etc. Também presente em diversos fármacos devido a sua ação biocida, atuando no combate de bactérias e fungos, sendo usado principalmente como conservante.

Figura 1 – Molécula de triclocarban.



Fonte: Do próprio autor.

Diversos estudos destacam a presença do TCC em diversas matrizes ambientais. No ambiente aquático esse composto é frequentemente encontrado em rios e sedimentos, principalmente próximo a ambientes urbanos, onde a sua concentração varia de ng L^{-1} e $\mu\text{g L}^{-1}$.

O TCC causa preocupação em relação aos produtos da sua degradação podendo gerar clorobenzenos e cloroanilinas. Esses compostos, mesmo em baixas concentrações, podem causar interferência endócrina, gerando problemas de desenvolvimento metabolismo, comportamento e afetando taxas de reprodução dos organismos expostos.

Estudos ecotoxicológicos têm sido utilizados para verificar efeitos tóxicos em organismos aquáticos. A *Daphnia magna*, microcrustáceo com reprodução assexuada e sensível a uma grande gama de substâncias tóxicas é um exemplo destes organismos. Essa avaliação pode ser realizada através da realização de bioensaios utilizando análises de biomarcadores.

Zagatto (2006, p. 464) define biomarcadores como “[...] respostas bioquímicas, fisiológicas ou parâmetros morfológicos alterados, causados pela exposição de um organismo a uma determinada substância possivelmente tóxica”.

O ensaio cometa é um biomarcador genético, rápido e sensível, que visa detectar danos no DNA de células individuais expostas a agentes genotóxicos.

O objetivo do presente trabalho é analisar a genotoxicidade do composto triclocarban utilizando o ensaio cometa como biomarcador genético expondo neonatos de *D. magna* em sua maior concentração ambiental encontrada na literatura.

MATERIAIS E MÉTODOS

CULTIVO E MANEJO DE *Daphnia magna*

O cultivo de *D. magna* foi mantido segundo a norma NBR 12713/2016. Os neonatos das culturas-estoque de *D. magna* foram cultivados em grupos de 50 indivíduos por béquer (2.000 mL) contendo aproximadamente 2 litros de água de cultivo (meio de cultivo M4), preparado e mantido no Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Os lotes foram mantidos em câmara de incubação, tipo BOD, com controle de temperatura ($20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), com luminosidade de 1.000 lux e fotoperíodo de 16 horas de luz. A alimentação foi realizada diariamente com uma suspensão de células de alga da espécie *Desmodesmus subspicatus*, na concentração de 5×10^6 células de alga por *Daphnia*, aproximadamente 0,25 mL de suspensão por organismo, uma vez ao dia.

ENSAIO COMETA COM *Daphnia magna*

O ensaio cometa foi realizado expondo 30 neonatos de *D. magna* em duplicata por 48 horas à solução de triclocarban na concentração ambiental ($6,3\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$), ao controle negativo (água de diluição), controle de solvente (DMSO 0,03%) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , $20\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$) que foi testado como controle positivo.

A técnica utilizada para o ensaio cometa foi descrita por Singh et al. (1988), com alterações. Após o tempo de exposição, 30 neonatos de cada amostra foram homogeneizados utilizando um homogeneizador rotativo de tecidos em microtubos de centrifugação contendo 200 μL de tampão PBS (pH 7,4). Através da homogeneização obtém-se a suspensão celular.

Em microtubos limpos, foram adicionados 80 μL de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) 0,05% e 30 μL de suspensão celular. A suspensão foi adicionada sobre as lâminas previamente cobertas com agarose 1,5%, recobertas com uma lamínula e acondicionadas na geladeira ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) por 25 minutos. Para cada concentração testada, foram obtidas seis lâminas.

Em seguida, foram retiradas as lamínulas e as lâminas foram mantidas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris) em uma cubeta e acondicionada na geladeira ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante dois dias para a remoção dos conteúdos celulares e exposição do material genético.

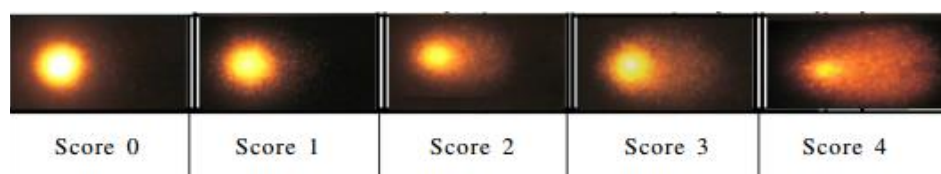
As lâminas foram retiradas da cubeta cuidadosamente e colocadas em uma cuba de eletroforese e imersas em uma solução tampão de eletroforese (NaOH 300 mM e EDTA 200 mM) pH > 13. Após a adição da solução tampão, as lâminas permaneceram por 30 minutos. Passados os 30 minutos, foi realizada a corrida eletroforética por 35 minutos, a 25 V e 300 mA, para ocorrer a migração do material genético. Todo o procedimento foi realizado com a ausência de luz.

Após a eletroforese as lâminas foram neutralizadas com solução tampão Tris (pH 7,5) e fixadas com etanol para posterior análise.

A análise foi realizada em microscópio de epifluorescência LEICA DMLS, com aumento de 400x. Foram utilizados 25 µL de brometo de etídio (20 µL mL⁻¹) sob as lâminas como corante para a análise.

A quantificação dos danos foi realizada visualmente, com a análise de 100 nucleóides por lâmina e atribuídos escores a esses danos (Figura 2).

Figura 2 – Classificação dos escores dos danos ao material genético.



Fonte: Silva (2012).

Após quantificação de danos de todas as lâminas foi realizado o cálculo do *score* de cada lâmina (Equação 1).

$$SCORE = (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4) \quad (1)$$

Onde, n_1 a n_4 é o número de cometas em cada uma das classes 1 a 4. Após a contabilização dos *scores* foi realizada análise estatística de Kruskal-Wallis com auxílio do programa BioEstat® 5.0 para verificar as diferenças significativas entre os grupos estudados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ensaio cometa tem um importante papel na avaliação da genotoxicidade, pois se trata de um ensaio capaz de detectar danos e quebras na molécula de DNA provocados por compostos.

Com o cálculo dos escores, foi obtida a mediana de cada grupo exposto. Os escores de cada lâmina analisada e respectiva mediana das amostras estão apresentados na Tabela 1.

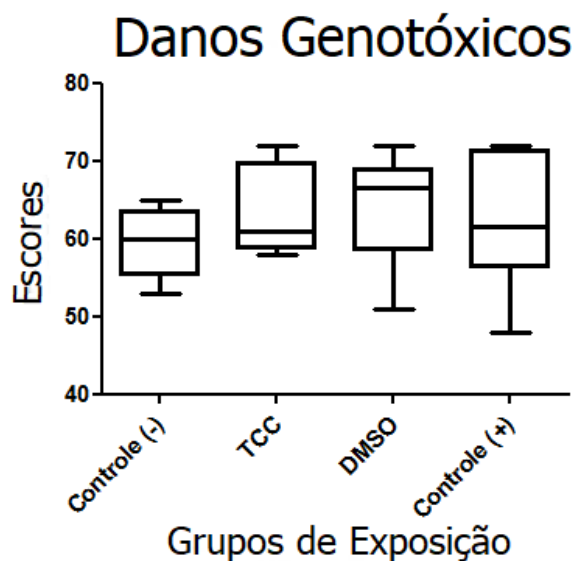
Tabela 1. Escores (por lâmina analisada) e mediana de cada amostra.

Amostras	Escores						Mediana
Controle (-)	65	56	53	60	63	60	60,00
TCC	59	59	58	63	69	72	61,00
DMSO	72	61	67	51	66	68	66,50
Controle (+)	64	48	57	59	71	62	60,50

Fonte: do próprio autor.

A partir do teste não paramétrico Kruskal-Wallis, que é utilizado para comparar duas ou mais amostras independentes de tamanhos iguais ou diferentes. As amostras de triclocarban utilizando sua concentração ambiental de $6,3 \mu\text{g L}^{-1}$ e do controle de solvente (DMSO 0,03%) não apresentaram efeito significativo em relação ao controle negativo ($p < 0,05$), as medianas são apresentadas na figura 3 a partir de um gráfico Box-plot.

Figura 3 – Gráfico dos escores dos danos ao DNA em *D. magna* para o controle negativo, triclocarban, controle de solvente (DMSO) e controle positivo.



Fonte: do próprio autor.

Porém, ao analisar os escores e as medianas, o TCC e o DMSO apresentaram valores maiores em relação ao controle negativo.

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é utilizado como controle positivo em ensaio cometa expondo raízes de propágulos de *Rhizophora mangle*, e neste estudo foi testado como controle positivo expondo neonatos de *D. magna*. O uso do peróxido de hidrogênio ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) como controle positivo para o ensaio cometa utilizando *D. magna* não se mostrou eficiente. Através do teste não paramétrico Kruskal-Wallis a amostra de peróxido de hidrogênio não apresentou efeito significativo em relação ao controle negativo ($p < 0,05$).

CONCLUSÃO

No presente estudo, através do ensaio cometa utilizando a eletroforese alcalina, o composto triclocarban não apresentou efeito significativo utilizando o teste não paramétrico Kruskal-Wallis em sua concentração ambiental ($6,3 \mu\text{g L}^{-1}$), assim como o controle de solvente (DMSO 0,03%). A utilização do peróxido de hidrogênio ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) como controle positivo para o ensaio cometa utilizando *Daphnia magna* não se mostrou eficiente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) campus Curitiba, pela oportunidade de realizar a pesquisa no Laboratório de Ecotoxicologia e ao LAMEAA. Agradeço também a minha orientadora e todo o grupo do laboratório, amigos e familiares.

REFERÊNCIAS

HALDEN, R.; PAULL, D. H. Analysis of triclocaban in Aquatic Samples by Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Environmental Science and Technology**. v. 38, 2004.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática – Princípios e Aplicações**. Editora Rima, São Carlos. p. 464, 2006.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12713: **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda** – Método de ensaio com *Daphnia spp* (Crustacea, Cladocera), Rio de Janeiro, 2009.

HALDEN, R. & PAULL, D. . Co-Ocurrence of Triclocarban and Triclosan in U.S. Water Resources. **Environmental science & technology**. v. 39, 2005.

SINGH, N. P.; MACCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**. v. 175, p. 184-191, 1988.

KNAPIK, L. Ecotoxicidade do inseticida malathion e seus efeitos sobre biomarcador genético ensaio cometa em *Daphnia magna*. 43 f. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba 2017.

SILVA, P. S. Avaliação da toxicidade e genotoxicidade das águas do rio criciúma (sc) utilizando como organismos bioindicadores *Artemia sp.*, *Daphnia magna* e *Allium cepa*. Trabalho de Conclusão de Curso, Ciências Biológicas UNESC, 2008.

PARRELLA, A.; LAVORGNA, M.; CRISCUOLO, E.; RUSSO, C.; ISIDORI, M. Ecogenotoxicity of six anticancer drugs using comet assay in daphnids. **Journal of Hazardous Materials**. v. 286, p. 573-580, 2015.