

Avaliação da genotoxicidade de triclosan e triclocarban usando ensaio com *Allium cepa*

Evaluation of genotoxic effects of triclosan and triclocarban by using the *Allium cepa* assay

RESUMO

O Brasil está entre os 4 países que mais consomem produtos de higiene pessoal e cosméticos. Devido à alta demanda há um crescente aumento de novos produtos para atrair os consumidores e uma gama de resíduos são lançados em matrizes ambientais. O triclosan (TCS) e o triclocarban (TCC) são contaminantes emergentes pertencentes à classe das bifenilas policloradas e devido sua ação biocida e fungicida são amplamente utilizados na indústria como agentes conservantes. O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial genotóxico e mutagênico do triclosan e triclocarban usando ensaio com *Allium cepa* (cebola). A metodologia utilizada foi descrita por Guerra e Souza (2002), com modificações. Triclosan e triclocarban foram avaliados em concentrações ambientais (TCS 2,5 µg L⁻¹ e TCC 6,3 µg L⁻¹, ambos apresentaram potencial genotóxico.

PALAVRAS-CHAVE: Contaminantes emergentes. Ecotoxicidade. DNA.

Fernanda dos Santos
Santosf.2015@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná,
Curitiba, Paraná, Brasil

Adriane Martins de Freitas

Universidade Tecnológica Federal do Paraná,
Curitiba, Paraná, Brasil

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

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



ABSTRACT

Brazil is among the 4 countries that most consume toiletries and cosmetics. Due to the high demand there is a growing increase of new products to attract consumers and a range of waste are thrown into environmental matrices. Triclosan (TCS) and triclocarban (TCC) are emerging contaminants belonging to the polychlorinated biphenyl class and due to their biocidal and fungicidal action are widely used in the industry as preservatives [TCC and TCS emerging contaminants, environmental concentration range, prod hygiene personal, biocides / preservatives; genotoxic potential] The aim of the present study was to evaluate the genotoxic and mutagenic potential of triclosan and triclocarban using *Allium cepa* (onion) assay. The methodology used was described by Guerra and Souza (2002), with modifications. Triclosan and triclocarban were evaluated at environmental concentrations (TCS 2.5 µg L⁻¹ and TCC 6.3 µg L⁻¹, both had genotoxic potential.

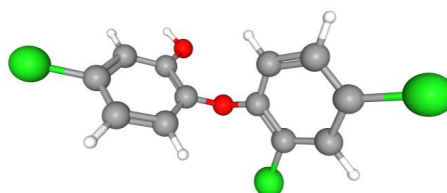
KEYWORDS: Emerging contaminants. Ecotoxicity. DNA

INTRODUÇÃO

Segundo a Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC) o Brasil ocupa o 4º lugar no ranking mundial de consumo de produtos de higiene pessoal e cosméticos. O setor está em constante crescimento e a cada dia surgem novos produtos para atrair ainda mais o consumidor [1]. Devido a esse crescimento ocorre também um aumento na quantidade de substâncias presentes em fármacos, cosméticos e produtos de higiene pessoal lançados no meio ambiente e faz-se necessários estudos de qualidade ambiental e monitoramento para apresentar informações relacionadas aos impactos que essas substâncias oferecem ao meio ambiente.

O Triclosan (TCS) e o Triclocarban (TCC) são substâncias pertencentes a classe da bifenilas policloradas (PCB's), são amplamente utilizadas em produtos de higiene pessoal e cosméticos devido sua ação fungicida e bactericida. O TCS, também conhecido como 5-Cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol, é classificado como um hidrocarboneto aromático halogenado contendo grupos fenol, eter difenílico e policlorados funcionais (Figura 1) [2] e [3], que age interrompendo a função da membrana celular bacteriana, a síntese de lipídeos e fosfolipídeos [4].

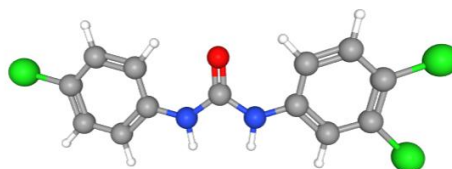
Figura 1. Estrutura 3D do Triclosan



Fonte: National Center for Biotechnology Information

O TCC, também conhecido como 3-(4-Clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)ureia (Figura 2) possui ação semelhante ao TCS e assim como ele, em 2017 foi banido dos produtos de higiene pessoal pela FDA, sendo necessária a revisão dos produtos antes de chegarem ao mercado [5] e [6].

Figura 2. Estrutura 3D do Triclocarban



Fonte: National Center for Biotechnology Information

Devido a presença de triclosan e triclocarban em matrizes ambientais e a escassez de estudos relacionados aos efeitos desses compostos no ambiente, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos genotóxicos e mutagênicos do TCS e TCC utilizando o ensaio com *A. cepa*.

METODOLOGIA

Os agentes teste utilizados foram triclosan e triclocarban (padrão farmacêutico secundário – Sigma-Aldrich). Devido à baixa solubilidade em água, as soluções-estoque foram preparadas utilizando dimetil sulfoxido (DMSO) para a solubilização (200 mg L⁻¹ para TCS e 400 mg L⁻¹ para TCC). As soluções estoque foram mantidas em geladeira em frasco âmbar para evitar a degradação dos compostos. As concentrações utilizadas nos ensaios com *A. cepa* corresponderam a concentrações ambientais descritas na literatura TCS 2,5 µg L⁻¹ [7] e TCC 6,3 µg L⁻¹ [8].

Para o ensaio foi utilizada a metodologia descrita por Guerra e Souza (2002) [9] com modificações. Foram utilizadas sementes comerciais da espécie *Baia Periforme*, da marca ISLA PAK, com índice de germinação de 94%, livre de defensivos. As sementes (18 sementes) foram distribuídas em placas de Petri, sobre papel-filtro embebido com as soluções de TCS e TCC (5mL), com água processada por osmose reversa (controle negativo) e solução com 0,03% de DMSO (controle de solvente). As placas foram envolvidas com papel filme e incubadas em B.O.D a 25°C até que as raízes atingissem aproximadamente 2 cm de comprimento. Após o período de crescimento as raízes foram coletadas com o auxílio de uma pinça e fixadas em Carnoy 3:1 recém preparado (3 partes de álcool para 1 de ácido acético) por 6 h em temperatura ambiente. Em seguida as raízes foram lavadas com água de osmose por 5 min em três repetições, e transferidos para frascos contendo HCl 1 N previamente estabilizados em banho-maria a 60°C, a hidrólise foi interrompida após 9 min com o auxílio de água de osmose. Após a lavagem as raízes foram transferidas para frascos âmbar contendo reativo de Schiff por 2 horas em local escuro. Sobre uma lâmina limpa e identificada foi colocada uma raiz e com o auxílio de uma navalha cortou-se a região meristemática (extremidade da raiz), o restante da raiz foi descartado, adicionou-se uma gota de carmim acético 2% sobre a região meristemática e cobriu-a com uma lamínula previamente limpa, foram confeccionadas 10 lâminas por tratamento. A fixação das lâminas foi realizada utilizando nitrogênio líquido, as lâminas foram mergulhadas por 15 segundos e com o auxílio de uma gilete retirou-se a lamínula. As lâminas foram deixadas em temperatura ambiente para secar, após a secagem foi colocado sobre a lâmina uma gota de bálsamo do Canadá, a lâmina foi recoberta com uma lamínula previamente limpa e deixou-se secar por 24 h.

A análise das lâminas foi realizada utilizando microscópio de luz com a objetiva de 40x, com o auxílio de um contador foram analisadas 500 células por lâmina, resultando em 5000 células por tratamento. Inicialmente foi contabilizado o número total de células; em seguida foi identificado e contabilizado as células em intérfase e em processo de divisão celular mitótica e por fim foram identificadas e contabilizadas células portadoras de anomalias.

Para o cálculo da porcentagem do índice mitótico foram contabilizadas as células em divisão e foi feita uma relação entre o número de células em divisão (NCD) e o número de células observadas (NCO), como mostra a equação (1).

$$IM = \frac{NCD}{NCO} \times 100 \quad (1)$$

O mesmo foi feito para o cálculo do efeito clastogênico, efeito aneugênico e micronúcleo. Para o efeito clastogênico, descrito na equação (2), foram somados o número de células que apresentaram quebra e/ou ponte cromossômica e foi feita a relação de células que apresentaram dano por número de células observadas.

$$EC = \frac{\sum \text{quebrae ponte}}{NCO} \times 100 \quad (2)$$

Para o efeito aneugênico, descrito na equação (3), foram somados o número de células que apresentaram dano aneugênico devido a perda, atraso, aderência ou broto e foi feita a relação de células que apresentaram dano por número de células observadas.

$$EA = \frac{\sum CDA}{NCO} \times 100 \quad (3)$$

E para o cálculo do índice mutagênico foram contabilizadas as células com micronúcleos e feita a relação por número de células observadas, descrito na equação (4).

$$IMut = \frac{NMN}{NCO} \times 100 \quad (4)$$

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados observados após a avaliação da genotoxicidade do TCS e TCC encontram-se na tabela 1. A figura 3 ilustra alguns danos encontrados durante a análise.

Tabela 1. Índice mitótico (IM), efeito clastogênico (EC), efeito aneugênico (EA) e micronúcleo (MN) analisados em raízes meristemáticas de *Allium cepa*.

AMOSTRA	IM (%)	EC	EA	MN
Controle negativo	20,27 ± 6,08	0,28 ± 0,59	0,80 ± 0,64	0,00 ± 0,31
DMSO 0,03%	22,74 ± 7,11	0,19 ± 0,25	0,29 ± 0,46	0,00 ± 0,27
TCS	38,50 ± 10,10	0,68 ± 0,87	0,99 ± 0,57	0,08 ± 0,26
TCC	41,17 ± 4,89	0,80 ± 0,87	1,21 ± 0,54	0,44 ± 1,64

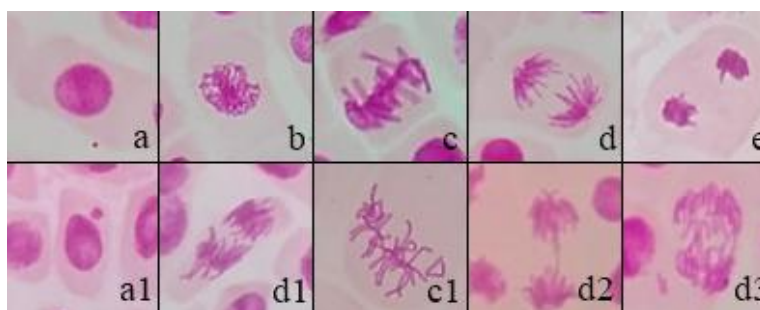
Fonte: Autoria própria

As amostras apresentaram variação significativa das médias com relação ao controle negativo segundo o teste estatístico de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$) para o índice mitótico, efeito clastogênico e efeito aneugênico. As amostras não apresentaram variação significativa das médias com relação ao controle negativo segundo o teste estatístico Kruskal-Wallis para a análise de micronúcleos.

O índice mitótico nos mostra o número de células em divisão e serve como parâmetro para avaliação citotóxica dos compostos, a desregulação da proliferação celular leva a erros na transcrição e síntese do DNA, é possível observar o potencial citotóxico do TCC e do TCS.

O efeito clastogênico está relacionado a anormalidades que mudam a estrutura dos cromossomos, sem alterar a quantidade de cromossomos. Dentre os efeitos clastogênicos podemos destacar pontes cromossômicas e quebras cromossômicas. O efeito aneugênico está relacionado com anormalidades que alteram a quantidade de cromossomos, como perda, brotos, atrasos e aderências. Os danos clastogênicos e aneugênicos podem levar a formação de micronúcleos, dessa forma um aumento no efeito clastogênico e aneugênico causado por um contaminante pode levar a um aumento no seu potencial mutagênico.

Figura 3. Células meristemáticas da raiz de *Allium cepa*. a. Interfase normal; a1. Interfase com micronúcleo; b. Prófase normal; c. Metáfase normal; c1. Metáfase com perda cromossômica; d. Anáfase normal; d1. Anáfase com atraso; d2. Anáfase com ponte cromossômica; d3. Anáfase com quebra cromossômica; e. Telófase normal



Fonte: Autoria própria

CONCLUSÕES

Através do estudo realizado foi possível observar uma variação significativa com relação ao controle negativo para índice mitótico do TSC $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ e TCC $6,3 \mu\text{g L}^{-1}$, sendo que o TCC apresentou o maior índice mitótico. Os efeitos aneugênicos e clastogênicos dos compostos estudados também apresentaram variação significativa com relação ao controle negativo, indicando o potencial genotóxico do TCS e TCC. Os compostos estudados não apresentaram potencial mutagênico de acordo com a análise de micronúcleos encontrados em células meristemáticas de *A. cepa*.

REFERÊNCIAS

[1] ABIHPEC. Panorama Geral do Setor 2018. Disponível em: <https://abihpec.org.br/publicacao/panorama-do-setor-2018/> Acesso em: 28 jul. 2019

[2] ORVOS, D. R., et al. Aquatic toxicity of Triclosan. Environmental Toxicology and Chemistry, 21, 2002. 1338-1349p

[3] National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Triclosan, CID=5564. Disponível em:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Triclosan> Acesso em: 28 jul. 2019

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

[5] National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Triclocarban, CID=7547. Disponível em:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Triclocarban> Acesso em: 28 jul. 2019

[6] FDA - Food and Drug Administration - Department of Health and Human Services. Triclosan - supporting information for toxicological evaluation by the national toxicology program. U.S, 2008

[7] 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

[8] HALDEN, R. U.; PAULL, D. H. Co-occurrence of triclocarban and triclosan in US water resources. Environmental Science & Technology, v. 39, n. 6, p. 1420-1426, 2005

[9] GUERRA, M.; SOUZA, M.J. Como observar cromossomos: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana. São Paulo: FUNPEC, 2002

[10] LEME, D.M., MARIN-MORALES, M.A., 2009. Allium cepa test in environmental monitoring: a review on its application. Muat. Res. 682, 71-81

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Laboratório de Ecotoxicologia da UTFPR pela estrutura e ensinamentos adquiridos, ao Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental da UFPR pelo apoio para a implementação do ensaio usando *Allium cepa* e a Fundação Araucária pelo apoio financeiro.