



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

JULIANA AUGUSTA GIL

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO TRICLOSAN NOS
DIFERENTES ESTÁGIOS DE VIDA DO LAMBARI (*Astyanax altiparanae*)

CAMPINAS

2024

JULIANA AUGUSTA GIL

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO TRICLOSAN NOS
DIFERENTES ESTÁGIOS DE VIDA DO LAMBARI (*Astyanax altiparanae*)

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Biologia Animal na área de concentração Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia.

Orientadora: Marcia Mayumi Ishikawa

Co-orientadora: Vera Lucia Scherholz Salgado de Castro

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA JULIANA AUGUSTA
GIL E ORIENTADA PELA DRA. MÁRCIA
MAYUMI ISHIKAWA.

CAMPINAS

2024

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

G37a Gil, Juliana Augusta, 1993-
Avaliação da toxicidade do triclosan nos diferentes estágios de vida do Lambari (*Astyanax altiparanae*) / Juliana Augusta Gil. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

Orientador: Márcia Mayumi Ishikawa.
Coorientador: Vera Lucia Scherholz Salgado de Castro.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Instituto de Biologia.

1. *Astyanax altiparanae*. 2. Peixe - Embrião. 3. Hematologia. 4. Peixe - Comportamento. 5. Triclosan - Toxicidade. I. Ishikawa Márcia Mayumi. II. Castro, Vera Lucia Scherholz Salgado de. III. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Assessment of the toxicity of triclosan in the different life stages of Lambari (*Astyanax altiparanae*)

Palavras-chave em inglês:

Astyanax altiparanae

Fishes - Embryos

Hematology

Fishes - Behavior

Triclosan - Toxicity

Área de concentração: Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia

Titulação: Mestra em Biologia Animal

Banca examinadora:

Márcia Mayumi Ishikawa [Orientador]

Eliane Tie Oba Yoshioka

Cassiana Maria Reganhan Coneglian

Data de defesa: 05-06-2024

Programa de Pós-Graduação: Biologia Animal

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0009-0008-7158-0256>

- Currículo Lattes do autor: <https://lattes.cnpq.br/5417972407915724>

Campinas, 05 de Junho de 2024.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Marcia Mayumi Ishikawa.

Profa. Dra. Eliane Tie Oba Yoshioka.

Profa. Dra. Cassiana Maria Reganhan Coneglian.

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica da aluna.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Biologia Animal da Unidade do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

As páginas da vida são Cheias de surpresas...

Há capítulos de alegria, mas também de tristeza.

Há mistérios e fantasias, sofrimentos e decepções...

Por isso, não rasgue páginas e nem solte capítulos.

Não se apresse a descobrir os mistérios.

Não perca as esperanças, pois muitos são os finais felizes.

E nunca se esqueça do principal:

No livro da vida, o autor é você!

Autran Dourado

AGRADECIMENTO

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - código de financiamento- 001, sob o número do processo 88887.487094/2020-00, agradeço por fazer parte do meu apoio financeiro, na qual foi essencial para que esta dissertação fosse concluída, agradeço também o apoio do projeto BRS-AQUA.

Primeiramente e acima de tudo agradeço a Deus, que sempre manteve vivo dentro do meu coração esse sonho, em segundo lugar dedico esta dissertação para meus amados avôs José e Julia, que sempre me apoiaram em todos meus sonhos me dando a força necessária para alcançar meus objetivos, e mesmo que hoje não estejam presentes neste plano espiritual sou eternamente grata aos dois. Aos meus pais Carlos e Maria que, ao longo de todos esses anos, sempre me deram toda educação e amor que uma filha poderia ter. Acompanhei de perto, desde pequena, os inúmeros esforços e o apoio irrestrito em todas as atividades que ajudaram a me tornar uma pessoa melhor. Serei eternamente grata a essas duas pessoas maravilhosas e incríveis que em muitos momentos foram capazes de abrir mão de seus sonhos, para que eu pudesse viver os meus.

Aos meus irmãos Alessandra, Rodrigo e Álvaro que ao longo dessa jornada foram minhas maiores inspirações, sempre ao meu lado me dando todo o apoio possível, vocês são e sempre serão os pilares da minha vida. A minha irmã Alessandra, faço um agradecimento especial, por ter sempre me mostrado o caminho certo quando eu estava perdida, obrigada por todos os conselhos que me deu ao longo dessa trajetória sem dúvidas a sua presença foi necessária para que eu alcançasse o objetivo. Ao meu namorado Mateus, por todo amor, companheirismo e inspiração nos últimos doze anos. Obrigada por ser essa pessoa iluminada, dotado de um excelente coração, juntos, somos mais fortes!

Aos meus amigos que estiveram comigo durante todos os momentos, pois só eles acompanharam os momentos felizes, ansiosos, as reflexões que por muitas vezes se transformaram em luzes no caminho a vocês Fernanda, Patrícia, Julia, Fernanda Petrini, Giovanni e Valery, sou grata.

A Embrapa Meio Ambiente, por ceder seus laboratórios para a realização do presente trabalho, assim como para diversas análises realizadas ao longo destes dois anos;

A orientadora Doutora Márcia Mayumi Ishikawa, que me ajudou desde o começo para realização deste trabalho, assim, sem dúvidas é uma das pessoas mais importantes para a conclusão desta dissertação, sem o seu apoio, paciência e empenho nada disso seria possível.

A co-orientação exercida pela pesquisadora Doutora Vera Lucia Scherholz de Castro, por toda sua ajuda e serenidade, agradeço por todos os ensinamentos.

Os meus mais sinceros agradecimentos para o Doutor Julio Ferraz de Queiroz, que em todos os momentos sempre se dispôs a ajudar com seu bom humor tornando tudo mais leve, sempre nos incentivando a nos tornar a melhor versão de nós mesmos, e acreditando no nosso potencial mesmo quando tudo estava contra, o meu mais cordial obrigado;

A Doutora Márcia Assalim por todo o auxílio e elucidações dadas nas análises cromatográficas e análises da qualidade de água;

Ao Doutor Claudio Martin Jonsson, por todos os ensinamentos científicos passados e pela ajuda dada;

Ao Doutor Thiago Francisco Ventoso Bompadre, pela ajuda e explicações nas análises estatísticas;

Ao grande e estimado amigo, pois ao longo dessa trajetória se tornou uma pessoa muito admirada e querida ao Doutor Henrique Valim, que não mediu esforços e empenho a ajudar e ensinar, em todos os momentos mesmo nos mais difíceis esteve ao meu lado me incentivando a continuar, agradeço por tudo que fez para que esta dissertação fosse concluída.

Aos membros da equipe da Embrapa Meio Ambiente, Rodrigo Castanha, Gino Zambon, Marcos Losekann e a Marisa Carvalho, que me ampararam durante todo o processo, obrigada por me ajudar a realizar as mais diferentes técnicas no laboratório;

Nunca esquecerei aqueles que realmente estiveram ao meu lado nesta trajetória, levarei todos com muito carinho e admiração para sempre no meu coração.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade do Triclosan nos diferentes estágios de vida do lambari-do-rabo-amarelo. Realizaram-se ensaios de toxicidade aguda e avaliação do efeito crônico em embriões e larvas. Nos ensaios de toxicidade de curta duração, após 48 horas pós-eclosão, foi adicionado o Triclosan no meio de embrião, mantendo-o em incubadora a 26 ± 1 °C e com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, onde eram constantemente observados os parâmetros de crescimento, danos teratogênicos e mortes. Para avaliar o efeito crônico nos adultos, utilizou-se a exposição de 14 dias, sendo realizada a coleta de amostras sanguíneas após 7 dias e após 14 dias de exposição, avaliando-se hematologia e o comportamento dos indivíduos. Os danos observados durante os testes realizados com larvas de embriões evidenciaram danos irreversíveis na coluna vertebral, danos fisiológicos relacionados ao coração, alteração na pigmentação, entre outros. As alterações nos peixes adultos foram principalmente aquelas ligadas ao sistema neurológico, observando-se ataxia, distonia, paralisia e, conseqüentemente, alguns indivíduos foram a óbito, apesar de todos os animais serem expostos a concentrações consideradas baixas (concentrações 0,0062 0,021 0,064 0,20 e 0,66 mg L⁻¹ para os adultos). Os resultados obtidos sugerem o risco e o impacto negativo que a introdução contínua dos produtos contendo Triclosan pode ocasionar ao ecossistema aquático, os resultados dos experimentos nos permitem concluir os impactos negativos e os riscos. As necessidades de medidas mais severas da legislação podem permanecer na discussão, mas não cabe concluir isso.

Palavras-chave: Lambari-do-rabo-amarelo, Embriões, Hematologia, Alterações Comportamentais.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the toxicity of Triclosan in the different life stages of the yellowtail lambari. Acute toxicity tests and evaluation of the common effect on embryos and larvae were carried out. In short-term toxicity tests, after 48 hours post-hatching, Triclosan was added to the embryo medium, keeping it in an incubator at 26 ± 1 °C and with a photoperiod of 12 hours of light and 12 hours of dark, where growth parameters, teratogenic damage and deaths were frequently observed. To evaluate habitual behavior in adults, a 14-day exposure was used, with blood samples being collected after 7 days and after 14 days of exposure, evaluating hematology and the individuals' health. The damage received during tests carried out with embryo larvae showed irreversible damage to the spine, physiological damage related to the heart, changes in pigmentation, among others. The changes in adult fish were mainly those linked to the neurological system, with ataxia, dystonia, paralysis and, consequently, some individuals died, despite all animals being exposed to low concentrations (concentrations 0.0062 0.021 0.064 0, 20 and 0.66 mg L⁻¹ for adults). The results found suggest the risk and negative impact that the continuous introduction of products containing Triclosan can cause to the aquatic ecosystem. The results of the experiments allow us to conclude the negative impacts and risks. The need for more severe legislative measures may remain under discussion, but it is not possible to conclude on this.

Keywords: Yellow-tailed Lambari, Embryos, Hematology, Behavioral Changes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Ecotoxicologia- Ciência Multidisciplinar.
- Figura 2.** Níveis de organização biológica e respostas com relação ao tempo e relevância ecológica.
- Figura 3.** Origens e rotas dos PPCPs.
- Figura 4.** Estudos agudos x Estudos crônicos (modificado).
- Figura 5.** Informações quanto aos riscos para saúde humana e ao meio ambiente
- Figura 6.** Fórmula Química Estrutural e Modelo 3D da Molécula.
- Figura 7.** Desenvolvimento embrionário, começando logo após a fertilização até sua forma adulta.
- Figura 8.** Posição taxonômica da família Characidae.
- Figura 9.** Exemplar de *Astyanax altiparanae* (Characidae).
- Figura 10.** Diferença entre fêmeas e macho de *Astyanax altiparanae*.
- Figura 11.** Caixa de reprodução dos lambaris.
- Figura 12.** Embriões de *Astyanax altiparanae*.
- Figura 13.** Embriões de *Astyanax altiparanae*, após 14 horas de desova.
- Figura 14.** Estrutura química do Triclosan.
- Figura 15.** Modelo de ensaio com placas de cultura celular com seis concentrações teste, e uma placa de controle positivo e uma placa de controle negativo pronto para receber os embriões.
- Figura 16.** FET test Adaptado de Guideline 236.
- Figura 17.** Alterações observadas nos indivíduos expostos nas concentrações 0,7 e 0,6 mg L⁻¹ de Triclosan.
- Figura 18.** Mortalidade dos embriões em diferentes concentrações de Triclosan.
- Figura 19.** Alterações observadas no desenvolvimento embrionário dos indivíduos expostos nas concentrações 0,165, 0,33 e 0,66 mg L⁻¹ de Triclosan.
- Figura 20.** Alterações observadas no desenvolvimento embrio-larval dos indivíduos expostos nas concentrações 0,02062, 0,0415 e 0,0825 mg L⁻¹ de Triclosan.
- Figura 21.** Larva dos grupos controle (controle normal e controle com etanol), sem nenhuma alteração morfológica.
- Figura 22.** Modelo do ensaio com placas de cultura celular com cinco concentrações teste, prontas para receber os embriões.
- Figura 23.** Índice de eclosão da fase embrio-larval de *Astyanax altiparanae*.
- Figura 24.** Índice de atraso no desenvolvimento da fase embrio-larval de *Astyanax*

altiparanae.

Figura 25. Índice de mortalidade da fase embrio-larval de *Astyanax altiparanae*.

Figura 26. Alterações observadas no desenvolvimento embrionário dos indivíduos expostos nas concentrações 0,0574; 0,01794 e 0,0018081 mg L⁻¹ de Triclosan.

Figura 27. Índice de edema do saco pericárdico da fase embrio-larval de *Astyanax altiparanae*.

Figura 28. Índice bradicardia da fase embrio-larval de *Astyanax altiparanae*.

Figura 29. Índice de absorção do saco pericárdico a fase embrio-larval de *Astyanax altiparanae*.

Figura 30. Índice de alterações na coluna da fase embrio-larval de *Astyanax altiparanae*.

Figura 31. Índice de deficiência em coluna da fase embrio-larval de *Astyanax altiparanae*.

Figura 32. Índice de deficiência em cauda da fase embrio-larval de *Astyanax altiparanae*.

Figura 33. Índice de curvatura da cauda da fase embrio-larval de *Astyanax altiparanae*.

Figura 34. Índice de alteração de pigmento da fase embrio-larval de *Astyanax altiparanae*.

Figura 35. Índice de má formação geral da fase embrio-larval de *Astyanax altiparanae*.

Figura 36. Alterações observadas no período de 24 horas pós-exposição ao Triclosan em larvas de *Astyanax altiparanae*.

Figura 37. Alterações observadas no desenvolvimento larval dos indivíduos expostos nas concentrações 0,0574; 0,01794; 0,005695 e 0,0018081 mg. L⁻¹ de Triclosan.

Figura 38. Alterações observadas no período de 48 horas pós-exposição ao Triclosan em larvas de *Astyanax altiparanae*.

Figura 39. Alterações observadas no período de 72 horas pós-exposição ao Triclosan em larvas de *Astyanax altiparanae*.

Figura 40. Alterações observadas no período de 96 horas pós-exposição ao Triclosan em larvas de *Astyanax altiparanae*.

Figura 41. Alterações observadas no período de 120 horas pós-exposição ao Triclosan em larvas de *Astyanax altiparanae*.

Figura 42. Alterações observadas no período de 144 horas pós-exposição ao Triclosan em larvas de *Astyanax altiparanae*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos Bioensaios de Ecotoxicidade.

Tabela 2. Características físicas e químicas do Triclosan.

Tabela 3. Variáveis físico-químicas da água nas diferentes concentrações de Triclosan para determinação da CL₅₀ em *Astyanax altiparanae*.

Tabela 4. Mortalidade de *Astyanax altiparanae* em diferentes concentrações de Triclosan para determinação da CL₅₀.

Tabela 5. Mortalidade de *Astyanax altiparanae* em diferentes concentrações de Triclosan para determinação da CL₅₀.

Tabela 6. Valores obtidos na CL₅₀ da fase embrio-larval de *Astyanax altiparanae* expostos ao Triclosan por 24, 48, 72 e 96 horas.

Tabela 7. Valores da CL₅₀ do Triclosan para outras espécies de peixes de água doce.

Tabela 8. Parâmetros físico-químicos da qualidade de água durante a exposição crônica em *Astyanax altiparanae*, exposto a diferentes concentrações de Triclosan.

Tabela 9. Perfil hematológico durante o período de exposição crônica em *Astyanax altiparanae* expostos a diferentes concentrações de Triclosan.

Tabela 10. Resposta comportamental do *Astyanax altiparanae* após exposição crônica ao Triclosan.

Tabela 11. Comparação estatística do grupo controle com meio de embrião e grupo controle com etanol 92% (Teste de Shapiro–Wilk, $p \geq 0,05$), para o ensaio de toxicidade crônica em embriões de *Astyanax altiparanae*.

Tabela 12. Escores atribuídos a cada categoria de dano de acordo com as anomalias observadas, durante o período entre 24 a 48 horas de embriões *Astyanax altiparanae*.

Tabela 13. Escores atribuídos a cada categoria de dano de acordo com as anomalias observadas, durante o período entre 96h a 144horas na fase embrio-larval de *Astyanax altiparanae*.

Tabela 14. Escores atribuídos a cada categoria de dano de acordo com as anomalias observadas, durante o período entre 24h a 144horas na fase larval de *Astyanax altiparanae*.

LISTA DE ABREVIATURAS

ASTM – American Society for Testing and Materials
AWWA – American Water Work Association
ANOVA – Análise de variância
ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
AFNOR – Association Française the Normalisation
B.O.D – Biochemical Oxygen Demand
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
CONASQ – Comissão Nacional de Segurança Química
CENO – Concentração de Efeito Não Observado
CEO – Concentração de Efeito Observado
CE₅₀ – Concentração mediana efetiva a 50% da população
CL₅₀ – Concentração mediana letal a 50% da população–
Cond – Condutividade elétrica
CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente
DIN – Deutsches Institut for Normung
ETE – Estações de Tratamento de Esgoto
EDTA – Ethylenediaminetetraacetic acid
FET – Guia Fish Embryo Acute Toxicity
Htc – Hematócrito
Hb – Hemoglobina
ISO – International Organization Standardization
OECD – Organization for environment co-operation and development
O.D – Oxigênio
PPCPs – Pharmaceuticals and Personal Care Products
PRONASQ – Programa Nacional de Segurança Química
PPT – Proteína plasmática total
Temp – Temperatura
TCS – Triclosan
VCM – Volume corpuscular médio

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	17
1. INTRODUÇÃO GERAL	17
2. OBJETIVOS	20
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1 Panorama Geral da Poluição Aquática	22
3.2 Ecotoxicologia Aquática	24
3.2.1 Ensaio de Ecotoxicidade para Avaliação de Efeito Agudo	29
3.2.2 Ensaio de Ecotoxicidade para Avaliação de Efeito Crônico	29
3.3 Produtos de Higiene e Fármacos no Ambiente Aquático	30
3.4 Aspectos Legais	34
3.5 Triclosan – Ocorrência no Ambiente Aquático e suas Implicações	36
3.6 Organismos Aquáticos como Bioindicadores Ambientais	39
3.6.1 Hematologia como Bioindicador Ambiental	40
3.6.2 Embriões como Bioindicador Ambiental	41
3.7 Características e Biologia do Gênero <i>Astyanax altiparanae</i>	43
3.7.1 A Família characidae e a subfamília tetragonopterinae	43
3.7.2 Gênero <i>Astyanax</i>	44
3.7.3 A Espécie <i>Astyanax altiparanae</i>	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS	48
CAPÍTULO II	65
RESUMO	66
1. MATERIAL E MÉTODOS	67
1.1 Local e Protocolo da Comissão de Ética no Uso de Animal	67
1.2 Aquisição e Aclimação dos Peixes	67
1.3 Manejo para Reprodução	67
1.3.1 Preparo dos Reprodutores e Coleta dos Embriões	67

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS	74
CAPÍTULO III	75
RESUMO	76
1. MATERIAL E MÉTODOS	77
1.1 Local e Protocolo da Comissão de Ética no Uso de Animal	77
1.2 Aquisição e Aclimação dos Peixes	77
1.3 Xenobiótico Estudado – Triclosan	77
1.4 Soluções Teste do Ensaio Preliminar dos Adultos	78
1.4.1 Controle com Solvente Etanol 92%	79
1.4.2 Ensaio Preliminares de Gradiente de Concentrações	79
1.5 Ensaio Definitivo da CL₅₀ em Adultos	79
1.6 Soluções Teste do Ensaio Embrio-larval	80
1.6.1 Controle com o Solvente Etanol 92%	83
1.6.2 Ensaio Definitivo da CL₅₀ da Fase Embrio-larval	83
1.6.3 Leituras das Placas Contendo Embriões e Larvas	83
1.7 Monitoramento dos Parâmetros físico-químicos da água	83
1.8 Estatística	84
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
2.1 Determinação da CL₅₀ na Fase Adulta	84
2.1.2 Variáveis Físico-químicas da Água da CL₅₀	84
2.2 Concentração Letal Média (CL₅₀)	85
2.3 TESTE AGUDO	89
2.3.1 Concentração Letal Média (CL₅₀) da Fase Embrio-larval	89
CONCLUSÃO	96

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS GERAIS	97
CAPÍTULO IV	100
RESUMO	101
1. MATERIAL E MÉTODOS	102
1.1 Local e Protocolo da Comissão de Ética no Uso de Animal	102
1.2 Aquisição e Aclimação dos Peixes.....	102
1.3 Soluções Teste do Ensaio Preliminar dos Adultos.....	102
1.3.1 Controle com Solvente Etanol 92%	103
1.4 Ensaio Subletal em Adultos	103
1.5 Monitoramento dos Parâmetros físico-químicos da água	103
1.6 Análises Hematológicas dos Adultos.....	103
1.7 Ensaio Subletal da Fase Embrio-larval	104
1.7.1 Local da Realização Experimental.....	104
1.7.2 Obtenção dos Organismos Teste	104
1.7.3 Soluções Teste do Ensaio Embrio-larval	105
1.8 Ensaio Subletal da Fase Embrio-larval	106
1.8.1 Controle com Solvente Etanol 92%	106
1.8.2 Leitura das Placas Contendo Embriões e Larvas	106
1.9 Estatística	107
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	107
2.1 Ensaio Subletal da Fase Adulta.....	107
2.1.1 Variáveis Físico-químicas da Água.....	107
2.2 Análises Hematológicas.....	110
2.3 Alterações Comportamentais	114
2.4 Ensaio Subletal da Fase Embrio-larval	116
2.4.1 Controle do Solvente Etanol 92%	116
2.4.2 Toxicidade Crônica (Embrio-larval)	117

2.4.2.1 Efeitos do Triclosan Sobre a Taxa de Eclosão do <i>Astyanax altiparanae</i>	117
2.4.2.2 Efeitos do Triclosan Sobre a Mortalidade do <i>Astyanax altiparanae</i>	120
2.4.2.3 Efeitos do Triclosan Sobre o Desenvolvimento Larval do <i>Astyanax altiparanae</i>	136
CONCLUSÃO.....	147
CAPÍTULO V.....	149
CONSIDERAÇÕES FINAIS	149
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS GERAIS	150
APÊNDICES	158
ANEXOS.....	160

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO GERAL

Ao longo dos últimos anos a quantidade de poluentes de diversas classes tem sido descartada incorretamente no meio ambiente, conseqüentemente essa atividade antropogênica sobre os ecossistemas tem ocasionado inúmeros desequilíbrios na fauna local, sendo a degradação dos recursos hídricos a mais preocupante (PORTO, 2000).

Diante disso, este tema tem sido muito debatido em reuniões mundiais, e cada vez mais tem se destacado a necessidade de elaborar planos para controlar a quantidade e identificar as concentrações destes agentes tóxicos lançados ao meio ambiente, buscando minimizar os impactos causados aos organismos expostos. Atualmente, a classe de xenobióticos que vem ganhando notoriedade por causar modificações orgânicas não elucidadas, citam-se os medicamentos de uso veterinário e humano e os produtos de Higiene Pessoal (EPA, 2022).

Estes fármacos, assim como, os Produtos Farmacêuticos e de Cuidados Pessoais (PPCPs – Pharmaceuticals and Personal Care Products), se tornam altamente nocivos para as populações residentes dos ecossistemas aquáticos uma vez que não se sabe ao certo quais modificações estruturais fisiológicas os mesmos podem causar, sendo continuamente lançado nos sistemas de esgoto, desta forma, este grupo possui uma serie de substâncias químicas diversificadas que são amplamente empregadas na medicina humana e veterinária, além de que algumas substâncias são utilizadas na rotina agrícolas e em cosméticos (DAUGHTON, 2007). Assim, após a utilização destes compostos tais como sabonetes, enxaguante bucais, produtos antibactericida, entre outros. Uma parte expressiva destas substâncias é excretada através das redes de esgoto chegando dessa forma, nas redes de Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) ou então são lançados de forma direta nos ecossistemas aquáticos decorrentes de efluentes domésticos e industriais sem tratamento.

Quando estas substâncias químicas, descartadas inapropriadamente pela rede de esgoto, chegam às ETE, a maior parte permanece no ambiente por um longo período, se mantendo inalterados ou sofrem modificações estruturais químicas, gerando subprodutos mais tóxicos. Diante deste contexto as metodologias utilizadas nas ETEs, por muitas

vezes são ineficazes uma vez que não são capazes de remover totalmente ou parcialmente estas moléculas no meio ambiente aquático (EPA, 2022).

Como resultado, inúmeros compostos das mais diversificadas classes de produtos farmacêuticos e Produtos de Higiene Pessoal atingem diversificados ambientes como águas superficiais, águas subterrâneas (FÁRRE et al., 2001) e sedimentos (AGUERA et al., 2003). Quando estes compostos sintéticos atingem o ambiente aquático e adentra o organismo, irá gerar um impacto sobre o sistema fisiológico destes indivíduos expostos sendo considerado patológico (HENSCHERL et al., 1997), a influência destas substâncias para os organismos expostos, apresenta um potencial tóxico extremamente importante e nocivo, mesmo em concentrações consideradas insignificantes (Zhang et al., 2019).

Conseqüentemente, a possibilidade destas substâncias ocasionar desequilíbrios estruturais nos organismos aquáticos é grande, sendo, portanto, necessário o descarte e o tratamento correto destes compostos químicos. O controle desses PPCPs se torna difícil uma vez que o aumento do consumo e descarte cresce exponencialmente a cada ano, desta forma cria-se a urgência de estudos aprofundados sobre os efeitos ecotoxicológicos destes compostos, esta avaliação torna-se indispensável para quantificar e qualificar os riscos ocasionados para o ambiente. Diante disso, nas últimas décadas estudos de toxicologia tem sido empregado para mensurar os efeitos deletérios assim como as alterações causadas pelos PPCPs, e seus subprodutos nas diversas espécies de organismos aquáticos (MONTAGNER; VIDAL; ACAYABA, 2022).

Das diversas classes de fármacos, o grupo dos antibióticos é um dos mais estudados devido a sua característica única de promover resistência em bactérias quando seu uso é feito de maneira incorreta (SANTOS et al., 2015), porém este resvês não é o único e exclusivamente só dos antibióticos, os produtos bactericidas aplicados em itens de higiene pessoal, como é o caso do Triclosan (TCS) também possuem a capacidade de gerar distúrbios associados a resistência bacterina no ambiente. A segurança deste bactericida tem sido contestada por exibir correlação à vitalidade do meio ambiente assim como a saúde humana, esta relação está associada a fatores como grau de toxicidade, ao fator atrelado a conversão das substâncias correlacionada com a fotodegradação e metilação biológica e sua capacidade de bioacumular (PEREIRA; SILVA DE ABREU; MARQUES, 2022). Alguns estudos provenientes da união europeia, do continente asiático e da América do Norte, têm sido reportados, comprovando assim a ocorrência do TCS nos ecossistemas aquáticos, sendo

predominantemente identificado nas bacias hidrográficas dulcícolas, estuarinos e marinhos. Na América do Sul, especificamente no Brasil, as informações referentes a artigos que corroboram para a identificação e ocorrência do TCS em matrizes ambientais são quiméricas ou escassas, assim como os estudos e análises ecotoxicológicas com substâncias emergentes, inclusas o TCS.

Diante da problemática apresentada, elaborou-se os objetivos do presente estudo.

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo empregar métodos e ensaios de toxicidade para avaliar os possíveis efeitos (agudo e crônico) ocasionados pelo uso do Triclosan, nos diferentes estágios de vida do *Astyanax altiparanae*, popularmente conhecido como lambari- do rabo- amarelo.

Dessa forma, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- 1) Avaliar os parâmetros de crescimento alométrico durante a ontogenia inicial da espécie no período Embrio-larval,
- 2) Determinar a concentração letal média (CL_{50-96h}) da fase embrio-larval e fase adulta.
- 3) Avaliar o comportamento, lesões e mortalidade dos lambaris adultos expostos a concentrações letais;
- 4) Avaliar os possíveis efeitos comportamentais e teratogênicos durante a exposição subletal ao TCS no estágio embrio-larval.
- 5) Avaliar os efeitos hematológicos e comportamentais durante a exposição subletal ao TCS em adultos;

A dissertação foi dividida em capítulos para melhor entendimento da sistemática utilizada.

Capítulo 1: Introdução geral e revisão bibliográfica.

Capítulo 2: Reprodução do *Astyanax altiparanae*: Neste capítulo, serão apresentados os resultados da reprodução natural do lambari-do-rabo-amarelo, sem a indução com hormônios.

Capítulo 3: Testes Agudos: Ensaios para avaliação do efeito agudo em adultos e embriões (mortalidade, sinais clínicos e taxa de desenvolvimento da fase embrio-larval).

Capítulo 4: Testes Crônicos: São apresentados os resultados dos ensaios para avaliação de efeito crônico (inibição do desenvolvimento embrio-larval de *Astyanax altiparanae*), e alterações hematológicas e clínicas da fase adulta.

Capítulo 5: Considerações finais: Este capítulo discute os resultados obtidos ao longo de toda a dissertação de forma integrativa e resume os principais destaques do trabalho.

3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

3.1 Panorama Geral da Poluição Aquática

Ao longo dos anos, inúmeras substâncias químicas são descartadas em grandes quantidades nos ecossistemas aquáticos, oriundas das atividades antrópicas, desta forma o dano gerado é devastador levando a impactos irreversíveis. Há tempos se correlaciona a poluição ambiental com as práticas humanas de gerar dejetos químicos e descartá-los no ambiente aquático, esta pratica é reconhecida desde o início da civilização humana. Contudo a contaminação aquática só obteve relevância quando atingiu um limite na qual se percebeu os efeitos prejudiciais em diversos níveis do meio ambiente e consequentemente em sua biota (FREIRY et al., 2014). Diante deste panorama assustador, o cenário atual não difere, pois novas tecnologias são diariamente implementadas para alavancar a expansão de novos compostos assim como potencializar novas formas de distribuição, sendo que o uso dessas substâncias tem colaborado de forma considerável para este quadro. Porém a ampliação da produção, e consequentemente o aumento do consumo, faz-se expandir consideravelmente a quantidade desses compostos no meio ambiente, refletindo em um novo obstáculo, sobretudo em relação à preservação dos recursos hídricos (SANTOS; MACHADO; SOUZA, 2020).

Estes compostos químicos desenvolvidos pelo homem compreendem em um considerável número de diversas substâncias, assim como seu potencial tóxico. Tendo em vista, que no decorrer dos anos, novos compostos químicos são sintetizados, sendo que muitos deles demonstram um elevado grau de toxicidade, sendo de forma imprudente na maioria das vezes lançados nos efluentes acarretando em danos diretos e indiretos nos organismos aquáticos (WARD, 1995; SOUSA, 2002). Estas substâncias químicas refletem 15% das importações e exportações dos países da OECD (*Organisation for Co-operation and Development*) sendo esta década, descrita como maior em termos de fabricação e consumo nos países em desenvolvimento (USEPA, 2012).

Informações recentes relatam que na União Europeia são patenteados cerca de 100.000 compostos químicos diferentes, dos quais 30.000 destas, são produzidas e comercializadas em quantidades maiores que 1 tonelada. De fato, são dados que impressionam, pois, a maioria destas substâncias não possuem informações suficientes, aos riscos oferecidos a saúde humana e aos ecossistemas (MORGER et al., 2022).

Segundo a Sociedade Americana de Química, aproximadamente 10 milhões de compostos químicos são descritos na literatura científica, acredita-se que em torno de 70 mil são habitualmente utilizadas em forma de fármacos entre outros produtos, sendo registrada a lista anualmente cerca de mil a duas mil novas substâncias (MOZETO et al., 2006).

Destacam-se nesta categoria os produtos de higiene pessoal, que estão entre as substâncias intituladas como “poluentes emergentes”, são consideradas substâncias novas por não se conhecer os mecanismos ligados com a sua toxicidade, pois suas concentrações ambientais, não foram identificadas e assim por consequência não são regulamentadas, sendo que as tecnologias atuais muitas vezes não são capazes de mensurar e quantificar suas concentrações, sendo, portanto não identificadas anteriormente, desta forma não eram consideradas um risco para o meio ambiente (HEBERER et al. 2002; SODRÉ et al. 2010; CRUZ et al. 2010), a inserção constante desses poluentes no ambiente aquático ocorre basicamente pela ineficiência dos mecanismos responsáveis pela captação do esgoto doméstico e industriais, que por consequência ocorre o descarte destas substâncias de modo direto nos corpos hídricos poluindo águas superficiais, solos e lodos. (NOGUEIRA et al. 2007).

Portanto, a compreensão a respeito destes diferentes xenobióticos que são introduzidos no ambiente aquático, faz-se necessário para identificar as características químicas destas moléculas, a fim de elaborar estratégias para o gerenciamento e fiscalização dos resíduos para assegurar a proteção ao meio ambiente, são fundamentais para minimizar os riscos ecológicos (SANTOS et al., 2020).

A contaminação é o efeito gerado sobre os organismos de modo que estes efeitos irão ocasionar danos a comunidades residentes e, a caracterização e diferenciação desta concepção de poluição e contaminação não podem ser meramente associadas com base em análises químicas, pois estas não fornecem informações sobre a biodisponibilidade e toxicidade (KUMAR et al., 2021).

Diante disso, nos últimos anos, empregaram-se esforços para desenvolver métodos analíticos e critérios para estabelecer a qualidade da água, desta forma os efeitos ecológicos não são só classificados de acordo os agentes químicos ou físicos responsáveis por ocasionar efeitos adversos (BURTSCHER-SCHADEN et al., 2022). Pois, atualmente para se avaliar e quantificar a qualidade da água se utiliza em termos de

"estrutura e funcionamento dos sistemas ecológicos" em vez de ser feita apenas com base na contaminação química. (DE MARCHI et al., 2020).

Portanto, estes conceitos apresentados refletem a Ecotoxicologia, que vem conquistando espaço e evidenciando abordagens mais amplas e completas nas análises químicas, auxiliando assim no entendimento sobre os mecanismos de toxicidade ligados aos compostos químicos em contato com o ambiente assim como identificar e caracterizar os efeitos ocasionados a diferentes níveis organização biológicos.

3.2 Ecotoxicologia aquática

As reações fisiológicas dos organismos vivos podem se manifestar de diferentes formas de acordo com os estímulos oferecido, ou seja, cada indivíduo reagirá de uma forma diferente ao estresse induzido, sendo esta uma ferramenta extremamente importante para qualificar e analisar a qualidade do ambiente que se encontram (SILVA; COSTA; FERREIRA, 2015).

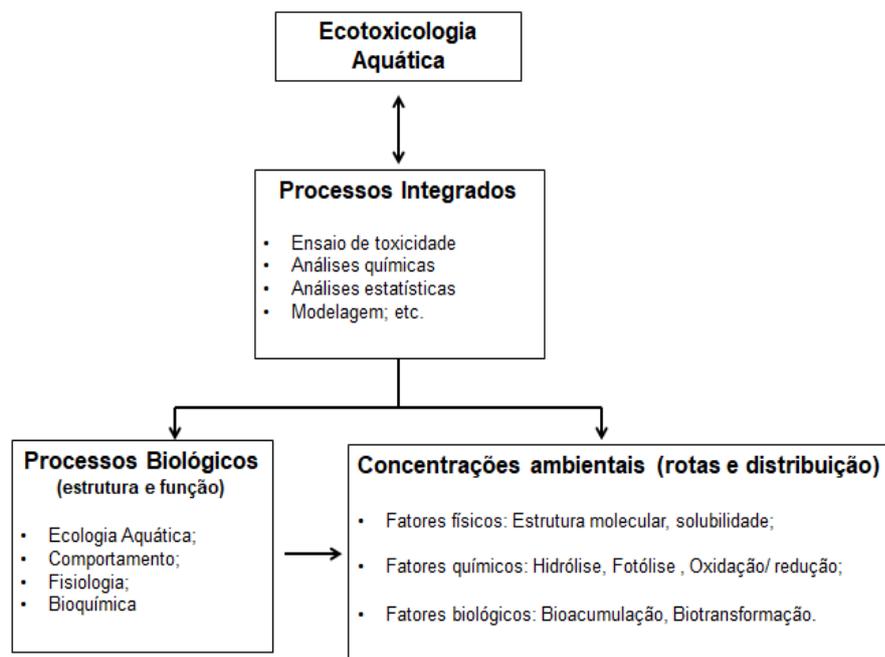
A expressão Ecotoxicologia ou Toxicologia Ambiental foi proposta em uma assembleia pela primeira vez em 1969, pelo *Committe of the International Council of Scientific Unions (ICSU)*, em Estocolmo, pelo toxicologista francês René Truhaut em 1969 (TRUHAUT, 1977 apud RAND 1995). Para René Truhaut o termo Ecotoxicologia é o estudo que determina e avalia os efeitos ocasionados por inúmeras substâncias, sendo estes naturais ou sintéticas sobre a fisiologia dos organismos vivos, ocasionando assim efeitos adversos sobre populações e comunidades de um sistema integrado de animais e vegetais sendo terrestres ou aquáticos. Portanto, está ciência avalia os danos ocasionados em todo o conjunto de elementos que constitui este sistema integrado que é a biosfera, englobando assim as substâncias com o ambiente que estes organismos estão inseridos, integrando-os no mesmo contexto ambiental (CAIRNS e NIEDERLEHNER, 1995).

Pouco tempo depois, NEWMAN et al. (2002), estabeleceu a Ecotoxicologia como uma ciência que estuda o sinergismo dos contaminantes e suas implicações sobre os elementos da biosfera, deste modo abrangendo também o homem.

Como mencionado anteriormente Ecotoxicologia envolve todos os ambientes sendo o de maior relevância aqueles interligados com a Ecotoxicologia Aquática, sendo, portanto, caracterizada pelo estudo das ações negativas sobre a fisiologia dos indivíduos expostos, deste modo é descrita por sua multidisciplinaridade (Figura 1).

Com embasamento nos modelos matemáticos é possível quantificar estatisticamente os resultados obtidos, assim como é factível usar métodos de modelagens matemáticas, este método permite avaliar de forma mais clara e precisa os efeitos biológicos ocasionados por substâncias tóxicas, desta forma auxilia na deliberação da hipótese mais coerente sobre a ocorrência de danos ocasionados em diferentes cenários ambientais (RAND et al., 1995).

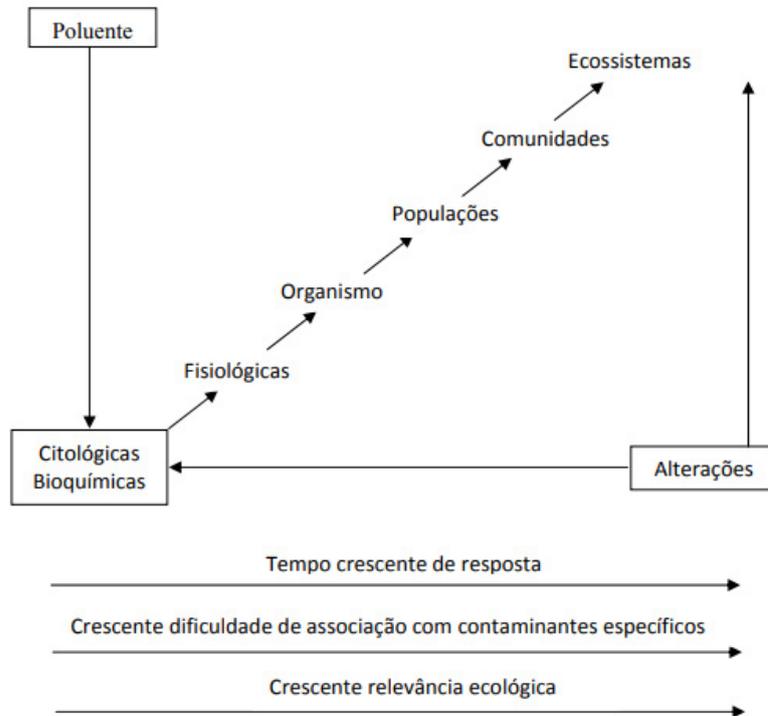
Figura 1. Ecotoxicologia- Ciência Multidisciplinar



Fonte: RAND et al., 1995.

Estes ensaios ecotoxicológicos podem ser aplicados para estabelecer as alterações biológicas, em múltiplos níveis da disposição biológica, sendo classificados desde moleculares, hematológicos, bioquímicos até mesmo em nível organizacional de comunidades e ecossistemas (Figura 2), sendo aplicados com o intuito de mensurar os danos ocasionados a introdução contínua destes compostos químicos, nos ecossistemas aquáticos, sendo utilizado para a avaliação e quantificação destes efeitos negativos os testes de toxicidade aguda e crônica, que já estão conjecturados na Legislação Brasileira, como por exemplo as Resoluções do CONAMA 357/2005 e a Resolução CONAMA nº 430, de 13 de maio de 2011 que estabelece as condições e os padrões de lançamento de efluentes em corpos d'água (BRASIL, 2005; BRASIL, 2011).

Figura 2. Níveis de organização biológica e respostas com relação ao tempo e relevância ecológica.



Fonte: NASCIMENTO et al., 2006.

Estes testes de toxicidade são delineados como método que quantifica a respostas dos organismos vivos expostos a uma determinada substância química, com o objetivo de mensurar a capacidade tóxica decorrentes dos efeitos sobre aquele determinado bioma, sendo avaliados de forma isolada ou em combinação, utilizando amostras ambientais e amostras biológicas, determinando assim os efeitos patológicos ocasionados nos indivíduos expostos (RAND et al., 1995). Ou seja, equivale sucintamente na exposição de um organismos-teste, sendo estes considerados e validados como organismos bioindicadores, que compreende em um organismo capaz de traduzir as respostas de uma matriz contaminada, podendo ser expressa através da água, solo, resíduos, efluentes, entre outros. Tendo como propósito replicar os efeitos tóxicos ocasionados a nível ecológico. Para se replicar estes efeitos, é preciso determinar os métodos de ensaio que serão utilizados, pois estes possuem uma ampla variação e utilização (sendo aplicados em águas continentais, estuarinas e marinhas), para a correta caracterização destes testes é realizada em ambientes controlados sob condições laboratoriais, porém também pode ser

utilizados a fim de expressar as mesmas condições ambientais normais podendo ser aplicados a campo, isto permite identificar os efeitos fisiológicos ocasionados pelos efeitos dos xenobióticos no ambiente (LEE; PARK; KIM, 2023).

Dessa forma estes ensaios são de extrema valia como ferramenta para se obter o controle destas substâncias químicas no ambiente, facultando informações importantes referentes acerca dos dados qualitativos e quantitativos sobre as variáveis fisiológicas individuais e de controle ambientais sobre estes estressores (COONEY, 1995), concedendo assim indícios precisos sobre as repercussões negativas dos efeitos gerados nestes ambientes, sendo empregada para evidenciar os efeitos tóxicos não só das substâncias primárias mas também utilizadas para avaliar a toxicidade de suas misturas que se apresentam na grande maioria de forma complexa tanto em fase líquida e sólida nos sedimento. Estes testes de toxicidade apresentam uma imensa relevância assim como benefícios como, por exemplo, o baixo custo financeiro, possui obtenção de informações assim como respostas rápidas, métodos de fácil compreensão e fácil interpretação dos resultados (STOKER et al., 2010).

RAND et al. (1995), descreveram que os primeiros testes de ecotoxicidade, com espécimes aquáticos foram executados a partir de 1930, tendo como propósito determinar a junção causa/efeito de compostos químicas. Estes podem ser realizados de acordo com três classificações (Tabela 1), agudos, crônicos ou crônicos de curta duração (HAMADA, 2008).

Tabela 1. Classificação dos Bioensaios de Ecotoxicidade.

Toxicidade	Duração	Definição
Aguda	Curta	Abrangem apenas parte do ciclo de vida dos organismos, avaliando-se efeitos como mortalidade ou imobilidade.
Crônica	Prolongada	Podem abranger todo o ciclo de vida dos organismos, avaliando-se parâmetros sub-letais, como deformidades.
Crônica de curta duração	Mediana	Abrangem partes sensíveis do ciclo de vida dos organismos, avaliando-se efeitos sub-letais.

Fonte: Hamada, 2008.

Os testes de toxicidades são efetuados em situações intrínsecas, ou seja, com endpoints de relevância específica que será mensurada a resposta em resultados tóxicos e não tóxicos. Aqueles caracterizados como testes tóxicos serão considerados como ecotoxicidade aguda que geralmente estará interligado com a mortalidade dos indivíduos, já os testes não tóxicos como ecotoxicidade crônica são mensurados através de anormalidade vinculadas ao comportamento e na grande maioria ligados a taxa de reprodução, estes ensaio possibilita a avaliação de uma determinada área assim como informações em nível da população residente, sendo descrita para uma espécie alvo ou uma substância (HAN et al., 2016). Nos ecossistemas naturais existe uma vasta diversidade de espécies que coabitam nestes ambientes, integrando-se entre si uma cadeia delicada que irá responder de modo característico e específico as condições expostas ao ambiente sendo, portanto que cada indivíduo respondera de uma forma a contaminação presente no ambiente aquático (SANTOS et al., 2015). Deste modo os dados alcançados através de um indivíduo não podem ser correlacionados ou transmitidos de modo fidedigno para mensurar os danos ocasionados a uma determinada comunidade, sendo, portanto, não indicado correlacionar estes índices ecológicos obtidos através de um único indivíduo, desta forma isto se torna um entrave nas políticas ambientais, dificultando assim as pesquisas ambientais (CHEN et al., 2023).

Atualmente, para facilitar e compreender os danos ocasionados por diversas substâncias são realizados cálculos que mesclam os resultados ecotoxicológicos com modelos bioestatísticos fundamentados nas propriedades físicos químicos do contaminante em estudo (LEE et al., 2023)

Sendo, portanto possível delimitar e determinar os danos ocasionados ao ambiente, assim como nos indivíduos expostos sendo então aplicados ensaios de ecotoxicidade aguda e/ou crônica que permite avaliar um ou mais endpoints em conjunto com a avaliação da dose-resposta (DOU et al., 2014).

Diante do exposto inúmeros estudos vêm sendo estabelecidos, a fim de se garantir métodos de ensaios de toxicidade mais eficazes, muitos destes testes já são pré-estabelecidos sendo em sua grande maioria padronizados em âmbito nacional e internacional por instituições ou organizações de normalização, como por exemplo, a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) e CONAMA 430/2011, American Society for Testing and Materials (ASTM), American Water Work Association (AWWA), International Organization Standardization (ISO), Organization for Economic

Co-Operation and Development (OECD), Association Française de Normalisation (AFNOR) e Deutsches Institut for Normung (DIN) (ABNT, 2017).

3.2.1 Ensaio de ecotoxicidade para avaliação do efeito agudo

Os testes de toxicidade aguda compreendem os processos que avaliam os efeitos, rápidos e severos, ocasionados aos organismos expostos às substâncias químicas, de modo geral as reações ocorrem por um período de tempo considerado curto, normalmente dá-se em um período de 0 a 96 horas. Geralmente, os parâmetros de avaliação são relacionados ao índice de letalidade e a acinesia dos organismos teste (ARAGÃO e ARAÚJO, 2006; MAGALHÃES e FILHO, 2008). O critério de avaliação relacionado aos ensaios de toxicidade aguda é indispensável para comprovar os efeitos letais em curtos períodos de tempo, deste modo às informações obtidas fornecem dados essenciais para a elaboração e aplicação de normas legislativas para melhoria da qualidade ambiental (FONSECA, 1991).

Com base nos dados obtidos, através dos ensaios de toxicidade aguda, podem-se aplicar modelos estatísticos, com a finalidade de determinar a concentração mediana que corresponde aos efeitos adversos em 50% dos indivíduos expostos durante o período de ensaio. Já para o cálculo da dose- resposta pode ser classificada em dois tipos, Concentração mediana letal a 50% da população (CL_{50}) e Concentração mediana efetiva a 50% da população (CE_{50}), sendo a CL utilizada para organismos vertebrados e invertebrados e a CE utilizada para algas (SOUZA, 2002).

3.2.2 Ensaio de ecotoxicidade para avaliação do efeito crônico

As avaliações relacionadas aos ensaios de toxicidade crônica são executadas para mensurar os impactos os compostos tóxicos sobre os organismos aquáticos por um tempo que pode compreender parte ou todo o ciclo de vida do indivíduo exposto (YAO et al., 2018). Os testes de toxicidade crônicos classificam os efeitos subletais dos xenobióticos no desenvolvimento fisiológico dos indivíduos, podendo ser classificados os distúrbios ocasionados como alterações de comportamento, alterações sobre a reprodução, distúrbios fisiológicos e bioquímicas (ADAMS et al., 2002). Conforme descrito pelos autores, estes ensaios crônicos são usualmente aplicados para a avaliação dos danos causados em longo prazo sobre a fisiologia do organismo teste, estes ensaios podem ser utilizados em todas as fases de vida dos indivíduos expostos, porém a efetividade é mais

intensa sobre as fases mais sensíveis do ciclo de vida, que corresponde a fase embrionária e larval, sendo utilizado também para mesurar os danos gerados na fase adulta dos organismos-teste (YIN et al., 2022). Os efeitos subletais são geralmente analisados em circunstâncias onde as concentrações do xenobiótico, permitem sobrevivência dos organismos-teste, porém apresentando disfunção orgânica em inúmeras funções fisiológicas (YIN et al., 2022).

Os ensaios de toxicidade crônica baseiam-se nos resultados alcançados através dos testes de toxicidade aguda, visto que as concentrações utilizadas para os ensaios de toxicidade crônica são calculadas através da CL_{50} , quando correlacionados com os ensaios agudos, os testes de toxicidade crônica possuem mais sensibilidade a diluições, em amostras ambientais, ou seja, o efeito está intimamente ligado a resposta contínua das substâncias tóxicas por um período de tempo considerado longo na qual determinado organismo é exposto (RAND; PETROCELI, 1985). Os resultados decorrentes aos ensaios de toxicidade crônica são apresentados em CENO (Concentração de Efeito Não Observado) sendo sua definição de acordo com a NBR13373 (ABNT, 2017) “na qual é visualizado a maior concentração mensurada da amostra, sendo está caracterizada por não causar efeitos adverso capaz de levar o indivíduo a óbito sendo este efeito avaliado estatisticamente os danos ocasionados ao organismo – teste será avaliado através de alterações em comportamento e reprodução nas condições de ensaio” ao contrário da Concentração de Efeito Observado (CEO) que representa a menor concentração da amostra que causa efeito (ANDRADE, 2004).

3.3 Produtos de Higiene pessoal e Fármacos no ambiente aquático

A água consiste em um meio sujeito a diversos tipos de contaminações decorrentes dos efeitos antrópicos como efluentes das indústrias, esgotos e dejetos do setor produtivo, além destes, também está exposto às contaminações de produtos emergentes como os medicamentos de última geração, produtos de higiene pessoal e também o crescente mercado de cosméticos (COSTA et al., 2020). Este conjunto de substâncias químicas é considerado um dos grupos mais amplos, pois nele está contido composto que vai desde agrotóxicos, fármacos e produtos de higiene pessoal, podendo ser moléculas naturais ou sintéticas na qual possui extraordinária capacidade de degradar diversos nichos ecológicos ocasionando inúmeros efeitos conhecidos e desconhecidos (MURRAY et al., 2010; SAUVÉ et al., 2014).

Em suma prevalência, a liberação das substâncias químicas para os ambientes (terrestre e aquático), pode acontecer de forma rápida ou por um longo período de tempo, sendo este fato um entrave para a identificação sendo ocasionados por inúmeros fatores, mas o principal é a limitação de métodos mais avançados para a quantificação e qualificação das concentrações destes compostos no ambiente (MAYNOU et al., 2021). Para DAUGHTON (2007) o meio que mais favorece a entrada destes compostos de modo contínuo no ambiente, é através das ETEs que tem sido relatado na literatura com a principal fonte de despejo de inúmeros poluentes. Em âmbito nacional, e possivelmente mundial, a maior parte das ETEs não possuem tecnologias para eliminar ou diminuir a toxicidade destas substâncias emergentes, o principal papel das ETEs é remover a carga orgânica dos efluentes, poucas ETEs possui tecnologia como tratamento terciário (osmose, membrana e nereda) (PEREIRA; SILVA DE ABREU; MARQUES, 2021).

Portanto, para a grande maioria dos PPCPs, a principal via de entrada é pela rede de esgoto doméstico para o ambiente. Isto de fato se torna problemático uma vez que a maioria dos PPCPs se torna persistente naquela localidade, ou seja, não precisa necessariamente ser constate para gerar um impacto acentuado, uma vez que estão sendo dispersos de maneira contínua para o ecossistema aquático (OLIVEIRA; GUILLEN; MARINELI; SILVA, 2022). As vias relacionadas aos descartes dos esgotos de hospitais, da indústria e da rede doméstica, assim como, o uso dos aterros do lodo das ETEs tem sido fontes de emissão contínua de contaminação (REIF et al., 2011), pois quando liberados aos ecossistemas aquáticos, modificam o local e se tornam reservatórios que por sua vez irá armazenar estas substâncias químicas transformando-os em fontes secundárias persistentes, que irá se concentrar em sedimentos, partículas orgânicas, ou na biota, portanto as fontes são diversas. (Figura 3) (MONTAGNER; VIDAL; ACAYABA, 2017).

Este acontecimento de descarte dos PPCPs no ambiente não é algo atual sendo estas substâncias desprezadas continuamente se transformando em compostos bioativos, que detém o potencial de perdurar por anos. O que mais uma vez se torna indispensável o monitoramento e a caracterização das concentrações de cada uma destas substâncias químicas no ecossistema aquático (DE MORAES, 2019).

Figura 3. Origens e rotas dos PPCPs



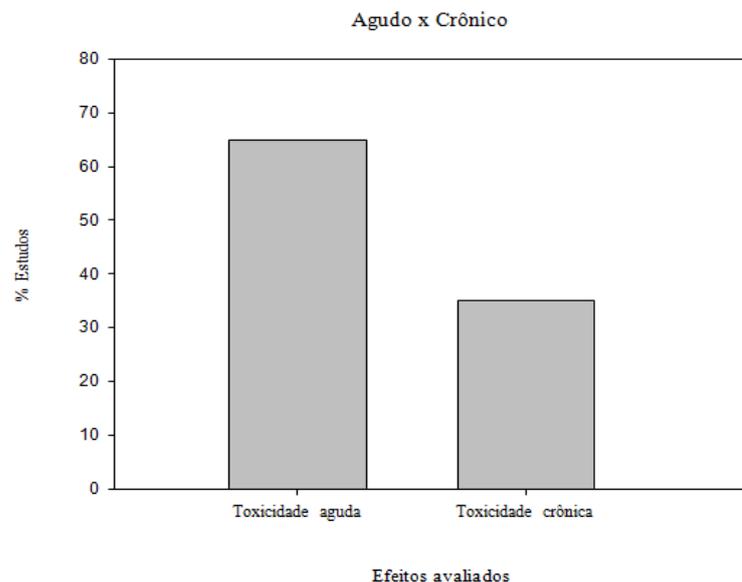
Fonte: FERNANDES, 2023.

Estes contaminantes têm sido cada vez mais detectados, no entanto, pouco se conhece sobre o seu mecanismo desde a absorção até a sua eliminação pelo organismo dos animais, e principalmente sobre os efeitos negativos que este grupo possa estar causando. O fato de estes compostos apresentarem baixa volatilidade sugere que sua distribuição no meio ambiente esteja ocorrendo por meio das vias aquáticas (FERNANDES, 2023). Dois processos de eliminação podem ser destacados durante o tratamento destes resíduos gerados: o da adsorção a sólidos suspensos e o da biodegradação (DE MORAES, 2019). Os processos atuais de remoção dos compostos químicos não são eficientes uma vez que estes métodos são empregados com a finalidade de remover partículas biológicas e algumas substâncias químicas. Nas estações de tratamento de esgoto, os poluentes emergentes não são retidos e passam com facilidade, pois suas particularidades físico-químicas permitem este acesso para os ecossistemas

aquáticos, além destas características específicas possuem também capacidade de solubilização em água, predisposição para volatilizar, alto índice de adsorção em lodo e tempo prolongado de meia-vida de degradação por processos abióticos e bióticos (SOARES; SOUZA, 2019).

Diante disso, se torna imprescindível o conhecimento a respeito dos prováveis impactos biológicos que estas substâncias químicas podem ocasionar, sendo importante mensurar e avaliar os riscos ambientais, sendo, portanto de extrema relevância que estudos ecotoxicológicos sejam realizados a fim de prever os efeitos agudos e crônicos, com essa diversa classe de PPCPs, assim para melhor compreensão dos efeitos gerados é necessário que distintos testes sejam realizados com diferentes organismos. A figura (4) abaixo mostra um estudo evidenciando as publicações entre 1996 a 2009, sobre as diferentes classes de PPCPs (SANTOS et al., 2015).

Figura 4. Estudos agudos x Estudos crônicos (modificado).



Fonte: SANTOS et al. 2015.

Os dados de toxicidade aguda acima citada são úteis para estimar os efeitos, de uma descarga acidental de substâncias tóxicas já os dados de toxicidade crônica são escassos. As outras referências na literatura que citam substâncias como os fármacos, com diferentes concentrações sendo estas muitas vezes em concentrações efêmeras que são capazes de causar grandes impactos no meio ambiente por um longo período de tempo (ARAGÃO, 2018). Hoje em dia, diversos são os estudos realizados em território

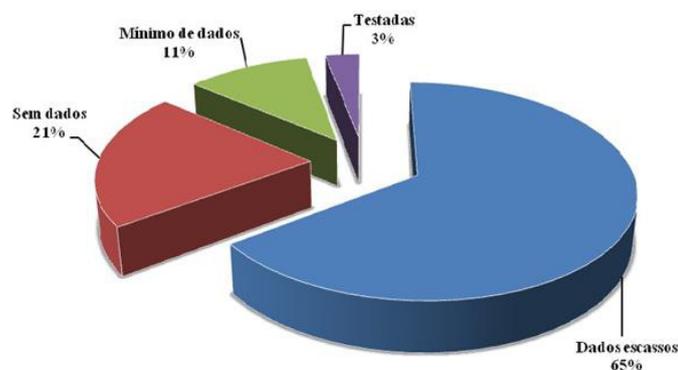
brasileiro para a identificação de PPCPs potencialmente perigosos para o meio ambiente, no entanto a literatura carece de dados, sendo assim mais estudos são necessários (DE SOUZA COUTO, 2020).

3.4 Aspectos legais

Nas últimas décadas os efeitos tóxicos de diversas substâncias químicas, decorrentes das atividades antrópicas, tem se ampliado nos ecossistemas, gerando grande preocupação as nações mundiais que se deparam com presença de compostos químicos ou micropoluentes emergentes, no meio ambiente, porém não só a substância química primária desperta interesse, mas também os subprodutos que estes irão gerar decorrentes da degradação, pois há poucas informações sobre os efeitos negativos que estes compostos irão ocasionar sobre a integridade dos ecossistemas e na disposição da comunidade biológica (FDA, 2016).

Segundo a agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (Environmental Protection Agency – EPA), grande parte destes conjuntos químicos compreende a uma diversificada gama de substâncias químicas que estão atreladas em produtos comercializados em farmácias e mercados como aqueles utilizados na limpeza da casa, na higiene pessoal, assim como para uso veterinário, na produção agrícola e nas indústrias (USEPA, 2008). Para os produtos que estão disponíveis no mercado, poucas informações referentes aos riscos que possam causar a saúde do homem e do meio ambiente estão disponíveis (Figura 5).

Figura 5. Informações quanto aos riscos para saúde humana e ao meio ambiente.



Fonte: USEPA, 2008.

O Programa Nacional de Segurança Química (PRONASQ), implementado pela Comissão Nacional de Segurança Química (CONASQ), é um órgão que regulariza e fiscaliza as substâncias químicas lançadas nos ecossistemas no Brasil (BRASIL, 2022). Esta instituição tem como premissa diligenciar de forma integrativa as informações das substâncias químicas no Brasil, visando à proteção do meio ambiente e da saúde humana, de modo a auxiliar desenvolvimento sustentável (BRASIL, 2022). Porém não há nenhum local de armazenamento de informações a respeito desses produtos químicos em uso (EPA, 2022).

Porém não há nenhum local de armazenamento de informações a respeito desses produtos químicos em uso (EPA, 2022). Ainda em âmbito federal, têm-se a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) 358/2005 e a Resolução RDC 306/2004, que na qual, possuem normativas acerca do despojo de resíduos químicos como aqueles atrelados aos serviços de saúde, fármacos e produtos químicos como os agrotóxicos (BRASIL, 2005; BRASIL, 2012).

Além de proferir o destino correto de descarte aos resíduos, também determina a realização de testes ecotoxicológicos no contexto legal, sendo o teste padronizado para garantir qualidade de águas especificada para preservação e proteção dos organismos aquáticos, sendo estes estudos de toxicidade responsáveis por coordenar e quantificar os danos fisiopatológicos gerados por xenobióticos (EPA, 2022).

A aplicação dos ensaios de toxicidade tem por finalidade a fiscalização e restrição das emissões, estando inserida na Resolução da Secretaria de Meio Ambiente do Estado de São Paulo - SMA 03 de 2000 (SÃO PAULO, 2023), que assenhereiam sobre as relações que assegure o nível de toxicidade permitida aos indivíduos aquáticos. Justificando, quaisquer interações entre compostos químicos nos efluentes, este não deverá causar efeitos adversos aos organismos aquáticos no corpo receptor.

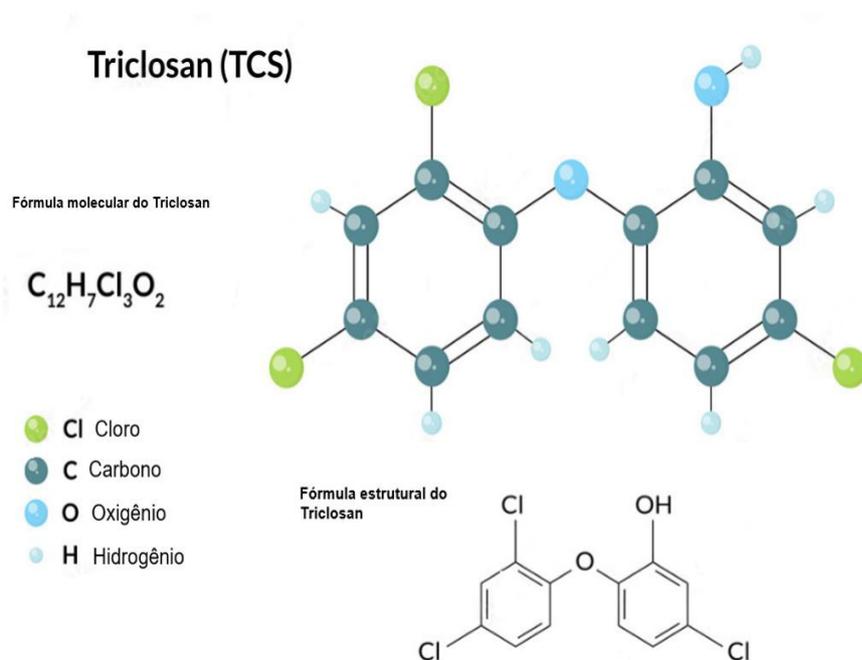
A respeito do controle de emissões a Resolução CONAMA 357/2005, determina limites de concentrações para diversas substâncias químicas além de classificar os corpos d'água (continentais e estuarinas) para seu enquadramento em classes de acordo com o uso (BRASIL, 2012).

Diante disto, faz-se necessário avaliar o risco que PPCPs e seus subprodutos químicos que podem causar ao meio ambiente, sendo necessária a identificação e quantificação das concentrações para prevenir variações fisiológicas nas comunidades biológicas e à saúde humana.

3.5 Triclosan – Ocorrência no ambiente aquático e suas implicações

Os PPCPs encontram-se amplamente difundidos no meio ambiente, dentre todos os PPCPs utilizados, quem mais se destaca é o Triclosan (TCS), conhecido como (5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxy) fenol, (Figura 6) (ETZEL; SMITH; BROWN, 2019). TCS possui ação antimicrobiana e, por isso, é muito utilizado nos produtos de higiene pessoal como, desodorantes, produtos de higiene bucal, sabonetes antimicrobianos, conservantes de um modo geral para cosméticos, embalagens de alimentos e demais produtos bactericidas (LYNDALL et al., 2017; PRAVEENA et al., 2019; SANGANYADO e GWENZI, 2019; XU et al., 2019; YOST Et al., 2017).

Figura 6. Fórmula Química Estrutural e Modelo 3D da Molécula Triclosan



Fonte: USEPA, 2008.

Segundo Teixeira e Jardim (2004), o TCS é uma substância química que possui uma estrutura molecular, clorado aromático com representantes funcionais do grupo dos

fenóis e apresenta forma de finos cristais brancos, é altamente lipofílico, sendo que seu primeiro registro data de 1969 como pesticidas e apenas em 1972 foi inserido na indústria como material de cuidados pessoais. Além de sua nomenclatura padrão, o TCS apresenta denominações como Irgasan, Irgasan DP 300, Irgacare MP, Lexol 300, Aquasept, Gamophen (USEPA, 2008).

A grande preocupação com o uso indiscriminado do TCS, está relacionada a sua presença nos ecossistemas aquáticos, pois a maior parte dos sistemas de tratamento de efluentes convencionais não possuem a capacidade de remoção total do composto (TEIXEIRA; JARDIM, 2004). Inúmeros são os efeitos que o TCS pode ocasionar em organismos, sendo os mais comuns efeitos tóxicos agudos, crônicos, alteração de biomarcadores bioquímicos, estresse oxidativo, genotoxicidade, citotoxicidade, entre outros. Em geral, sua concentração no ambiente aquático está na ordem de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$, tanto em águas superficiais quanto no sedimento em diversos países, incluindo o Brasil (WITORSCH, 2014; WU et al., 2019).

AGUERA et al. (2003), relataram O TCS na concentração de $22 \mu\text{g.L}^{-1}$ em estudos em amostras de efluente tratado, e observaram concentrações acima de $130,7 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ nas amostras dos sedimentos. Estes resultados demonstram que o TCS é inserido continuamente no meio aquático, pelas ETEs.

NISHI et al. (2008) realizaram o monitoramento da presença do TCS em água de superfície do Canal Tone no Japão e observaram concentrações de 55ng.L^{-1} a 134ng.L^{-1} em diferentes pontos estudados. ZHAO et al. (2010) analisaram amostras de água superficial e sedimento de três rios da China, além de amostras provenientes de ETE. Neste estudo, conseguiram determinar concentrações de TCS em água superficial variando de $90,2 \text{ng.L}^{-1}$ a 478ng.L^{-1} . Nas amostras de sedimento observaram concentrações que variaram de 345ng/g^{-1} a 1329ng/g^{-1} . Estes dados corroboram com o observado por AGUERA et al. (2003) onde as maiores concentrações do TCS foram encontradas nas amostras de sedimento.

A grande preocupação relacionada à permanência do TCS nos ecossistemas aquáticos, não está associada somente ao seu potencial tóxico, mas também a habilidade dos seus subprodutos que são formados através da fotodegradação, em apresentar efeitos tóxicos mais potentes do que a molécula primária, sendo o principal produto de degradação o 2,8-diclorodibenzeno-p-dioxina (2,8-DCDD), que tem a características de ser carcinogênico nos indivíduos expostos em longo prazo, além deste aspecto também

está intimamente ligado à formação de compostos como os fenóis clorados e outras dioxinas (CHU et al., 2020 ; EJTAHED et al., 2020 ; USMAN et al., 2020).

Para NIEHS et al. (2022) este comportamento de modificação estrutural da molécula primária do TCS, pode ocasionar em produtos de degradação que possui um maior tropismo por tecidos adiposos, na qual estes compostos irá se ligar as moléculas de gordura e ficará armazenado, sendo um fator que influencia de modo direto nos efeitos tóxicos no organismo do indivíduo, sendo portanto considerado mais bioacumuláveis e de difícil metabolização e excreção, dentre estes subprodutos que apresentam esta característica lipofílica se encontra o metil-Triclosan, que tem como origem a reação de metilação biológica. Além disto, a fotodegradação natural ou artificial acelera a transformação química do TCS em dioxinas (HIPPARGI et al., 2021; KAUR et al., 2020).

A transformação do TCS em dioxinas sucede após 3 dias de exteriorização a luz sintética (lâmpada fluorescente) ou luz natural, esta característica pode ocorrer também em nichos dulcícolas e marinhos. Dentro deste conceito é importante ressaltar que alguns relatos em literatura indicam que o pH, do meio de transporte (água) pode influenciar no potencial tóxico do TCS (ARANAMI et al., 2007), esta característica foi observada em estudo conduzido por ORVOS et al. (2002), que identificaram que pelo TCS estar na sua forma molecular iônica, e quando em contato com um meio que tem o pH 8,5 , sua habilidade em transpassar as membranas lipídicas diminui significativamente, esta relação foi observada com o microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia* que exibiu uma ínfima sensibilidade ao TCS em testes executados com o pH em torno de 8,5. Esta capacidade em se bioacumular não se limita a uma única espécie, pois como já relatada o TCS consegue transitar em diferenciados nichos tróficos. Inúmeros artigos científicos têm atestado a habilidade tóxica do TCS em diversas espécies.

Diante deste contexto estudo com *Cladophora sp*, mensurou os coeficientes de bioacumulação (BAF), obtendo o peso fresco das algas, coletadas uma pequena amostra da vazante e uma alíquota foi coletada de uma estação de tratamento de esgoto, localizado no norte do Texas – USA. Os dados obtidos apresentavam variação de 900 a 2100 mg/L⁻¹, para as amostras de água, os valores relacionados a concentração de TCS observados para as algas apresentou uma variação de 100 ng.g⁻¹ a 150 ng.g⁻¹ na qual todas as amostras avaliadas apresentaram alto coeficiente de bioacumulação principalmente nas algas (COOGAN et al., 2007).

Em estudo conduzido por FAIR et al. (2009), na qual investigaram a possível presença do TCS em plasma de *Tursiops truncatus*, popularmente conhecido como golfinho nariz de garrafa. A identificação do TCS em plasma sanguíneo de animais da natureza, capturados em dois estuários da Flórida, USA. Também foram feitas colheitas de alíquotas de água de uma estação de tratamento de esgoto na mesma região. Os dados obtidos demonstraram concentrações de TCS em plasma sanguíneo de *Tursiops truncatus* que apresentaram variação de 0,025 ng.g⁻¹ a 0,270 ng.g⁻¹ (sendo este o peso úmido). Já para as alíquotas de água as concentrações observadas foram em média de 7,5 ng.L⁻¹.

PALENSKE et al. (2010), verificaram efeitos tóxicos ocasionados pelo TCS em anfíbios em distintos estágios de desenvolvimento. O range de maior índice de infiltração de TCS, sucedeu no estágio 49 do desenvolvimento larval do anfíbio *Xenopus laevis*, sendo os índices de variação observados com maior prevalência nas concentrações 2600 ng.g⁻¹ a 270,000 ng.g⁻¹.

Em estudo conduzido por ADOLFSSON-ERICI et al. (2002), averiguaram a existência do TCS em amostras de leite materno na cidade de Estocolmo, na Suécia.

De acordo com o estudo, foram constatados altos índices de TCS em diferentes concentrações, sendo três amostras de leite com resultados com alto teor de TCS e nas outras cinco amostras que apresentaram concentrações mais amenas, a variação observada entre as amostras foi de 300 µg.kg⁻¹. Estes estudos realizados com espécies diferentes têm apresentado resultados indicando que o TCS, é capaz de modificar os níveis hormonais ocasionando alterações endócrinas, também são visualizados os desarranjos no sistema nervoso central caracterizado por uma neurotoxicidade além de diminuição na atividade tireoidiana assim como o desenvolvimento de células tumorais mamárias (ZHANG et al., 2021; WEE et al., 2020; FAIR et al., 2009).

Desta forma, acerca dos relatos apresentados, é de total urgência a execução e padronização de estudos ecotoxicológicos, para identificar e quantificar de forma mais precisa assim como compreender os mecanismos relacionados aos sítios de ação desta substância química.

3.6 Organismos aquáticos como bioindicadores ambientais

Inúmeros métodos são utilizados para validar e classificar os ambientes contaminados por substâncias tóxicas um dos meios mais eficientes para monitorar estes

xenobióticos é a utilização de peixes como organismos sentinelas, pois apresentam sensibilidade com relação à qualidade do ambiente em que vivem (YANCHEVA et al., 2015). Desta forma é possível mensurar os danos ambientais através da quantificação das alterações em nível bioquímico, fisiológico, genético, morfológico ou comportamental. Para a utilização desses indivíduos, como organismos bioindicadores alguns fatores precisam ser atendidos como os coeficientes bio-ecológicos e ambientais, sendo estes dois fatores extremamente importantes para a estruturação dos indivíduos bioindicadores/sentinelas, pois através destes é determinado às condições na qual será aplicado em programas de monitoramento e em testes ecotoxicológicos (Juan et al., 2021).

Para RAND et al. (1995), os ensaios de ecotoxicidade são de extrema importância para dimensionar os danos causados por xenobióticos, mas para isto é necessário padronizar e adequar os testes assim como os indivíduos que serão utilizados para os estudos toxicológicos, sendo que estes precisam atender os inúmeros critérios adotados em relação aos organismos-teste, tais como;

- Apresente uma variação genética ampla assim como sua sensibilidade frente ao agente estressor;
- Deve possuir ampla distribuição;
- Apresente uma relevância comercial e relevância ecológica;
- Fácil manejo e cultivo dentro de instalações de pesquisa, de forma a facilitar os testes de toxicidade aguda e crônica;
- Conhecimento já existente de sua biologia fisiológica, de modo a permitir a visualização e interpretação dos dados obtidos nos ensaios.

Para que a execução dos ensaios de toxicidade com organismos aquáticos ocorra da maneira mais eficiente, é necessário que apresentem ampla disponibilidade. Sendo assim há três maneiras de apoderar-se dos organismos: através da captura em ambientes naturais, obtenção por meio de pisciculturas habilitadas e a criação em laboratório. Uma grande diversidade de organismos-testes é utilizada em testes laboratoriais, dentre os grupos mais importantes se encontram as bactérias, as microalgas, os microcrustáceos, os equinóides, os moluscos e os peixes (GUESMI; SLENO 2020).

3.6.1 Hematologia como bioindicador ambiental

A hematologia é a área da biologia que pesquisa e trata possíveis distúrbios morfológicos associados ao sangue assim como órgãos hematopoiéticos. Sua análise consiste em quantificar e qualificar modificações estruturais em eritrócitos, leucócitos e trombócitos, bem como os outros elementos presentes, tais como, proteínas e hemoglobina. Os parâmetros sanguíneos e os parâmetros bioquímicos e enzimáticos, contribuem para a identificação correta assim como auxiliam os testes toxicológicos sobre um possível quadro de contaminação ambiental. (REDDY et al., 2017). De acordo com ADHIKARI et al. (2004), os indicadores hematológicos são de extrema importância, pois através dos resultados, obtém-se o status fisiohistopatológicos dos indivíduos, desta forma, se transforma em um dos elementos essenciais para análise da funcionalidade do sistema do peixe submetido a uma substância tóxica. A aplicação da hematologia como biomarcador ambiental, proporciona uma quantificação mais rápida da higidez dos organismos aquáticos, sendo capaz de mensurar os efeitos causados pela exposição aos xenobióticos (MAYER et al., 1992; ROCHA, 2009). A constituição fisiológica do sangue está ligada a diversos fatores como, sexo, estágio gonadal entre outros (LAVANYA et al., 2011).

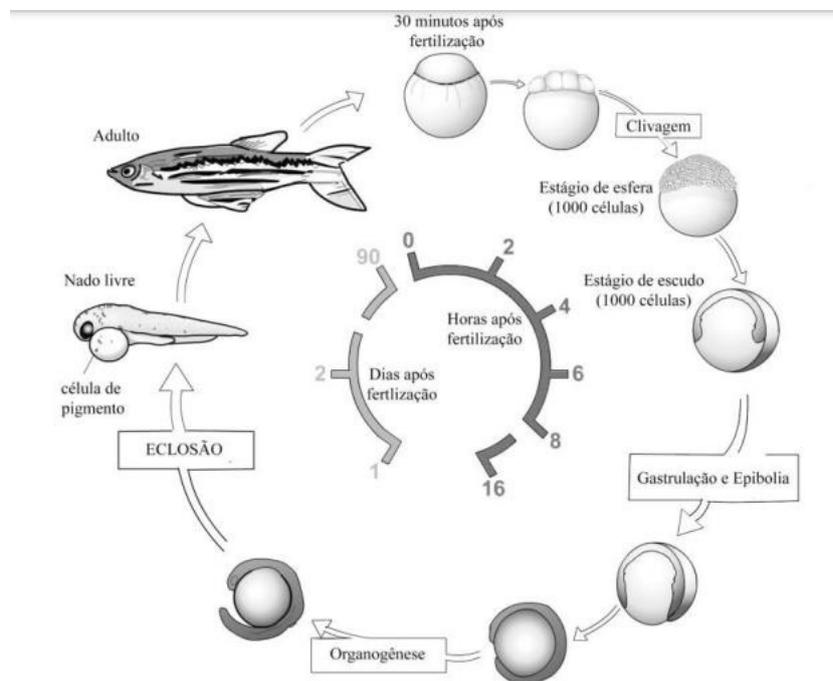
Por outro lado, fatores externos como infecções e estresse também podem ter um impacto significativo (MCCORMICK; NAIMAN, 1985). Em teleósteos, os órgãos responsáveis pela hematopoiese são o baço e o rim. Segundo DHEER et al. (1987), a produção de células sanguíneas pode ser influenciada por diversos fatores, incluindo aqueles relacionados ao ambiente. Dessa forma, os parâmetros hematológicos são essenciais tanto para identificar alterações fisiológicas quanto para avaliar a saúde dos organismos em situações de estresse.

3.6.2 Embriões como bioindicador ambiental

O uso de embriões de peixes, vem ganhando notoriedade no campo das pesquisas ecotoxicológicas, pela praticidade e pelos resultados gerados. Outro fator que contribui para a popularidade do uso de embriões em estudos científicos é a possibilidade de se realizar a sua reprodução em laboratório de forma relativamente simples (CAPELA et al., 2016; EU, 2006; LUECHTEFELD et al., 2018; SANTOS et al., 2018). Um casal de peixe, a depender da espécie escolhida, pode facilmente produzir cerca de 200 embriões, e sendo a fecundação externa, torna-se viável a coleta desses embriões para a realização de estudos experimentais.

O ciclo completo de desenvolvimento do embrião ocorre em até 96 horas (Figura 7), e por possuir o seu ovo transparente, é possível acompanhar o seu pleno desenvolvimento, possibilitando observar eventuais alterações em diversos órgãos como coração e olhos. Outras vantagens no uso de embriões estão relacionadas ao pouco espaço necessário para a realização do experimento, uma vez que os grupos amostrais podem ser organizados em placas de cultura de 96 poços, resultando em baixo custo de manutenção durante os experimentos realizados (OECD, 2012). A espécie de peixe mais usual como modelo experimental para testes toxicológicos é o *Danio rerio*. Uma das principais referências para a realização de testes com embriões de peixe-zebra é o guia Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test (OECD, 2012) o qual detalha todas as etapas experimentais dos testes com embriões, inclusive as alterações possíveis de se observar durante o seu desenvolvimento (D’COSTA, A. SHEPHERD, I. T. 2009).

Figura 7. A imagem ilustra o desenvolvimento embrionário, começando logo após a fertilização até sua forma adulta.



Fonte: Adaptado de D’COSTA, A.; SHEPHERD, I. T. 2009.

É fundamental destacar que cada espécie de peixe possui características distintas no seu desenvolvimento embrionário. Alguns espécimes apresentam ovos translúcidos, o que facilita a visualização do embrião em laboratório, enquanto outros não possuem essa característica. O *Danio rerio* e o *Astyanax altiparanae*, por exemplo, possuem ovos

translúcidos, o que os torna adequados para serem utilizados como espécimes bioindicadora (GARCIA et al., 2015).

3.7 Características e biologia do gênero *Astyanax altiparanae*

3.7.1 A família Characidae e a Subfamília Tetragonopterinae

A família Characidae compreende na maior fração de peixes de água doce do Brasil, quando correlacionada com as demais famílias da ordem Characiformes, desta forma torna-se a maior e mais variada, sendo considerada de fato a mais complexa. Nesta família está contida peixes de hábitos diversificados como herbívoros, onívoros, carnívoros, sendo estes dispersos a uma grande diversidade de habitats (BRITSKI et al., 1998).

Os indivíduos ligados a esta imensa família, ocorrem desde o continente americano, México-Estados Unidos até o Sul da Argentina e África (LUCENA, 1993). No continente americano esta família se divide em 30 subfamílias e aproximadamente 250 gêneros (BRITSKI, 1972) e 1406 espécies (FROESE; PAULY, 2004).

Estas espécies, usualmente exibem nadadeira e caudas volumosas, são exímios nadadores, e a grande parcela dos peixes inseridos nesta família apresentam escamas. Alguns destes indivíduos são bem populares no Brasil, como os lambaris, piracanjubas, piranhas, pacus, peixe-cachorro, dourado, entre outros. Por se tratar de diferentes organismos, estes apresentam características morfológicas distintas como a variação do tamanho que vai desde dois cm, como por exemplo, os pequiras, até mais de um metro, como o dourado (BRITSKI, 1972). De fato, a quantidade de espécies compreendidas nesta família, apresenta rica diversidade de indivíduos que exibe formas distintas e outras semelhantes, dificultando assim a identificação e classificação nestes agrupamentos naturais dentro dela. Desta forma estudos tem sido empregado para auxiliar a identificar a conexão de parentesco entre as famílias que compõem este variado grupo, poucos estudos tem alcançado êxito, sendo afetado produzindo dúvidas sobre a efetividade de ser um monofilético (LUCENA, 1993).

Os resultados citogenéticos publicados acerca da família Characidae remetem a dados que comprovam a heterogeneidade que esta grande família expressa, sendo deste modo identificado particularidades distintas entres estes indivíduos que compõem estas subfamílias. A subfamília Tetragonopterinae, engloba o maior número de espécies no

Brasil, é bastante diversificado e possui muitos gêneros e espécies (Figura 8) (BRITSKI, 1972).

Figura 8. Posição taxonômica da família Characidae.

FILO – Chordata
 SUBFILO – Vertebrata
 SUPERCLASSE – Pisces
 CLASSE – Osteichthyes
 SUBCLASSE – Actinopterygii
 INFRACLASSE – Teleostei
 SUPERORDEM – Osthariophysi
 SÉRIE – Otophysi
 SUBSÉRIE – Characiphysi
 ORDEM – Characiformes
 FAMÍLIA – Characidae
 SUBFAMÍLIA - Tetragonopterinae
 GÊNERO – *Astyanax*
 ESPÉCIE: *Astyanax altiparanae*

Fonte: FINK e FINK 1981.

A identificação e classificação dos indivíduos se fundamentam nas características individuais destes representantes, a classificação segue critérios, sendo que os diferenciais na dentição consistem em um dos principais pontos a ser utilizado na classificação, por exemplo, a presença de dentes cuspidados, sua organização em duas ou três séries no pré-maxilar e em uma única série na mandíbula (FINK e FINK 1981). Seguindo esses critérios, as espécies de Tetragonopterinae, possui hábitos alimentares prevalentemente onívoros, e encontra-se distribuído em ambientes diversificados (BRITSKI et al., 1998) além de exibir. Diante deste fato a subfamília Tetragonopterinae exibe uma imensa variedade morfológica e cada indivíduo expressa uma característica específica, tem sido cada vez mais relatada e admitida que este grupo não retrate somente um agrupamento monofilético, mas sim um agrupamento parafilético (BUCKUP, 1998; WEITZMAN et al., MALABARBA, 1998).

3.7.2 Gênero *Astyanax*

O gênero *Astyanax* é um dos mais relevantes da América do Sul, são reconhecidos corriqueiramente como piabas, surubins ou lambaris (LIMA et al., 2003;

HALUCH e ALBILHOA, 2005). GARUTTI (1995; 1998) menciona que este gênero é constituído por aproximadamente 100 espécies e subespécies e tem uma disposição correlacionada, propondo um endemismo notável. VAZ (2000) considera que a maior parte das espécies deste grupo não foi identificada e nem descritos corretamente, uma vez que o grau de similaridade morfológica é alto, sendo sua designação dificultada assim como sua caracterização. Deste modo o gênero *Astyanax* apresenta hábito de forragear diferentes habitats assim como transitar em diferentes níveis tróficos, apresenta capacidade notável de modificar seus hábitos alimentares, em resposta às mudanças ambientais (LOBÓN-SERVIÁ e BENNEMANN, 2000). Este grupo comporta indivíduos pequenos, até 200 mm, possui como importante característica na dentição, duas séries de dentes no pré-maxilar, sendo uma série interna com cinco dentes, possui uma linha completa na lateral e apresentam à nadadeira caudal nua, as escamas apresentam cor cobre apenas a base dos raios da nadadeira caudal (DIAS et al., 2023).

Para METZENER et al. (2004), o gênero *Astyanax* tem um grande potencial genético para pesquisas ecotoxicológicas uma vez que os mesmos apresentam características ligadas rusticidade e rápido crescimento, sendo, portanto, uma espécie com potencial de ser utilizados como biomarcador ambiental. Além destas qualidades, para a linha de pesquisa apresenta também aptidão para os piscicultores que tem apresentado interesse por estes animais uma vez que possui uma ótima praticidade para ser utilizados como iscas- vivas assim como a qualidade de sua carne para consumo humano (TEIXEIRA et al., 2009; VITORINO et al., 2011; MARTINEZ et al., 2012).

O lambari são peixes que apresentam características migratórias, sua reprodução é definida através da fecundação externa e não apresenta comportamento parental com período reprodutivo prolongado de setembro a março e desova parcelada (VAZZOLLER e MENEZES, 1992). Sendo o ciclo reprodutivo mais intenso na piracema, também realizando curtas migrações ascendentes na época de cheias, assim lhes proporcionando o estímulo necessário para a reprodução e algumas espécies aparecem com maior frequência no período em que ocorrem as cheias, estando presentes em ambientes com fundo de areia (VAZ et al., 2000).

3.7.3 A espécie *Astyanax altiparanae*

Astyanax altiparanae (GARUTTI; BRITSKI, 2000) é a nova designação para o lambari-do-rabo-amarelo que era anteriormente era classificado como *Astyanax*

bimaculatus. Esta nova designação foi realizada por intermédio da retificação do gênero *Astyanax* ssp, que através de estudos nas bacias hidrográficas do Alto Paraná, Rio São Francisco e Rio Amazonas, eram primeiramente reconhecidos e identificados como pertencente ao grupo *Astyanax bimaculatus*, a característica em comum expressa por estes indivíduos inclui manchas na região umeral de formato ovalado e mancha no pedúnculo caudal estendendo-se à extremidade dos raios caudais medianos (NAKAJIMA et al., 2012).

O lambari-do-rabo-amarelo, também popularmente conhecido como tambiú ou lambari-relógio, possui distribuição geografia por inúmeros lagos e rio do Brasil, sendo sua maior concentração pela bacia do alto rio Tibagi e na bacia do alto rio Iguçu (GRAÇA e PAVANELLI, 2002), entretanto, embora expresse características marcantes, esta espécie decorre em grande pluralidade em microambientes, fazendo com que as populações ligadas a este grupo de peixes não se apresente de forma homogêneas quanto à sua morfologia (RAMSDORF, 2007).

As características fenóticas desta espécie incluem indivíduos pequenos, apresentam crescimento rápido, podendo atingir sua maturidade em aproximadamente, quatro meses de idade, onde os machos podem chegar a atingir cerca de 7 a 9 cm e as fêmeas cerca de 9 a 12 cm de comprimento e chegar a cerca 60 gramas de peso vivo (PORTO-FORESTI et al., 2001). Já as características reprodutivas da espécie apresentam diferenças entre machos e fêmeas, ou seja, apresenta dimorfismo sexual sendo evidentes estes aspectos, as fêmeas exibem tamanho corporal maior que os machos, o corpo é mais robusto sendo arredondado e são precoces em relação aos machos (PORTO-FORESTI et al., 2000; SATO et al., 2006).

O *Astyanax altiparanae* apresenta características marcantes como sua coloração prateado por toda extensão corpórea, apresentando a região ventral esbranquiçada e a região dorsal cinzenta, as nadadeiras caudal, anal e pélvica são amareladas enquanto as demais são hialinas ou levemente amareladas. Na caudal, ainda, há uma faixa mediana negra estendida à extremidade dos raios medianos, separando os lobos superior e inferior. Acima da pupila, há uma mancha amarelo-ferrugem (GARUTTI e BRITSKI, 2000) (Figura 9).

Figura 9. Exemplar de *Astyanax altiparanae* (Characidae).



Fonte: GARUTTI; BRITSKI, 2000.

A fase de crescimento e desenvolvimento embrionário apresenta já nos primórdios de amadurecimento, uma expressão genética que irá determinar se o indivíduo irá se originar macho ou fêmea, porém o ambiente tem forte influência sobre esta variável, pois os embriões por mais que tenha no seu código genético o gene masculino ou feminino ainda não expressa essa qualidade morfológica neste estágio de vida (GARUTTI e VENERE, 2009).

Esta definição morfológica irá se expressar na fase larval, onde por forte influência da ação de hormônios e fatores ambientais que determinara a designação sexual dos indivíduos. Deste modo se na fase larval ocorrer quais quer mudanças sobre o balanço hormonal ou ambiental, este resultara em provocar mudança de sexo (BALDISSEROTTO, 2002). Esta espécie é capaz de colonizar diversos ambientes aquáticos. Sendo sua dieta alimentar predominantemente onívora, ou seja, seus hábitos alimentares são de fácil manejo, aceitando dietas variadas de acordo com a disponibilidade de recursos (PAZIAN et al., 2012).

De acordo CASTILHO e ALMEIDA (2007), o lambari-do – rabo-amarelo possui qualidades que eleva o interesse na espécie, pois apresenta um alto índice de sobrevivência, curtas gerações, prole numerosa e por ser de fácil manejo em condições de laboratório.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Ecotoxicologia aquática – toxicidade crônica de curta duração – método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea)**. NBR 15350. Rio de Janeiro, 2017.

ADAMS, W. J.; ROWLAND, C. D. **Aquatic toxicology test methods**. In: HOFFMAN, C. J.; RATTNER, B. A.; BURTON, G. A. JR.; CAIRNS, J. JR. (Eds.). *Handbook of Ecotoxicology*. 2. ed. Boca Raton, FL: Lewis Publishers, p. 19-43, 2002.

ADHIKARI, N. P.; PEHG, X.; ALIZADEH, A.; GANTI, S.; NAYAK, S. K.; KUMAR, S. K. **Multiscale modeling of the surfactant mediated synthesis and supramolecular assembly of cobalt nanodots**. *Physical Review Letters*, v. 93, p. 18301-18304, 2004.

ADOLFSSON-ERICI, M.; PETTERSSON, M.; PARKKONEN, J.; STURVE, J. **Triclosan, a commonly used bactericide found in human milk and in the aquatic environment in Sweden**. *Chemosphere*, v. 46, p. 1485-1489, 2002.

AGUERA, A.; ALBA-FERNÁNDEZ, A. R.; PIEDRA, L.; MÉZCUA, M.; GÓMEZ, M. J. **Evaluation of Almeida-Toledo, L. F. Contribuição à citogenética de peixes neotropicais**. São Paulo: Instituto de Biociências de São Paulo, USP, 2003. 84 p. Tese de livre-docência - Instituto de Biociências de São Paulo, Universidade de São Paulo.

AGUERA, A.; ALBA-FERNÁNDEZ, A. R.; PIEDRA, L.; MÉZCUA, M.; GÓMEZ, M. J. **Evaluation of Almeida-Toledo, L. F. Contribuição à citogenética de peixes neotropicais**. São Paulo: Instituto de Biociências de São Paulo, USP, 2003. 84 p. Tese (Livre-docência) – Instituto de Biociências de São Paulo, Universidade de São Paulo.

ANDRADE, M. A. R. A. de. **A creche enquanto espaço de ações das políticas públicas destinadas à infância**. *Serviço Social e Realidade (Franca)*, v. 13, n. 2, p. 79-88, 2004.

ARAGÃO, M. A.; ARAÚJO, R. P. A. **Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos**. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Eds.). *Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações*. São Carlos, SP: RIMA, p. 117-152, 2006.

ARAGÃO, Rafaela Barbosa de Andrade. **Fármacos como poluentes emergentes em ambientes aquáticos: panorama de consumo na Região Metropolitana de São Paulo e quadro comparativo de políticas públicas entre países**. 2018.

ARANAMI, K.; READMAN, J. W. **Photolytic degradation of triclosan in freshwater and seawater**. *Chemosphere*, v. 66, p. 1052-1056, 2007.

BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia aplicada à piscicultura**. Santa Catarina: UFSM, 2002. 212 p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução RDC nº 306, de 7 de dezembro de 2004. Dispõe sobre o regulamento técnico de boas práticas para serviços de saúde**. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 8 dez. 2004. Seção 1, p. 50-55.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução CONAMA nº 358, de 29 de abril de 2005. Estabelece diretrizes e normas para o lançamento de efluentes líquidos e gerenciamento de águas residuais**. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 2 mai. 2005. Seção 1, p. 83-84.

BRASIL. **Resolução CONAMA nº 430, de 13 de maio de 2011. Estabelece as condições e os padrões de lançamento de efluentes em corpos d'água**. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 17 maio 2011.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução CONAMA nº 463, de 8 de novembro de 2012. Altera a Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005, que estabelece normas para o lançamento de efluentes líquidos**. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 9 nov. 2012. Seção 1, p. 51-52. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/portugues/legislacao/conama>. Acesso em: 26 jul. 2024.

BRASIL. **Lei n. 6.437, de 20 de agosto de 1977. Configura infrações à legislação sanitária federal, estabelece as sanções respectivas, e dá outras providências.** Brasília, 1977. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l6437.htm. Acesso em: 22 jul. 2022.

BRASIL. **Programa Nacional de Segurança Química (PRONASQ).** Implementado pela Comissão Nacional de Segurança Química (CONASQ). Brasília, 2022.

BRITSKI, H. A. **Peixes de água doce do estado de São Paulo: sistemática, poluição e piscicultura.** São Paulo, 1972.

BRITSKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco).** 3. ed. Minas Gerais: Ministério da Irrigação – Codevasf, 1988.

BUCKUP, P. A. **Relationships of the Characidiinae and phylogeny of Characiform fishes (Teleostei, Ostariophysi).** In: **PHYLOGENY AND CLASSIFICATION OF NEOTROPICAL FISHES.** Porto Alegre: Edipucrs, 1998. p. 123-144.

BURTSCHER-SCHADEN, H.; DURSTBERGER, T.; ZALLER, J. G. **Comparação toxicológica de substâncias ativas de pesticidas aprovadas para agricultura convencional vs. orgânica na Europa.** *Toxics*, v. 10, p. 753, 2022.

CAIRNS, J. Jr.; NIEDERLEHNER, B. R. **Ecological toxicity testing.** Boca Raton, FL: Lewis Publishers, 1995. 228 p.

CAPELA, R. et al. **Embryo bioassays with aquatic animals for toxicity testing and hazard assessment of emerging pollutants: a review.** *Science of the Total Environment*, [S.l.], v. 677, p. 135740, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135740>. Acesso em: 26 jul. 2024.

CHEN, L.; YANG, L.; ZHANG, Y.; ZHAO, H. **Regulatory and environmental challenges associated with triclosan: Current perspectives and future directions.** *Environmental International*, v. 170, p. 107693, 2023.

CHU, W.; FANG, C.; DENG, Y.; XU, Z. **Intensified disinfection amid COVID-19 pandemic poses potential risks to water quality and safety.** *Environmental Science et al., Technology*, v. 55, n. 7, p. 4084-4086, 2020.

COOGAN, M. A.; EDZIYIE, R. E.; LA POINT, T. W.; VENABLES, B. J. **Algal.** In: RAND, G. M. (ed.). *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment.* North Palm Beach, FL: Ecological Services Inc., 2007. p. 151-173.

COONEY, J. D. **Sediment tests.** In: RAND, G. M. (Ed.). *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment.* North Palm Beach, FL: Ecological Services Inc., 1995.

COSTA, L. C. J. et al. **Impact of triclosan on human health and the environment: A review of current research.** *Journal of Environmental Management*, v. 260, p. 110094, 2020.

CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M. de L. C.; SILVA, R. B. da; FOSTER, J. E. **Spodoptera frugiperda (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) management of maize (Zea mays L.) crop using a sexual pheromone trap as a decision tool for pesticide application.** *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, Sete Lagoas, v. 9, n. 2, 2010. No prelo.

DAUGHTON, C. G. **Pharmaceuticals in the environment: Sources and their management.** In: BARCELÓ, D. (Ed.). *Analyses, fate and removal of pharmaceuticals in the water cycle.* 1. ed. Elsevier, 2007. p. 1-49.

D'COSTA, A.; SHEPHERD, I. T. **Zebrafish development and genetics: introducing undergraduates to developmental biology and genetics in a large introductory laboratory class.** *Zebrafish*, v. 6, n. 2, p. 169-177, jun. 2009.

DE MARCHI, S. et al. **Triclosan exposure and impact on human health: A comprehensive review.** *Environmental International*, v. 140, p. 105745, 2020.

DE MORAES, N. P. **Fotocatálise heterogênea aplicada na degradação de poluentes orgânicos utilizando catalisador híbrido de óxido de zinco-xerogel de carbono.** 2019. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

DE SOUZA COUTO, Jarina Maria et al. **Remoção de carbamazepina em soluções aquosas por adsorção em carvão ativado em pó e avaliação da toxicidade crônica.** *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n. 2, p. 8744-8765, 2020.

DHEER, J. M. S.; DHEER, T. R.; MAHAJAN, C. L. **Haematological and haematopoietic responses to acid stress in an air-breathing freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch.** *Journal of Fish Biology*, v. 30, p. 577-588, 1987.

DIAS, G. M. C.; BEZERRA, V.; RISSO, W. E. et al. **Alterações hematológicas e bioquímicas no peixe neotropical *Astyanax altiparanae* após exposição aguda a uma mistura de cádmio e níquel.** *Poluição do Solo, Ar e Água*, v. 234, p. 307, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11270-023-06325-5>. Acesso em: 26 jul. 2024.

DOU, L. et al. **Genome-wide analysis of the WRKY gene family in cotton.** *Molecular Genetics and Genomics*, v. 289, p. 1103–1121, 2014.

EPA. United States Environmental Protection Agency. **National Primary Drinking Water Regulations.** [s.d.]. Disponível em: <https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/national-primary-drinking-water-regulations#eight>. Acesso em: 18 jul. 2022.

ETZEL, T. M. et al. **Urinary triclosan concentrations during pregnancy and birth outcomes.** *Environmental Research*, v. 156, p. 505-511, 2017. DOI: 10.1016/j.envres.2017.03.015.

EUROPEAN UNION. **Directive 2006/118/EC of the European Parliament and of the Council of 12 December 2006 on the protection of groundwater against pollution and deterioration.** Bruxelas: EU, 2006. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32006L0118>. Acesso em: 26 jul. 2024.

FAIR, P. A. et al. **Occurrence of triclosan in plasma of wild Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) and their environment.** *Environmental Pollution*, v. 157, p. 2248-2254, 2009.

FARRÉ, M. et al. **Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography mass spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischeri*.** *Journal of Chromatography*, v. 938, p. 187-197, 2001.

FDA (US Food and Drug Administration). **21 CFR Parte 310: Segurança e eficácia de antissépticos de consumo. Produtos antimicrobianos tópicos para uso humano sem receita. Regra final.** *Federal Register*, v. 81, p. 61106-61130, 2016.

FERNANDES, S. C. S. **Determinação de sertralina, venlafaxina e seus metabolitos ativos em sangue e urina por UPLC-MS/MS.** 2023. Dissertação (Mestrado em Química Forense) – Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2023.

FINK, S. V.; FINK, W. L. **Interrelationships of the ostariophysan fishes (teleostei).** *Zoological Journal of the Linnean Society*, v. 72, n. 4, p. 297-353, 1981.

FONSECA, A. L. **A biologia das espécies *Daphnia laevis*, *Ceriodaphnia silvestrii* (Crustácea, Cladocera) e *Poecilia reticulata* (Pisces, Poecillidae) e o comportamento destes em testes de toxicidade aquática com efluentes industriais.** 1991. 210 f. [Dissertação de Mestrado] – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

FREIRY, R.; STELZER, J. A.; MALTCHIK, L.; ARENZON, A. **Sensitivity of *Danio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) during two stages of development based on acute toxicity tests.** *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 93, p. 442-445, 2014.

FROESE, R.; PAULY, D. **FishBase.** World wide web electronic publication. Disponível em: <www.fishbase.org>. Version 12/2004. Acesso em: 15 out. 2011.

GARCIA, J. C. et al. **Efeitos ecotoxicológicos de carbofurano e nanotubos de carbono multicamadas oxidados no peixe de água doce Tilápia do Nilo: nanotubos melhoram a pesticida ecotoxicidade.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 111, p. 131-137, 2015.

GARUTTI, V. **Morfologia, reprodução e aspectos evolutivos de *Astyanax bimaculatus* (Ostariophysi, Characidae) em cursos de água da bacia do rio Paraná.** 1988. Tese (Doutorado em Zoologia) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1988. 151 p.

GARUTTI, V. **Revisão taxonômica dos *Astyanax* (Pisces, Characidae), com mancha umeral ovalada e mancha no pedúnculo caudal, estendendo-se a extremidade dos raios caudais medianos, das bacias do Paraná, São Francisco e Amazônica.** 1995. Tese (Livre-docência) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 1995. 286 p.

GARUTTI, V.; BRITSKI, H. A. **Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia.** *Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia PUCRS. Série Zoologia*, Porto Alegre, v. 13, p. 65-88, 2000.

GARUTTI, V.; VENERE, P. C. ***Astyanax xavante*, a new species of characid from middle rio Araguaia in the Cerrado region, Central Brazil (Characiformes: Characidae).** *Neotropical Ichthyology*, v. 7, p. 377-383, 2009.

GRAÇA, W. J.; PAVANELLI, C. S. **Astyanax altiparanae Garutti e Britski, 2000 (Osteichthyes, Characidae) na bacia do rio Iguçu.** *Acta Scientiarum*, v. 24, n. 2, p. 451-453, 2002.

GUESMI, H.; SLENO, S. **Assessment of environmental pollution using aquatic bioindicators.** *Journal of Environmental Protection*, v. 48, n. 5, p. 1125-1138, 2020.

HAMADA, N. **Ensaio de toxicidade empregados na avaliação de efeitos no sistema de tratamento de esgotos e efluentes, ETE Suzano, e seu entorno, utilizando organismos aquáticos.** 2008. [Dissertação de Mestrado] – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

HAN, D.; LEE, S. H.; CHOI, K. **Triclosan and its effects on the aquatic environment: A comprehensive review.** *Science of the Total Environment*, v. 541, p. 223-237, 2016.

HEBERER, T.; JÜRGENSEN, H.; JÜRGENSEN, S. **Synthetic musks in the aquatic system of Berlin as an example for urban ecosystems.** In: RIMKUS, G. G. (Ed.). *Synthetic musk fragrances in the environment.* Heidelberg: Springer, [no prelo] 2002.

HENSCHER, K. P.; WENZEL, A.; DIEDRICH, M.; FLIEDNER, A. **Environmental hazard assessment of pharmaceuticals.** *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 25, p. 220-225, 1997.

HIPPARGI, G.; ANJANKAR, S.; KRUPADAM, R. J.; RAYALU, S. S. **Simultaneous wastewater treatment and generation of blended fuel methane and hydrogen using Au-Pt/TiO₂ photo-reforming catalytic material.** *Fuel*, v. 291, p. 120113, 2021. DOI: 10.1016/j.fuel.2020.120113.

JUAN, X.; LOPEZ, M.; GARCIA, R. **Impact of environmental stressors on aquatic bioindicators: A comprehensive study.** *Journal of Environmental Science and Technology*, v. 56, n. 9, p. 1245-1260, 2021.

KAUR, H. et al. **Enhanced photocatalytic degradation of antimicrobial triclosan using rGO–TiO₂ composite under natural solar illumination.** *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, v. 31, p. 6045-6058, 2020. DOI: 10.1007/s10854-020-03156-6.

KUMAR, P.; SINGH, S.; GUPTA, S.; SHUKLA, R. **The effect of triclosan on the aquatic environment: Analysis and management strategies.** *Science of the Total Environment*, v. 767, p. 144209, 2021.

LAVANYA, S.; RAMESH, M.; KAVITHA, C.; MALARVIZHI, A. **Hematológico, bioquímico e respostas ionorregulatórias da carpa indiana *Catla catla* durante a exposição crônica subletal ao arsênio inorgânico.** *Chemosphere*, v. 82, n. 7, p. 977-988, 2011.

LEE, J. H.; PARK, S. Y.; KIM, H. J. **The regulatory landscape of triclosan: Policy changes and environmental implications.** *Journal of Environmental Management*, v. 336, p. 117639, 2023. DOI: 10.1016/j.jenvman.2023.117639.

LEE, S.; NAMBI, R. W.; WON, S. et al. **Dietary selenium requirement and toxicity levels in juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*.** *Aquaculture*, v. 464, p. 153-158, 2023.

LIMA, F. C. T. et al. **Genera Incertae Sedis in Characidae.** In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. Jr. (Eds.). *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. Porto Alegre: Edipucrs, p. 106-169, 2003.

LOBÓN-CERVIÁ, J.; BENNEMANN, S. **Temporal trophic shifts and feeding diversity in two sympatric, neotropical, omnivorous fishes: *Astyanax bimaculatus* and *Pimelodus maculatus* in Rio Tibagi (Paraná, southern Brazil).** *Archiv für Hydrobiologie*, Stuttgart, v. 149, n. 2, p. 285-306, 2000.

LUCENA, C. A. S. **Estudo filogenético da família Characidae com uma discussão dos grupos naturais propostos (Telestei, Ostariophysi, Characiformes)**. 1993. Tese (Doutorado em Zoologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 125 p.

LYNDALL, J. L. et al. **Evaluation of triclosan in Minnesota lakes and rivers: part I—ecological risk assessment**. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 142, p. 578-587, 2017.

MAGALHÃES, D. P.; FILHO, A. S. F. **A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos**. *Oecologia Brasiliensis*, v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.

MAYNOU, A. et al. **Triclosan: Environmental fate, risks, and regulations**. *Environmental International*, v. 146, p. 106208, 2021.

MCAVOY, D. C. et al. **Hypoosmoregulation in an anadromous teleost: influence of sex and maturation**. *Journal of Experimental Zoology*, v. 234, p. 193-198, 1985.

METZENER, A. F. M.; ROTEROTTE, J. A.; SENHORINI, J. A. **Crescimento e sobrevivência final de juvenis de lambari (*Astyanax altiparanae*) sob diferentes densidades de estocagem, na fase de alevino**. In: 1º Congresso da Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, Vitória-ES, Brasil, 2004. Resumo. p. 203.

MONTAGNER, Cassiana C.; VIDAL, Cristiane; ACAYABA, Raphael D. **Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios**. *Química Nova*, v. 40, n. 9, p. 1094-1110, 2017.

MORGER, A. et al. **Studying and mitigating the effects of data drifts on ML model performance at the example of chemical toxicity data**. *Scientific Reports*, v. 12, p. 7244, 2022.

MOZETO, A. A.; ZAGATTO, P. A. **Introdução de agentes químicos no ambiente.** In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Ed.). *Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações.* São Carlos, SP: Rima, 2006. p. 15-38.

MURRAY, A.; SKENE, K.; HAYNES, K. **The circular economy: an interdisciplinary exploration of the concept and application in a global context.** *Journal of Business Ethics*, v. 140, n. 3, p. 369-380, 2017.

NAKAJIMA, R. T. et al. **Evolutionary dynamics of rRNA gene clusters in cichlid fish.** *BMC Evolutionary Biology*, v. 12, p. 198, 2012.

NASCIMENTO, I. A.; SOUSA, E. C. P. M.; NIPPER, M. **Métodos em ecotoxicologia marinha – aplicações no Brasil.** In: NASCIMENTO, I. A.; SOUSA, E. C. P. M.; NIPPER, M. (Eds.). *Métodos em ecotoxicologia marinha – aplicações no Brasil.* São Paulo, SP: Artes Gráficas e Indústria Ltda., p. 262, 2006.

NEWMAN, M. C.; UNGER, M. A. **Fundamentals of ecotoxicology.** 2. ed. Boca Raton, FL: Lewis Publishers, 2002.

NISHI, I.; KAWAKAMI, T.; ONODERA, S. **Monitoring of triclosan in the surface water of the Tone Canal, Japan.** *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 80, p. 163-166, 2008.

NOGUEIRA, A. C. et al. **Concentração de hidroxiprolina como marcador bioquímico do dano músculo esquelético após treinamento de resistência de força.** *Revista Brasileira de Ciências e Movimento*, v. 15, n. 2, p. [páginas], 2007.

OLIVEIRA, José Carlos de; GUILLEN, Rubens Diego Marineli; SILVA, Daniel de Souza. **Portaria nº 888, de 04 de maio de 2021 do Ministério da Saúde: o ponto de partida para enfrentamento aos contaminantes emergentes.** *Brazilian Journal of Development*, v. 8, n. 4, p. 30890-30901, Curitiba, abr. 2022.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Guideline for Testing of Chemicals. No. 305, Bioaccumulation in fish: aqueous and dietary exposure.** Paris: OECD, 2012.

ORVOS, D. R. et al. **Aquatic toxicity of triclosan.** *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 21, p. 1338-1349, 2002.

PALENSKE, N. M.; NALLANI, G. C.; DZIALOWSKI, E. M. **Physiological effects and bioconcentration of triclosan on amphibian larvae.** *Comparative Biochemistry and Physiology C: Toxicology et al., Pharmacology*, v. 152, n. 4, p. 453-458, 2010. DOI: 10.1016/j.cbpc.2010.04.009.

PEREIRA, S. Y.; SILVA DE ABREU, A. E.; MARQUES, A. **Fármacos e produtos de cuidado pessoal na água subterrânea: revisão da literatura.** *Águas Subterrâneas*, v. 2022.

PEREIRA, S. Y.; SILVA DE ABREU, A. E.; MARQUES, A. **Fármacos e produtos de cuidado pessoal na água subterrânea: revisão da literatura.** *Águas Subterrâneas*, 2021.

PORTO-FORESTI, F.; CASTILHO-ALMEIDA, R. B.; FORESTI, F. **Biologia e criação.** In: PUSCEDDU, F. H.; LAMEIRA, V.; BOHRER, M. B. **Efeitos crônicos do fármaco triclosan sobre *Ceriodaphnia dubia* através de ensaios crônicos de ecotoxicologia.** *Livro de Resumos do VIII Congresso SETAC LA*, 2000.

PORTO-FORESTI, F.; CASTILHO-ALMEIDA, R. B.; FORESTI, F. **Biologia e criação.** In: PUSCEDDU, F. H.; LAMEIRA, V.; BOHRER, M. B. (Org.). *Efeitos crônicos do fármaco triclosan sobre *Ceriodaphnia dubia* através de ensaios crônicos de ecotoxicologia.* Livro de resumos do VIII Congresso SETAC LA, 2000.

PORTO-FORESTI, F. et al. **Cultivo do lambari: uma espécie de pequeno porte e grandes possibilidades.** *Panorama da Aquicultura*, Rio de Janeiro, RJ, v. 11, n. 67, p. 15-19, 2001.

PRAVEENA, S. M. et al. **Occurrence and potential human health risk of pharmaceutical residues in drinking water from Putrajaya (Malaysia).** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 180, p. 549-556, 2019.

RAMSDORF, W. A. **Utilização de duas espécies de *Astyanax* (*Astyanax* sp. e *A. altiparanae*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (Fazenda Canguiri – UFPR).** 2007. Tese (Mestrado em Genética) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2007.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. (Eds.). **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications.** New York: Hemispheres Publishing, p. 374-415, 1985.

RAND, G. M.; WELLS, P. G.; MCCARTY, L. S. **Introduction to aquatic ecotoxicology.** In: RAND, G. M.; WELLS, P. G.; MCCARTY, L. S. (Eds.). *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment.* North Palm Beach, FL: Ecological Services Inc., 1995.

REDDY, P. B.; BAGHEL, B. S. **Assessment of heavy metal contamination in aquatic ecosystems: case studies and methodologies.** *Journal of Environmental Management*, v. 45, n. 3, p. 123-135, 2012.

SANGANYADO, E.; GWENZI, W. **Antibiotic resistance in drinking water systems: occurrence, removal, and human health risks.** *Science of the Total Environment*, v. 669, p. 785-797, 2019.

SANTOS, Caroline Piffer Diniz; MACHADO, Alan Rodrigues Teixeira; SOUZA, Flávio Henrique Batista de. **Carvão ativado como estratégia para remoção de interferentes endócrinos.** In: *CONGRESSO BRASILEIRO INTERDISCIPLINAR EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA (I CoBICET)*. 2020.

SANTOS, L. H. M. L. M. et al. **Impact of progressive resistance training in Brazilian HIV patients with lipodystrophy.** *Journal of AIDS & Clinical Research*, v. 4, p. 1–4, 2015.

SÃO PAULO. Secretaria do Meio Ambiente (SMA). **Resolução SMA nº 12, de 15 de março de 2023. Estabelece normas e procedimentos atualizados para o controle de poluentes atmosféricos em fontes fixas.** *Diário Oficial do Estado de São Paulo*, São Paulo, SP, 16 mar. 2023. Seção 1, p. 45-50. Disponível em: <http://www.sma.sp.gov.br/legislacao>. Acesso em: 26 jul. 2024.

SATO, Y.; SAMPAIO, E. V.; FENERICH-VERANI, N.; VERANI, J. R. **Biologia do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*).** In: *ESPÉCIES NATIVAS PARA PISCICULTURA*. Santa Maria: ED UFMS, 2005. p. 468.

SAUVÉ, L. **Educação ambiental: possibilidades e limitações.** *Educação e Pesquisa*, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 317-322, maio/ago. 2014.

SILVA, C. A. D.; COSTA, L. C. J.; FERREIRA, A. M. **Triclosan exposure and human health: A review of the evidence.** *Environmental International*, v. 80, p. 84-92, 2015.

SOARES, F. S. S.; SOUZA, L. P. P. **Contaminação das águas de abastecimento público por poluentes emergentes e o direito à saúde.** Belo Horizonte/MG, Brasil: Ministério Público do Estado de Minas Gerais; Coari/AM, Brasil: Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Saúde e Biotecnologia, Departamento de Medicina, 2019.

SODRÉ, F. F. et al. **Métodos em ecotoxicologia marinha – aplicações no Brasil.** *Título do Livro*. São Paulo, SP: Artes Gráficas e Indústria Ltda., 2002. p. 262.

SOUSA, E. C. P. M. **Toxicologia marinha: histórico.** In: NASCIMENTO, I. A.; SOUSA, E. C. P. M.; NIPPER, M. (Eds.). *Métodos em ecotoxicologia marinha – aplicações no Brasil*. São Paulo, SP: Artes Gráficas e Indústria Ltda., p. 262, 2002.

STOKER, T. E.; ROBINETTE, C. L.; COOPER, R. L. **Triclosan exposure and effects on reproductive development.** *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, v. 73, n. 12, p. 765-787, 2010.

TEIXEIRA, W. G. et al. **Organization of repeated DNA elements in the genome of the cichlid fish *Cichla kelberi* and its contributions to the knowledge of fish genomes.** *Cytogenetic and Genome Research*, v. 125, p. 224-234, 2009.

TRUHAUT, R. **Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 1, p. 151-173, 1977.

UARTIROLI, A.; WAGSTAFF, C. R. D.; ETZEL, E. F. **The professional quality of life of sport psychologists: development of a novel conceptualization and measure.** *Professional Psychology: Research and Practice*, v. 50, n. 3, p. 155-167, 2019.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **National Primary Drinking Water Regulations.** [S.l.], [s.d.]. Disponível em: <https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/national-primary-drinking-water-regulations#eight>. Acesso em: 18 jul. 2022.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **Guidelines for water reuse.** Washington, DC, USA: USEPA, 2012.

USEPA – United States Environmental Protection Agency. **Reregistration eligibility decision for triclosan.** List B. Case no. 2340, p. 98, 2008.

USMAN, M.; FAROOQ, M.; HANNA, K. **Environmental side effects of the injudicious use of antimicrobials in the era of COVID-19.** *Science of the Total Environment*, v. 745, p. 141053, 2020.

VAZ, M. M.; TORQUATO, V. C.; BARBOSA, N. D. C. **Guia ilustrado de peixes da bacia do rio Grande.** Belo Horizonte: CEMIG e CETEC, 2000. 144 p.

VAZZOLER, A. E. A.; MENEZES, N. A. **Síntese dos conhecimentos sobre o comportamento reprodutivo dos characiformes da América do Sul (Teleostei, Ostariophysi).** *Revista Brasileira de Biologia*, v. 52, p. 627-640, 1992.

WARD, G. S. **Saltwater tests**. In: RAND, G. M. (Ed.). *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment*. North Palm Beach, FL: Ecological Services Inc., 1995.

WITORSCH, R. J. **Endocrine-disrupting chemicals and the regulatory challenge**. *Environmental Health Perspectives*, v. 122, n. 2, p. 123-129, 2014.

WU, J. et al. **Formation of dioxins from triclosan with active chlorine: a potential risk assessment**. *Journal of Hazardous Materials*, v. 367, p. 128-136, 2019.

WU, X.; YU, H.; LIU, J. **Effects of triclosan exposure on aquatic organisms and its environmental implications**. *Science of The Total Environment*, v. 689, p. 650-660, 2019.

XU, M. et al. **Occurrence and ecological risk of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and pesticides in typical surface watersheds, China**. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 142, p. 578-587, 2019.

YANCHEVA, V. et al. **Peixes em estudos ecotoxicológicos: estudos**. *Revista de Ecologia dos Balcãs*, v. 7, p. 149-169, 2015.

YAO, H. et al. **Environmental and health risks of triclosan: A comprehensive review**. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 25, n. 30, p. 30542-30557, 2018.

YIN, X. et al. **Triclosan exposure and its effects on microbial resistance: Insights and implications**. *Science of the Total Environment*, v. 830, p. 154671, 2022. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.154671.

YOST, L. J. et al. **Evaluation of triclosan in Minnesota lakes and rivers: part II-human health risk assessment**. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 142, p. 588-596, 2017.

ZHANG, J. et al. **Impacto do desinfetante na transferência de resistência bacteriana a antibióticos entre biofilme e água da torneira em uma rede de distribuição simulada.** *Environmental Pollution*, v. 246, p. 131-140, 2019.

ZHANG, Z. et al. **Joint label prediction based semi-supervised adaptive concept factorization for robust data representation.** 2020.

ZHAO, J.-L. et al. **Occurrence and risk of triclosan and triclocarban in the Pearl River system, South China: from source to the receiving environment.** *Journal of Hazardous Materials*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.02.2010>. Acesso em: 26 jul. 2024.

CAPÍTULO II

REPRODUÇÃO DO
LAMBARI-DE-RABO-AMARELO

RESUMO

O presente estudo teve como propósito realizar a reprodução do lambari-do-rabo-amarelo em ambiente laboratorial, adaptando a metodologia utilizada para o Zebrafish. Para a padronização da metodologia foram utilizados lambaris adultos, na qual foram aclimatados durante 60 dias, em aquários separados, machos e fêmeas que foram alocados em dois aquários retangulares de vidro com volume útil de 200L, com aeração constante por meio de um compressor de ar, controles de temperatura, iluminação artificial com fotoperíodo de 12h/12h, constantemente monitorado de acordo com as exigências da espécie. Após o período de aclimatação os animais, foram selecionados de acordo com as características reprodutivas, as fêmeas foram avaliadas e aquelas que apresentaram ventre abaulado e macio e papila urogenital avermelhada foram selecionadas, e para os machos aqueles que apresentaram espículas na nadadeira anal evidentes foram escolhidos. Deste modo os indivíduos foram alocados em uma caixa de reprodução ficando juntos por aproximadamente 14 horas, sendo avaliado o comportamento reprodutivo da espécie, após o término da desova os mesmos foram encaminhados novamente para os aquários de origem e os embriões coletados e avaliados. O procedimento adotado foi realizado de maneira natural sem utilizar indutores hormonais, os resultados obtidos nos permitem afirmar que a reprodução em laboratório apresentou resultados promissores.

Palavras-chave: Lambari-do-rabo-amarelo; Fisiologia; Reprodução em Laboratório.

1. MATERIAL E MÉTODOS

1.1 Local e protocolo da Comissão de Ética no Uso de Animal

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Aquicultura e Ecotoxicologia – LAE da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP. O experimento com os lambaris foi conduzido entre Março de 2021 a Setembro de 2023.

O manejo dos animais durante o experimento seguiu o protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Embrapa Meio Ambiente (Protocolo nº 010/2019).

1.2 Aquisição e aclimação dos peixes

Os peixes foram adquiridos de uma piscicultura localizada na região de Mogi Mirim – SP. Foram transportados em sacos plásticos, contendo um terço de água e dois terços de oxigênio, até o biotério da Embrapa Meio Ambiente, onde foram aclimatados por sete dias em tanques de polipropileno com capacidade para 500L. Os tanques foram acoplados a um sistema de filtragem e aeração constante. Os lambaris foram alimentados com ração comercial Nutriflakes (em flocos).

Durante o período de aclimação realizou-se o monitoramento da qualidade da água por meio dos parâmetros físico-químico da água, utilizando-se uma sonda multiparâmetro (U-50, Horiba, Kyoto, Japan). Os parâmetros aferidos foram: temperatura (temp.) $26,5 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$, pH 7.03 ± 0.27 , condutividade (Cond.) 0.124 ± 0.01 e oxigênio dissolvido (OD) 7.38 ± 0.37 , a amônia foi monitorada utilizando-se o kit Amônia Tóxica água doce (Labcon Test) indicando valores de 0.009 ± 0.01 .

1.3 Manejo para reprodução

1.3.1 Preparo dos reprodutores e coleta dos embriões

Após 60 dias de aclimação, dez fêmeas de cada unidade experimental, apresentando sinais de maturidade reprodutiva como ventre abaulado e macio com a papila urogenital avermelhada foram selecionadas. Realizou-se a biometria dessas fêmeas e o peso médio foi de $8,07 \pm 18,01\text{g}$ e o comprimento médio foi $9,63 \pm 0,45\text{ cm}$. Da mesma forma que as fêmeas, dez machos de cada unidade experimental que apresentavam espículas na nadadeira anal foram selecionados e submetidos a biometria, o peso médio observado foi de $6,09 \pm 17,04\text{g}$ e comprimento médio de $8,27 \pm 0,13\text{ cm}$. (Figura 10).

Figura 10. Diferença entre fêmeas e machos de *Astyanax altiparanae*. Na qual o exemplar acima é uma fêmea, pois apresenta características como ventre abaulado, coloração alaranjada na região abdominal e tamanho corpóreo superior, já o exemplar abaixo é um macho, apresenta espículas na nadadeira anal evidente e subtamanho quando comparado a fêmea.



Fonte: Gil, A. J. 2024.

Os casais foram mantidos em uma caixa de reprodução, na proporção de um macho para uma fêmea, o fotoperíodo utilizado foi de 12h/12h, permanecendo no escuro no período noturno e no início da manhã, receberam luz natural para que a desova ocorresse naturalmente, sem a utilização de hormônios. No fundo da caixa de acasalamento utilizaram-se bolinhas de gude e casinhas de cerâmicas para que os ovos fossem depositados sobre estes e ficassem protegidos da predação pelo casal de reprodutores, (Figura 11 e 12).

Figura 11. Caixa de reprodução dos lambaris com superfície revestida com folhas de bananeira para a postura (A) e fundo da caixa revestido com bolinha de gude e casinhas de cerâmica para evitar a predação dos embriões (B).



Fonte: Gil, A. J. 2024.

Figura 12. Embriões de *Astyanax altiparanae*.



Fonte: Gil, A. J. 2024.

Logo após a postura, os ovos foram retirados da caixa com auxílio de uma rede de malha fina de inox, a solução de meio de embrião foi preparada segundo NÜSSLEIN-

VOLHARD e DAHM, 2002. Após o preparo da solução os embriões foram higienizados e foram caracterizados em ovos férteis (fecundados e translúcidos) e inférteis (não fecundados ou coagulados) com o auxílio de uma lupa utilizando um aumento 60x (modelo- CP602- Phoenix luferco). Realizou-se os Ensaio toxicológicos com os ovos, seguindo o protocolo *Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test* da *Organization for Economic Co-operation and Development (OECD)*, 2013.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após adaptar a metodologia de reprodução usada para o zebrafish, foram realizados os ajustes necessários respeitando a fisiologia do lambari visto que o lambari-do-rabo-amarelo possui hábitos semelhantes ao zebrafish, ou seja, apresenta comportamento diurno, sendo mais ativo durante as primeiras horas da manhã, e ao longo do dia exibe oscilações no seu desempenho diminuindo sua atividade, enquanto que a noite estes indivíduos se tornam inativos (repouso), durante o período de descanso, na qual, os opérculos ficam quase sem movimento sendo um mecanismo fisiológico adaptado para o repouso desta espécie (SMITH et al., 2024).

Esse padrão circadiano de atividade é considerado um sistema multifotorreceptor que está associado ao um sistema multioscilar, isto significa que o sistema nervoso central através da glândula pineal e retina são responsáveis por captar os impulsos fóticos externos convertendo em um ritmo circadiano, sendo desta forma responsável por controlar inúmeros mecanismos fisiológicos, bioquímicos e comportamentais da espécie.

Portanto, as atividades desempenhadas com estes indivíduos dentro de biotérios requerem cuidados com o fotoperíodo que necessita seguir as exigências da espécie utilizada, interrupções no ciclo de iluminação podem ocasionar inúmeros transtornos fisiológicos, principalmente aqueles ligados com a excreção e secreção de hormônios da glândula pineal. Para o lambari o ciclo circadiano tem influência direta sobre a fisiologia reprodutiva na qual ocorrem modificações no eixo hipotálamo-hipófise-gônadas que está relacionado com o grau de luminosidade que aquele indivíduo recebe, sendo o lambari uma espécie que apresenta seu ciclo de reprodução em dias mais longos do ano (primavera-verão) (PORTO-FORESTI et al., 2005; SATO et al., 2006).

Dessa forma, o manejo dos peixes foi de extrema importância, para assegurar que a reprodução transcorresse de forma natural em biotério, sem a necessidade de utilizar nenhum hormônio sintético. Este processo permitiu a obtenção dos embriões em

quantidade e qualidade suficientes para os testes toxicológicos. O fotoperíodo utilizado durante a reprodução foi de 12 escuro /12 claro.

Os peixes foram separados por sexo durante o período de aclimação para facilitar o manejo e estimular a liberação de feromônios masculinos e femininos no momento da reprodução quando os machos e fêmeas são escolhidos e mantidos nas caixas de reprodução.

Assim que os peixes foram colocados juntos no aquário de reprodução, iniciou-se o ritual de acasalamento que perdurou durante todo o momento que os casais estiveram juntos, este comportamento foi semelhante ao descrito para o *Danio rerio* (SMITH et al., 2024).

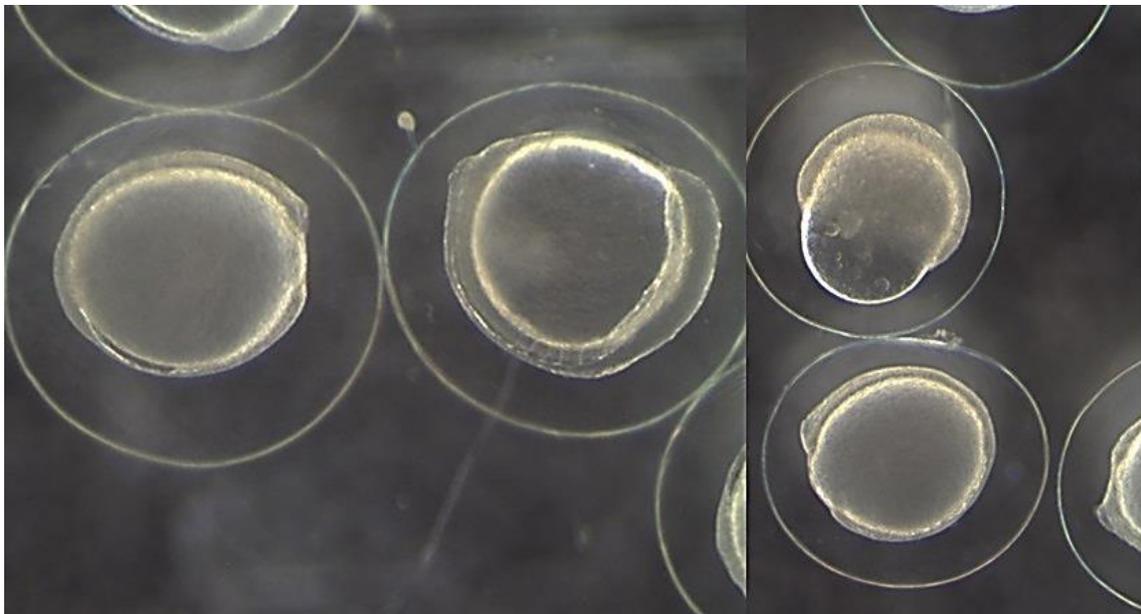
Durante o período assistido da reprodução dos lambaris, foi observado que os machos inicialmente, exibiram sinais de corte, nadando ao redor das fêmeas, com as nadadeiras ligeiramente levantadas, esta demonstração é geralmente associada com a demarcação de território para que outros machos não se aproximem. Após o reconhecimento, os machos nadam em paralelo com a fêmea circundando o seu corpo, estimulando neurotransmissores e neuromoduladores a liberar neuro-hormônio hipotalâmico, desta forma ocorre a liberação dos óvulos e, conseqüentemente do esperma simultaneamente (PORTO-FORESTI et al., 2005; SATO et al., 2006).

Estes mecanismos de corte, liberação e fecundação dos óvulos foram observados antes do amanhecer, nas primeiras horas de luz do dia, porém, a reprodução dos lambaris não ocorreu somente nas primeiras horas, mas também no decorrer do dia sendo que o maior pico de desova ocorreu às 7 horas da manhã onde a luminosidade foi mais intensa.

O lambari parece preferir locais com vegetação rasteira, assim como aguapés e cascalhos sendo necessárias águas rasas para que os embriões possam se desenvolver o mais próximo possível da lamina d'água para se obter a melhor oxigenação, em laboratório, podem-se adicionar plantas como folhas de bananeiras ou aguapés aos tanques de reprodução, com a intenção de simular o ambiente natural (PORTO-FORESTI et al., 2005; SATO et al., 2006). O comportamento de corte foi observado no presente trabalho, exatamente como o descrito na literatura (JUDYCKA et al., 2018; PEREIRA et al., 2019), sendo o tempo de reconhecimento de aproximadamente quatro horas, após este período começou a ocorrer de fato a desova. Após o período de desova é de extrema importância que se separe os casais o mais rápido possível, pois as fêmeas começam a apresentar sinais de agressividade para com os machos.

Por possuir o hábito de colocar seus ovos em igarapés, foi adicionada folha de bananeira na superfície da água, para mimetizar o ambiente natural proporcionando qualidade e bem-estar para os animais, desta forma a desova ocorreu mais próximo do natural, sendo eficiente e atingindo o objetivo, de se ter uma desova natural sem o estímulo de hormônios sintéticos. Após o período de 14 horas, os embriões viáveis foram selecionados com auxílio de uma lupa (modelo- CP602- Phoenix Iuferco), observando as características como ausência de anomalias e malformações físicas, assim como as características de desenvolvimento fisiológico (Figura 13).

Figura 13. Embriões de *Astyanax altiparanae*, após 14 horas de desova.



Fonte: Gil, A. J. 2024.

Após a triagem os embriões foram acondicionados em câmaras B.O.D (Biochemical Oxygen Demand – Modelo- EL131), a 26° C com fotoperíodo 12h claro/12h escuro em condições idênticas à sala de cultivo, para posteriormente, iniciar os testes toxicológicos, sendo mantidos neste sistema até o final do período experimental. O período de desenvolvimento embrionário foi assistido durante 48 horas, após este período observou-se a eclosão dos indivíduos que atingiram o estágio larval em 36 horas.

CONCLUSÃO

A metodologia adaptada para a reprodução natural do lambari em ambiente laboratorial apresentou resultados promissores. É importante ressaltar que as modificações realizadas no protocolo de reprodução do *Danio rerio*, foram de extrema importância para o sucesso da desova do lambari, visto ter sido necessário estudar as características comportamentais e fisiológicas da espécie em estudo, para assim adaptar o sistema de cultivo. Deste modo para proporcionar a desova foram feitas modificações na disposição da caixa de reprodução que utilizou artifícios naturais como a introdução da folha de bananeira e de bolinhas de gude (para mimetizar o cascalho do fundo dos rios e os igarapés), além destes arranjos também foi modificada o período de introdução dos reprodutores uma vez que o protocolo original dispõe a introdução dos indivíduos no período da manhã por um curto tempo. O lambari apresentou características de cortejo mais longas e reconhecimento do ambiente, deste modo foi feito a introdução dos indivíduos ao final da tarde, sendo este tempo de aproximadamente 13 horas, para que no início da manhã ocorresse a desova.

O lambari-do-rabo-amarelo apresentou características viáveis e acessíveis para uso como modelo experimental nos testes de Ecotoxicologia com o xenobiótico Triclosan, como alta sensibilidade, alterações indicadoras de danos moleculares a nível genético e capacidade de recuperação frente à exposição do mesmo, assim como características de ser um bom bioindicador da qualidade ambiental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

JUDYCKA, S. et al. **Optimal sperm concentration in straws and final glucose concentration in extender are crucial for improving the cryopreservation protocol of salmonid spermatozoa.** *Aquaculture*, [S.l.], v. 486, p. 90-97, 2018.

NÜSSLEIN-VOLHARD, C.; DAHM, R. **Zebrafish.** EUA: Oxford University Press, 2002.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test.** Paris: OECD, 2013.

PEREIRA, J. R. et al. **Dimethyl sulfoxide, methanol and methyl glycol in the seminal cryopreservation of Suruvi, *Steindachneridion scriptum*.** *Animal Reproduction Science*, [S.l.], v. 200, p. 7-13, 2019.

PORTO-FORESTI, F. et al. **Cultivo do lambari: uma espécie de pequeno porte e grandes possibilidades.** *Panorama da Aqüicultura*, v. 11, n. 67, p. 15-19, 2005.

SATO, Y.; SAMPAIO, E. V.; FENERICH-VERANI, N.; VERANI, J. R. **Biologia reprodutiva de duas espécies de Characidae (Osteichthyes, Characiformes) da bacia do São Francisco, Minas Gerais, Brasil.** *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 23, n. 1, p. 267-273, 2006.

SMITH, T. M. et al. **A simple method for the preparation of fish embryo medium.** *Journal of Visualized Experiments (Jove)*. Disponível em: <https://www.jove.com/video/53927/simple-method-for-the-preparation-of-fish-embryo-medium>. Acesso em: 27 jul. 2024.

CAPÍTULO III

TESTE AGUDO

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos agudos do Triclosan-TCS na fase embrião-larval e adulta de lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). Para tanto o valor médio da CL (D)50; 96h encontrada para a fase embrião-larval foi de 0,0574 mg L⁻¹ enquanto o valor médio da CL (D)50;96h obtido para a fase adulta foi de 0,66 mg L⁻¹. Desse modo a exposição em ambas às fases de desenvolvimento (embrião-larval e adulta), foi durante 96 horas sendo observados a mortalidade, sinais clínicos e alterações teratogênicas. Portanto, concluiu-se que o Triclosan apresenta efeito adverso sobre a viabilidade e desenvolvimento da fase embrião-larval e efeitos neurológicos e alto índice (78%) de letalidade para a fase adulta do lambari-do-rabo-amarelo.

Palavras-chave: Alterações fisiológicas, Bactericida, Lambari do rabo amarelo.

1. MATERIAL E MÉTODOS

1.1 Local e protocolo da Comissão de Ética no Uso de Animal

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Aquicultura e Ecotoxicologia – LAE da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP. O experimento com os lambaris foi conduzido entre Março de 2021 a Setembro de 2023.

O manejo dos animais durante o experimento seguiu o protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Embrapa Meio Ambiente (Protocolo nº 010/2019).

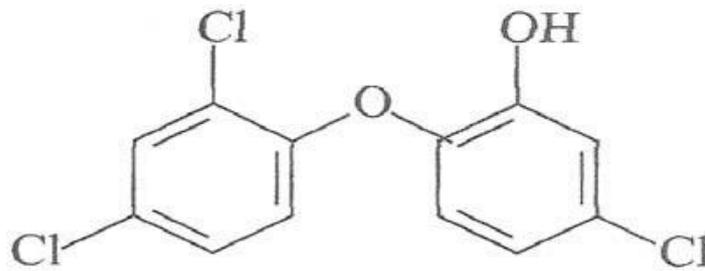
1.2 Aquisição e aclimação dos peixes

Os peixes foram adquiridos de uma piscicultura localizada na região de Mogi Mirim – SP. Foram transportados em sacos plásticos, contendo um terço de água e dois terços de oxigênio, até o biotério da Embrapa Meio Ambiente, onde foram aclimatados por sete dias em tanques de polipropileno com capacidade para 500L. Os tanques foram acoplados a um sistema de filtragem e aeração constante. Os lambaris foram alimentados com ração comercial Nutriflakes (em flocos).

Durante o período de aclimação realizou-se o monitoramento da qualidade da água por meio dos parâmetros físico-químico da água, utilizando-se uma sonda multiparâmetro (U-50, Horiba, Kyoto, Japan). Os parâmetros aferidos foram: temperatura (temp.) $26,51 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$, pH $7,03 \pm 0,27$, condutividade (Cond.) $0,124 \pm 0,01$ e oxigênio dissolvido (OD) $7,38 \pm 0,37$, a amônia foi monitorada utilizando-se o kit Amônia Tóxica água doce (Labcon Test) valores de $0,009 \pm 0,01$.

1.3 Xenobiótico estudado – Triclosan

O composto Triclosan (TCS–2.4.4.– tricloro–2 hidroxí difenil éter) apresenta baixa volatilidade, baixa solubilidade e possui característica lipofílica. A estrutura química do TCS está representada na Figura 14.

Figura 14. Arranjo químico do Triclosan.

Fonte: MERCK®, 2010.

As principais características físicas e químicas do composto Triclosan estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Características físicas e químicas do Triclosan (TCS)

Fórmula Molecular	$C_{12}H_7Cl_3O_2$
Peso molecular	289,5 g/mol
Cor	Cristais brancos
Gravidade Específica	$1,55 \times 10 \text{ kg/m}^3$ a 22° C
Constante de Dissociação (pK_a)	8,14 a 20° C
Estabilidade	Estável em condições normais
Ponto de fusão	56,5° C
Solubilidade em água	0,012 g/L a 20° C
Constante de partição (LogKow)	4,8 a 25° C
Pressão de vapor	$5,2E-6 \text{ mm Hg}$ a 25° C $2,2E-6 \text{ mm Hg}$ a 20° C

Fonte: Registration Eligibility Decision for Triclosan (EPA, 2008).

1.4 Soluções-teste de TCS para o ensaio preliminar dos Adultos

O TCS possui baixa solubilidade em água e por isso foi necessário diluí-lo inicialmente, em etanol 92% (Álcool etílico líquido hidratado 92 % INPM). Durante todo o período de execução do estudo, foram elaboradas soluções estoque/ solução mãe, dispondo como teor inicial a concentração de 1:1000, ou seja, 1g de TCS em 1 litro de etanol 92%. Mantendo a proporção indicada, pesou-se 0,01g de TCS, sendo diluído em 10 mL de etanol 92%. Em seguida, com o auxílio de uma pipeta volumétrica, foram

coletados 5 (cinco) mL da solução de TCS e etanol 92%, que corresponde a 5 (cinco) mg de TCS, para 1000 mL de água do sistema, obtendo-se assim, uma solução estoque com a concentração de 5 mg L⁻¹. A partir desta solução estoque, foram preparadas as soluções-teste de todos os ensaios realizados no presente estudo.

1.4.1 Controle com o solvente etanol 92%

Os possíveis efeitos nos organismos-teste decorrentes do solvente etanol 92% (Álcool etílico líquido hidratado 92 % INPM) que foi utilizado para diluição do TCS foram avaliados, acrescentando nos ensaios de toxicidade um controle contendo o solvente com a maior concentração testada de cada ensaio.

1.4.2 Ensaios preliminares de gradientes de concentrações

Realizaram-se ensaios preliminares para obtenção das concentrações a serem utilizados nos organismos-teste nos ensaios definitivos para os adultos e para a fase Embrio-larval.

1.5 Ensaio definitivo da CL₅₀ em adultos

O ensaio com adultos de *Astyanax altiparanae* foi conduzido seguindo-se o protocolo OECD TG 203 (OECD 1992). Após o período de aclimação, 98 exemplares de *A. altiparanae* com peso médio 7,08 ± 19,06 g com comprimento total médio 7,66 ± 0,15cm, respectivamente, foram distribuídos em 12 aquários retangulares de vidro com volume útil de 250L com aeração constante promovida por um soprador 0,1 cv/h. Foram utilizadas cinco concentrações (controle com etanol 92%, controle sem etanol, 0,5 mg L⁻¹, 0,6 mg L⁻¹, 0,7 mg L⁻¹, 0,8 mg L⁻¹, 0,9 mg L⁻¹), contendo TCS (determinadas através de um ensaio piloto), com duas repetições cada. Para cada repetição havia 7 animais, totalizando 14 animais por tratamento.

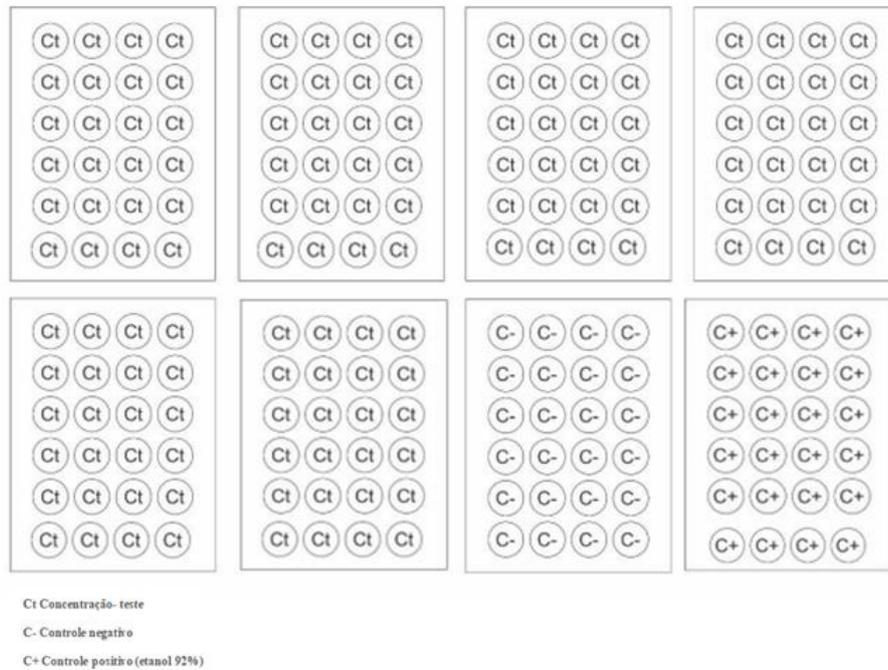
Os animais foram mantidos em um sistema semi-estático por um período de 96 horas sem fornecimento de alimentação como sugerido pela OECD (1992), assim como mantidos em fotoperíodo de 12h/12h, constantemente monitorada de acordo com as exigências da espécie. Os sinais clínicos e mortalidade foram registrados a cada 24 horas. Ao final de 96 horas, os peixes vivos foram eutanasiados seguindo o AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals, que preconiza o uso de benzocaína na concentração de 100 e 300 mg/L por aprofundamento anestésico.

1.6 Soluções-teste do ensaio Embrio-larval

O preparo das diluições foi baseado no protocolo EPA, (2002) com meio de embrião, na qual seu preparo foi baseado na metodologia segundo NÜSSLEIN-VOLHARD e DAHM, (2002). Os embriões foram mantidos a temperatura, 25° C, B.O. D (Biochemical Oxygen Demand – Modelo- EL131). Para tanto, foram preparadas seis diluições entre 0,02 e 0,66 mg L⁻¹. Como o TCS não é solúvel em água foi preparado uma solução estoque (solução mãe). Para tanto, foram pesados 6,6 mg de TCS e adicionada 10 ml de etanol 92% para solubilizar o material.

A seguir, foi adicionado o meio de embrião, transferiu-se quantitativamente a solução obtida para um balão volumétrico de 1000 mL e completou-se o volume para um litro com o meio de embrião. Em seguida foi transferido para balões volumétricos de 100 ml cada um com suas respectivas concentrações, as placas foram preenchidas com 2 ml L⁻¹ de cada concentração e seus respectivos controles e um embrião foi transferido para cada poço (Figura 15). As placas foram acondicionadas em uma câmara de B.O. D (Biochemical Oxygen Demand – Modelo- EL131), a 26° C com fotoperíodo 12h claro/12h escuro em condições idênticas à sala de cultivo. Durante 96 horas de exposição, houve troca das soluções a cada 24 horas, pois o Triclosan se degrada neste período de tempo.

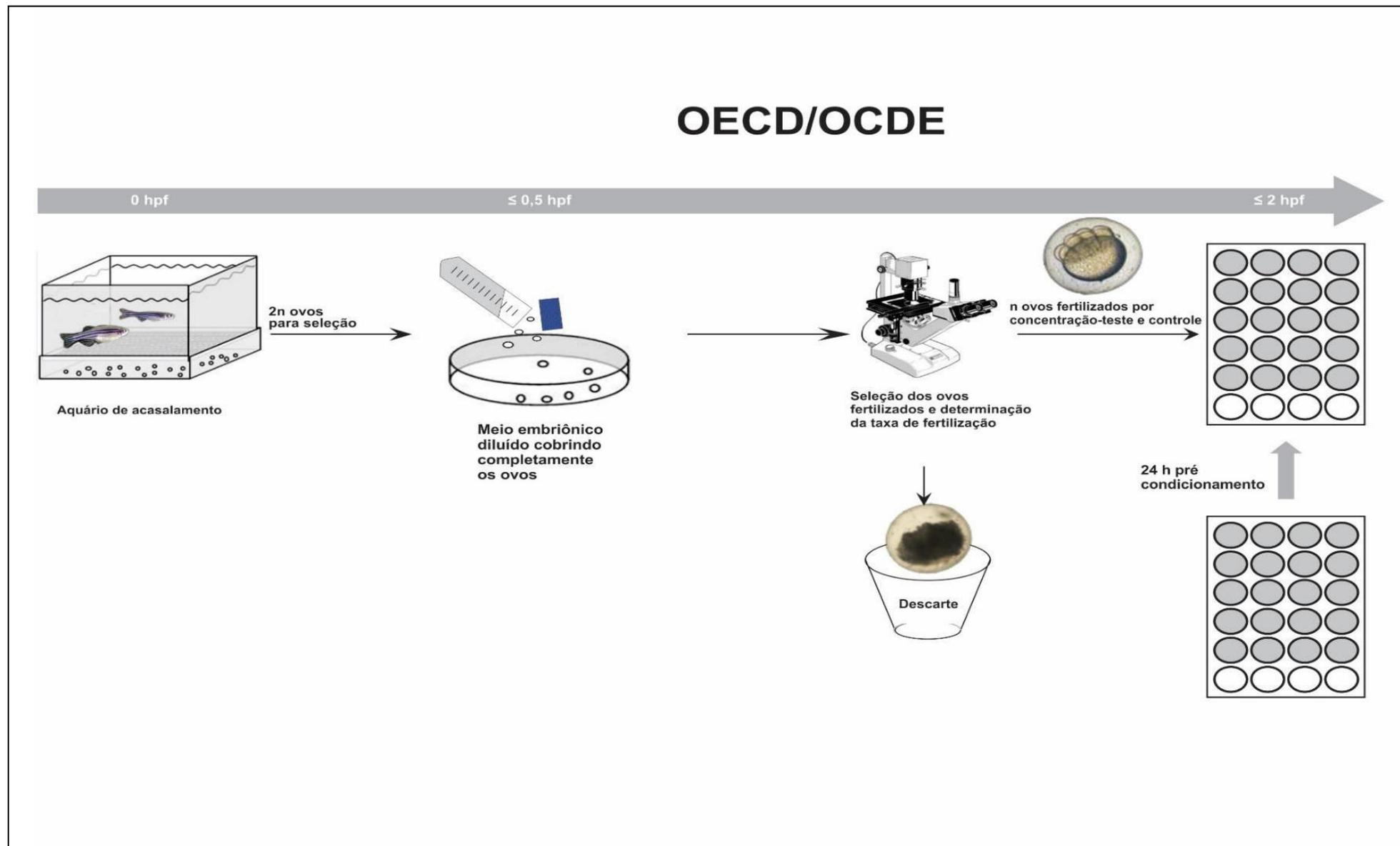
Figura 15. Protótipo do teste em placas de cultura com seis concentrações teste, e duas placas de controle positivo sendo uma delas com etanol 92% pronto para receber os embriões.



Fonte: Adaptado de OECD, 2013.

A figura 16 retrata a adaptação utilizada seguindo como modelo o Fish Embryo Acute Toxicity, conhecido como *FET test*, sendo apresentada dessemelhança de que no Fet da OECD os ovos fecundado vão para placas de petri com as concentrações-teste, depois de selecionados, antes de passarem para as placas de 24 poços (Adaptado de OECD, 2013).

Figura 16. FET test Adaptado de Guideline 23



Fonte: OECD, 2013.

1.6.1 Controle com o solvente etanol 92%

A maior concentração que corresponde a 10 ml L⁻¹ do solvente etanol 92% (Álcool etílico líquido hidratado 92 % INPM) utilizado para diluição do TCS foi utilizado nos ensaios de toxicidade como controle para avaliar os possíveis efeitos que o etanol poderia causar nos organismos-teste.

1.6.2 Ensaio definitivo da CL₅₀ da fase Embrio-larval

A exposição foi realizada de acordo com o protocolo modificado do FET (Fish Embryo Acute Toxicity) da OECD 236 (organization for environment co-operation and development) (OECD, 2013). Os embriões em estágio de gástrula foram expostos por 96 horas em microplacas de 24 poços (um organismo por poço) em triplicatas. Os ovos coletados foram testados em seis concentrações diferentes de TCS (0,02062, 0,0415, 0,0825, 0,165, 0,33 e 0,66 mg L⁻¹) com seus respectivos controles.

1.6.3 Leituras das placas contendo embriões e larvas

A leitura das placas foi realizada no Laboratório de Toxicologia, baseado no protocolo segundo SANTIAGO et al., (2021), na qual as avaliações e visualização foi realizada em microscópio estereoscópico (modelo- SMZ 2 led, software optika view versão 7.1.1.5- Opitika®) a 80x e de um microscópio invertido Zeiss® Axio, acoplado a câmera Zeiss® AxioCam ERC5S a 50, 100 e 200x de aumento a 24h, 48h, 72h e 96 hpf (horas após a fertilização dos ovos). Pesquisou-se os 4 desfechos principais ou *end points*: a) coagulação dos ovos; b) falta de formação dos somitos; c) falta de batimento cardíaco; d) falta de destacamento da cauda do saco vitelínico, e, ainda, a ocorrência de edemas no saco vitelínico, edema cardíaco e coágulo, falta de pigmentação, deformação da coluna vertebral e falta de emergência das larvas, a eclosão ou emergência das larvas normalmente ocorre de 48 a 96 hpf. Todos os ensaios foram realizados com três repetições para cada concentração. Antes e depois da exposição ao TCS foram medidos pH, oxigênio dissolvido, amônia e nitrito no laboratório de Toxicologia, encontrando-se teores dentro dos parâmetros aceitáveis pelo *FET test*.

1.7 Monitoramento dos parâmetros físico-químicos da água dos adultos

Realizou-se o acompanhamento dos parâmetros físico-químicos da água durante o período de determinação da CL_{50} (96 horas) de exposição por meio de uma sonda multiparâmetro (U-50, Horiba, Kyoto, Japan), no período da manhã. Os dados aferidos foram: temperatura (Temp), pH, condutividade elétrica (Cond) e oxigênio dissolvido (O.D).

1.8 Estatística

Os dados da CL_{50} dos adultos e dos embriões foram analisados pelo software Statgraphics Centurion XVII, versão 1. 17. 04 (StatPoint Technologies). A normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste de Shapiro–Wilk, e a homogeneidade da variância pelo teste de Levene. As diferenças estatísticas entre os grupos foram avaliadas pela análise de variância (ANOVA) unidirecional ou pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, dependendo da normalidade das variáveis. A ANOVA foi seguida do teste de Tukey ou Games-Howell, dependendo da homogeneidade das variáveis. Os dados que não satisfizeram a suposição de normalidade foram analisados por Kruskal-Wallis seguido pelo teste post-hoc de Bonferroni. O nível de significância foi de 95% em todos os casos.

2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 Determinação da Cl_{50} na fase adulta

2.1.2 Variáveis físico-químicas da água da CL_{50}

Os resultados obtidos para parâmetros físico-químicos da água durante o período de exposição encontram-se descritas na Tabela 3 e 4. Não houve diferença entre os tratamentos nos parâmetros de qualidade de água, como: temperatura, pH, oxigênio dissolvido, condutividade e amônia, mensurados, de acordo com TAVARES (1995), esses valores atenderam os padrões recomendados para a espécie.

Tabela 3. Variáveis físico-químicas da água nas diferentes concentrações de Triclosan (TCS) para determinação da CL₅₀ em exemplares adultos de *Astyanax altiparanae*.

Tratamentos com TCS (mg L ⁻¹)	Tempo de exposição em horas				
	Temp. (°C)	pH	OD (mg L ⁻¹)	Cond. (mS cm)	Turbidez
0	23,18	7,48	5,53	0,15	0,52
0,5	24,34	7,25	5,68	0,13	0,75
0,6	23,57	7,33	5,45	0,14	0,78
0,7	24,36	7,28	6,10	0,15	0,98
0,8	24,54	7,30	5,79	0,14	1,78
0,9	24,95	7,22	5,88	0,15	1,98

2.2 Concentração Letal Média (CL₅₀)

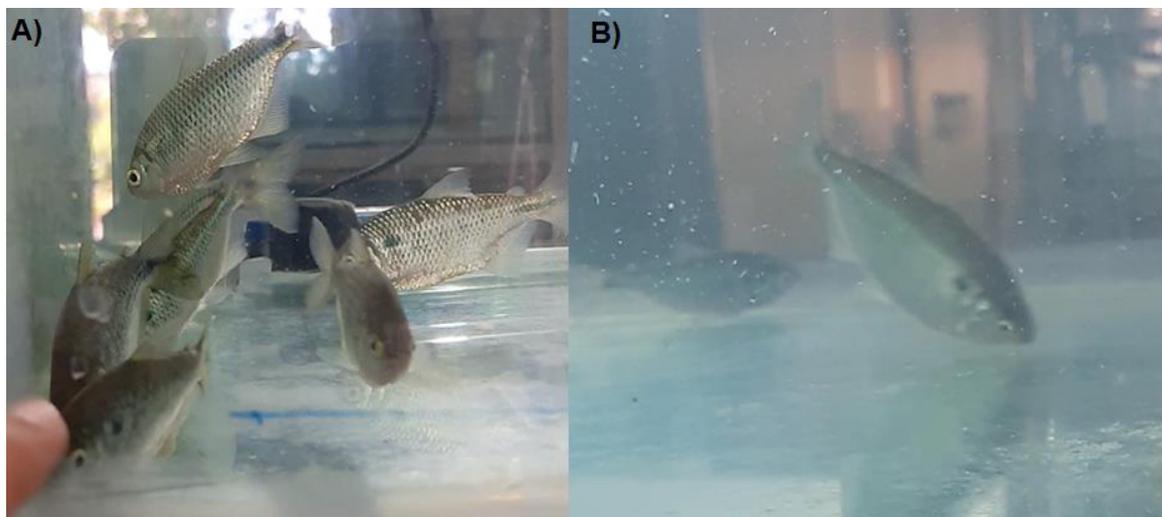
Os dados obtidos acerca dos valores relacionados a mortalidade dos lambaris expostos a diferentes concentrações de TCS estão apresentados na tabela 8, onde as mortes iniciaram-se nas concentrações 0,8 e 0,9 mg. L⁻¹, assim como mortes nas primeiras 24 horas de exposição.

Tabela 4. Mortalidade de exemplares adultos de *Astyanax altiparanae* em diferentes concentrações de Triclosan (TCS) para determinação da CL₅₀.

Tratamentos (TCS) (mg L ⁻¹)	Tempo de exposição em horas			
	24	48	72	96
0	0	0	0	0
0,5	0	0	0	0
0,6	0	0	0	0
0,7	0	2	0	0
0,8	14	-	-	-
0,9	14	-	-	-

As alterações clínicas observadas nos lambaris adultos se manifestaram 1 hora após a aplicação do TCS em cada unidade experimental nas concentrações de 0,7 e 0,6 mg L⁻¹, onde pode ser observado, natação errática, concentração dos animais nas áreas com aeração, espasmos musculares, ataxia e petéquias (Figura 17).

Figura 17. Alterações observadas nos indivíduos adultos expostos às concentrações 0,7 e 0,6 mg L⁻¹ de Triclosan. Podendo ser visualizada, a concentração dos animais nas áreas com aeração e não responsivos a estímulos externos (A) e na segunda imagem foi observado, natação errática, espasmos musculares e ataxia (B).



Fonte: Gil, A. J. 2024.

Para a concentração 0,5 mg. L⁻¹ não foi observado nenhuma alteração clínica e nem mortalidade assim como no grupo controle.

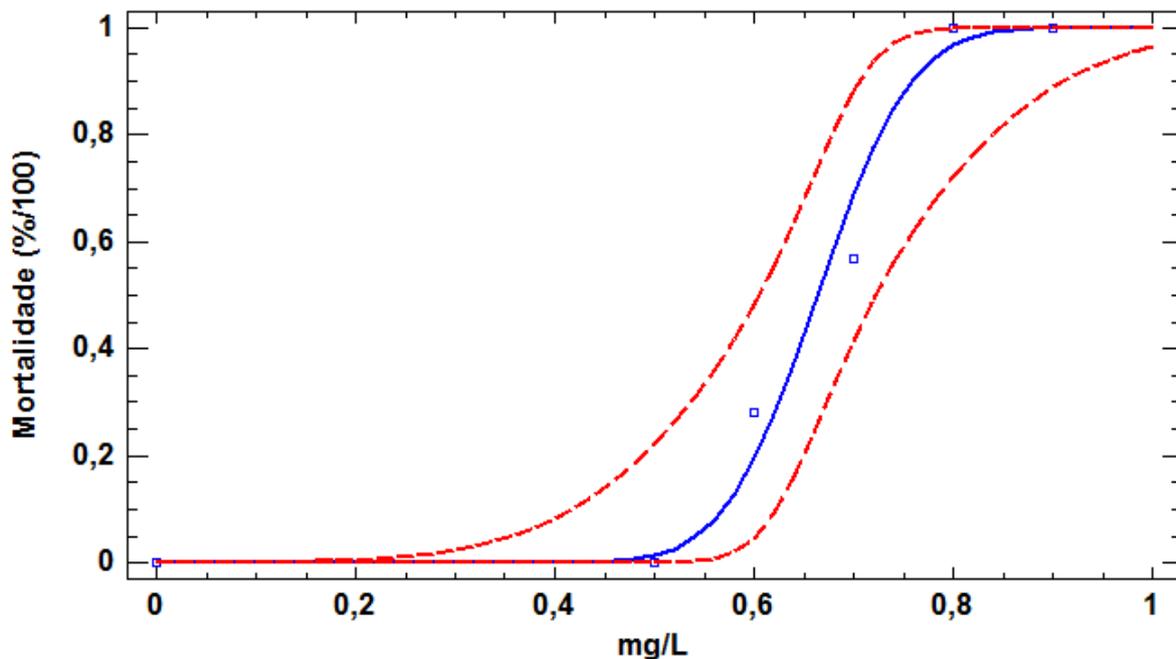
Para DUBE; HOSETTI (2010), inúmeros fatores podem interferir na qualidade respiratória dos peixes sendo estes caracterizados por diminuição da taxa de oxigênio, a execução de impulsos natatórios rápidos como em evasões, a ingestão de alimentos, o estresse, a poluição da água, entre outros.

Dentre estes fatores citados, a poluição causada por xenobióticos tem influência direta sobre as variáveis respiratórias, dos organismos aquáticos, visto que as trocas gasosas ocorrem exclusivamente na maioria dos peixes por meio das brânquias, que consequentemente, afetam o funcionamento correto destas estruturas acarretando em distúrbios respiratórios tais como o aumento na frequência ventilatória, elevação da taxa de tosse, irritação/lesão branquiais e deficiência no processo de troca gasosa que são indicadores robustos nos animais e, concomitantemente, da qualidade da água.

MARTINS (2018), observou os efeitos tóxicos ocasionados pelo TCS sobre a resposta cardiorrespiratória do *Brycon amazonicus*, evidenciou, nos indivíduos expostos sinais clínicos de ataxia, distonia e opacidade de córnea e de estruturas adjacentes do olho após aproximadamente 8 horas de exposição do TCS. Os resultados encontrados no presente estudo, foram semelhantes aos que foram descritos por MARTINS (2018), além destas alterações também foram observados indivíduos com sinais neurológicos intensos que possivelmente, este acometimento neurológico esteja relacionado com o fato do TCS ter induzido um quadro severo de hipóxia nos lambaris.

O valor obtido da CL₅₀ 96 horas para a espécie *Astyanax altiparanae* contaminados pelo Triclosan, encontram-se descrito no gráfico 1.

Gráfico 1. Curva concentração-resposta referente à exposição do *Astyanax altiparanae*, a diferentes soluções-teste de Triclosan durante 96 h, sendo o valor obtido da CL₅₀- 96h de 0,66 mg L⁻¹.



Fonte: Gil, A. J. 2024.

As linhas pontilhadas representam os limites, inferior e superior, de referência para a espécie 95% (0,60 mg L⁻¹ – 0,72 mg L⁻¹). Os dados foram analisados utilizando o programa Statgraphics Centurion XVII (Version 17.1.04) através do módulo Probit Analysis.

Quando comparada com as demais espécies, *A. altiparanae* se mostrou mais sensível a ambientes contaminados por TCS do que as espécies Peixe Guarú (*Poecilia vivípara*), peixe arroz (*Oryzias latipes*) e tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*) (SEENIVASAN et al., 2021). Já quando se faz a comparação com o *Danio rerio* (zebrafish), o *A. altiparanae* não apresenta grande sensibilidade (0,66 mg L⁻¹) ao ser comparado com o zebrafish, pois o valor da CL₅₀ 96 h do *Danio rerio* corresponde a 0,34 mg L⁻¹.

Inúmeros estudos com diferentes organismos aquáticos têm demonstrado os efeitos tóxicos causados pelo TCS, seu potencial tóxico não se limita apenas em se bioacumular nos tecidos dos indivíduos, mas também possui a característica de se ligar a

outros compostos e aumentar a toxicidade destes, além de gerar subprodutos mais tóxicos. Desta forma é clara a necessidade de avaliar os impactos e efeitos produzidos em longo prazo pelo TCS (COOGAN et al., 2007).

2.3. TESTE AGUDO

2.3.1 Concentração letal média (CL₅₀) da fase embrio-larval

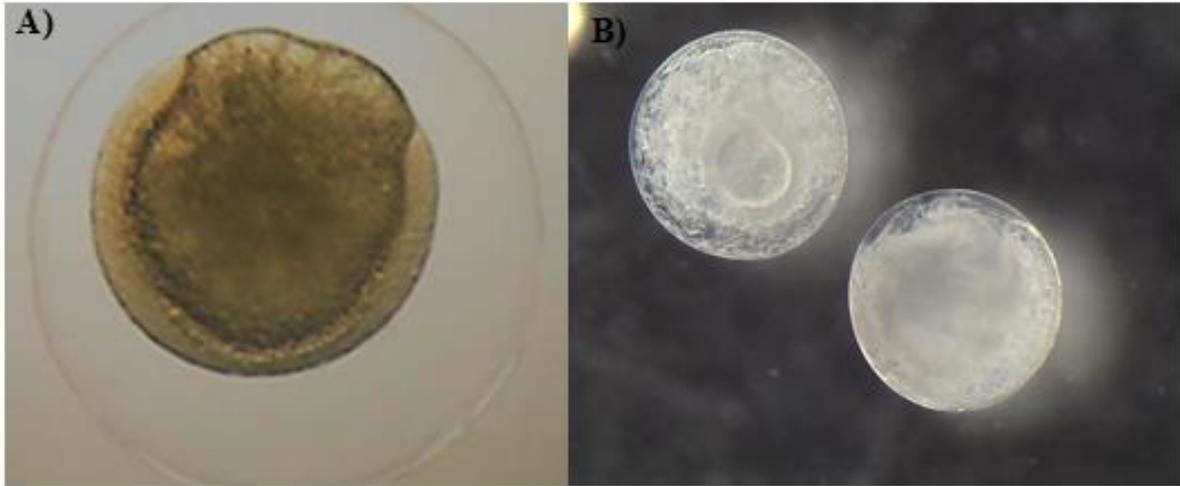
Os resultados da mortalidade dos embriões expostos a diferentes concentrações do TCS estão apresentados na tabela 5, onde as mortes iniciaram-se nas concentrações de 0,165, 0,33 e 0,66 mg L⁻¹, assim como mortes nas primeiras 24 horas de exposição (Figura 18).

Tabela 5. Mortalidade (%) de *Astyanax altiparanae* da fase embrio-larval em diferentes concentrações de Triclosan (TCS) para determinação da CL₅₀.

Tratamentos (TCS) (mg L ⁻¹)	Tempo de exposição em horas			
	24	48	72	96
0	0	0	0	0
0,02062	0	0	0	0
0,0415	0	0	0	0
0,0825	0	0	15	9
0,165	2	22	-	-
0,33	4	20	-	-
0,66	24	-	-	-

Nos testes de toxicidade são observados diversos tipos de respostas na qual o organismo-teste irá apresentar em decorrência da exposição prolongada ou curta, que se dão comumente pelas alterações ligadas ao índice de letalidade, modificações comportamentais e índice de sobrevivência (ANDRADE et al., 2005; FERREIRA, 2016).

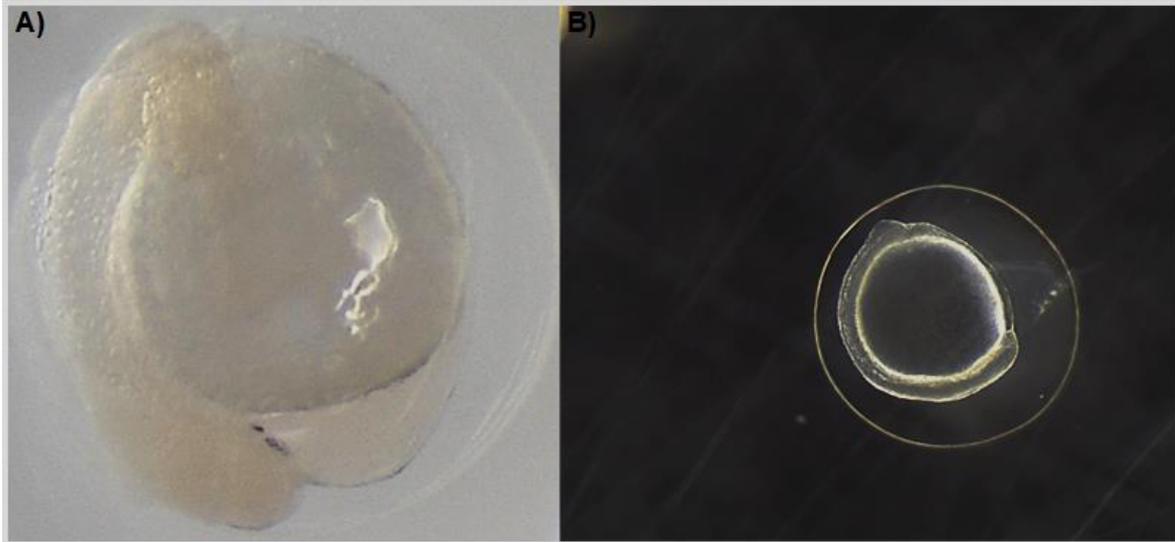
Figura 18. Mortalidade dos embriões em diferentes concentrações (0,02062, 0,0415, 0,0825, 0,165, 0,33 e 0,66 mg L⁻¹) de Triclosan. Embrião normal (A) e embrião coagulado (B).



Fonte: Gil, A. J. 2024.

As manifestações clínicas observadas pela intoxicação ao TCS foram visualizadas 24 horas após a inserção da substância teste em cada unidade experimental nas concentrações de 0,165, 0,33, 0,66 mg L⁻¹, onde pode ser observado, eclosão tardia, atraso na formação do otólito, malformações em coluna, edema pericárdico e subtamanho (Figura 19).

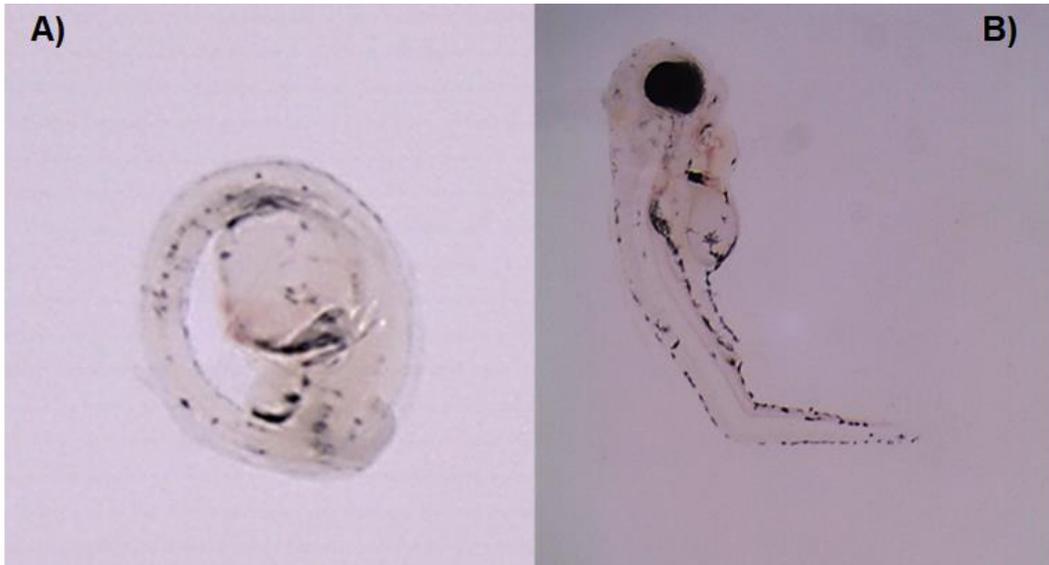
Figura 19. Alterações observadas no desenvolvimento embrionário dos indivíduos expostos nas concentrações 0,165, 0,33 e 0,66 mg L⁻¹ de Triclosan. (A) Embrião com anormalidades de desenvolvimento como eclosão tardia e má formações e (B) embrião sem nenhuma alteração no desenvolvimento.



Fonte: Gil, A. J. 2024.

Para as demais concentrações também foram observadas alterações como deformidades faciais, edema ocular acompanhado de hemorragia, aumento e deformidade do saco vitelino, alterações em coluna e após a eclosão as larvas apresentavam dificuldade em natação (movimentação em decúbito lateral) e cauda curta a partir de 72 horas de exposição exceto nos grupos controles, onde não foi evidenciado nenhum dos sinais citados acima (Figura 20 e 21).

Figura 20. Alterações observadas no desenvolvimento embrio-larval dos indivíduos expostos nas concentrações 0,02062, 0,0415 e 0,0825 mg L⁻¹ de Triclosan. (A) A fase embrio-larval apresenta anormalidades de desenvolvimento como deformidade do saco vitelino e alterações em coluna e (B) na segunda imagem, larva apresentando encurtamento de cauda e aumento das estruturas cardíacas acompanhada de hemorragia.



Fonte: Gil, A. J. 2024.

Figura 21. Larva dos grupos controle (controle normal e controle com etanol), sem nenhuma alteração morfológica.



Fonte: Gil, A. J. 2024.

Essas alterações também foram relatadas por ISHIBASHI et al. (2004), que avaliaram os efeitos causado pelo TCS no desenvolvimento embrionário do *Oryzias latipes*, descrevendo resultado semelhante ao que foi encontrado no presente estudo, visto que na concentração $0,62 \text{ mg L}^{-1}$, ocorreu atraso na eclosão, diminuição da fertilização dos ovos, ou seja, diminuição no número de embriões, deformidades estruturais, edema cardíacos e morte.

À medida que ocorre a degradação do TCS na água, mais elevada torna-se sua toxicidade para os indivíduos aquáticos. Isto deve-se ao aumento da concentração de seus metabolitos que são gerados a partir da fototransformação produzindo 2,8-diclorodibenzeno-p-dioxin, 5-cloro-2- (4-clorofenoxi) fenol e 2-hidroxi-8-clorodibenzodioxina (dioxinas e clorofenóis), que são reconhecidamente carcinogênicos, estando, de acordo com os relatos observado por YOSHIMURA; ENDOH (2005).

A literatura relata que o tempo de fotodegradação do TCS ocorrem em torno de 15 a 24 horas WANG et al., 2017. Outros estudos, tais como MARTÍNEZ-ZAPATA et al., 2013 e WANG et al., 2017, discutem que o pH, tem influência direta na degradação deste composto. Para evitar os efeitos indesejáveis como a degradação e a biotransformação em seus metabólitos, o método implementado para o experimento, foi utilização de um sistema semi-estático, na qual foi realizada uma troca de água ao longo de todo o período, a cada 24 horas.

Estudos de toxicidade aguda de TCS têm sido muito realizados com diferentes espécies de organismos aquáticos, tanto para vertebrados, como para invertebrados. A CL_{50} 24, 48, 72 e 96 horas determinada para a fase embrio-larval de *Astyanax altiparanae* contaminados por TCS encontram-se descrita na tabela 6.

Tabela 6. CL₅₀ da fase embrio-larval de *Astyanax altiparanae* expostos ao Triclosan por 24, 48, 72 e 96 horas.

Tempo (horas)	CL 50 mg L ⁻¹	95 % Limite de confiança (mg L ⁻¹)	
		L. Inferior	L. Superior
24	0,2503	0,2061	0,3144
48	0,1564	0,1287	0,194
72	0,07172	0,06258	0,06258
96	0,05741	0,04885	0,06788

Diante dos resultados apresentados acima o TCS apresentou toxicidade aguda para embriões/larvas (96 h CL₍₅₀₎ = 0,0574 mg L⁻¹ do *Astyanax altiparanae*. Resultados semelhantes foram encontrados na literatura, a toxicidade aguda foi avaliada em outras espécies de peixes. Muitos cientistas têm demonstrado a importância de se correlacionar os efeitos adversos à exposição do TCS em diferentes organismos (ZHANG et al., 2020; LIU et al., 2019; CHEN et al., 2020; YANG et al., 2020; XU et al., 2020) (Tabela 7).

Tabela 7. CL₅₀ do Triclosan para outras espécies de peixes de água doce.

Espécie	CL50	Referência
<i>Pimephales promelas</i> (Cyprinidae)	260 µg.L ⁻¹	ORVOS et al. (2002)
<i>Lepomis macrochirus</i> (Centrarchidae)	370 µg.L ⁻¹	ORVOS et al. (2002)
<i>Pangasianodon hypophthalmus</i> (Pangasiidae)	1458 µg L ⁻¹	SAHU et al. (2018)
<i>Xiphophorus helleri</i> (Poeciliidae)	1470 µg L ⁻¹	LIANG et al. (2013)
<i>Oryzias latipes</i> (Adrianichthyidae) - adultos	1700 µg L ⁻¹	NASSEF et al. (2010)
<i>Oryzias latipes</i> (Adrianichthyidae) - embriões	399 µg L ⁻¹	ISHIBASHI et al. (2004)
<i>Oryzias latipes</i> (Adrianichthyidae) - larvas	602 µg L ⁻¹	ISHIBASHI et al. (2004)
<i>Anabas testudineus</i> (Anabantidae)	1767 µg.L ⁻¹	PRIYATHA e CHITRA, (2018)
<i>Oreochromis niloticus</i>	2810 µg.L ⁻¹	VIJITHA et al. (2017)

De acordo com os dados apresentados na Tabela 7, observa-se uma grande variação nos valores da CL₅₀ - 96h variando de 260 µg L⁻¹ para *Pimephales promelas* (ORVOS, 2002) até 2810 µg L⁻¹ para a espécie mais cultivada *Oreochromis niloticus* (VIJITHA, 2017). Quando comparada com as demais espécies, *A. altiparanae* se mostrou mais sensível a ambiente contaminado por TCS do que as espécies Bluegill (*Lepomis macrochirus*), e peixe arroz (*Oryzias latipes*) e *Danio rerio* (zebrafish), cujo valor da CL₅₀ 96 h do *Danio rerio* corresponde a 0,42 mg. L⁻¹ e o do *A. altiparanae* 0,0574 mg L⁻¹, desta forma podemos considerar que o lambari é uma ferramenta mais efetiva para a detectar a presença do TCS nos ecossistemas, podendo ser considerado um sentinela.

Estas variações de concentrações nas diferentes espécies de peixes podem estar associadas a dois fatores sendo um deles o fator biótico (fisiológico) que corresponde à capacidade de osmorregulação e respostas a diferentes fatores de estresse (SCHRECK et al., 2001). E o segundo abiótico (ambiente) como a temperatura reduzida ou aumentada, mudanças em parâmetros da oxigenação da água, PH que é um dos parâmetros que mais interfere na fotodegradação do TCS. Desta forma estes fatores ligados com a quantidade de Triclosan no ambiente influenciam diretamente nas manifestações clínicas, mortalidade e alterações fisiológicas dos indivíduos expostos.

CONCLUSÃO

Resíduos de TCS ocasionaram efeitos tóxicos agudos nas fases embrio-larval e adulta do lambari-do-rabo-amarelo. O valor médio da CL (I)50; 96h encontrada para a fase embrio-larval foi de $0,0574 \text{ mg L}^{-1}$ enquanto o valor médio da CL (I)50;96h obtido para a fase adulta foi de $0,66 \text{ mg L}^{-1}$.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

ANDRADE, R. L. B. et al. **Comportamento, sobrevivência e desenvolvimento de lebistes, *Poecilia reticulata*, submetidos a agentes utilizados na profilaxia de doenças.** *Acta Scientiarum. Animal Science*, v. 27, n. 4, p. 523-528, 2005.

AVMA (American Veterinary Medical Association). **AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals.** 2020.

CHEN, W. et al. **Impact of triclosan exposure on the behavior and development of zebrafish embryos.** *Environmental Pollution*, [S.l.], v. 263, p. 114396, 2020.

COOGAN, M. A. et al. **Algal bioaccumulation of triclocarban, triclosan, and methyltriclosan in a North Texas wastewater treatment plant receiving stream.** *Chemosphere*, v. 67, p. 1911-1918, 2007.

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*, [S.l.], 2010.

EPA (Agência de Proteção Ambiental dos EUA). **Orientação sobre avaliação cumulativa de riscos de pesticidas químicos que possuem um mecanismo comum de toxicidade.** Escritório de Programas de Pesticidas, Agência de Proteção Ambiental dos EUA, Washington, DC, 14 jan. 2008.

EPA (Environmental Protection Agency). **Guidelines for Carcinogen Risk Assessment.** Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency, 2002.

FERREIRA, Ana Maria. **Impactos Ambientais de Poluentes Orgânicos em Ecossistemas Aquáticos.** 2016. 150 f. Tese (Doutorado em Ciências Ambientais) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

ISHIBASHI, H. et al. **Effects of triclosan on the early life stages and reproduction of medaka, *Oryzias latipes*, and induction of hepatic vitellogenin.** *Environmental and Symbiotic Sciences*, Prefectural University of Kumamoto, 3-1-100 Tsukide, Kumamoto 862-8502, Japan, 2004.

LIU, X. et al. **Effects of triclosan on zebrafish embryonic development: Evidence for endocrine disruption and teratogenicity.** *Chemosphere*, [S.l.], v. 238, p. 124675, 2019.

MARTÍNEZ-ZAPATA, M.; ARISTIZÁBAL, C.; PEÑUELA, G. **Photodegradation of the endocrine-disrupting chemicals 4-n-nonylphenol and triclosan by simulated solar UV irradiation in aqueous solutions with Fe(III) and in the absence/presence of humic acids.** *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, [S.l.], v. 257, p. 1-8, 2013.

MARTINS, F. N. **Efeitos do contaminante emergente triclosan sobre a função cardiorespiratória do matrinxã, *Brycon amazonicus*.** In: MARTINS, M. L. et al. (Org.). *Haematological alterations of *Leporinus macrocephalus* (Osteichthyes: Anostomidae) naturally infected by *Goezia leporini* (Nematoda: Anisakidae) in fish pond.* *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 56, n. 5, p. 640-646, 2018.

MERCK®. **Manual Merck: Manual de Referência para o Profissional de Saúde.** 18. ed. São Paulo: Merck, 2010.

OECD (Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico). **OECD 236: Guideline for the Testing of Chemicals. Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test.** 2013.

OECD (Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico). **OECD TG 203: Guidelines for Testing of Chemicals. Fish Acute Toxicity Test.** 1992. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264079921-en>. Acesso em: 27 jul. 2024.

ORVOS, D. R. et al. **Aquatic toxicity of triclosan.** *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 21, p. 1338-1349, 2002.

SANTIAGO, M. R.; COSTA, A. R. **Ecotoxicity analysis of a commercial tobacco-based pesticide on zebrafish (*Danio rerio*).** *Journal of Research in Biology (Online)*, [S.l.], v. 4, p. 1441-1443, 2021.

SCHRECK, C. B.; CONTRERAS-SANCHEZ, W.; FITZPATRICK, M. S. **Effects of stress on fish reproduction, gamete quality and progeny.** *Aquaculture*, v. 197, p. 3-24, 2001.

SEENIVASAN, Deepika et al. **Effect of triclosan (TCS) on the protein content and associated histological changes on tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852).** *Environmental Science and Pollution Research*, [S.l.], v. 28, n. 35, p. 48767-48778, 2021. Recebido em: 20 abr. 2020. Aceito em: 15 jun. 2021.

TAVARES-DIAS, M. et al. **Hematologia de teleósteos brasileiros com infecção parasitária. I. Variáveis do *Leporinus macrocephalus* Garavelo e Britski, 1988 (Anostomidae) e *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Characidae).** *Acta Scientiarum*, v. 21, p. 337-342, 1995.

VIJITHA, C. K.; ASIFA, K. P.; CHITRA, K. C. **Assessment of genotoxic and hematological consequence of triclosan in the fish, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758).** *International Journal of Advanced Research*, v. 3, p. 101-109, 2017.

WANG, Y.; RODDICK, F. A.; FAN, L. **Direct and indirect photolysis of seven micropollutants in secondary effluent from a wastewater lagoon.** *Chemosphere*, [S.l.], v. 185, p. 122-129, 2017. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.06.122.

XU, F. et al. **Triclosan affects zebrafish embryogenesis and larval development: Insights into its toxicological effects.** *Science of The Total Environment*, [S.l.], v. 742, p. 140434, 2020.

YANG, H. et al. **Assessment of triclosan-induced alterations in zebrafish embryonic development and potential mechanisms.** *Journal of Hazardous Materials*, [S.l.], v. 392, p. 122249, 2020.

YOSHIMURA, T.; ENDOH, M. **Effects of environmental pollutants on aquatic species.** *Journal of Environmental Science*, v. 12, n. 3, p. 456-467, 2005.

ZHANG, H. et al. **Triclosan-induced developmental toxicity in zebrafish embryos: Role of oxidative stress and cellular apoptosis.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, [S.l.], v. 198, p. 110637, 2020.

CAPÍTULO IV

**TESTE
CRÔNICO**

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade subletal do Triclosan sobre os parâmetros hematológicos e alterações clínicas em adultos, assim como alterações teratogênicas na fase embrio-larval do *A. altiparanae* (Lambari-do-rabo- amarelo). Para os testes com embriões e larvas foram utilizados cinco tratamentos sendo dois controles (com etanol 92% e outro sem etanol) e cinco concentrações (0,0574; 0,01794; 0,005695; 0,0018081 e 0,000574 mg L⁻¹), cada um contendo quatro repetições. O tempo de duração do teste com embriões e larvas foi de 144 horas sendo avaliadas as alterações a cada 24 horas assim como as trocas de solução com renovação completa. Já os testes com os indivíduos adultos duração foi de 14 dias, dentro deste período pré-estabelecido foi feita a coleta de sangue, avaliação clínica dos animais e da taxa de mortalidade de acordo com cada concentração testada. Para isto foi dividido em duas etapas, a primeira em sete dias e a segunda coleta em 14 dias, foram coletados animais individualmente e aleatoriamente, em cada aquário onde estavam expostos as concentrações de 0,00062, 0,064, 0,021, 0, 20 e 0,66 mg L⁻¹ e controle. Portanto a avaliação das anormalidades observadas em cada fase de desenvolvimento do lambari permitiu concluir que os efeitos tóxicos do Triclosan alteram significativamente os parâmetros hematológicos, aumenta a taxa de anormalidades em embriões e larvas além de causar alterações neurológicas em ambas às fases analisadas.

Palavras-chave: Lambari-do-rabo-amarelo; Fisiologia; Antimicrobiano.

1. MATERIAL E MÉTODOS

1.1 Local e protocolo da Comissão de Ética no Uso de Animal

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Aquicultura e Ecotoxicologia – LAE da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP. O experimento com os lambaris foi conduzido entre Março de 2021 a Setembro de 2023.

O manejo dos animais durante o experimento seguiu o protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Embrapa Meio Ambiente (Protocolo nº 010/2019).

1.2 Aquisição e aclimação dos peixes

Os peixes foram adquiridos de uma piscicultura localizada na região de Mogi Mirim – SP. Foram transportados em sacos plásticos, contendo um terço de água e dois terços de oxigênio, até o biotério da Embrapa Meio Ambiente, onde foram aclimatados por sete dias em tanques de polipropileno com capacidade para 500L. Os tanques foram acoplados a um sistema de filtragem e aeração constante. Os lambaris foram alimentados com ração comercial Nutriflakes (em flocos).

Durante o período de aclimação realizou-se o monitoramento da qualidade da água por meio dos parâmetros físico-químico da água, utilizando-se uma sonda multiparâmetro (U-50, Horiba, Kyoto, Japan). Os parâmetros aferidos foram: temperatura (temp.) $26,1 \pm 1,4^{\circ}\text{C}$, pH 7.03 ± 0.26 , condutividade (Cond.) 0.122 ± 0.01 e oxigênio dissolvido (OD) 7.28 ± 0.37 , a amônia foi aferida utilizando o kit Amônia Tóxica água doce (Labcon Test) valores de 0.005 ± 0.01 .

1.3 Soluções-teste do ensaio dos adultos

Por possuir baixa solubilidade em água, o Triclosan foi diluído em etanol 92% (Álcool etílico líquido hidratado 92 % INPM), para subsequente ser diluído em água no preparo das soluções-teste. Para os ensaios da fase subletal com adultos realizados neste estudo, foram preparadas soluções, tendo como ponto de partida a concentração de 1:2000, ou seja, 2g de Triclosan em 2 litro de etanol 92%. Mantendo a proporção indicada, pesou-se 0,02g de Triclosan, sendo dissolvido em 10 mL de etanol 92%. Em seguida, com o auxílio de uma pipeta volumétrica, foram coletados 5 (cinco) mL da solução de Triclosan e etanol 92%, que corresponde a 5 (cinco) mg de Triclosan, e avolumados para 200 mL com água do sistema, obtendo-se assim, uma solução- estoque

com a concentração de 5 mg L⁻¹. A partir desta solução estoque, foram preparadas as soluções-teste de todos os ensaios realizados no presente estudo.

1.3.1 Controle com o solvente etanol 92%

A fim de avaliar possíveis efeitos nos organismos-teste relacionados ao solvente etanol 92% (Álcool etílico líquido hidratado 92 % INPM), utilizado na diluição de Triclosan, foi realizado nos ensaios de toxicidade um controle do solvente com a maior concentração testada de cada ensaio.

1.4 Ensaio subletal em adultos

Após a determinação da CL₅₀, foi realizado o teste crônico ou subletal. A partir do valor obtido no teste agudo, 10% deste valor foi considerado como base para o início do teste crônico por um período de 14 dias. Para isto 320 exemplares de *Astyanax altiparanae* com peso médio 6,09 ± 19,05g com comprimento total médio 7,53 ± 0,14cm, respectivamente, foram distribuídos em 28 aquários, com volume útil de 250L contendo aeração constante promovida por um soprador 0,1 cv/h. Foram utilizados 5 tratamentos sendo dois controles (com etanol 92% e outro sem etanol) e cinco concentrações (0,0062 mg L⁻¹; 0,021 mg L⁻¹, 0,064 mg L⁻¹, 0,20 mg L⁻¹ e 0,66 mg L⁻¹), cada um contendo quatro repetições, os animais foram mantidos em um sistema semi-estático com fotoperíodo de 12h/12h, constantemente monitorada de acordo com as exigências da espécie. Os sinais clínicos e mortalidade foram registrados a cada 24 horas. Em cada unidade experimental foram colocados 10 animais, totalizando 40 animais por tratamento. Foram realizadas duas coletas, sendo uma após 7 dias de exposição e a outra após 14 dias.

1.5 Monitoramento dos parâmetros físico-químicos da água

Realizou-se o monitoramento dos parâmetros físico-químicos da água durante os ensaios subletais no período da manhã, por meio de uma sonda multiparâmetro (U-50, Horiba, Kyoto, Japan). Aferiu-se os dados de temperatura (Temp), pH, condutividade elétrica (Cond) e oxigênio dissolvido (O.D).

1.6 Análises hematológicas dos adultos

Realizou-se a coleta de sangue de três (3) lambaris de cada repetição após 7 e 14 dias de exposição, totalizando doze animais por tratamento em cada coleta. Os animais

foram anestesiados com benzocaína 100 g L⁻¹ (banho de imersão), antes da coleta. Realizou-se a coleta por punção vasocaudal, com auxílio de seringas contendo EDTA (3%). As amostras foram utilizadas para determinação do hematócrito (Htc) pelo método do microhematócrito segundo GOLDENFARB (1971), da concentração da hemoglobina (Hb) pelo método da cianometahemoglobina proposto por COLLIER (1944), da concentração de proteínas plasmáticas totais (PPT) com o auxílio do refratômetro, da concentração Glicose através de glicosímetro (Accu-Chek Instant[®]) e contagem de eritrócitos em câmara de Neubauer (células por microlitro- μ L).

Os índices hematimétricos VCM (volume corpuscular médio), foi analisado segundo WINTROBE, (1934). O VCM é utilizado como auxílio para avaliação dos eritrócitos. Para o cálculo foram utilizados os valores de hematócrito e a contagem de eritrócitos, segundo a fórmula:

$$\text{VCM} = \frac{Ht \times 10}{\text{RBC (mm}^3\text{)}}$$

1.7 Ensaio subletal da fase Embrio-larval

1.7.1 Local de realização experimental

O experimento foi conduzido no Laboratório de Aquicultura e Ecotoxicologia da Embrapa Meio Ambiente localizado em Jaguariúna – SP. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA (Embrapa Meio Ambiente) Protocolo n° 010/2019.

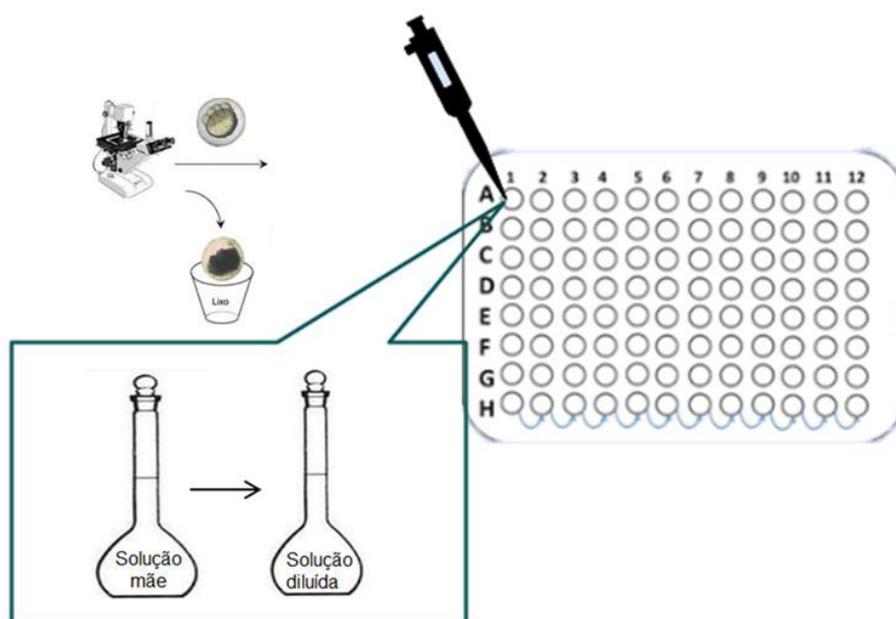
1.7.2 Obtenção dos organismos teste

Os exemplares de *A. altiparanae* foram obtidos a partir da reprodução feita no Laboratório de Aquicultura e Ecotoxicologia da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna – SP. O ensaio dos embriões/larvas seguiu as diretrizes da OECD 236 (Organization for Environment Co-operation and Development) (OECD, 2013). Os embriões foram alocados em recipientes de vidro estéreis, com capacidade de 25 mL, com ambiente controlado, temperatura 25 \pm 1°C, fotoperíodo de 12h: 12h (claro: escuro) e pH de 7,0 \pm 0,5, sendo as soluções renovadas diariamente após o período de observação (total de 6 dias).

1.7.3 Soluções-teste do ensaio Embrio-larval

O preparo das diluições foi baseado no protocolo EPA, (2002) com meio de embrião, na qual seu preparo foi baseado na metodologia segundo NÜSSLEIN-VOLHARD e DAHM (2002). Os embriões foram mantidos a temperatura, 25° C, em estufa B.O. D (Biochemical Oxygen Demand – Modelo- EL131). Para tanto, foram preparadas cinco diluições entre 0,0005 e 0,05 mg L⁻¹. Como o Triclosan não é solúvel em água foi preparado uma solução estoque (solução mãe). Para tanto, foram pesados 5.74 mg de Triclosan e adicionada 10 ml L⁻¹ de etanol 92% para solubilizar o material. A seguir, foi adicionado o meio de embrião, transferiu-se quantitativamente a solução obtida para um balão volumétrico de 1000 mL L⁻¹ e completou-se o volume para um litro com o meio de embrião. Em seguida foi transferido para balões volumétricos de 100 ml L⁻¹ cada um com suas respectivas concentrações, as placas foram preenchidas com 2 ml L⁻¹ de cada concentração e seus respectivos controles e um embrião foi transferido para cada poço (Figura 22). As placas foram acondicionadas em uma câmara de B.O.D (Biochemical Oxygen Demand – Modelo- EL131), a 26° C com fotoperíodo 12h claro/12h escuro em condições idênticas à sala de cultivo. Durante 6 dias de exposição, houve troca das soluções a cada 24 horas, pois o Triclosan se degrada neste período de tempo.

Figura 22. Modelo do ensaio com placas de cultura celular com cinco concentrações teste, prontas para receber os embriões.



Fonte: Adaptado de OECD, 2013.

1.8 Ensaio subletal da fase Embrio-larval

Após a determinação da CL₅₀, foi realizado o teste crônico ou subletal. A partir do valor obtido no teste agudo, 10% deste valor foi considerado como base para o início do teste crônico por um período de 6 dias. Foram utilizados 5 tratamentos sendo dois controles (com etanol 92% e outro sem etanol) e cinco concentrações (0,0574; 0,01794; 0,005695; 0,0018081 e 0,000574 mg L⁻¹), cada um contendo quatro repetições, os embriões foram mantidos em um sistema semi-estático com fotoperíodo de 12h claro/12h escuro, constantemente monitorada de acordo com as exigências da espécie. Os sinais clínicos e mortalidade foram registrados a cada 24 horas. Em cada unidade experimental foram colocados 24 animais, totalizando 72 animais por tratamento.

1.8.1 Controle com o solvente etanol 92%

A fim de avaliar possíveis efeitos nos organismos-teste relacionados ao solvente etanol 92% (Álcool etílico líquido hidratado 92 % INPM), utilizado na diluição de Triclosan, foi realizado nos ensaios de toxicidade um controle do solvente com a maior concentração testada de cada ensaio. O solvente etanol 92%, utilizado neste trabalho foi adquirido de comercio local.

1.8.2 Leituras das placas contendo embriões e larvas

A leitura das placas foi realizada no Laboratório de Toxicologia da Embrapa Meio Ambiente, sendo as leituras baseadas no protocolo segundo SANTIAGO et al. (2021), na qual as avaliações e visualização foi realizada em microscópio estereoscópico (modelo- SMZ 2 led, software optika view versão 7.1.1.5- Opitika®) a 80x e no Laboratório de Aquicultura e Ecotoxicologia (LAE) em microscópio invertido Zeiss® Axio, acoplado a câmera Zeiss® AxioCam ERC5S a 50, 100 e 200x de aumento a 6 dias (após a fertilização dos ovos), pesquisamos os 4 desfechos principais ou *end points*: a) coagulação dos ovos b) falta de formação dos somitos c) falta de batimento cardíaco d) falta de destacamento da cauda do saco vitelínico, e, ainda, a ocorrência de edemas no saco vitelínico, edema cardíaco e coágulo, falta de pigmentação, deformação da coluna vertebral e falta de emergência das larvas, a eclosão ou emergência das larvas normalmente ocorre de 48 a 96 hpf. Todos os ensaios foram realizados com três repetições para cada concentração. Antes e depois da exposição ao Triclosan foram medidos pH,

oxigênio dissolvido, amônia e nitrito no laboratório de Toxicologia, encontrando-se teores dentro dos parâmetros aceitáveis pelo *FET test*.

1.9 Estatística

Os dados dos embriões foram analisados pelo software Statgraphics Centurion XVII, versão 1. 17. 04 (StatPoint Technologies). A normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste de Shapiro–Wilk, e a homogeneidade da variância pelo teste de Levene. As diferenças estatísticas entre os grupos foram avaliadas pela análise de variância (ANOVA) unidirecional ou pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, dependendo da normalidade das variáveis. A ANOVA foi seguida do teste de Tukey ou Games-Howell, dependendo da homogeneidade das variáveis. Os dados que não satisfizeram a suposição de normalidade foram analisados por Kruskal-Wallis seguido pelo teste post-hoc de Bonferroni. O nível de significância foi de 95% em todos os casos.

Os dados dos lambaris adultos foram analisados estatisticamente usando o software R Studio versão 3.4.2. A normalidade das variáveis foi avaliada pela análise de variância com o Teste F seguido do Teste de Tukey juntamente a este, foi feito o teste de regressão linear quadrática, onde, os parâmetros significativos no Teste T student, foram divididos nas constantes a b e c para a equação quadrática.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 Ensaio subletal da fase adulta

2.1.1 Variáveis físico-químicas da água

No decorrer dos 14 dias do teste crônico foram mensurados diariamente os valores de Temperatura; pH; Oxigênio dissolvido; turbidez; Amônia e Condutividade. Os valores relacionados à amônia foram mensurados a cada três dias uma vez que a troca de água era feita a cada 24 horas a partir da inoculação do Triclosan, sendo seus níveis relativamente baixos. Os valores obtidos ao longo dos 14 dias de teste estão descritos na tabela 8.

Tabela 8. Parâmetros físico-químicos da qualidade de água durante a exposição crônica em *Astyanax altiparanae*, exposto a diferentes concentrações de Triclosan.

Tratamentos com TCS (mg L ⁻¹)	Tempo de exposição em horas				
	Temp. (°C)	pH	OD (mg L ⁻¹)	Cond. (mS cm)	Turbidez
0	25,38	7,28	7,13	0,05	—
0,0062	24,34	7,25	6,68	0,03	—
0,021	25,57	7,23	6,45	0,04	—
0,064	24,36	7,28	6,31	0,05	—
0,20	24,54	7,25	6,79	0,04	—
0,66	24,95	7,12	6,88	0,05	—

Dentre os parâmetros mensurados a temperatura exerce uma função importante sobre os indivíduos, pois estão intimamente ligadas aos fenômenos fisiológicos essenciais para os peixes como respiração, digestão, excreção, alimentação e movimentação. Sendo este o principal parâmetro a ser monitorado e avaliado na piscicultura. (O’GORMAN et al., 2016).

Ao longo dos 14 dias de exposição não foram observadas alterações anormais em relação ao parâmetro de temperatura, os resultados observados se mantiveram dentro da normalidade. Em estudo conduzido por BALDISSEROTTO et al. (2005), observaram que lambaris toleram águas com uma variação de 24 - 32°C. SCHIMITTOU (1993), descreve que o lambari-do-rabo-amarelo tem preferência por águas com uma temperatura em torno de 24°C. Neste estudo, durante o período de exposição ao Triclosan a faixa de temperatura apresentou variações entre 24° a 28 ° C proporcionando a faixa agradável de cultivo aos indivíduos.

Para o parâmetro pH, os valores observados durante o período de exposição ao Triclosan, se mantiveram dentro dos limites aceitáveis para a espécie, sendo estas variações consideradas insignificantes quando comparadas ao controle. De acordo com BALDISSEROTTO et al. (2005), os resultados demonstrados no presente estudo, são apropriados para o cultivo do *Astyanax altiparanae* em laboratório, visto que a faixa ideal do pH para espécie está entre 6,5 a 8,0. Para OBA et al. (2006), as variações relacionadas ao pH devem ser mínimas, uma vez que modificações neste parâmetro pode

causar estresse e conseqüentemente induzir a altas taxas de mortalidade nos indivíduos, as atividades exercidas na água devem apresentar uma faixa de tolerância, com valores de pH entre 6,0 e 9,0.

Os resultados observados neste estudo, para o parâmetro de OD não evidenciou nenhuma alteração entre os tratamentos quando comparados com o grupo controle, demonstrando resposta satisfatória, sendo os valores observados acima de 4 mg/L. De acordo com a resolução do CONAMA 357/05, os índices mínimos toleráveis de oxigênio dissolvido (OD) na água para manter o equilíbrio fisiológico dos organismos aquáticos é de 5,0 mg/L, contudo cada organismo aquático apresenta uma margem de tolerância que varia entre as espécies, sendo está vinculada com o processo de depuração e adaptação.

Os limites aceitáveis de oxigênio minimizam o estresse ocasionado pela privação do oxigênio, que conseqüentemente assegura respostas favoráveis no desempenho zootécnico das espécies, corroborando com QUEIROZ et al. (2006), que acredita que oxigênio dissolvido é o principal recurso natural capaz de manter a vida, sendo este o elemento primordial para assegurar a sobrevivência dos peixes, sendo um fator limitante na produtividade dos sistemas de cultivo.

Os valores de amônia observado no presente estudo se encontram dentro dos limites aceitáveis para a espécie em estudo, a amônia é o principal fator, associado a índices elevados de letalidade nos sistemas de cultivo, isto se deve a alta mortalidade está intimamente associada ao índice alto de amônia, sendo a principal ocasionadora de falha na sanidade dos organismos aquáticos. Portanto concentrações improprias de amônia restringem a sobrevivência e os índices de desenvolvimento dos peixes, além de influir prováveis modificações histológicas e fisiológicas (LIEW et al., 2013).

Quando sistemas de cultivo possui um manejo de baixa renovação de água, e alto índice de alimentação assim como sobras de ração, influi diretamente na elevação nos índices nitrito, sendo um composto orgânico nitrogenado proveniente da decomposição da matéria orgânica, podendo assim, ultrapassar o valor tolerável (0,3 mg/L), e se tornar prejudicial ao desempenho dos peixes (KUBITZA, 2007). No presente estudo as concentrações detectadas de amônia foram mínimas, a ponto de não interferir na qualidade de vida dos indivíduos expostos, pois a troca de água foi realizada a cada 24 horas minimizando assim seus efeitos. Durante o período de exposição ao Triclosan os parâmetros relacionados à condutividade se mantiveram dentro dos parâmetros almejados para o ambiente laboratorial, sem grandes variações. De acordo com LUSHCHAK

(2016), em ecossistemas a condutividade com até 6% não afeta no desempenho e desenvolvimento e sobrevivência do lambari. Os valores obtidos no presente estudo para o parâmetro de turbidez expressaram diferenças significativas nas concentrações 0,064 mg L⁻¹, 0,20 mg L⁻¹ e 0,66 mg L⁻¹.

Dentre todos os valores relacionados à água, este é o único que facilmente é influenciável pela quantidade de sólidos suspenso na água na qual age diretamente sobre a luminosidade, sendo o único critério que não está inserido a nenhuma norma ou legislação, embora seja um exímio disseminador e divisor de avaliação.

Os valores relacionados ao parâmetro de turbidez devem-se apresentar inferior a 5,0 NTU são considerados valores plausíveis, porem recomenda-se que estes valores atrelados a turbidez se encontre abaixo de 1 NTU. Como se trata de um teste de fácil aplicação, pois sua determinação e medição são realizadas através da visualização sendo seu resultado de fácil acesso, a turbidez pode ser utilizada como indicador potencial para doenças de veiculação hídrica (BRASIL, 2021).

2.2 Análises hematológicas

Os resultados hematológicos observados durante a exposição crônica pelo período de 7 e 14 dias encontram-se dispostos na Tabela 9. Os parâmetros hematológicos têm sido utilizados para verificar efeitos deletérios ocasionados pelas mais diversas substâncias, além de mensurar os danos produzidos pelo xenobióticos, assim como medir o estresse de peixes (QUEIROZ, 2012; CORRAL, 2014). HEATH (1995) relata que a exposição a substâncias tóxicas tem o potencial de influenciar os parâmetros hematológicos de modo que este pode se apresentar de forma elevada ou apresentar uma diminuição, sendo um parâmetro de extrema importância para os ensaios toxicológicos (SAMPATH et al., 1993).

Tabela 9. Parâmetros hematológicos de adultos de *Astyanax altiparanae* durante o período de exposição crônica a diferentes concentrações de Triclosan.

Parâmetros Hematológicos									
Parâmetro	Triclosan mg L ⁻¹							CV%	P-valor
	Controle	Controle Etanol	0,0062	0,021	0,064	0,20	0,66		
Eritrócito	11,54 ab	10,83 ab	14,0 a	9,34 ab	7,79 b	7,93b	13,96a	39,9	<0,001
Hemoglobina	7,89 b	7,89 b	10.4a	9.48ab	9.22ab	10.4a	8.01b	18.0	<0.01
Hematócrito	0.26a	0.26a	0.27a	0.27a	0.23a	0.22a	0.11b	23.4	<0.01
VCM	0,23 a	0,25 a	0,23 a	0,33 a	0,31 a	0,28 a	0,09 b	36,6	<0,001
Glicemia	66ab	66ab	65ab	49ab	56ab	47b	74a	34.7	<0.01

Coleta 14 dias									
	Triclosan mg L ⁻¹							CV%	P-valor
	Controle	Controle Etanol	0,0062	0,021	0,064	0,20	0,66		
Eritrócito	11,34 c	11,34 c	15,87 bc	13,19 bc	16,61 ab	15,05 bc	15,63 bc	24,5	0,011
Hemoglobina	10.5b	10.5b	10.2b	10.1b	10.9ab	10.6b	10.4b	15.2	0.004
Hematócrito	0.27	0.27	0.23	0.27	0.22	0.25	0.21	20.7	<0.01
VCM	0,31 a	0,31 a	0,15b	0,21 ab	0,13b	0,17b	0,15b	54,9	0,425
Glicemia	66	66	63	56	69	69	86	33.0	0.089

Médias seguidas de letras distintas na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey, (P < 0,05). Seguido do teste de regressão linear quadrática.

Os resultados observados durante a primeira coleta que ocorreu 7º dia de exposição ao Triclosan demonstraram diferenças estatísticas entre os tratamentos e o grupo controle, ocasionado pelo estresse de aclimação, trocas de água e disputa por alimento. Sendo, portanto um indicativo que os indivíduos expostos ao agente tóxico, apresentaram ativação do sistema fisiológico, como aumento na capacidade respiratória e ativação do sistema de defesa através do hemograma que apresentou elevação no número de eritrócitos (Erit.), hemoglobina (Hb) e hematócrito (Htc), ao mesmo tempo em que os valores de glicemia demonstraram a existência de estresse.

O grupo exposto ao tratamento com o TCS demonstrou aumento na resposta com relação à elevação da capacidade respiratória este aumento pode estar associado com a capacidade hemolisante do Triclosan e rápida oxidação da hemoglobina em metemoglobina, além destas alterações nos parâmetros eritrocitários ocorreu também o aumento da glicemia sugerindo estresse decorrente da exposição ao TCS.

Em estudo conduzido por VIJITHA et al, (2017), com *Oreochromis niloticus* submetidos a 2810 µg L⁻¹ de TCS evidenciou redução dos eritrócitos, hematócrito e hemoglobina e aumento no VCM. Já SAHU et al. (2020), utilizando peixe *Pangasianodon hypophthalmus* expostos a diferentes concentrações de TCS indicaram diminuição significativa em relação aos eritrócitos, hematócrito e volume corpuscular médio.

GEETHA e PRIYA (2020), usando *Labeo rohita* expostos ao TCS relatam aumentos em hemoglobina, volume corpuscular médio, danos estruturais nas membranas dos eritrócitos e hemólise disseminada. Na análise dos parâmetros hematológicos, avaliados após 14 dias, na qual se observou resposta diferente do perfil de 7 dias, provavelmente, pela interferência do estresse decorrente do próprio ambiente laboratorial e do manejo durante o experimento e da exposição ao TCS ambos associados.

Após os 14 dias foi observado que a glicemia, apresenta variações, sendo possível observar a resposta fisiológica mediante ao estresse produzido aos grupos (controle e tratado). Observa-se que o grupo controle demonstra capacidade de resposta respiratória, assim como os grupos tratados com maiores concentrações, sendo que no tratamento 0,064mg L⁻¹ apresentou aumento de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito em relação as demais concentrações testadas.

Dados semelhantes foram encontrados por GHELFI et al., (2016) onde *Hoplias malabaricus* expostos ao Triclosan apresentaram elevação dos valores de hemoglobina e hematócrito.

Em estudo conduzido por AJIMA et al., (2015) com *Clarias gariepinus*, os efeitos observados foi aumento nas menores concentrações dos animais expostos, onde se teve um aumento exponencial do eritrócito, hemoglobina e glicemia.

Os resultados do presente estudo estão de acordo com CARVALHO e FERNANDES (2006) com *Prochilodus scrofa* exposta a diferentes concentrações de Triclosan, onde relatam aumento significativo em eritrócitos, hemoglobina e hematócrito em 7 dias de exposição, após, observaram que no decorrer dos dias os parâmetros hematológicos apresentaram aumento exponencial dos valores visualizados anteriormente. Segundo VOSYLIENÉ (1999), os parâmetros hematológicos podem sofrer alterações subsequentes a ampliação da ação eritropoietina do baço e do rim proveniente do estresse.

Durante o estresse alguns mecanismos fisiológicos são ativados, deste modo, ocorre à despolarização do eixo hipotálamo-sistema nervoso- simpático que irá ativar as células cromafins (HSC), que por consequência sucede na liberação de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina), além da ativação do eixo primário também é ativado o eixo hipotálamo-hipófise-inter-renal (HHI) que facilita a liberação dos corticosteroides (cortisol e cortisona).

Desta forma a ação destes hormônios em inúmeros órgãos-alvo, resulta em modificações bioquímicas e fisiológicas denominadas respostas secundárias ao estresse, essas alterações são também observadas por meio do aumento do número de eritrócitos e da queda no Volume Corpuscular Médio (VCM). Para TAVARES et al., (2004), estas modificações que são observadas no eritrograma, principalmente no hematócrito são mediadas pelo estresse, que por sua vez promove hemoconcentração ou hemodiluição; na hemoconcentração pode ser pela liberação de eritrócitos pelo baço; na hemodiluição a redução nos valores do hematócrito. Além destas alterações relacionadas ao eritrograma a glicose sanguínea é um parâmetro essencial para o monitoramento do estresse (MARIANO et al., 2011).

Quando ocorre um estímulo exacerbado o índice de glicose aumenta ocasionado em uma hiperglicemia transitória que está associada aos efeitos das catecolaminas que estimulam a glicogenólise, permitindo que a glicose do fígado caia na corrente

sanguínea visto que o glicogênio é uma das muitas formas de armazenamento da energia, dos peixes e é encontrado em grande quantidade nos tecidos do fígado e músculo dos peixes (CYRINO et al., 2000).

A elevação nos níveis de glicose é uma das respostas típicas aos estressores principalmente quando estão atrelados a fatores abióticos como é o caso dos poluentes em geral, em peixes (WENDELAAR-BONGA, 1997).

2.3 Alterações comportamentais

Alterações comportamentais em peixes podem fornecer informações importantes para avaliação e monitoramento de ecossistemas, além de serem atribuídas à inibição da atividade da acetilcolinesterase induzida por xenobióticos, levando ao acúmulo de acetilcolina nas sinapses colinérgicas, terminando com hiperestimulação (MUSHIGERI e DAVID, 2005).

Para o período de exposição de 14 dias, os peixes apresentaram hiperatividade com movimentos erráticos nos aquários podendo ser estes classificados como; leve, moderado, forte e muito forte. As concentrações na qual os animais expressaram comportamento considerados leve foram 0,0062 e 0,021 mg/L⁻¹ na qual estes indivíduos apresentaram movimentos lento e comportamento de engolir ar, estas alterações não foram consideradas graves uma vez que estes animais conseguiram se adaptar a estas condições sendo observado o comportamento de adaptabilidade ao TCS, já para a concentração 0,064 mg/L⁻¹, observou-se que os indivíduos expostos apresentaram variações de comportamento sendo caracterizados entre moderado e forte, pois foram visualizados movimentos repetitivos de engolir o ar, desconforto respiratório, movimento lento, natação descoordenada, hiperventilada tendência à fuga ou salto, estas manifestações clínicas foram visualizadas em 15% dos indivíduos expostos nestas concentrações. Para as concentrações 0,20 e 0,66 mg L⁻¹, os animais apresentaram sintomas clínicos caracterizados como forte e muito forte, sendo estes movimentos repetitivos de engolir o ar, desconforto respiratório, movimento lento, natação descoordenada, hiperventilada tendência à fuga ou salto, porem alguns indivíduos exibiram reações mais exacerbadas como alterações neurológicas severas que refletiram na qualidade de vida destes indivíduos expostos, demonstrando sinais claros de intoxicação em decorrência ao TCS.

O aumento da tendência de fuga ou salto também foi observado em peixes expostos ao TCS. Assim que o produto químico (TCS) foi adicionado, os peixes começaram a se mover em direção ao fundo dos aquários e apresentavam diferentes graus de distúrbios comportamentais.

As irregularidades comportamentais apresentadas pelos peixes expostos aumentaram de modo proporcional a elevação das concentrações de TCS, exibindo uma correlação positiva com a concentração (Tabela 10). Nenhum comportamento anormal visível foi observado no grupo controle de peixes durante o estudo.

Tabela 10. Resposta comportamental de exemplares de *Astyanax altiparanae* após exposição crônica ao Triclosan.

Comportamento	Concentração mg L ⁻¹					
	0	0,0062	0,021	0,064	0,20	0,66
Engolir Ar	-	-	+	++	+++	++++
Desconforto respiratório	-	-	+	+++	++++	++++
Movimento lento	-	+	+	+++	++++	++++
Natação descoordenada	-	-	-	++++	+++	++++
Hiperventilação	-	-	-	++	++++	++++
Tendência de fuga ou salto	-	-	++	++	+++	++++

Nenhum -, Leve +, Moderado ++, Forte +++, Muito forte +++++.

Mudanças comportamentais, incluindo inquietação, natação errática e subida à superfície foram observadas no *A. altiparanae*, essas alterações se deram no grupo

exposto ao TCS, principalmente nas concentrações 0,66, 0,20, 0,064 e 0,021 mg L⁻¹. As alterações comportamentais observadas podem ser uma síndrome evasiva desenvolvida em relação a substância em questão. O desconforto respiratório, observado em peixes expostos, pode ser causado por alterações no epitélio branquial associado a uma disfunção neurológica, o que resultou em alta frequência respiratória. De acordo com BANERJEE (2008) que avaliou os efeitos do Triclosan em *P. hypothalmus* relata aumento da atividade opercular, incoordenação natatória e alterações neurológicas. Durante o estudo conduzido com *Anabas testudineus* na concentração de 1,4 mg.L⁻¹, na qual os autores PRIYATHA e CHITRA (2018), observaram variações comportamentais similares ao do presente estudo, ÇELEBI e GÖK (2018) para *D. rerio* e *Poecilia reticulata* expostos ao TCS em diferentes concentrações, também relatam mudanças comportamentais, como natação rápida e descontrolada, movimento errático, tendência de fuga ou salto, perda de equilíbrio, dificuldade respiratória e produção de muco pelo corpo.

Os resultados do presente estudo está de acordo com OMOREGIE et al. (2009), que avaliou os sinais clínicos em *O. niloticus* exposta a diferentes concentrações de Triclosan, onde foram observadas, dificuldade respiratória nas concentrações mais elevadas, natação descoordenada, tendência de fuga ou salto.

2.4 Ensaio subletal da fase Embrio-larval

2.4.1 Controle do solvente etanol 92%

Com o intuito de quantificar os possíveis efeitos ocasionados ao desenvolvimento embrio-larval de *A. altiparanae*, associados ao solvente etanol 92% utilizado na diluição do Triclosan, foram realizados controles do solvente com a maior concentração testada.

Não houve diferença estatística (teste de Shapiro–Wilk, $p \geq 0,05$) entre o controle de meio de embrião com o controle com etanol 92% no ensaio, indicando que seu uso não causou nenhum efeito adverso observado (Tabela 11).

Tabela 11. Comparação estatística do grupo controle com meio de embrião e grupo controle com etanol 92% (Teste de Shapiro–Wilk, $p \geq 0,05$), para o ensaio de toxicidade crônica em embriões de *Astyanax altiparanae*.

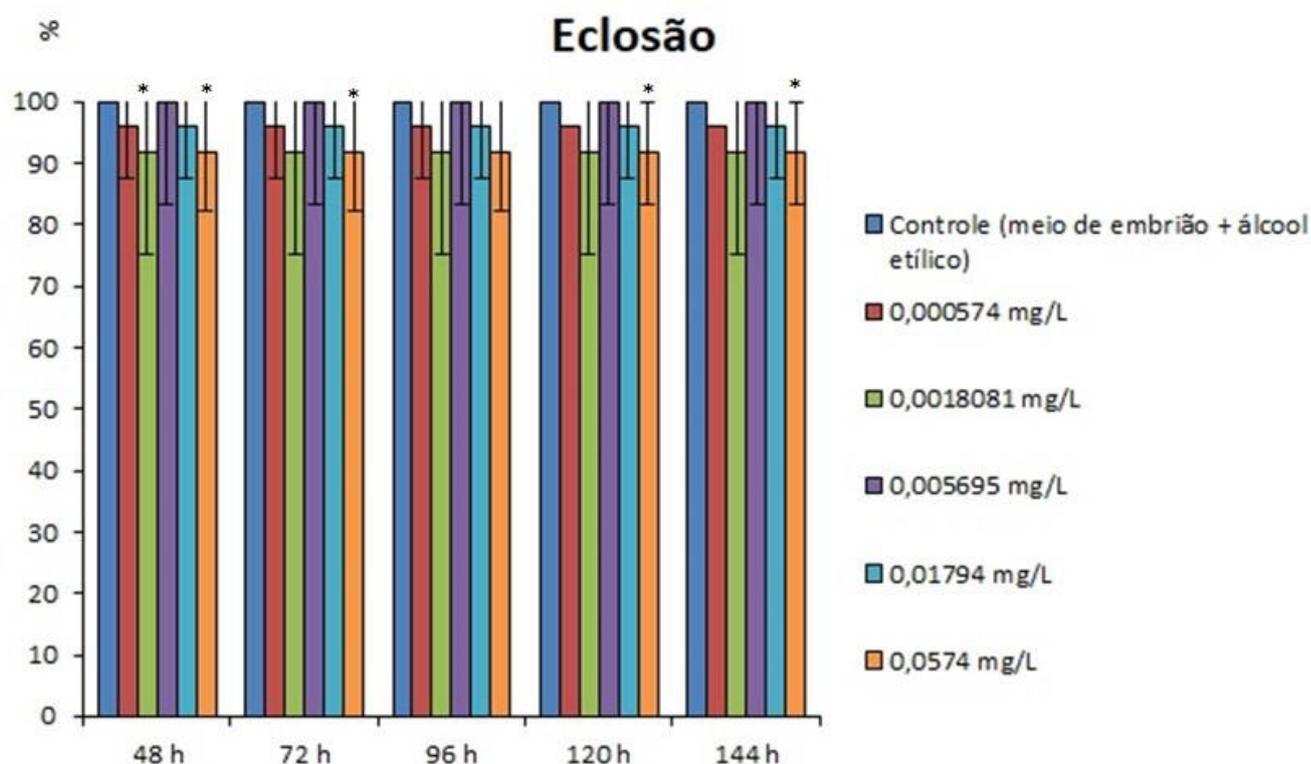
Tratamento	Desenvolvimento Embrio-larval normal médio (%)	Desvio Padrão
Meio de Embrião	99,6	0,9
Etanol 92%	99,4	0,8

2.4.2 Toxicidade crônica (Embrio-larval)

2.4.2.1 Efeitos do Triclosan sobre a taxa de eclosão do *Astyanax altiparanae*.

Quando comparamos a taxa de eclosão nas diferentes concentrações (0,0574; 0,01794; 0,005695; 0,0018081 e 0,000574 mg. L⁻¹), com o controle negativo no ensaio, observamos que as eclosões dos embriões nas concentrações mais elevadas foram tardias com ocorrência de alterações teratogênicas (Figura 23).

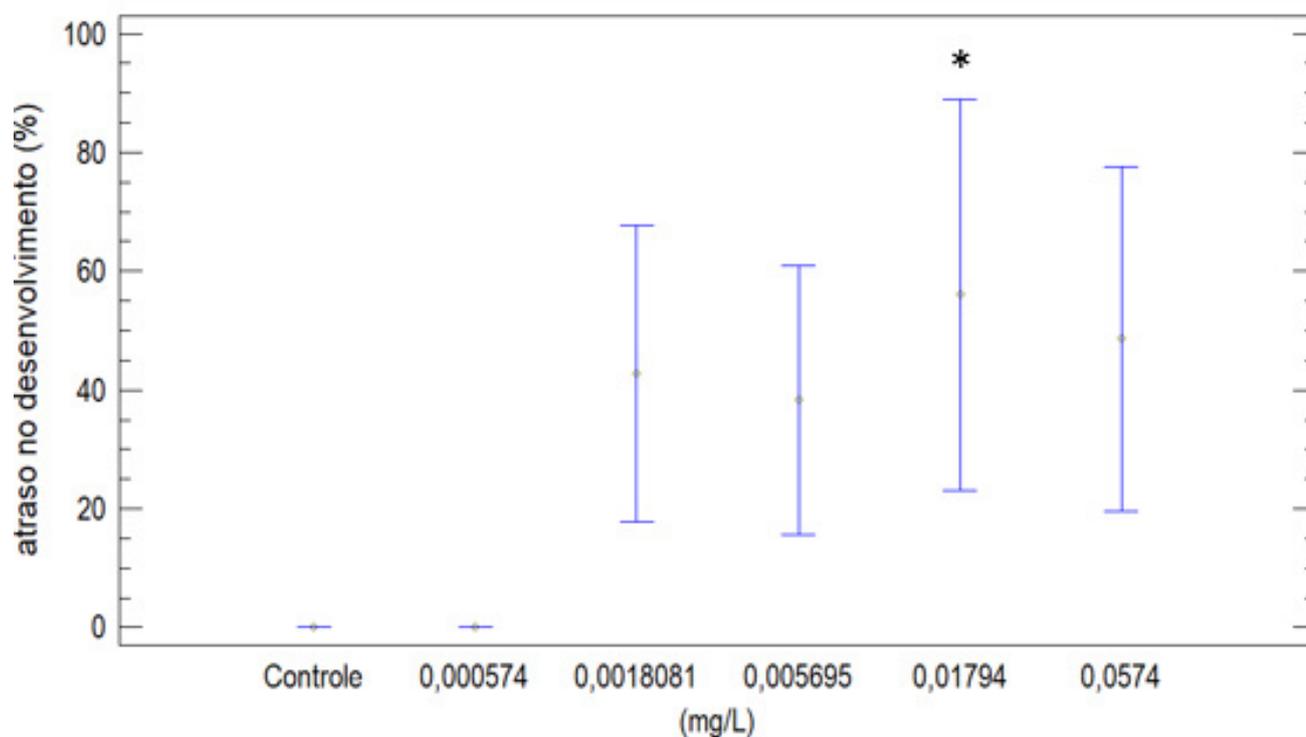
Figura 23. Índice de eclosão da fase embrião-larval de *Astyanax altiparanae*.



Valores médios (\pm intervalo de confiança 95%; $n = 4$) referentes à eclosão *Astyanax altiparanae*, exposto a diferentes concentrações de Triclosan durante 144h. Aplicou-se teste de Kruskal- Wallis seguido do teste Bonferroni, constatando diferenças significativa em relação ao controle ($p < 0,05$). * Indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.

Os testes de toxicidade crônica foram realizados utilizando larvas de *A. altiparanae* com 48 horas pós-eclosão e embriões com menos de 24 horas pós-fertilização. O desenvolvimento embrionário, a eclodibilidade e o tempo de eclosão dos ovos de *A. altiparanae*, foram afetados pelo tratamento com TCS nas concentrações 0,0018081 e 0,0574 mg. L⁻¹. A eclodibilidade dos ovos fertilizados expostos ao TCS durante 6 dias foi significativamente diminuída em relação aos controles ($P < 0,05$), neste estudo, foram investigados os efeitos do TCS nas fases iniciais de vida do lambari (*A. altiparanae*) (Figura 24).

Figura 24. Índice de atraso no desenvolvimento da fase embrio-larval de *Astyanax altiparanae*.



Valores médios (\pm intervalo de confiança 95%; $n = 5$) referentes ao atraso no desenvolvimento em *Astyanax altiparanae*, exposto a diferentes concentrações de Triclosan durante 24h. Aplicou-se procedimento de Kruskal - Wallis seguido do teste Bonferroni. * Indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.

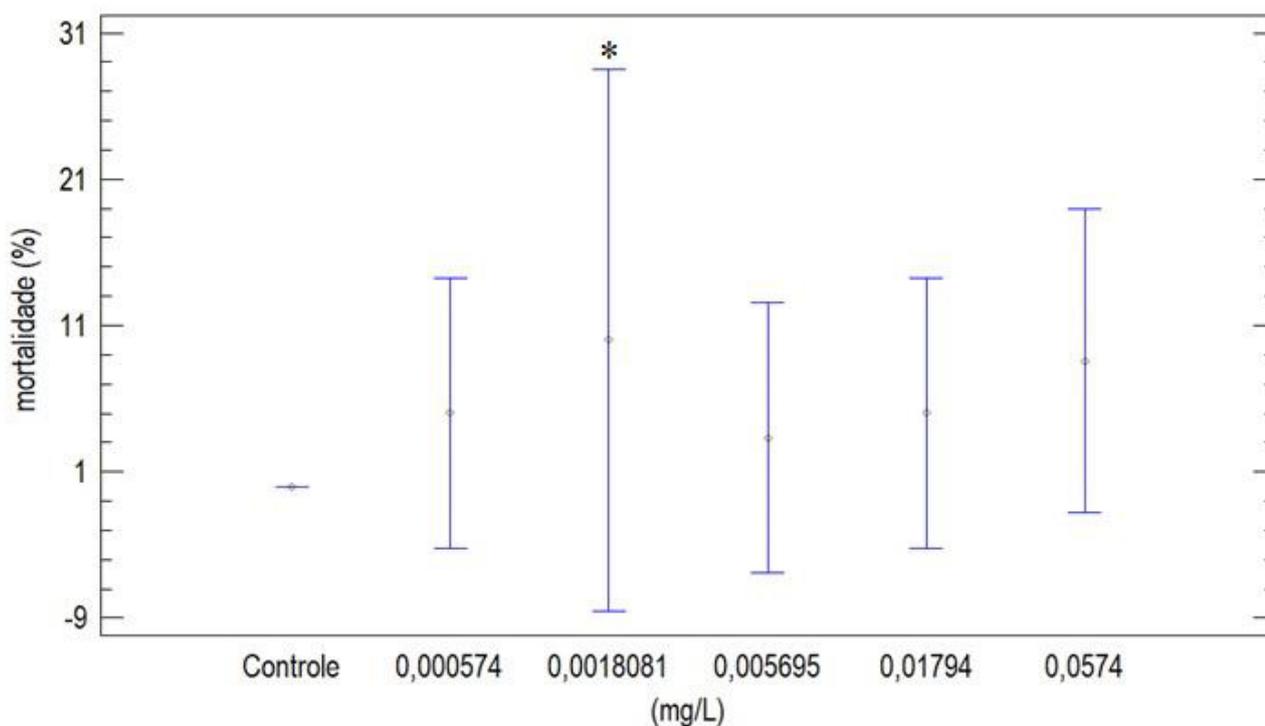
Estes resultados sugerem que o TCS tem alta toxicidade nos estágios iniciais da vida do lambari, e que o metabólito do TCS pode ser considerado um composto estrogênico fraco, com potencial para induzir efeitos adversos no desenvolvimento da fase embrio-larval. Estes resultados foram semelhantes ao encontrado em estudos com embriões/larvas de *Pimephales promelas*, na qual foram testadas concentrações de TCS consideradas ambientalmente relevantes este estudo foi conduzido por SCHULTZ; BARTELL; SCHOENFUSS (2012), que corroboram para os resultados encontrados neste estudo. HAMM et al. (2001), relataram os fatores que afetam a sensibilidade da fase embrio-larval de peixes expostos a xenobióticos, os embriões são cercados por um córion, uma barreira protetora, porém semipermeável, que permite a absorção de diversas substâncias, sejam elas tóxicas ou não, desta forma ocorre a disfunção

orgânica, acarretando em diminuição do tamanho do embrião, diminuição na taxa de eclosão, alterações teratogênicas e consequentemente morte embrionária.

2.4.2.2 Efeitos do Triclosan sobre a mortalidade do *Astyanax altiparanae*.

Quando comparamos a taxa de mortalidade nas diferentes concentrações (0,0574; 0,01794; 0,005695; 0,0018081 e 0,000574 mg. L⁻¹), com o controle negativo no ensaio, observamos que a mortalidade, apresentou diferença apenas na concentração 0,0018081 mg. L⁻¹ apresentando índices de mortalidade mais altos comparadas com as demais concentrações utilizadas, sendo que as alterações provocadas clinicamente pelo TCS levaram os indivíduos a óbito. Adicionalmente, foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os tempos avaliados e/ou entre os grupos controle e tratado com o produto Triclosan (Figura 25).

Figura 25. Índice de mortalidade da fase embrio-larval de *Astyanax altiparanae*.



Valores médios (\pm intervalo de confiança 95%; n = 5) referentes à mortalidade de *Astyanax altiparanae*, exposto a diferentes concentrações de Triclosan durante 144h. Aplicou-se procedimento de Kruskal - Wallis seguido do teste Bonferroni. Indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.

Durante o período de observação dos embriões, verificou-se que a cada 24h os parâmetros mensurados durante a visualização foram aqueles relacionados ao desenvolvimento, sendo estes, coagulação, formação de somitos, desprendimento de cauda e presença de batimento cardíaco através de estereoscópio. A observação destes parâmetros permitiu verificar as alterações que provocaram a morte destes indivíduos.

Sendo o principal fator as alterações relacionadas ao sistema cardiovascular, na qual a maioria dos indivíduos apresentou má formação nas estruturas cardíacas, outras alterações também foram visualizadas durante o período de exposição dos embriões (Tabela 12).

Tabela 12. Escores atribuídos a cada categoria de dano de acordo com as anomalias observadas, durante o período entre 24 a 48 horas de embriões *Astyanax altiparanae*.

Alterações	Concentração mg L ⁻¹					
	0	0,000574	0,005695	0,01794	0,001808	0,0574
Coagulação dos ovos	-	+	+	+++	+++	++++
Falta de formação dos somitos	-	+	+	+++	++++	++++
Falta de batimento cardíaco	-	+	++	+++	++++	++++
Falta de destacamento da cauda	-	-	-	+	+++	++++
Edema cardíaco	-	-	+	+++	++++	++++
Edemas no saco vitelínico	-	-	++	++	++++	++++

Nenhum -, Leve +, Moderado ++, Forte +++, Muito forte +++++.

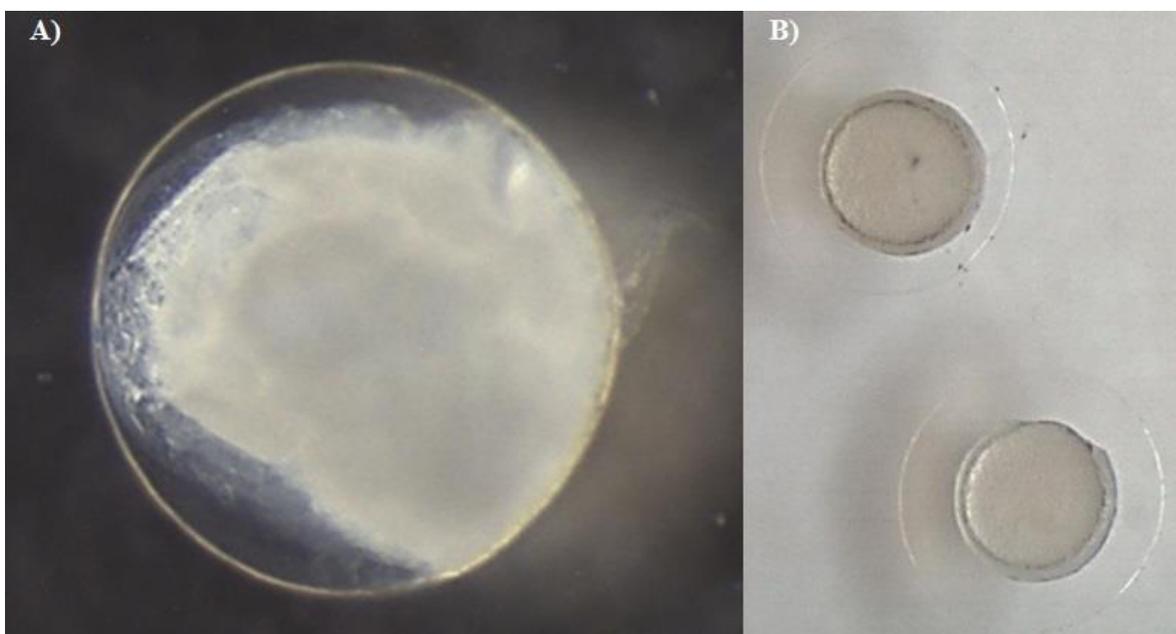
Mesmo em baixas concentrações o TCS, foi capaz de causar índices de mortalidade em embriões de *A. altiparanae* no período de 48 horas pós-exposição, sendo que as alterações teratogênicas causadas pelo uso do Triclosan em um curto período de tempo são capazes de alterar a fisiologia de desenvolvimento desta espécie.

Durante o período experimental foram retirados alguns embriões para a observação em microscópico óptico, na imagem (Figura 26) sendo possível observar as alterações morfológicas nos indivíduos durante o ensaio, dentre eles destacam-se embriões coagulados e não formação de somitos. Estas alterações foram classificadas em leve, moderada, forte e muito forte. Estas comorbidades foram visualizadas em todas as concentrações testadas, apresentando graus diferenciados entre elas. Para as concentrações de 0,000574 e 0,005695 mg/L⁻¹, todas as alterações visualizadas foram

caracterizadas como leve a moderada, apenas 5% dos indivíduos foram a óbito nessas concentrações.

Para as demais concentrações 0,01794, 0,001808 e 0,0574 mg/L⁻¹, todas as alterações visualizadas foram caracterizadas como forte a muito forte, sendo que 16,5% dos indivíduos foram a óbito nessas concentrações.

Figura 26. Alterações observadas no desenvolvimento embrionário dos indivíduos expostos nas concentrações 0,0574; 0,01794 e 0,0018081 mg L⁻¹ de Triclosan. Embrião com anormalidades de desenvolvimento como eclosão tardia e má formações (A) e embrião sem nenhuma alteração no desenvolvimento (B).



Fonte: Gil, A. J. 2024.

Para a avaliação do estágio embrio-larval observa-se, deformações cefálica, deformações torácicas, axiais e na cauda. Durante o período dos testes inúmeros indivíduos exibiram mais de uma irregularidade biológica (Tabela 13). Quando essas anomalias observadas se expressavam de modo exacerbado, como edemas cardíacos e má formação cefálica, os organismos morreram. A concentração que apresentou diferença estatisticamente significativa em relação as demais foi a 0,001808 mg/L⁻¹, na qual o índice de anormalidades ligada a deformidade incompatíveis com a vida foi de 33,3 % quando comparada as demais esse foi o índice mais elevado observado no período de correspondente a 24 a 48 horas.

Tabela 13. Escores atribuídos a cada categoria de dano de acordo com as anomalias observadas, durante o período entre 96h a 144horas na fase embrio-larval de *Astyanax altiparanae*.

Alterações	Concentração mg L ⁻¹					
	0	0,000574	0,005695	0,01794	0,001808	0,0574
Axial (esqueleto/cauda)	-	+	+	+++	+++	++++
Nadadeiras atrofiadas danificadas	-	+	+	+++	++++	++++
Lesão na estrutura da nadadeira	-	+	++	+++	++++	++++
Deformidades faciais	-	-	-	+	+++	++++
Ausência de pigmento nos olhos	-	-	+	+++	++++	++++
Edema ocular	-	-	++	++	++++	++++
Deformidades na estrutura bucal	-	-	-	-	+++	+++
Distensão e/ou atrofia corporal	-	-	+	++	++++	++++
Edema cardíaco	-	-	-	++	++++	++++

Nenhum -, Leve +, Moderado ++, Forte +++, Muito forte +++++.

As alterações observadas na fase Embrio-larval, descritas acima, nos permite avaliar o quão agressivo é a exposição ao Triclosan mesmo em concentrações

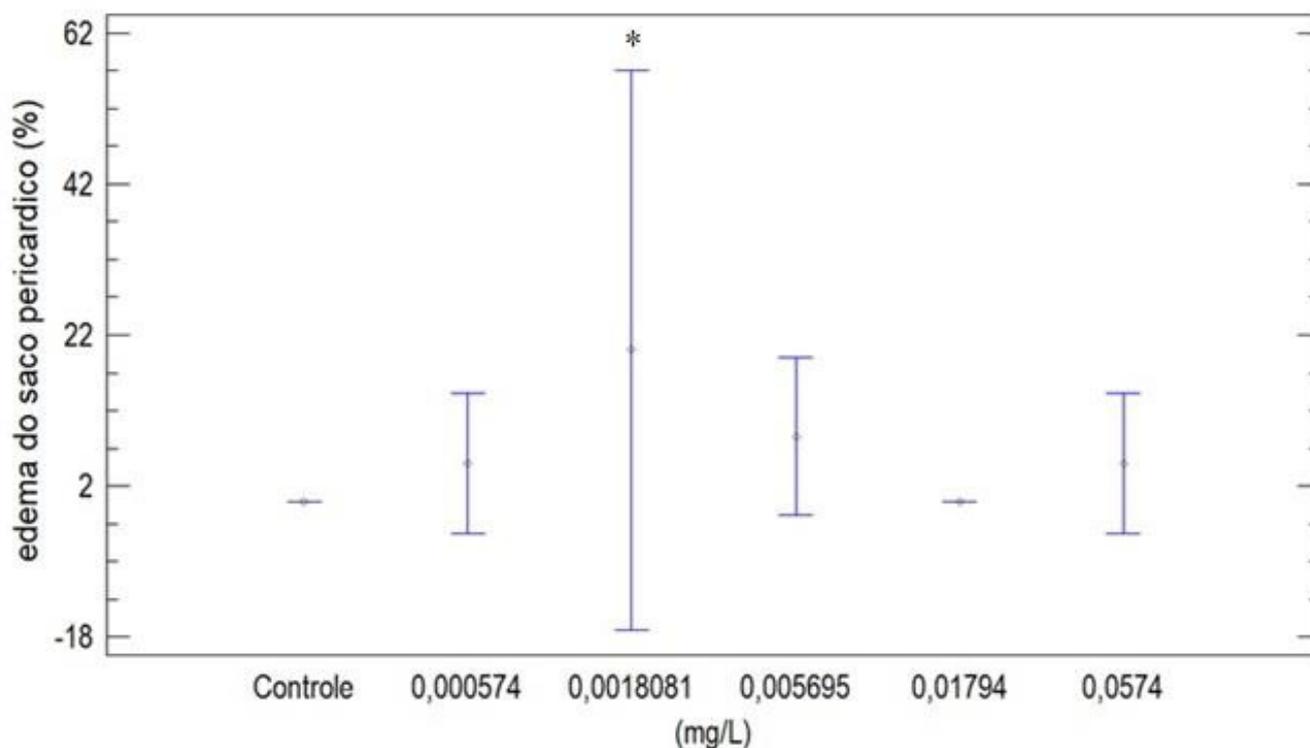
consideradas baixas, sendo que inúmeras alterações foram provocadas em um curto período de exposição de 144 horas.

Desta forma as alterações mais graves analisadas que levaram os indivíduos a óbito foi deformidades no sistema cardiovascular (edema cardíaco seguido de hemorragias), que na concentração $0,0018081 \text{ mg L}^{-1}$, foi superior as demais, desta forma, apresentaram alterações estatisticamente significativas entre os tempos avaliados e/ou entre os grupos controle e tratado com o produto Triclosan.

Para a avaliação dos sinais cardíacos foi feito a observação do parâmetro frequência cardíaca no tempo de 120horas, na qual os indivíduos expostos as concentrações $0,0574$ e $0,01794 \text{ mg L}^{-1}$, apresentaram sinais elevados de bradicardia, porém não foi observado diferenças estatísticas significativas entre os tempos avaliados.

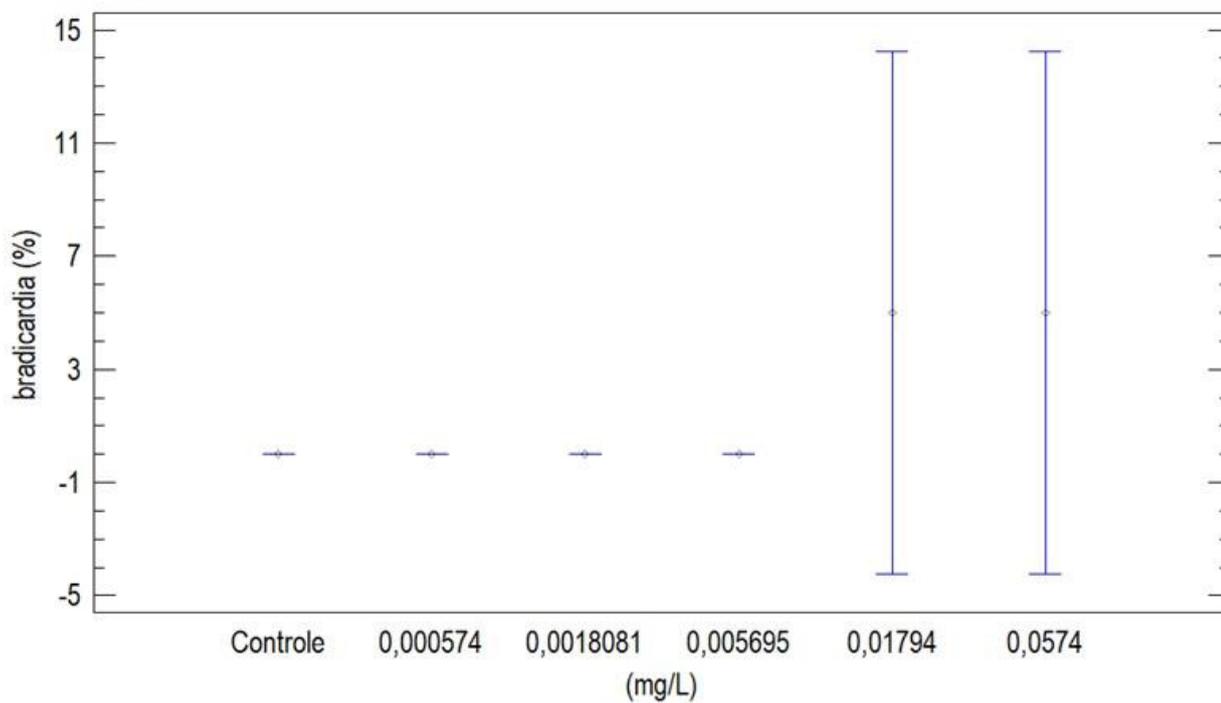
Outro parâmetro examinado foi à absorção do saco pericárdico, na qual indivíduos expostos na concentração $0,0574 \text{ mg L}^{-1}$, tiveram a absorção em 96 horas, resultando em uma deficiência das estruturas cardíacas que não se desenvolveram de maneira correta, ocasionando má formações na estrutura tecidual do órgão (Figuras 27 a 29).

Figura 27. Índice de edema do saco pericárdico da fase embrio-larval de *Astyanax altiparanae*.



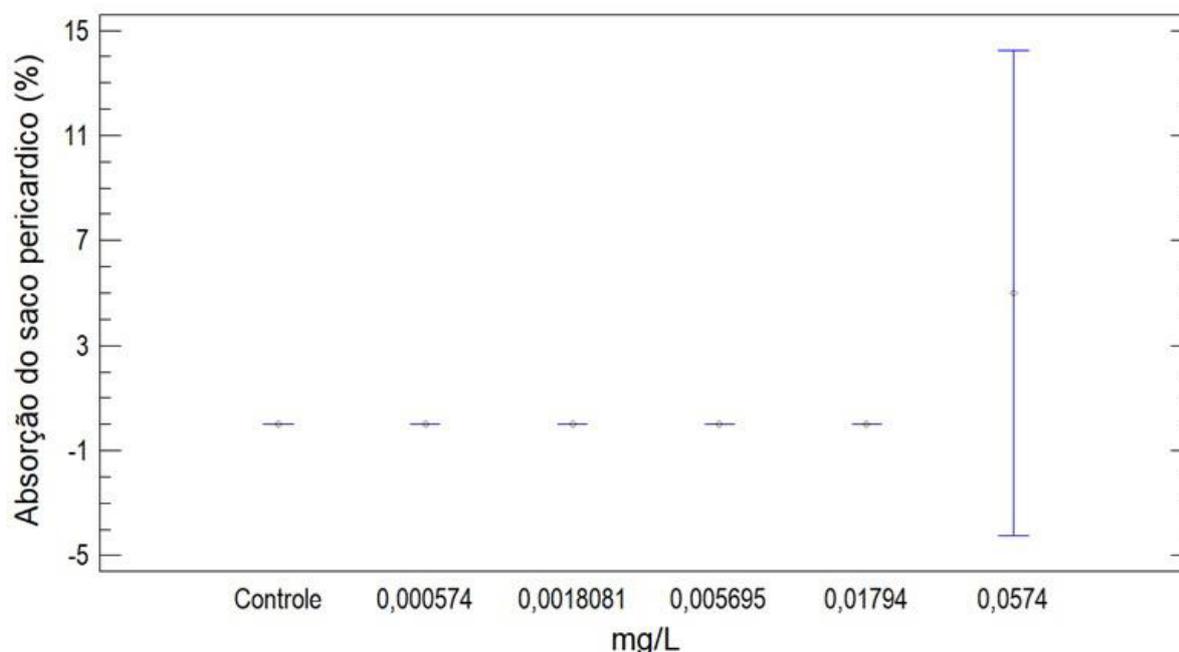
Valores médios (\pm intervalo de confiança 95%; $n = 5$) referentes à edema de pericárdio de *Astyanax altiparanae*, exposto a diferentes concentrações de Triclosan durante 120h. Aplicou-se procedimento de Kruskal - Wallis seguido do teste Bonferroni constatando diferenças significativas em relação ao controle ($p > 0,05$). * Indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.

Figura 28. Índice bradicardia da fase embrio-larval de *Astyanax altiparanae*.



Valores médios (\pm intervalo de confiança 95%; n = 5) referentes à bradicardia em *Astyanax altiparanae*, exposto a diferentes concentrações de Triclosan durante 120 h. Aplicou-se procedimento de Kruskal - Wallis seguido do teste Bonferroni não se constatando diferenças significativa em relação ao controle ($p > 0,05$).

Figura 29. Índice de absorção do saco pericárdico a fase embrio-larval de *Astyanax altiparanae*.

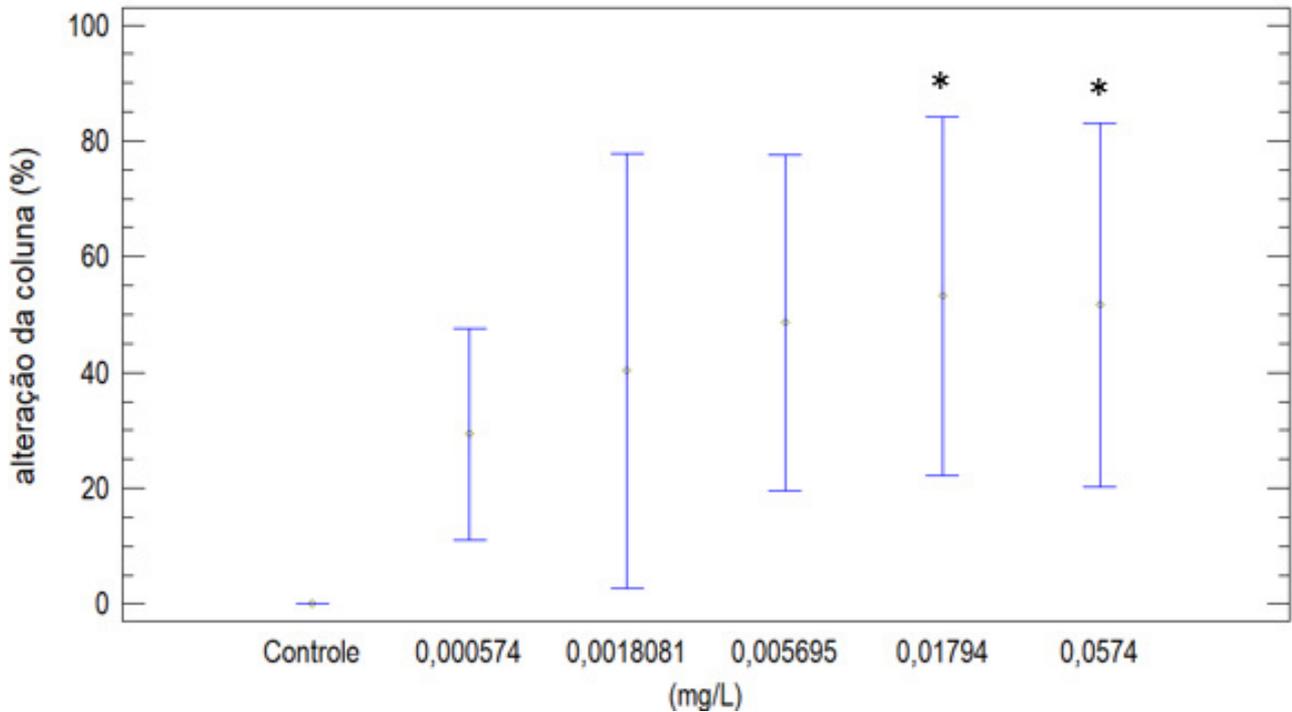


Valores médios (\pm intervalo de confiança 95%; $n = 5$) referentes à absorção do saco pericárdico em *Astyanax altiparanae*, exposto a diferentes concentrações de Triclosan durante 120 h. Aplicou-se procedimento de Kruskal - Wallis seguido do teste Bonferroni não se constatando diferenças significativa em relação ao controle ($p > 0,05$).

Para as alterações axiais (deformidades em coluna vertebral e cauda), as concentrações que apresentaram maior índice de deformidade estrutural foi 0,0574 e 0,01794 mg L⁻¹, apresentando alterações estatisticamente significativas entre os tempos avaliados e/ou entre os grupos controle e tratado com o produto Triclosan.

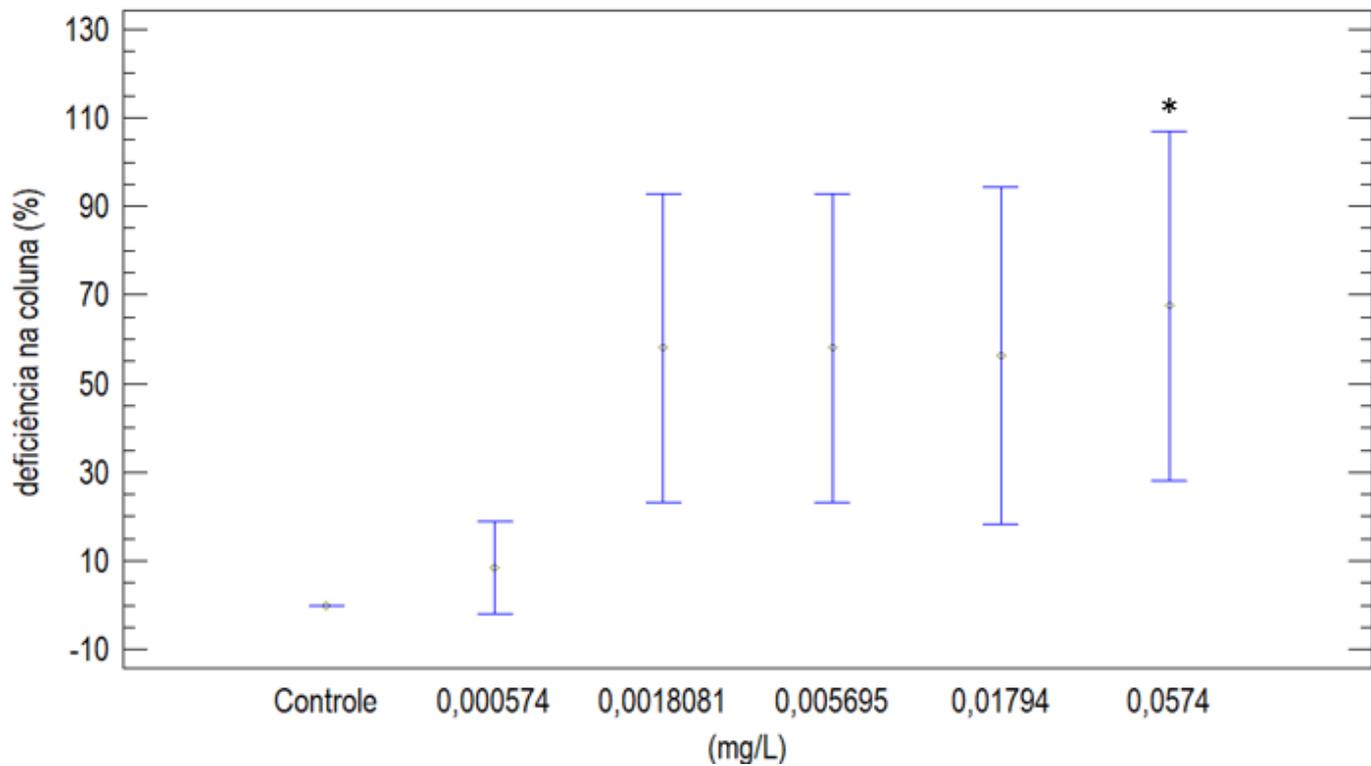
Também foram avaliados os seguintes parâmetros curvatura da cauda, deficiência da cauda e deficiência na coluna. Para os parâmetros deficiência da cauda e deficiência na coluna houve diferenças estatísticas significativas, já para a curvatura da cauda não foi observada nenhuma diferença estatística significativa (Figuras 30 a 33).

Figura 30. Índice de alterações na coluna da fase embrio-larval de *Astyanax altiparanae*.



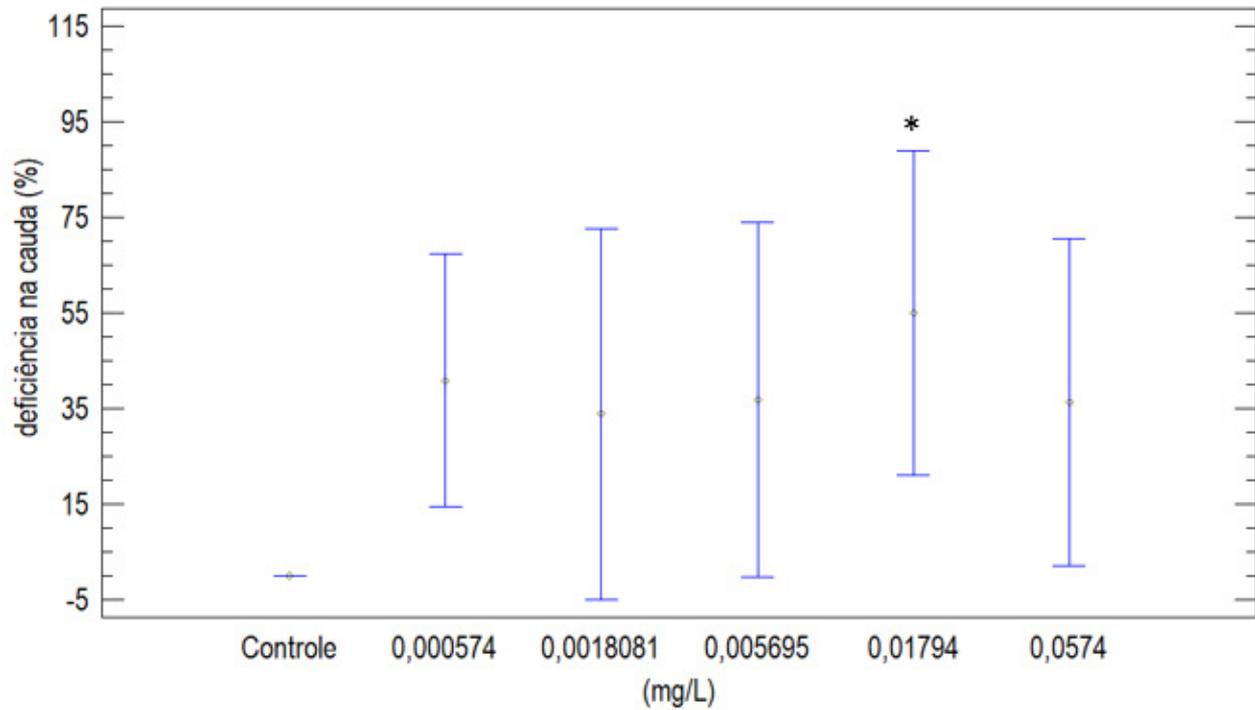
Valores médios (\pm intervalo de confiança 95%; $n = 5$) referentes à alteração da coluna em *Astyanax altiparanae*, exposto a diferentes concentrações de Triclosan durante 48 h. Aplicou-se procedimento de Kruskal - Wallis seguido do teste Bonferroni. * Indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.

Figura 31. Índice de deficiência em coluna da fase embrio-larval de *Astyanax altiparanae*.



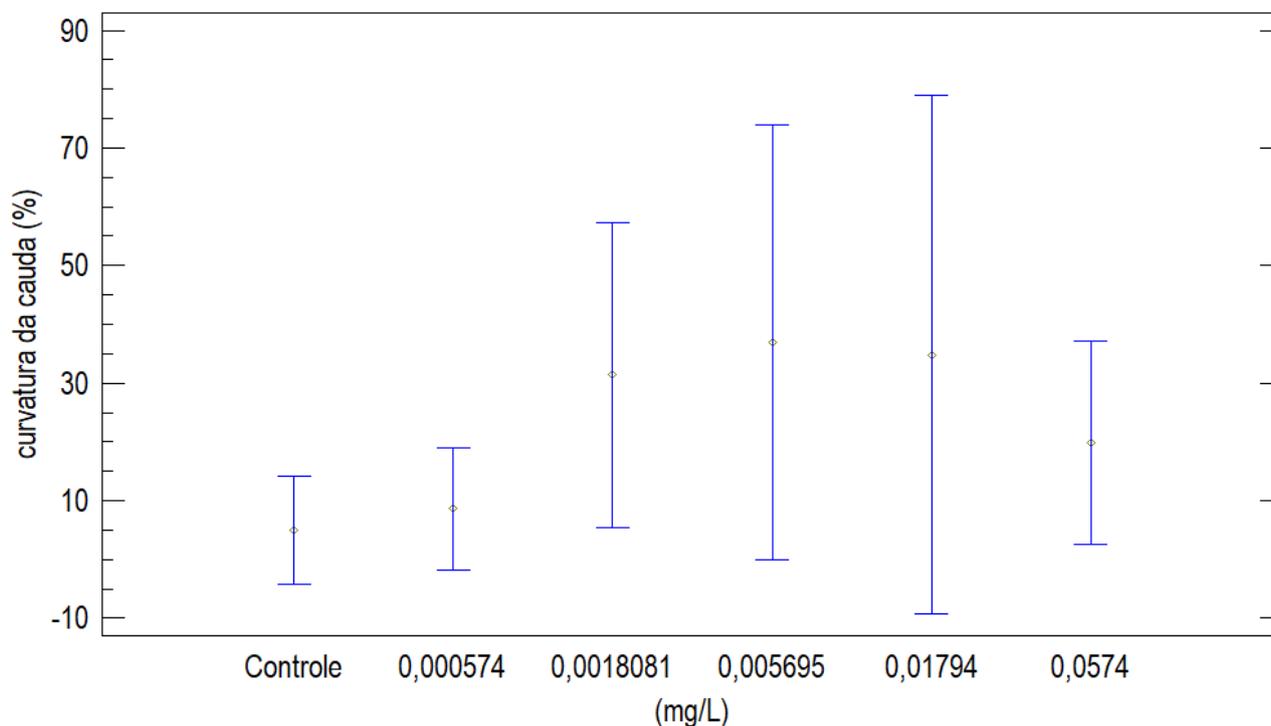
Valores médios (\pm intervalo de confiança 95%; $n = 5$) referentes à deficiência da coluna em *Astyanax altiparanae*, exposto a diferentes concentrações de Triclosan durante 96 h. Aplicou-se ANOVA seguida do test pos-hoc de Games -Howell. * representa diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.

Figura 32. Índice de deficiência em cauda da fase embrio-larval de *Astyanax altiparanae*.



Valores médios (\pm intervalo de confiança 95%; $n = 5$) referentes à deficiência na cauda em *Astyanax altiparanae*, exposto a diferentes concentrações de Triclosan durante 144 h. Aplicou-se procedimento de Kruskal - Wallis seguido do teste Bonferroni. * Indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.

Figura 33. Índice de curvatura da cauda da fase embrio-larval de *Astyanax altiparanae*.



Valores médios (\pm intervalo de confiança 95%; n = 5) referentes à curvatura da cauda em *Astyanax altiparanae*, exposto a diferentes concentrações de Triclosan durante 144 h. Aplicou-se procedimento de Kruskal - Wallis seguido do teste Bonferroni não se constatando diferenças significativa em relação ao controle ($p > 0,05$).

Desta maneira, observa-se que parâmetros subletais no FET (OECD 236) possui relevância expressiva sobre os resultados relacionados aos ensaios de toxicidade aguda e crônica no estágio embrionário. Pois estes testes auxiliam no entendimento e observação de distúrbios hemostáticos como por exemplo o acúmulo de hemácias e a formação de edemas como os de pericárdio, saco vitelínico e cauda, que são comumente observados quando estes indivíduos são expostos a substâncias tóxicas seja por um curto ou longo período de tempo, sendo estas anomalias de grande impacto e magnitude sobre o sistema fisiológico destes organismo, sendo na grande maioria processos irreversíveis, salvo aqueles ligados a um curto período de exposição assim como a concentração imposta a esses organismo, sendo possível reverter as alterações ocasionados ao desenvolvimento do embrião (HELLFELD et al., 2020).

No presente estudo as alterações relacionadas a estas disfunções fisiológicas citadas foram fatais. Não sendo observado nenhum indivíduo que foi viável ao fim do tempo de exposição de 144 horas.

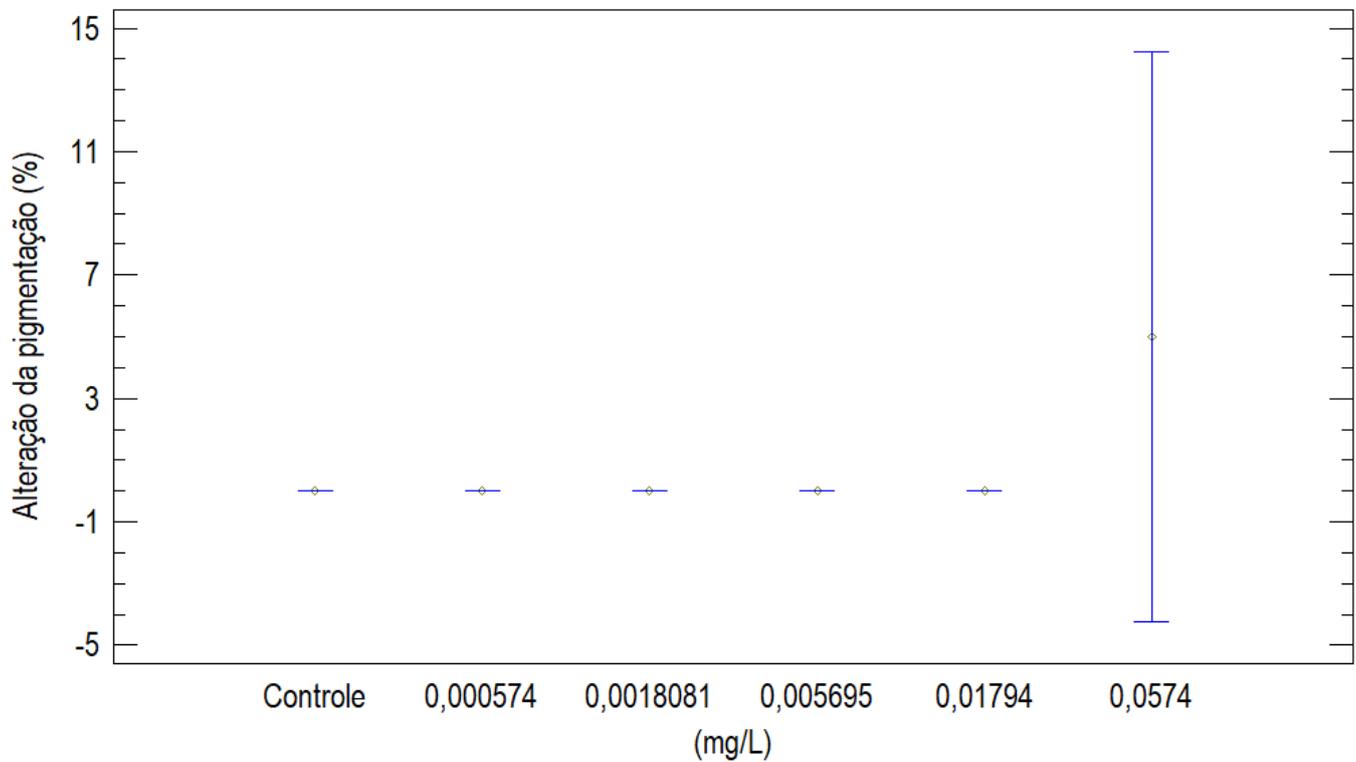
Sendo, portanto, as deformidades relacionadas a má formações de cauda, olho e de otólito e malformação craniofacial consideradas anomalias que expressa recuperação prolongada e que na maioria dos casos raramente vai ser reversível.

Adicionalmente outros efeitos subletais também expressam modificações estruturais importantes como diminuição/ má absorção do saco vitelínico, assim como, alterações ligadas a esta condição, diminuição ou falta de pigmentação corporal igualmente de outras estruturas como por exemplo a ausência de pigmentação de olhos para estas anormalidades ainda se tem pouca ou nenhuma informação sobre a reversibilidade do quadro, sendo escasso o conhecimento acerca das complicações ocasionadas quanto a essas anormalidades (REHMAN et al., 2024).

Além desses efeitos, ocasionados sobre a condição corpórea do animal, também há aquelas alterações ligadas ao sistema nervoso central, que irá se manifestar de inúmeras formas, sendo a mais visível a modificação do comportamento do indivíduo que irá manifestar alterações clínicas como tremores, dificuldade assim como ausência do equilíbrio, distúrbios ligados a locomoção sendo portanto caracterizadas como efeitos neurotóxicos sendo observados em larvas, embriões e adultos (HELLFELD et al., 2020).

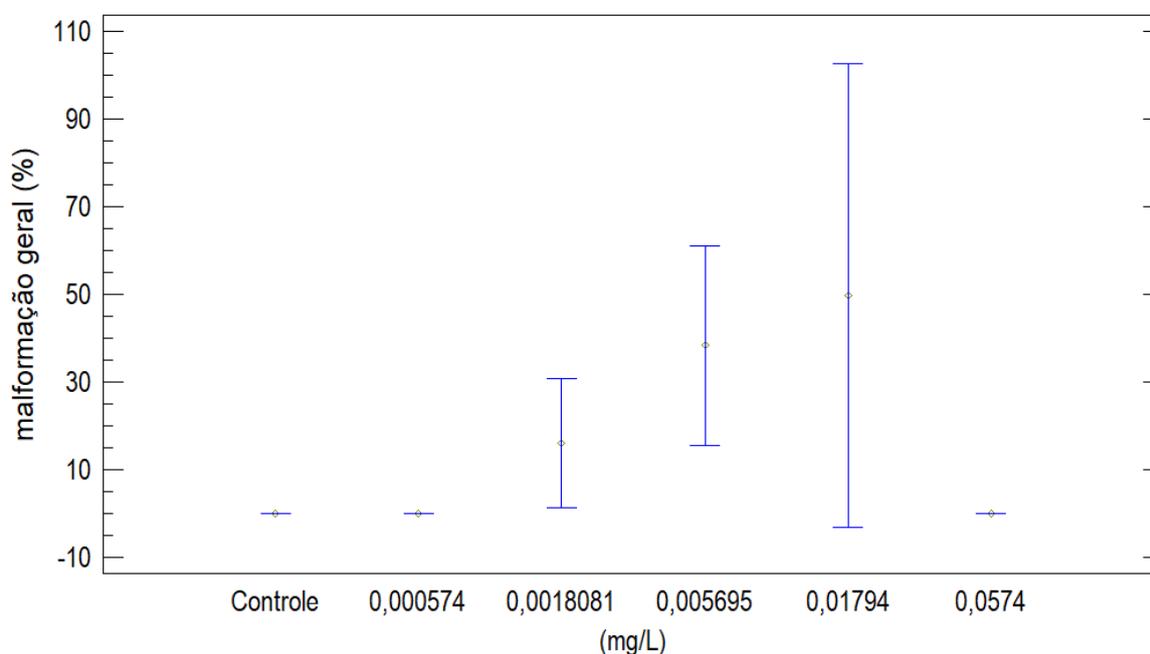
Outras anomalias foram identificadas no presente estudo, sendo estas mais brandas apresentando um percentual de 8,33% quando comparada as demais alterações, tais como alterações de pigmentos e má formação em geral, tais alterações apresentaram recuperação antes do final do ensaio em 144h (Figuras 34 e 35).

Figura 34. Índice de alteração de pigmento da fase embrio-larval de *Astyanax altiparanae*.



Valores médios (\pm intervalo de confiança 95%; $n = 5$) referentes à alteração da pigmentação em *Astyanax altiparanae*, exposto a diferentes concentrações de Triclosan durante 96 h. Aplicou-se procedimento de Kruskal - Wallis seguido do teste Bonferroni não se constatando diferenças significativas em relação ao controle ($p > 0,05$).

Figura 35. Índice de má formação geral da fase embrio-larval de *Astyanax altiparanae*.



Valores médios (\pm intervalo de confiança 95%; $n = 5$) referentes à malformação geral em *Astyanax altiparanae*, exposto a diferentes concentrações de Triclosan durante 96 h. Aplicou-se procedimento de Kruskal - Wallis seguido do teste Bonferroni não se constatando diferenças significativas em relação ao controle ($p > 0,05$).

Os resultados evidenciados neste estudo estão conforme as alterações observadas por MACEDO (2015) que executou testes de toxicidade com embriões de *D. rerio*, afim de, identificar possíveis alterações morfológicas causadas pela exposição ao Triclosan em concentrações consideradas baixas.

As alterações identificadas no estudo abriram margem para discussões ligadas ao quanto o Triclosan consegue ser potencialmente tóxico em baixas concentrações, visto que altos índices de anomalias e deformações ($P < 0,05$) foram observadas entre o grupo controle e as concentrações utilizadas de TCS, sendo que em especial nas concentrações acima de $64 \mu\text{g L}^{-1}$ a maioria dos indivíduos veio a óbito ou ficaram com sequelas irreversíveis, que ao longo do seu desenvolvimento acarretou em complicações mais graves.

Em outro estudo conduzido por OLIVEIRA (2009) que avaliou as alterações causadas pelo uso do Triclosan em concentração de $500 \mu\text{g L}^{-1}$, identificaram alterações

severas e alta incidência de disfunções como edemas cardíacos e má formação na coluna. CHEN et al. (2015), relataram que 24 horas de exposição a 300 µg/L de TCS em embriões de peixes, podem causar atraso no desenvolvimento e alterações expressivas de três marcadores de células-tronco, *oct4*, *sox2* e *nanog* em 24 hpf, indicando a possibilidade de efeitos tóxicos no desenvolvimento.

Atualmente há diversos relatos na literatura (KUMAR et al., 2022; ZHANG et al., 2020; LIU et al., 2020; CHEN et al., 2019; WANG et al., 2019), que este xenobiótico possui uma série de efeitos tóxicos suscitando perturbações fisiológicas consideráveis nos indivíduos expostos. Desta forma os dados apresentados no presente estudo corroboram com os dados achados em literatura.

2.4.2.3 Efeitos do Triclosan Sobre Desenvolvimento Larval do *Astyanax altiparanae*.

Os efeitos ocasionados por substâncias potencialmente tóxicas podem insurgir através de alterações fisiológicas como redução do desenvolvimento saudável dos indivíduos expostos (PEREIRA, 2008). A exequibilidade dos embriões, bem como a habilidade de desenvolvimento larval pode irradiar sobre as condições dos organismos e sua capacidade de sobreviver (HODGSON, 2004).

Com o objetivo de avaliar possíveis alterações no desenvolvimento larval do *A. altiparanae*, foi feita a observação dos indivíduos, durante o período de exposição de 144 horas, as larvas apresentaram atraso no desenvolvimento, alterações na pigmentação dos olhos e do corpo, alterações na curvatura da cauda, diminuição de tamanho, alterações neurológicas como hiperatividade com movimentos em decúbito lateral, alterações em coluna, alterações na estrutura das nadadeiras, edema de saco pericárdico e outras alterações também foram visualizadas ao longo do período de exposição, estas alterações foram classificadas como leve, moderada, forte e muito forte (Tabela 14).

As irregularidades fisiológicas apresentadas pelas larvas expostas aumentaram com o acréscimo das concentrações de TCS, exibindo uma correlação positiva com a concentração. Nenhuma alteração fisiológica anormal visível foi observada no grupo controle das larvas durante o estudo.

Tabela 14. Escores atribuídos a cada categoria de dano de acordo com as anomalias observadas, durante o período entre 24h a 144horas na fase larval de *Astyanax altiparanae*.

Comportamento	Concentração mg L ⁻¹					
	0	0,000574	0,005695	0,01794	0,001808	0,0574
Axial (esqueleto/cauda)	-	+	+	+++	+++	++++
Nadadeiras atrofiadas danificadas	-	+	+	+++	++++	++++
Lesão na estrutura da nadadeira	-	+	++	+++	++++	++++
Deformidades faciais	-	-	-	+	+++	++++
Ausência de pigmento nos olhos	-	-	+	+++	++++	++++
Edema ocular	-	-	++	++	++++	++++
Deformidades na estrutura bucal	-	-	-	-	++	++
Distensão e/ou atrofia corporal	-	-	+	++	++++	++++
Edema cardíaco	-	-	-	++	++++	++++

Nenhum -, Leve +, Moderado ++, Forte +++, Muito forte +++++.

As alterações fisiológicas observadas estão relacionadas a fatores abióticos desfavoráveis durante o desenvolvimento embrionário, tais como alterações correlacionadas a qualidade da água (baixa concentração de oxigênio dissolvido,

alterações ligadas a temperatura e principalmente mudanças no pH) (HATTORI et al., 2004).

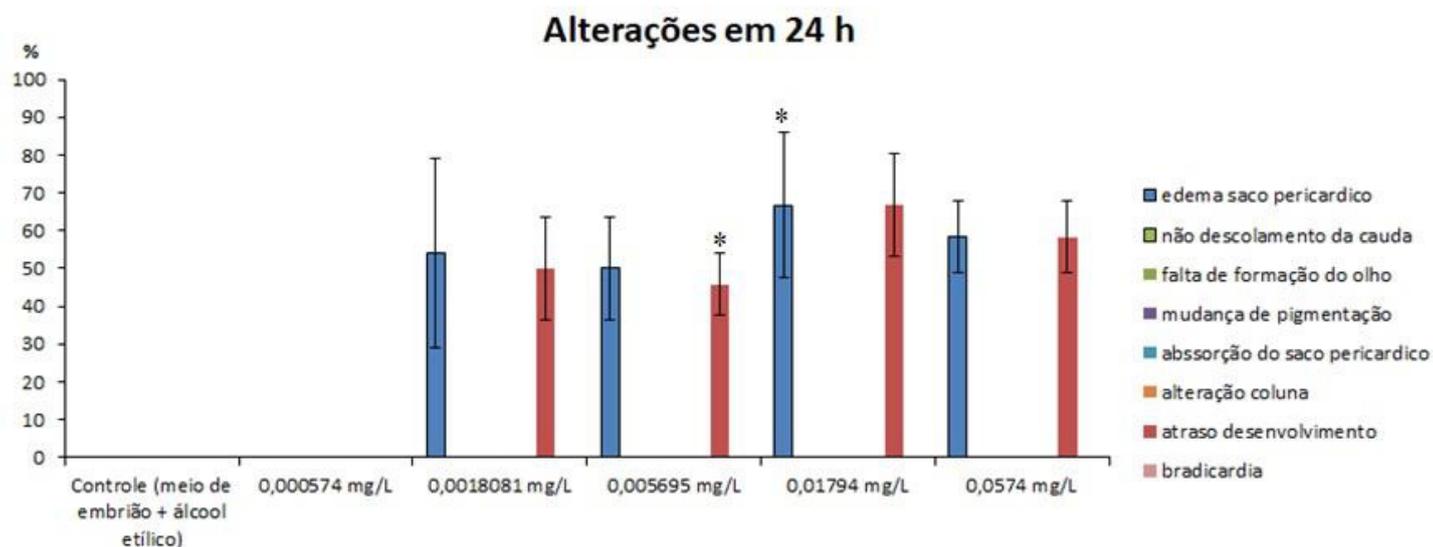
Essas alterações citadas estão diretamente ligadas a exposição dos indivíduos ao TCS na fase embrionária, na qual o Triclosan altera as concentrações de oxigênio disponível na água e com a modificação do pH ocorre a fotodegradação do TCS em compostos mais tóxicos, conseqüentemente ocorre a alteração da membrana do córion fetal causando variações teratogênicas nas larvas (CHATAIN, 1994).

Quando comparamos as alterações de desenvolvimento nas diferentes concentrações (0,0574; 0,01794; 0,005695; 0,0018081 e 0,000574 mg. L⁻¹), com o controle negativo no ensaio, observamos que as deformações ocorreram principalmente nas concentrações mais elevadas.

Dentro do período de 24 horas pós-exposição às alterações predominantes foram edema de saco pericárdico e atraso no desenvolvimento, principalmente nas concentrações 0,0574; 0,01794; 0,005695 e 0,0018081 mg. L⁻¹. Para a concentração 0,000574 mg. L⁻¹, as alterações observadas foram classificadas como leve, sendo, portanto, compatível com a vida, por mais que 10 % dos indivíduos expostos tenha apresentado alterações físicas estas não provocaram anormalidades mais severas levando a distúrbios fisiológicos graves, estes animais conseguiam expressar seu comportamento habitual assim como desenvolver suas atividades rotineiras, porém é valido evocar que estes indivíduos só permaneceram vivos pois estavam em ambiente controlado (artificial), uma vez que em ambiente natural sua sobrevivência seria prejudicada.

Adicionalmente, foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os tempos avaliados e/ou entre os grupos controle e tratado com o produto Triclosan (Figuras 36 e 37).

Figura 36. Alterações observadas no período de 24 horas pós-exposição ao Triclosan em larvas de *Astyanax altiparanae*.



Valores médios (\pm intervalo de confiança 95%; $n = 5$) referentes às alterações em *Astyanax altiparanae*, exposto a diferentes concentrações de Triclosan durante 24 horas. Aplicou-se procedimento de Kruskal - Wallis seguido do teste Bonferroni. * Indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.

Walter e colaboradores examinaram amostras de água de cinco açudes da região de Campina Grande na Paraíba (Brasil), em que a substância teste (xenobiótico) em questão foi um poluente emergente da mesma classe do Triclosan, os pesquisadores constataram que as amostras de água testadas apresentavam um alto índice de letalidade sobre embriões de zebrafish. Durante as avaliações dos indivíduos que sobreviveram, estes apresentavam malformações como ausência de boca, edema cardíaco e alterações em coluna que foram caracterizadas como incompatíveis com a vida levando estes indivíduos a morte (WALTER et al., 2018).

Estudos de toxicologia ambiental de diversos compostos têm apresentado resultados semelhantes ao encontrado no presente estudo, tal fato se mostra preocupante uma vez que demonstrado o potencial de ligação molecular do Triclosan com outros agentes químicos, desta forma, as substâncias em conjunto são potencializadas aumentando, assim os efeitos teratogênicos sobre os organismos aquáticos (SCHWARZ

et al., 2016; MARTINS et al., 2015; SANG et al., 2018; WANG et al., 2016; KIM et al., 2016; REINHARDT et al., 2018).

Figura 37. Alterações observadas no desenvolvimento larval dos indivíduos expostos nas concentrações 0,0574; 0,01794; 0,005695 e 0,0018081 mg. L⁻¹ de Triclosan. A fase embrio-larval apresenta anormalidades de desenvolvimento como deformidade do saco vitelino e atraso na eclosão (A) e em (B) larva apresentando encurtamento de cauda e aumento das estruturas cardíacas acompanhada de hemorragia.



Fonte: Gil, A. J. 2024.

Já as alterações observadas no período de 48 horas pós-exposição foram predominantes, má formações em geral, alterações em coluna e falta de formação de somitos (Figura 38).

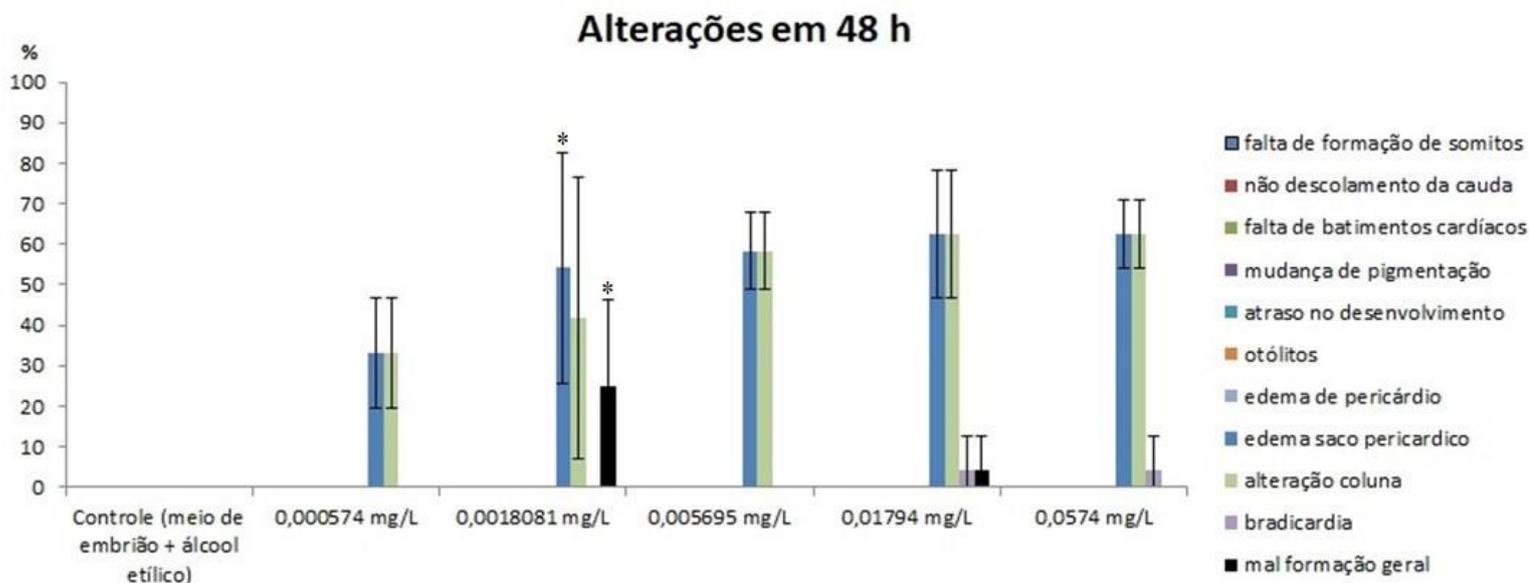
De acordo com FREITAS et al., 2001 e NEWMANN et al., 2003, algumas substâncias tóxicas como o Triclosan podem suscitar efeitos negativos e muitas vezes irreversíveis sobre o desenvolvimento dos embriões e larvas, sendo estes a nível celular modificando e alterando a codificação do DNA, resultando em fragmentação dos cromossomos e influenciando na mitose, acarretando em morte, malformações anatômicas, deficiências hematológicas e bioquímicas (principalmente aquelas ligadas a deficiência de fósforo e sendo mais preocupando o decréscimo do cálcio) ou funcionais como crescimento tardio.

As anomalias da coluna vertebral observadas em peixes são geralmente decorrentes da privação de alguns minerais como cálcio e fosforo, ou redução da miosina, sendo estes compostos de extrema importância para o desenvolvimento orgânico desses indivíduos, pois são responsáveis pela manutenção e formação óssea, organização e constituição das membranas celulares e contribui para o metabolismo energético (DIEMER et al., 2011).

A organogênese é determinada pelo advento da origem dos primeiros somitos e do saco vitelino. Durante este período o embrião prossegue se desenvolvendo e ocorre o surgimento dos anexos ligados à coluna vertebral e ao sistema nervoso central, dentre as estruturas fisiológicas visualizadas nesta fase estão o aparecimento da cauda livre, aumento da região da cabeça, vesícula ótica, tubo neural na região cefálica, notocorda, deslocamento da cauda, alongamento do embrião a partir do eixo cefálico caudal e os primeiros movimentos musculares (SAMPAIO, 2006; NEUMANN, 2011). Após o desenvolvimento completo das estruturas orgânicas a eclosão dá-se pela movimentação da cauda, que rompe o córion (GANECO, 2003). Após a fase de embriogênese e ruptura do córion, o indivíduo é agora caracterizado pela fase de desenvolvimento larval, onde inúmeros eventos estruturais fisiológicos podem ser observados, como a formação adequada das estruturas ligadas ao sistema digestivo (lúmen intestinal), inflação da bexiga natatória, amadurecimento dos arranjos da coluna vertebral (amadurecimento das nadadeiras e cauda e flexão da notocorda) (GODINHO, 2007; SANTOS et al., 2002).

Quando o indivíduo é exposto a substâncias tóxicas alterações no desenvolvimento embrionário, ocorrem, estas dependendo da fase de amadurecimento do embrião pode levar a morte ou causar danos teratogênicos na fase larval.

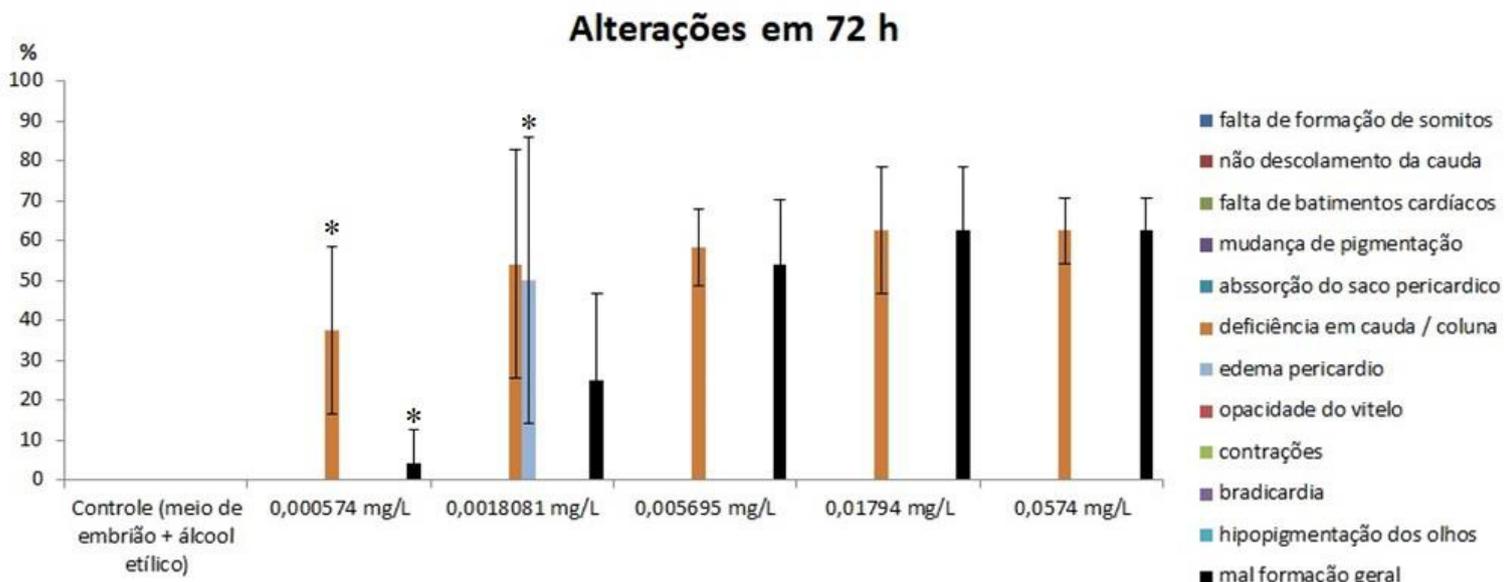
Figura 38. Alterações observadas no período de 48 horas pós-exposição ao Triclosan em larvas de *Astyanax altiparanae*.



Valores médios (\pm intervalo de confiança 95%; n = 5) referentes às alterações em *Astyanax altiparanae*, exposto a diferentes concentrações de Triclosan durante 48 horas. Aplicou-se procedimento de Kruskal - Wallis seguido do teste Bonferroni. * Indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.

As alterações observadas nos períodos de 72 horas e 96 horas pós-exposição foram, deficiência de cauda / coluna, falta de formação de somitos e deformações gerais visualizados no tempo de 72 horas respectivamente, para 96 horas as deformidades observadas foram deficiência de cauda, falta de batimentos cardíacos, edema de pericárdio, contrações e má formações em geral. (Figuras 39 e 40).

Figura 39. Alterações observadas no período de 72 horas pós-exposição ao Triclosan em larvas de *Astyanax altiparanae*.



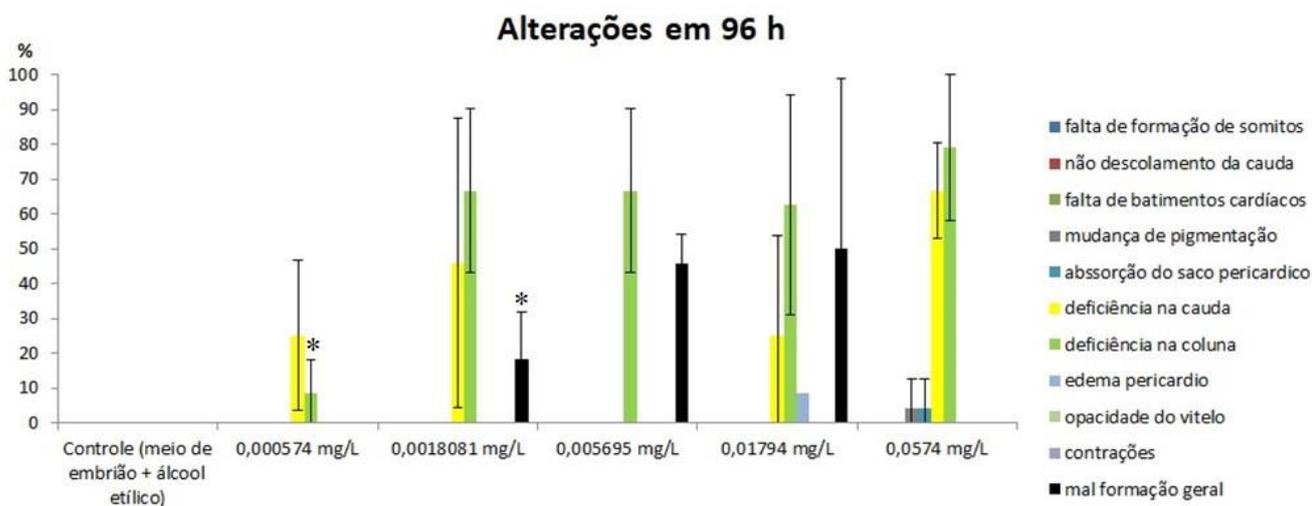
Valores médios (\pm intervalo de confiança 95%; $n = 5$) referentes às alterações em *Astyanax altiparanae*, exposto a diferentes concentrações de Triclosan durante 72 horas. Aplicou-se procedimento de Kruskal - Wallis seguido do teste Bonferroni. * Indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.

As estruturas relacionadas à coluna e seus anexos (cauda e nadadeiras), são de extrema importância para o desenvolvimento dos peixes, pois são responsáveis por conferir proteção as estruturas nervosas como a medula espinhal, e proporciona comunicação direta do sistema nervoso central com o sistema locomotor (cauda e nadadeiras), sendo desta forma responsável por garantir a mobilidade e equilíbrio corporal, anomalias nestes anexos fisiológicos podem afetar significativamente a capacidade de fuga assim como a habilidade natatória uma vez que esses mecanismos detêm certa relevância nos estádio iniciais de desenvolvimento (JIANG et al.,2024).

Desta forma o cenário ambiental, realça as modificações orgânicas causadas por diversas substâncias tóxicas incluindo o TCS, que interfere de forma negativa no desenvolvimento fisiológico dos indivíduos expostos, acarretando em mutações estruturais que por muitas vezes são incompatíveis com a vida ou podem causar perda de autonomia na mobilidade e, conseqüentemente aumentar vulnerabilidade desses

indivíduos acarretando em sua predação (NAGAMATSU, 2003). Diante disto o estudo realizado por SCHULTZ; BARTEL; SCHOENFUSS (2012) vem de encontro com estas alterações mencionadas em literatura, no estudo conduzido por estes autores com embriões/ larvas de *Pimephales promelas*, observaram que a exposição ao Triclosan e seus subprodutos ocasionou alterações significativas sobre a estrutura da coluna e diminuição do tamanho dos embriões e larvas e aumento das anomalias ligadas aos apêndices da coluna principalmente sobre a estrutura da cauda, o tempo de exposição ao Triclosan foi de 12 dias, sendo renovado a cada 24 horas assim como as observações dos indivíduos.

Figura 40. Alterações observadas no período de 96 horas pós-exposição ao Triclosan em larvas de *Astyanax altiparanae*.

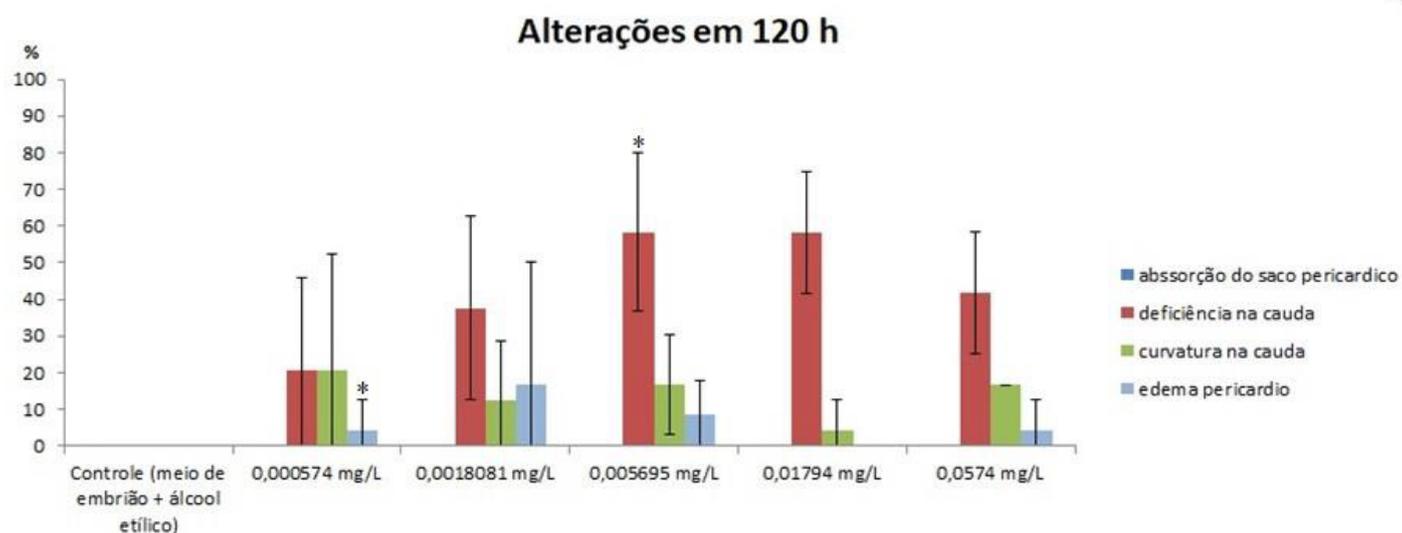


Valores médios (\pm intervalo de confiança 95%; n = 5) referentes às alterações em *Astyanax altiparanae*, exposto a diferentes concentrações de Triclosan durante 96 horas. Aplicou-se procedimento de Kruskal - Wallis seguido do teste Bonferroni. * Indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.

As alterações observadas nos períodos de 120 horas e 144 horas pós-exposição foram, deficiência de cauda, curvatura de coluna e edema de pericárdio visualizados no tempo de 122 horas respectivamente, para 144 horas as deformidades observadas foram deficiência de cauda e curvatura de cauda, sendo que para o tempo de 144 horas o grupo

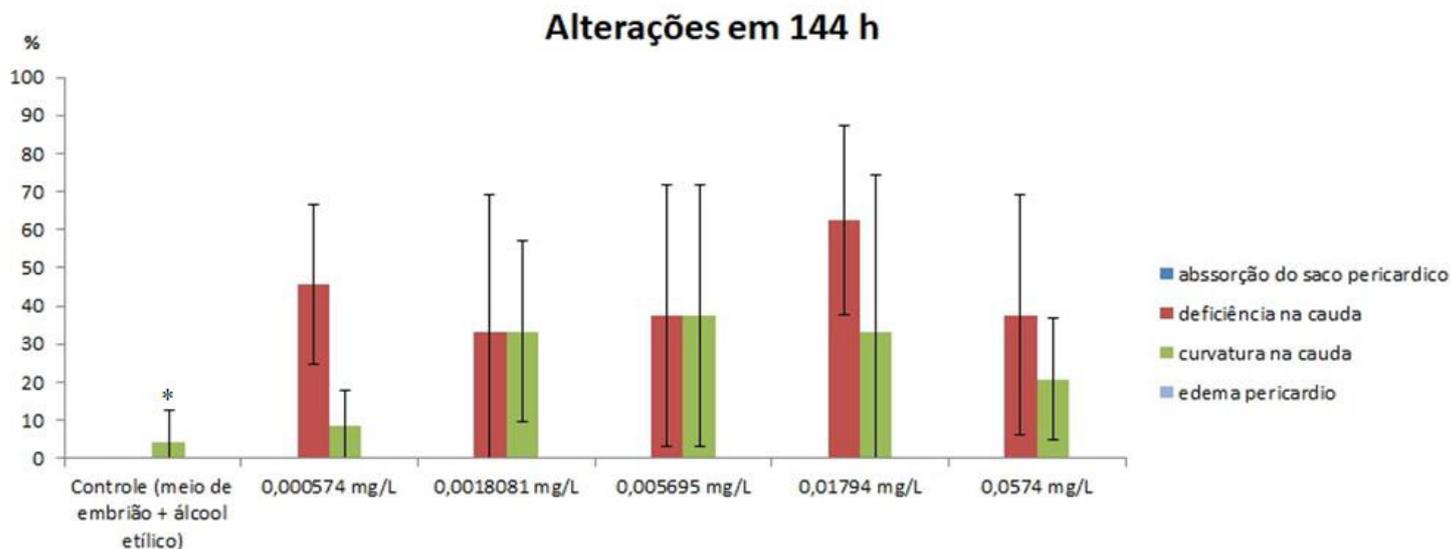
controle apresentou diferença estatística significativa entre o controle e os grupos tratados para a alteração curvatura de cauda (Figuras 41 e 42).

Figura 41. Alterações observadas no período de 120 horas pós-exposição ao Triclosan em larvas de *Astyanax altiparanae*.



Valores médios (\pm intervalo de confiança 95%; n = 5) referentes às alterações em *Astyanax altiparanae*, exposto a diferentes concentrações de triclosan durante 120 horas. Aplicou-se procedimento de Kruskal - Wallis seguido do teste Bonferroni. * Indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.

Figura 42. Alterações observadas no período de 144 horas pós-exposição ao Triclosan em larvas de *Astyanax altiparanae*.



Valores médios (\pm intervalo de confiança 95%; $n = 5$) referentes às alterações em *Astyanax altiparanae*, exposto a diferentes concentrações de Triclosan durante 144 horas. Aplicou-se procedimento de Kruskal - Wallis seguido do teste Bonferroni. * Indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.

Alguns estudos na literatura têm demonstrado o potencial tóxico do Triclosan sobre os mecanismos fisiológicos principalmente aqueles ligados ao epitélio cardíaco, tamanho estrutural do corpo assim como alterações ligadas aos anexos que compõem estas estruturas. Segundo Kim et al. (2009) os efeitos de TCS, em concentrações significativas para larvas de *O. latipes*, onde as larvas expostas apresentaram alterações no comprimento, alterações cardiogênicas e alterações neurológicas graves.

Todas as alterações referidas acima foram visualizadas no presente estudo, diante de diversas evidências, dos danos gerados pelo TCS é necessário que medidas mais severas sejam tomadas em relação ao uso e principalmente providencias para assegurar o descarte correto deste composto visando minimizar os danos causados aos organismos aquáticos (WANG, 2024).

CONCLUSÃO

Observaram-se efeitos tóxicos subletais do Triclosan nos parâmetros hematológicos dos adultos, na taxa de anormalidades em embriões e larvas, e nas respostas neurológicas em ambas às fases analisadas.

CAPÍTULO V

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo pode-se observar que as concentrações de Triclosan (TCS), causaram mortalidade significativa, mesmo naquelas consideradas baixas, além de induzir efeitos subletais durante os estágios iniciais de vida. As maiores concentrações de TCS provocaram danos morfológicos como degeneração no epitélio cardíaco, alterações severas de coluna e cauda, entre outras alterações que comprometeram sua longevidade embrio-larval. Além dessas variações nos estágios iniciais também foi quantificado o dano fisiológico e comportamental em adultos de lambari-do-rabo-amarelo, na qual foi possível avaliar o estresse causado pelo uso TCS, pelo aumento dos índices glicêmicos e outras alterações hematológicas significativas. As variações comportamentais observadas foram predominantemente àquelas ligadas às alterações neurológicas na qual os indivíduos expostos demonstraram sinais clínicos como ataxia, distaxia, distonia, equimos, mioclonias, narcose, nistagmos e apraxia. Portanto, a espécie *A. altiparanae* possui características como plasticidade e rusticidade para ser considerada uma espécie bioindicadora em ambientes contaminados por TCS além de apresentar reprodução de fácil realização em laboratório. Os dados alcançados neste estudo corroboram a importância da continuidade dos trabalhos abordando a ecotoxicologia aquática dos produtos oriundos das atividades da sociedade moderna, assim como, dos estudos mais aprofundados sobre os danos genotóxicos causados pelo Triclosan.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

AJIMA, M. N.; OGO, O. A.; AUDU, B. S.; UGWOEGBU, K. C. **Chronic diclofenac (DCF) exposure alters both enzymatic and hematological profile of African catfish, *Clarias gariepinus*.** *Drug and Chemical Toxicology*, v. 38, p. 383-390, 2015.

BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil.** Santa Maria: Editora UFMS, 2005. 468 p.

BANERJEE, A. **Disciplinando a morte: gestão da hipertensão e a produção de subjetividades mortais.** *Saúde*, Londres, v. 12, n. 1, p. 25-42, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 888, de 4 de maio de 2021. Estabelece o padrão de potabilidade para a água destinada ao consumo humano e os procedimentos de controle e vigilância das condições de saúde.** *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 5 maio 2021.

CARVALHO, C. S.; FERNANDES, M. N. **Effect of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH.** *Aquaculture*, v. 251, p. 109-117, 2006.

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.

CHATAIN, B. **Abnormal swimbladder development and lordosis in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus auratus*).** *Aquaculture*, v. 119, p. 371-379, 1994.

CHEN, H. et al. **Triclosan-Induced Disruption of Stem Cell Marker Expression in Zebrafish Embryos.** *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 72, p. 103296, 2019.

CHEN, X. et al. **The effects of triclosan on pluripotency factors and development of mouse embryonic stem cells and zebrafish.** *Archives of Toxicology*, v. 89, p. 635-646, 2015.

COLLIER, H. B. **The standardization of blood haemoglobin determinations.** *Canadian Medical Association Journal*, v. 50, p. 550-552, 1944.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). **Resolução n. 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos d'água e os padrões de qualidade para lançamento de efluentes.** *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 18 mar. 2005. Seção 1, p. 58-60.

CYRINO, J. E. P.; PORTZ, L.; MARTINO, R. C. **Retenção de proteína e energia em juvenis de "black bass" *Micropterus salmoides*.** *Scientia Agricola*, v. 57, n. 4, p. 609-616, 2000.

DIEMER, O. et al. **Níveis de fósforo total na alimentação de juvenis de jundiá criados em tanques-rede.** *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 41, p. 559-563, 2011.

EPA. **Orientações sobre avaliação cumulativa de riscos de pesticidas químicos que possuem um mecanismo comum de toxicidade.** Escritório de Programas de Pesticidas, Agência de Proteção Ambiental dos EUA, Washington, DC, 14 jan. 2002.

FREITAS, C. M.; PORTO, M. F. S.; PIVETTA, F.; MOREIRA, J. C.; MACHADO, J. M. H. **Poluição ambiental - um problema de todos, que afeta uns mais que os outros.** *Bahia Análise & Dados*, Salvador, n. 4, p. 260-270, mar. 2001.

GANECO, L. N. **Análise dos ovos de piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1894), durante a fertilização e o desenvolvimento embrionário, sob condições de reprodução induzida.** 2003. 78 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

GEETHA, E.; PRIYA, M. **Impact of Environmental Pollutants on Aquatic Life.** *Journal of Aquatic Sciences*, v. 15, n. 4, p. 456-465, 2020.

GHELFI, A. et al. **Evaluation of biochemical, genetic and hematological biomarkers in a commercial catfish *Rhamdia quelen* exposed to diclofenac.** *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 96, p. 49-54, 2016.

GODINHO, H. **Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção.** *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 351-360, 2007.

GOLDENFARB, P. B.; BOWYER, F. P.; BROSIOUS, E. **Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination.** *American Journal of Clinical Pathology*, v. 56, p. 35-39, 1971.

HAMM, J. T.; WILSON, B. W.; HINTON, D. E. **Increasing uptake and bioactivation with development positively modulate diazinon toxicity in early life stage medaka (*Oryzias latipes*).** *Toxicological Sciences*, v. 61, p. 304-313, 2001.

HATTORI, J. et al. **Phenolic acid metabolites as biomarkers for tea- and coffee-derived polyphenol exposure in human subjects.** *British Journal of Nutrition*, v. 91, n. 2, p. 301-305, 2004.

HEATH, A. G. **Water pollution and fish physiology.** 2. ed. Boca Raton: Lewis Publishers, 1995.

HODGSON, J. M. et al. **Phenolic acid metabolites as biomarkers for tea- and coffee-derived polyphenol exposure in human subjects.** *British Journal of Nutrition*, v. 91, n. 2, p. 301-305, 2004.

JIANG, Yanhong et al. **Critical review on the environmental behaviors and toxicity of triclosan and its removal technologies.** *Science of The Total Environment*, v. 880, p. 173013, 2024.

KIM, J. D. et al. **Normal forebrain development may require continual Wnt antagonism until mid-somitogenesis in zebrafish.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 381, n. 4, p. 717-721, 2009.

KIM, J. et al. **Environmental Impact of Antibacterial Agents: Triclosan and Its Substitutes.** *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 188, p. 620, 2016.

KUBITZA, F. A. **Versatilidade do sal na piscicultura.** *Revista Panorama da Aquicultura*, v. 1, p. 14-23, 2007.

KUMAR, S. et al. **Triclosan-Induced Developmental Toxicity in Zebrafish Embryos: Analyzing the Expression of OCT4, SOX2, and NANOG.** *Toxicology Reports*, v. 9, p. 23-32, 2022.

LIEW, G.; MICHAELIDES, M.; BUNCE, C. **A comparison of the causes of blindness certifications in England and Wales in working age adults (16-64 years), 1999-2000 with 2009-2010.** *BMJ Open*, v. 4, n. 2, p. e004015, 2014. DOI: 10.1136/bmjopen-2013-004015.

LIU, Y. et al. **Effects of Triclosan Exposure on the Expression of Pluripotency Markers OCT4, SOX2, and NANOG in Zebrafish Embryos.** *Environmental Pollution*, v. 258, p. 113691, 2020.

LUSHCHAK, V. I. **Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach.** *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 42, n. 2, p. 711-747, 2016.

MACEDO, A. S. D. **Screening the effects of emerging pollutants using embryo bioassays: triclosan, methyl-triclosan and perfluoroalkyls chemicals.** 2015. 115 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Porto, 2015.

MARTINS, F. et al. **Toxicological Effects of Triclosan and Its Analogues on Aquatic Organisms: A Review.** *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, v. 50, n. 5, p. 438-450, 2015.

MUSHIGERI, S. M.; DAVID, M. **Efeitos de fatores ambientais na saúde dos peixes.** *Journal of Aquatic Science*, v. 12, n. 4, p. 123-134, 2005.

NAGAMATSU, P. C. **Efeitos de metais neurotóxicos em larvas de *Rhamdia quelen* expostas em fases iniciais de desenvolvimento.** 2013. 85 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, 2013.

NEUMANN, E. **Desenvolvimento inicial de jatuarana, *Brycon amazonicus* (Teleostei, Characidae).** 2011. 125 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2011.

NEWMAN, M. C.; UNGER, M. A. **Fundamentals of Ecotoxicology**. 2. ed. Boca Raton: Lewis Publishers, 2003. 458 p.

NÜSSLEIN-VOLHARD, C.; DAHM, R. **Zebrafish**. Oxford: Oxford University Press, 2002.

OBA, E. T. **Efeitos do exercício físico moderado e da suplementação da dieta com vitamina C no crescimento e no metabolismo de matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) (Teleostei: Characidae)**. 2006. 99 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2006.

OECD. **OECD guidelines for the testing of chemicals, section 2: test no. 236: fish embryo acute toxicity (FET) test**. OECD iLibrary, Paris, p. 1-22, 26 jul. 2013.

O'GORMAN, N. et al. **Competing risks model in screening for preeclampsia by maternal factors and biomarkers at 11-13 weeks gestation**. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 214, n. 1, p. 103.e1-103.e12, jan. 2016.

OLIVEIRA, R. et al. **Effects of triclosan on zebrafish early-life stages and adults**. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 16, n. 6, p. 679-688, 2009.

OMOREGIE, E.; IGOCHE, L.; OJOBE, T.; ABSALOM, K. V.; ONUSIRIUKA, B. C. **Effect of varying levels of sweet potato (*Ipomea batatas*) peels on growth, feed utilization and some biochemical responses of the cichlid (*Oreochromis niloticus*)**. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, v. 9, n. 2, p. 700-712, 2009.

PEREIRA, C. D. S. **Biomarcadores de exposição, efeito e bioacumulação de xenobióticos em mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758) transplantados ao longo do litoral de São Paulo**. 2008. Tese (Doutorado em Ciências, Área de Oceanografia Biológica) – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

QUEIROZ, J. F. de; BOEIRA, R. C. **Recomendações práticas para o manejo de sedimentos do fundo dos viveiros de aquicultura**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2006. 6 p. il. (Embrapa Meio Ambiente. Comunicado Técnico, 37).

QUEIROZ, M. N. **Efeito do extrato aquoso da *Piper aduncum* L. no controle de parasitas monogenéticos (Platyhelminthes: Monogenoidea) e parâmetros fisiológicos do pirarucu *Arapaima gigas* Schinz, 1822.** 2012. 90 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Nilton Lins / Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM, 2012.

REHMAN, Muneeb U. et al. **After effects of Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) on the biosphere and their counteractive ways.** *Separation and Purification Technology*, v. 289, p. 126921, 2024.

REINHARDT, J. et al. **Living conditions and level of independence of adult Spina Bifida patients in Germany.** *Edorium Journal of Disability and Rehabilitation*, 2018.

REINHARDT, M. et al. **Occurrence and Ecotoxicity of Chlorinated Triclosan Derivatives in the Environment.** *Environmental Science & Technology*, v. 52, n. 15, p. 8765-8774, 2018. DOI: 10.1021/acs.est.8b02350.

SAHU, P. **Closure of universities due to coronavirus disease 2019 (COVID-19): impact on education and mental health of students and academic staff.** *Cureus*, v. 12, n. 4, p. e7541, 12 abr. 2020.

SAMPAIO, K. H. **Superfície ovocitária e desenvolvimento inicial de quatro espécies de peixes de interesse comercial da bacia do rio São Francisco.** 2006. 55 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

SAMPATH, K.; VELAMMAL, S.; KENNEDY, I. J.; JAMES, R. **Haematological changes and their recovery in *Oreochromis mossambicus* as a function of exposure period and sublethal levels of Ekalux.** *Acta Hydrobiologica*, v. 35, p. 73-83, 1993.

SANG, Y. et al. **The Impact of Triclosan, Triclocarban, and Other Antimicrobial Agents on Aquatic Environments and Organisms.** *Science of The Total Environment*, v. 616-617, p. 757-764, 2018.

SANTIAGO, M. R.; COSTA, A. R. **Ecotoxicity analysis of a commercial tobacco based pesticide on zebrafish (*Danio rerio*)**. *Journal of Research in Biology (Online)*, v. 4, p. 1441-1443, 2021.

SANTOS, J. E.; GODINHO, H. P. **Ontogenic events and swimming behavior of larvae of the characid fish *Salminus brasiliensis* (Cuvier) (Characiformes, Characidae) under laboratory conditions**. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 19, p. 163-171, 2002.

SCHMITTOU, J. **Impact of pollution on fish populations**. 1993. 200 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1993.

SCHULTZ, M. M.; BARTELL, S. E.; SCHOENFUSS, H. L. **Effects of triclosan and triclocarban, two ubiquitous environmental contaminants, on anatomy, physiology, and behavior of the fathead minnow (*Pimephales promelas*)**. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 63, n. 1, p. 114-124, 2012.

SCHULTZ, M. M.; BARTELL, S. E.; SCHOENFUSS, H. L. **Effects of triclosan and triclocarban, two ubiquitous environmental contaminants, on anatomy, physiology, and behavior of the fathead minnow (*Pimephales promelas*)**. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 63, n. 1, p. 114-124, 2012.

SCHWARZ, J. et al. **Environmental Fate and Effects of Triclocarban: A Review**. *Environmental Science & Technology*, v. 50, n. 12, p. 6574-6587, 2016.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Edição eletrônica e arte final. Ribeirão Preto: Editora, 2004. 144 p.

VIJITHA, C. K.; ASIFA, K. P.; CHITRA, K. C. **Assessment of genotoxic and haematological consequence of triclosan in the fish, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)**. *International Journal of Applied Research*, v. 3, n. 2, p. 101-109, 2017.

VON HELLFELD, R.; BROTZMANN, K.; BAUMANN, L.; et al. **Adverse effects in the fish embryo acute toxicity (FET) test: a catalogue of unspecific morphological**

changes versus more specific effects in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environmental Sciences Europe*, v. 32, 2020.

VOSYLIENÉ, M. Z. **The effects of heavy metals on haematological indices of fish (survey).** *Acta Zoologica Lituanica*, v. 9, p. 76-82, 1999.

WALTER, J. M. et al. **Occurrence of Harmful Cyanobacteria in Drinking Water from a Severely Drought-Impacted Semi-arid Region.** *Frontiers in Microbiology*, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00194.

WANG, Fan. **Reproductive endocrine disruption effect and mechanism in male zebrafish after life cycle exposure to environmental relevant triclosan.** *Aquatic Toxicology*, v. 270, p. 106899, 2024.

WANG, X. et al. **The Impact of Triclosan on the Expression of Stem Cell Markers OCT4, SOX2, and NANOG in Early Zebrafish Development.** *Aquatic Toxicology*, v. 206, p. 148-155, 2019.

WANG, X. et al. **The Impact of Triclosan on the Expression of Stem Cell Markers OCT4, SOX2, and NANOG in Early Zebrafish Development.** *Aquatic Toxicology*, v. 206, p. 148-155, 2016.

WENDELAAR BONGA, S. E. **The stress response in fish.** *Physiological Reviews*, v. 77, n. 3, p. 591-625, jul. 1997.

WINSTROBE, M. **The use of the microhematocrit method in the clinical laboratory.** *American Journal of Clinical Pathology*, v. 4, n. 6, p. 626-634, 1934.

ZHANG, J. et al. **Impact of Triclosan on Stem Cell Markers in Zebrafish Embryos: Implications for Developmental Toxicology.** *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, v. 55, n. 8, p. 978-986, 2020.

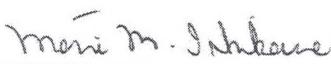
APÊNDICES

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO TRICLOSAN NOS DIFERENTES ESTÁGIOS DE VIDA DO LAMBARI (*Astyanax altiparanae*)**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 30/07/2024

Assinatura: 
Nome do(a) autor(a): **Juliana Augusta Gil**
RG n.º 49515148-8

Assinatura: 
Nome do(a) orientador(a): **Márcia Mayumi Ishikawa**
RG n.º 20150125-9

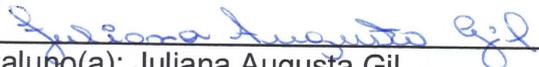


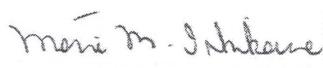
COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109. 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado, intitulada “**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO TRICLOSAN NOS DIFERENTES ESTÁGIOS DE VIDA DO LAMBARI (*Astyanax altiparanae*)**”, desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: 
Nome do(a) aluno(a): Juliana Augusta Gil

Assinatura: 
Nome do(a) orientador(a): Márcia Mayumi Ishikawa

Data: 30/07/2024

ANEXOS

M.CEUA.CNPMA Nº 4/2021

Jaguariúna, 04 de agosto de 2021.

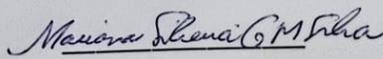
Márcia Mayumi Ishikawa

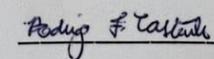
Embrapa Meio Ambiente

AUTORIZAÇÃO PARA A REALIZAÇÃO DE ATIVIDADES DE ENSINO OU DE PESQUISA CIENTÍFICA

Certificamos que a proposta intitulada “Biomarcadores e toxicidade do triclosan nos diferentes estágios de vida do lambari”, registrada com o nº 010/2019, sob a responsabilidade de Márcia Mayumi Ishikawa que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Embrapa Meio Ambiente, em 04/08/2021 .

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	13/01/2020 a 20/07/2023
Espécie/linhagem/raça	<i>Astyanax altiparanae</i>
Nº de animais	250
Peso/Idade	20 à 30g/ Adultos
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Piscicultura Polettini (cadastrada na CEUA Meio Ambiente (http://pisciculturapolettini.blogspot.com/))


Vice coordenadora da CEUA


Secretário da CEUA