



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG  
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Toxicidade dos fármacos clorexidina e triclosan no isópodo terrestre *Balloniscus* spp.

Letícia Schmidt Fraga

Orientador: Dr. Flavio Manoel Rodrigues da Silva Junior

Monografia apresentada como requisito  
da Disciplina de Trabalho de Graduação  
II - 15125 - do Curso de Bacharelado  
em Ciências Biológicas.

Outubro/2016

## **Agradecimentos**

Agradeço ao Flávio, meu orientador, por todo o auxílio na realização deste trabalho. Agradeço sua dedicação em me ajudar a desenvolvê-lo e a paciência que sei que foi necessária durante este período.

Agradeço a Lisiane, pelo empréstimo do laboratório e acima de tudo pela dedicação em me auxiliar. Agradeço pelas explicações sempre muito detalhadas, muito obrigada por tudo.

Agradeço aos estagiários de iniciação científica, Antonio Borges, Nicolas Farias e Elizabeth Rodrigues, que me ajudaram muito na realização dos experimentos.

## Sumário

<b>Lista de abreviaturas</b> .....	4
<b>Resumo</b> .....	5
<b>Abstract</b> .....	6
<b>Introdução geral</b> .....	7
Antimicrobianos como poluentes no solo .....	7
Antimicrobiano: Clorexidina.....	9
Antimicrobiano: Triclosan .....	10
Invertebrados terrestres .....	11
Isópodos terrestres.....	11
Bactérias do trato digestivo de isópodos terrestres .....	12
<b>Resumo</b> .....	14
<b>Introdução</b> .....	15
<b>Materiais e Métodos</b> .....	17
Exposição .....	17
Análises da exposição (Experimento 1) .....	18
Análise do Experimento 2 .....	18
<b>Resultados e discussão</b> .....	20
<b>Conclusões</b> .....	23
<b>Referências</b> .....	24
<b>Tabelas e figuras</b> .....	26
<b>Conclusão geral</b> .....	29
<b>Bibliografia</b> .....	31

## **Lista de abreviaturas**

$\mu\text{g/L}$  microgramas por litro

BHI Infusão de cérebro-coração

CHX Clorexidina

DNA Ácido Desoxirribonucléico

UFC Contagem de Unidades Formadoras de Colônias

EC10 Concentração efetiva 10

EC50 Concentração efetiva 50

ENR Enzima enoil-ACP redutase

IC95% Intervalo de confiança de 95%

$\text{mg/kg}$  Miligramas por quilogramas

$\text{mg/L}$  Miligramas por litro

$\text{mg/ml}$  Miligramas por Militros

rRNA Ácido ribonucleico ribossômico

T1 Tiroxina

TCS Triclosan

## Resumo

Triclosan e clorexidina são antimicrobianos de amplo espectro presentes em produtos de higiene pessoal, por exemplo, estes fármacos vêm sendo identificados no meio ambiente, no solo e água, onde os organismos que ali habitam são expostos a sua presença, podendo ser prejudicial a estes. O isópodo terrestre *Balloniscus* spp. é um organismo de solo, amplamente distribuído, este animal foi exposto a dois diferentes fármacos: triclosan e clorexidina nas concentrações 0,002mg/mL e 0,005mg/mL, respectivamente. Realizou-se dois experimentos diferentes, no primeiro experimento os animais foram separados em três diferentes tratamentos, clorexidina, triclosan e controle (água destilada), permanecendo durante 14 dias expostos em placas de Petri, sendo metade dos animais em substrato solo e a outra metade em papel filtro. No segundo experimento os animais foram expostos aos mesmos tratamentos, nas mesmas concentrações e neste caso apenas em solo como substrato, durante quatro dias. Após a exposição avaliou-se o peso dos animais, quantidade e peso das fezes e a ingestão de alimentos nos animais do primeiro experimento. Utilizando estes dados calcularam-se as taxas de assimilação e consumo, assim como a eficiência de assimilação. Ao término da exposição do segundo experimento, encaminhou-se para análise da composição bacteriana do trato digestivo, sendo então realizada a extração do tubo digestivo e a sua masceração a fim de obter um líquido homogêneo contendo bactérias que se encontravam em seu interior, e posteriormente, este foi distribuído em uma placa contendo ágar BHI, permitindo o crescimento. Realizou-se a contagem de unidades formadoras de colônias, assim como, coloração de Gram e teste de motilidade, além de testes químicos, como o teste da catalase e teste da oxidase. Os resultados demonstram que houve aumento de unidades formadoras de colônias bacterianas no tratamento triclosan e diminuição no tratamento clorexidina em relação ao controle, no entanto, a diversidade de bactérias apresentou-se mais elevada no tratamento clorexidina, mantendo semelhante em relação ao controle, o contrário ocorreu com triclosan que apresentou baixa diversidade. Em relação à taxa de assimilação e de eficiência de assimilação do *Balloniscus* spp. demonstrou-se diferença significativa em substrato papel filtro, no tratamento com clorexidina em relação ao controle. Portanto, mais estudos se fazem necessários a fim de identificar com maior precisão o real dano que estes fármacos podem gerar em *Balloniscus* spp.

Palavras-chave: antibióticos; microbiota; oniscidea; toxicologia terrestre; trato digestivo.

## Abstract

The terrestrial isopod *Balloniscus* spp. was exposed to two different drug: triclosan and chlorhexidine in concentrations 0,002 mg/ml and 0,005 mg/mL, respectively, in order to observe changes in nutrient assimilation and gastrointestinal microflora of animals. To this end, in the first experiment, the animals were separated into three different treatments, chlorhexidine, triclosan and control of soil as substrate and the above-mentioned concentrations, they remained for 14 days in exposure, half of the animals on the soil substrate and the other half on filter paper. In the second experiment the animals were exposed to my treatments in soil as a substrate for four days. The first experiment evaluated after exposure to animal weight, quantity and stool weight and food intake. Using these data were calculated and the rates of assimilation consumption and assimilation efficiency. The second experiment, at the end of the exhibition sent for analysis of bacterial makeup of the digestive tract, and then performed the extraction of this and maceration in order to obtain a homogeneous liquid containing bacteria that were inside, and later this was distributed on a BHI agar plate containing allowing growth. It carried out the counting of colony forming units, as well as Gram staining, and chemical tests, such as the catalase test and oxidase test. The results show that there was an increase in the number of bacterial colonies in the triclosan treatment and decrease in chlorhexidine treatment compared to control, however, the diversity of bacteria showed up higher in the chlorhexidine treatment, keeping similar relative to the control, the opposite occurred with triclosan which showed low diversity. Regarding the rate of assimilation and assimilation efficiency of *Balloniscus* spp. only demonstrated a significant difference in the substrate filter paper, treatment with chlorhexidine compared to control. The results demonstrate that drugs affecting these organisms is potentially harmful.

Keywords: antibiotics; bacterium; oniscidea; terrestrial toxicology; digestive tract.

## **Introdução geral**

O solo é formado naturalmente, constituindo-se da camada mais externa da crosta terrestre. É formado por diversos micro-habitats que possuem características químicas e físicas diferenciadas, além disso apresenta diferentes comunidades biológicas, constituindo em habitat de uma infinidade de organismos, bactérias, fungos e uma diversificada fauna edáfica como enquitreídeos, colêmbolas, ácaros, nematoides etc, além disso, ele fornece fixação e nutrição as plantas e armazena água (Derísio, 2000; Abreu et al., 2010).

O desenvolvimento urbano causa alterações na mecânica natural do meio ambiente, existem diversas maneiras pelas quais podemos alterá-lo, prejudicando o ambiente terrestre, por exemplo, a própria urbanização já é prejudicial ao solo, pois a construção de prédios e rodovias dificulta o retorno da água ao solo, por exemplo. Resíduos sanitários, sejam eles domésticos ou industriais, chegam ao solo e alteram sua composição original, assim como a agricultura e a pecuária, a extração de compostos armazenados no solo, e acidentes ocorridos em rodovias durante o transporte de cargas (Derísio, 2000).

### Antimicrobianos como poluentes no solo

Os antimicrobianos são substâncias naturais ou sintéticas que atuam sobre microorganismos inibindo o crescimento ou causando a sua morte, e são divididos em quatro classes: antibacterianos, antivirais, antifúngicos e antiparasitários. Além de sua aplicação fundamental para com a saúde humana, antimicrobianos também têm sido utilizados na promoção do crescimento e para a prevenção e tratamento infecções de animais e plantas (Toledo et al., 2007; Mello et al., 2011).

O descarte e disposição final destes produtos tem ganhado destaque dentro da área ambiental, pois existem diversas maneiras de estes antimicrobianos alcançarem o solo, contaminando-o. Primeiramente, estes são utilizados em seres humanos para tratamento ou prevenção de enfermidades e através despejo de esgotos domésticos em cursos d'água, por exemplo, podem alcançar o ambiente natural. Isto se torna relevante porque o tratamento de esgotos é inexistente em muitas cidades, dos esgotos coletados apenas 40% deles é tratado no Brasil, cerca de 48,6% da população nem possui acesso a coleta deste (Instituto Trata Brasil, 2015). Além disso, quando ocorre o tratamento de esgotos a eliminação destes fármacos é muitas vezes apenas parcial, sendo que resquícios dessas

substâncias são comumente encontrados (Colaço et al., 2014). Assim como o descarte juntamente com o lixo caseiro, que muitas vezes não manuseado de maneira correta, podendo parar diretamente no solo (Pinto et al., 2014; Miotto et al., 2015), e no final, através destas águas contaminadas estes fármacos acabam alcançando diretamente o solo.

Antimicrobianos sendo utilizados em animais podem alcançar o solo através de suas excretas, pois em muitos casos os fármacos administrados aos animais não são completamente metabolizados, podendo inclusive ser encontradas em sua forma original (Sarmah et al., 2006; Kemper, 2008). Estas excretas podem ser dispensadas diretamente no solo ou coletadas e utilizadas como adubo posteriormente, expondo o solo aos compostos existentes nestas. Tratando-se das plantas os antimicrobianos costumam ser administrados diretamente sobre elas, e conseqüentemente, o solo pode ser diretamente contaminado. Um ponto importante a ser destacado é que a agricultura foca essencialmente em patógenos de origem alimentar, bactérias que estão presentes tanto em animais quanto em humanos, como, por exemplo, *Escherichia coli* ou *Enterococcus faecium*. Logo que a mesma estirpe pode colonizar animais e seres humanos, os genes de resistência a antibióticos podem ser facilmente disseminados (Sundsford et al., 2001; Garofalo et al., 2007).

Uma vez no ambiente, estes fármacos alteram principalmente a micro-biosfera, causando mudanças locais em sua composição, provavelmente, por causa disso, as conseqüências da poluição por estes sobre a biodiversidade têm recebido menor atenção. Estudos demonstram que a presença destes fármacos em solo, podem de fato alterar a micro-biosfera terrestre, por exemplo, a exposição de comunidades microbianas à ciprofloxacina favorecem a seleção de bactérias gram-negativas e redutoras de sulfato (Cordova-Kreylos e Scow, 2007). Em pesquisa bibliográfica, DeVries e Zhang (2016) encontraram 13 estudos relatando 19 diferentes antibióticos que afetam a nitrificação, ou seja afetando as bactérias que atuam no ciclo, interferindo diretamente no ciclo do nitrogênio. Os antimicrobianos são capazes, também, de afetar a fauna e flora por exemplo, Carlsson et al. (2013) testou a toxicidade de 15 antimicrobianos frente embriões de *Danio rerio*, sendo estes 10 antiparasitários e 5 antibacterianos, os antiparasitários demonstraram-se mais tóxicos, foram relatados casos de mortalidade e má formação. Liu et al. (2009a) testou seis antibióticos (clortetraciclina, tetraciclina, tilosina, sulfametoxazol, sulfametazina e trimetropim) frente a três tipos de plantas (aveia, arroz e pepino) demonstrando que estes fármacos apresentam fitotoxicidade, sendo o arroz, por exemplo, mais sensível ao sulfametoxazol com o valor de EC10 de 0,1 mg/L.

## Antimicrobiano: Clorexidina

A clorexidina (CHX) é um composto catiônico sintético derivado da bisbiguanida. Grande variedade de marcas de antissépticos existentes no mercado são à base de CHX, isto se deve ao alto poder antimicrobiano e baixo custo (Alaki et al., 2002; Sweetman, 2007). O composto age sobre a membrana citoplasmática dos microrganismos, causando perda do controle osmótico, desnaturação, resultado em rompimento do material intracelular e conseqüente morte celular (Heiling e Chandler, 1998; Sena et al., 2006; Rodrigues et al., 2009).

Este fármaco é considerado de amplo espectro, devido a sua atividade contra bactérias tanto gram-positivas quanto gram-negativas, sendo as positivas normalmente mais suscetíveis (Tortora et al., 2000), além disso, apresenta ação contra alguns vírus e fungos (Bailey e Longson, 1972; Hiom et al., 1992). É bastante utilizado na odontologia, sendo destacável seu uso no tratamento de gengivites e periodontites, sendo encontrado em enxaguantes bucais (Steinberg e Rothman, 1996), além de seu uso na desinfecção da pele e membranas mucosas.

Diversos estudos vêm demonstrando a toxicidade da CHX como, por exemplo, sobre fibroblastos (Pucher e Daniel, 1992; Hidalgo & Dominguez, 2001), células epiteliais gengivais (Babich et al., 1995) e macrófagos (Li et al., 2012), além disso têm demonstrado-se sua capacidade de afetar a capacidade renal e sua hepatotoxicidade (Chow et al 1977). Gianelli et al. (2008) analisou a toxicidade da CHX frente a vários tipos celulares como osteoblastos, endoteliais e linhas celulares de fibroblastos, demonstrando que este fármaco é altamente citotóxico.

Quanto a sua interação no meio ambiente, alguns estudos vêm sendo realizados, no entanto ainda não existem experimentos realizados com organismos de solo. No ambiente aquático Lawrence et al., (2008) realizou testes para determinar a interferência da CHX sobre a formação de biofilme e concluiu que nas baixas concentrações testadas há pouca interferência sobre a comunidade bacteriana. Jesus et al., 2013 procurou determinar as concentrações letais e subletais deste fármaco em meio aquático para quatro organismos: a bactéria *Vibrio fischeri*, a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, o crustáceo *Daphnia magna* e para embrião do peixe *Danio rerio*. O fármaco apresentou-se bastante tóxico para as algas 72 h-EC50 de 62,2µg/l e crustáceos 48 h-EC50 de 45,0 µg/l, já a toxicidade em embrião de peixe e bactérias é mais baixa 96 h-EC50 de 804,0µg/l e a 15

min-EC50 de 1,694.0µg/l, respectivamente, no entanto em peixes a presença do antimicrobiano causou alterações no líquido amniótico, ocasionando em anormalidades.

#### Antimicrobiano: Triclosan

O triclosan (TCS) 5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol é um antimicrobiano que atua como antibacteriano inibindo a síntese de ácidos graxos, através da inibição da enzima enoil-ACP redutase (ENR), assim privando a bactéria da possibilidade, por exemplo, de formar uma membrana plasmática, e conseqüentemente ocasionado sua morte (Heath et al., 1999; Stewart et al., 1999), no entanto, além da atividade antibacteriana o composto apresenta atividade antifúngica e antiviral (Jones et al., 2000). Este fármaco é utilizado na constituição de produtos de cuidados pessoais, como sabonetes, desodorantes, creme dental (Bhargava e Leonard, 1996; Jones et al., 2000) e vem sendo identificado em solo por diversos estudos como o de Lozano et al., 2010.

O efeito toxicológico do TCS é evidenciado por diversos estudos. Ajao et al. (2015) testou a toxicidade deste fármaco *in vitro* frente a diferentes células de mamíferos e concluiu que a exposição de espermatozóides de porco ao fármaco paralisa a vibração de sua cauda e como consequência sua mobilidade, bem como hiperpolariza a região do acrossoma e da bainha fibrosa do flagelo. Neste mesmo estudo mitocôndrias de fígado de rato foram expostas ao fármaco e concluiu-se que houve redução síntese de ATP desacoplado a respiração e absorção excessiva de oxigênio, além de haver um aumento na fosforilação oxidativa. Em outro estudo, Crofton et al. (2007) demonstra que o TCS em ratos perturba a homeostase da tiroxina (T1), hormônio da tireóide. Em mais um estudo utilizando ratos Yueh et al. (2014) traz evidências de que o TCS causa tumor no fígado.

Estudos toxicologia desse produto no ambiente têm demonstrado resultados semelhantes. Sabe-se que o TCS é degradado, sendo sua meia vida 18 dias em concentração de 1mg/kg em condições aeróbicas, durante este processo ele pode sofrer fototransformação produzindo 2,8-diclorodibenzeno-p-dioxina que é reconhecidamente carcinogênico (Latcha et al., 2003; Sanchez-Prado, 2006). Liu et al. (2009b) apresenta resultados que indicam que o TCS é fitotóxico, quando presente no solo, ele inibiu o crescimento das plantas, assim como a respiração e a atividade da fosfatase, e observou-se ainda um aumento na utilização de fontes de carbono, além das plantas, Butler et al. (2011) apresenta em seu trabalho resultados que indicam que o TCS é capaz de inibir a respiração e reduzir a biomassa de comunidades bacterianas do solo. O TCS também se demonstra

tóxico a animais terrestres, a exposição de *Achatina fulica* ao fármaco indica que os animais sofreram redução em seu crescimento e na ingestão de alimento durante a exposição (Wang et al., 2014). Já em estudo realizado com *Eisenia fetida* os resultados são mais preocupantes, demonstram que o TCS causou estresse oxidativo e dano no DNA no animal (Lin et al., 2010). Assim, percebe-se que a presença deste fármaco no solo pode trazer inúmeras consequências aos residentes.

#### Invertebrados terrestres

O solo é rico em vida, temos bactérias, fungos, plantas, animais. A fauna é classificada de acordo com seu tamanho e mobilidade, sendo, portanto, dividida em: microfauna, mesofauna e macrofauna. A microfauna compõe-se de protozoários; a mesofauna de colêmbolas e ácaros. A macrofauna é construída de minhocas, cupins, formigas e besouros. Estes alguns exemplos dos constituintes de cada classificação. Estes animais que habitam o solo são responsáveis por inúmeras funções como a decomposição da matéria orgânica, a ciclagem dos nutrientes, manutenção da estrutura do solo, por exemplo, controlando a erosão do solo e o suprimento de água, controle de pragas evitando doenças agrícolas e conservação da biodiversidade (Abreu et al., 2010).

#### Isópodos terrestres

Objetivando determinar as consequências dos antimicrobianos, TCS e CHX, biodisponíveis no solo, utilizaremos isópodos terrestres, que são naturais no ambiente terrestre e são amplamente distribuídos. Existem registros de sua ocorrência em florestas tanto temperadas quanto tropicais, cavernas, desertos, campos, montanhas de altitudes que alcancem até 3000m. No entanto, os habitats mais úmidos e sombreados, sob pedras e serrapilheira são os mais propícios a encontrá-los (Hassall e Sutton, 1977; Linsenmair, 1984; Sfenthourakis, 1992; Furlan, 1996; Zimmer, 2003; Hassall et al. 2006; Tuf et al., 2008).

Estes pertencem à subordem Oniscidae Latreille, 1829 que é a única de Isopoda que comporta espécies efetivamente terrestres (Sutton, 1980). Os Oniscidea constituem um diversificado grupo de crustáceos terrestres com 3637 espécies, sendo apenas 104 descritas para o Brasil (Schmalfuss, 2003).

Estes animais são primariamente detritívoros, frugívoros, saprófagos, porém alimentam-se também de plantas verdes, além disso, são coprofágicos, ingerindo as próprias fezes e as de outros animais (Hassal e Rushton, 1982; Facelli e Pickett, 1991; Szlávecz e Pobožny, 1995). Esses animais atuam na fragmentação de matéria orgânica em decomposição, agindo na degradação da celulose, e este potencial se deve a presença de bactérias endossimbiontes no seu intestino e hepatopâncreas (Zimmer, 2006). É reconhecida a relevância destes animais na ciclagem de nutrientes, a biota de solo também é importante na produção de assoalho florestal e evita a erosão do solo (Lavelle et al., 2006). Além disso, Quadros (2010) destaca que estes animais podem ser utilizados na restauração de ecossistemas degradados, e algumas espécies, como *Baloniscus sellowi* (Brandt, 1883), que apresenta ampla distribuição, alta capacidade de colonização de ambientes, pode ser utilizado como bioindicador. Sendo assim, estes animais apresentam-se de suma importância para o ecossistema terrestre e para o estudo deste.

#### Bactérias do trato digestivo de isópodos terrestres

Os compostos, TCS e CHX, em solo podem afetar diretamente tanto as bactérias quanto os fungos presentes no ambiente, mas, além disso, podem indiretamente afetar plantas e animais que habitam o local. As plantas irão absorver água e nutrientes do solo e desta forma podem expor-se aos compostos. Os animais podem, por exemplo, sofrer efeitos adversos pela exposição desnecessária ao composto e, além disso, podem ter sua microbiota afetada pelos fármacos.

Em função de o seu hábito alimentar, os isópodos terrestres necessitam estabelecer simbiose com micro-organismos em seu trato digestivo, visando melhorar a capacidade de assimilação de nutrientes. Sua microbiota natural ainda não está bem determinada, mas alguns estudos procuram esclarecer a composição desta. Inhen e Zimmer (2007) realizaram um experimento com *Porcellio scaber* para determinar o consumo seletivo de bactérias e fungos, concluíram que na maioria dos casos as bactérias gram-positivas foram preferidas em relação a bactérias gram-negativas e fungos.

A microbiota do sistema digestivo destes animais ainda não está bem definida, no entanto, Kostanjsek et al. (2002) apresentam em seu trabalho com *P. scaber* uma tabela com diversas bactérias que já foram identificadas, utilizando gene 16S rRNA, do trato digestivo destes animais, entre as que possuíam um percentual de similaridade superior a

80% encontram-se: *Bacteroides acidofaciens*, *Neisseria perflava*, *Neisseria mucosa*, *Neisseria flavescens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus saccharolyticus*. Posteriormente Kostanjsek (2004) indicou mais algumas espécies de bactérias identificadas para a mesma espécie de isópoda, entre elas estão: *Desulfotomaculum ruminis* e algumas do gênero *Mollicutes*, e do gênero *Desulfotomaculum*.

Wang et al. (2007) realizou um experimento com *Oniscus asellus* e determinou que espécimes de bactéria da classe Mollicutes e da ordem Rickettsiales são encontradas no hepatopâncreas destes animais.

Para a espécie desse estudo não existe relatos de grupos ou espécies de microorganismos identificados no tubo digestivo e este trabalho poderá fornecer informações sobre grupos microbianos e o impacto da disposição de antimicrobianos no ambiente na comunidade microbiana e no processo de assimilação de nutrientes pelo isópodo terrestre do gênero *Balloniscus*.

1 **Toxicidade dos fármacos clorexidina e triclosan no isópodo terrestre *Balloniscus spp.***

2 FRAGA<sup>(1)</sup>, L., VOLCÃO<sup>(2)</sup>, L., SILVA JR.<sup>(3)</sup>, F.M.

3 <sup>(1)</sup> Universidade Federal do Rio Grande. Av. Itália km 8, Bairro Carreiros. Rio Grande, Rio Grande do Sul,  
4 Brasil. Endereço eletrônico: leticia\_schmidt@hotmail.com.br

5 <sup>(2)</sup> Universidade Federal do Rio Grande. Av. Itália km 8, Bairro Carreiros. Rio Grande, Rio Grande do Sul,  
6 Brasil. Endereço eletrônico: f.m.r.silvajunior@gmail.com

7 <sup>(3)</sup> Universidade Federal do Rio Grande. Av. Itália km 8, Bairro Carreiros. Rio Grande, Rio Grande do Sul,  
8 Brasil. Endereço eletrônico: lisivolcao@hotmail.com

9 **Resumo**

10 Triclosan e clorexidina são antimicrobianos de amplo espectro presentes em produtos de  
11 higiene pessoal, por exemplo, estes fármacos vêm sendo identificados no meio ambiente,  
12 sendo os organismos expostos, sendo potencialmente prejudicial. O isópodo terrestre  
13 *Balloniscus spp.* é um organismo de solo, amplamente distribuído. Este foi exposto a estes  
14 dois fármacos. Analisou-se o efeito destes em funções metabólicas do isópodo, concluindo  
15 que houve diferença significativa na taxa de assimilação e eficiência de assimilação em  
16 relação ao controle. Realizaram-se também análises da microbiota do trato digestivo do  
17 *Balloniscus spp.*, e conclui-se que houve um aumento na quantidade de unidades formadoras  
18 de colônias na exposição ao triclosan em relação ao controle e redução no tratamento  
19 clorexidina. No entanto, o tratamento triclosan apresentou menor diversidade bacteriana em  
20 relação ao controle, enquanto que o tratamento clorexidina manteve-se diversidade  
21 semelhante ao controle.

22 **Termos para indexação:** antibióticos, microbiota, oniscidea toxicologia terrestre, trato  
23 digestivo.

24 \_

25

## Introdução

26 Antimicrobianos são substâncias que inibem o crescimento de micro-organismos ou  
27 causam morte destes, classificam-se em quatro tipos de antimicrobianos: antibacterianos,  
28 antivirais, antifúngicos e antiparasitários. O tratamento ineficiente do esgoto (Colaço et. al.  
29 2014), o seu descarte inadequado destes agentes (Miotto et.al.2015), seu uso no tratamento de  
30 animais e plantas, no tratamento de enfermidades e auxiliando na promoção de maior  
31 crescimento (Kemper 2008), são algumas das maneiras pelas quais esses fármacos podem  
32 alcançar o solo, contaminando-o.

33 No solo, os antimicrobianos podem atuar principalmente sobre a micro-biosfera,  
34 como, por exemplo, a exposição de bactérias a ciprofloxacina ocasionou na seleção de  
35 organismos gram-positivos e redutores de sulfato (Córdova-Kreylos e Scow 2007). DeVries e  
36 Zhang (2016) em pesquisa bibliográfica relatou 13 estudos com 19 diferentes antibióticos que  
37 afetam a nitrificação, havendo, portanto, prejuízos as bactérias que participam do ciclo do  
38 nitrogênio. Além disso, estudos demonstram fitotoxicidade (Liu et.al. 2009a) e toxicidade a  
39 animais (Carlsson et.al.2013).

40 A clorexidina é um composto sintético derivado da bis-biguanida, é considerada um  
41 antibacteriano de amplo espectro, sendo ativa tanto contra gram-positivas quanto gram-  
42 negativas, além disso, apresenta atividade também contra vírus e fungos (Bailey e Longson  
43 1972, Hiom et.al. 1992). A clorexidina atua sobre a membrana citoplasmática, causando perda  
44 do controle osmótico, ocasionando morte celular (Sena et.al. 2006).

45 Não há estudos realizados em organismos de solo envolvendo a clorexidina, porém  
46 estudos em ambiente aquoso demonstram seu potencial toxicológico. Jesus et.al. 2013 utilizou  
47 quatro organismos de meio aquático em seu estudo: a bactéria *Vibrio fischeri*, a alga  
48 *Pseudokirchneriella subcapitata*, o crustáceo *Daphnia magna* e o embrião de peixe *Danio*

49 *rerio*. Sendo que entre estes o organismo mais suscetível foram as algas 72 horas-EC50 de  
50 62,2 µg/l e o menos, as bactérias 15 minutos-EC50 de 1,694 µg/l, peixes apresentaram-se  
51 pouco suscetíveis, mas no entanto, esta concentração causou alterações no líquido amniótico,  
52 ocasionando em anormalidades.

53 O segundo antimicrobiano, o triclosan, apresenta atividade antibacteriana, e além  
54 disso, apresenta atividade antifúngica e antiviral (Jones et.al. 2000). Atuando como  
55 antimicrobiano ele age inibindo a enzima enoil-ACP redutase (ENR), assim, impedindo a  
56 síntese de ácidos graxos e ocasionando morte (Heath et.al.1999, Stewart et.al.1999). Diversos  
57 estudos procuram demonstrar as alterações que este composto pode ocasionar em organismos  
58 do solo, este apresenta-se fitotóxico, inibindo o crescimento, a respiração e diminuindo a  
59 atividade da fosfatase (Liu et.al. 2009b), além de tóxico a animais terrestres, como *Eisenia*  
60 *fetida* em que a exposição ocasionou em estresse oxidativo e dano no DNA (Lin et.al. 2010).

61 A fim de determinar os efeitos da presença deste fármaco no solo a organismos que o  
62 habitam, escolheu-se o isópodos terrestres, *Balloniscus* spp., que apresentam ampla  
63 distribuição no solo. Este é primariamente detritívoro, atuando na fragmentação da matéria  
64 orgânica e isto é possível pela presença de bactérias endossimbiontes em seu intestino e  
65 hepatopâncreas (Zimmer 2006). A microbiota do trato digestivo de *Balloniscus* spp. ainda não  
66 foi determinada, porém estudou-se algumas espécies como *Porcellio scaber* e *Oniscus*  
67 *asellus*, para as quais foram identificadas as seguintes bactérias: *Bacteroides acidofaciens*,  
68 *Neisseria perflava*, *N. mucosa*, *N. flavescens*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*,  
69 *Enterococcus faecium*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. gallinarum*, *E. saccharolyticus*, e exemplares  
70 da ordem Rickettsiales e da classe Mollicutes. (Konstanjsek et. al. 2002, Konstanjsek et. al.  
71 2004, Wang et.al., 2007).

## **Materiais e Métodos**

72

73 A coleta dos animais foi realizada ao lado do prédio da Psicologia na Universidade  
74 Federal do Rio Grande – FURG (-32.074409, -52.169960) em Rio Grande, Rio Grande do  
75 Sul, Brasil. A coleta é realizada manualmente após a retirada da camada superficial de  
76 serrapilheira e os animais foram encaminhados ao Laboratório de Ensaios Farmacológicos e  
77 Toxicológicos do Instituto de Ciência Biológicas da FURG.

78 Os fármacos utilizados foram obtidos em farmácias de manipulação do município do  
79 Rio Grande, RS.

### **Exposição**

81 No laboratório os animais foram dispostos em placas de Petri, de acordo com a  
82 metodologia de Ribeiro et al., 2001, havendo algumas alterações a acerca do período de  
83 exposição que neste caso foi reduzido devido a meia vida do fármaco triclosan de 18 dias.  
84 Estes foram em dois experimentos, sendo que no primeiro os animais permaneceram em  
85 placas de petri durante 14 dias e no segundo durante quatro dias.

86 No primeiro experimento (figura II) 60 animais foram separados em seis tratamentos,  
87 cada tratamento contendo 10 indivíduos. Os animais foram dispostos em placas de Petri,  
88 sendo uma placa para cada tratamento, ou seja, 10 animais por placa. A fim de comparar os  
89 efeitos da exposição puramente ao fármaco e da exposição ao fármaco em meio terrestre,  
90 metade dos tratamentos continham solo como substrato e a outra metade recebeu apenas papel  
91 filtro. Os indivíduos dos tratamentos 2, 4 e 6 receberam solo como substrato e respectivamente,  
92 foram expostos a triclosan, clorexidina e água destilada, e os tratamentos 1, 3 e 5  
93 permaneceram apenas com papel filtro como substrato, sendo expostos a triclosan,  
94 clorexidina e água destilada, respectivamente.

95 No segundo experimento (figura III) 30 indivíduos que foram distribuídos em três  
96 grupos de exposição, o primeiro exposto ao triclosan, o segundo clorexidina e o terceiro foi  
97 exposto apenas à água destilada, sendo este o grupo controle. Todos permaneceram em placas  
98 de Petri contendo solo como substrato.

99 Houve um período de uma semana para aclimação. Os isópodos terrestres foram  
100 alimentados com couve durante o período de exposição, e foram expostos a uma concentração  
101 de 0,005mg/mL de clorexidina e 0,002mg/mL de triclosan, respectivamente, para ambos os  
102 experimentos.

### 103 **Análises da exposição (Experimento 1)**

104 Ao término dos 14 dias de exposição os isópodos terrestres foram dispostos em  
105 novas placas, separados individualmente, durante um período de 24 horas, a fim de analisar a  
106 quantidade de alimento ingerido, o peso das fezes e o peso do animal, durante este período.  
107 Os organismos que morreram foram contados (taxa de mortalidade), e calculou-se a partir das  
108 observações a taxa de consumo (alimentos consumidos em mg/animal/dia), a taxa de  
109 assimilação (alimentos assimilados em mg/animal/dia) e a eficiência de assimilação  
110 (porcentagem de alimentos assimilados em relação à comida consumida) segundo o realizado  
111 por Ribeiro et al., 2001.

### 112 **Análise do Experimento 2**

113 Após a realização destas medições os animais foram encaminhados ao Laboratório  
114 de Biologia, Ecologia e Aplicação de Fungos localizado na Universidade Federal de Pelotas  
115 (UFPEL) Campus Capão do Leão, onde utilizando-se da metodologia de Drobne et.al. (2002)  
116 a qual descreve que a cabeça e o terceiro tergito do pleon do animal devem ser cortados, para  
117 que assim as vísceras sejam extraídas e transferidas para um tubo contendo 3ml de solução

118 salina e pérolas de vidro, e sejam homogeneizadas três vezes durante 30 segundos.  
119 Posteriormente, esta solução salina contendo as vísceras dos isópodos foram diluídas em mais  
120 6mL de solução salina, a partir desta solução foi realizada uma série diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ ,  
121 utilizou-se as diluições  $10^{-4}$  a  $10^{-7}$  para a realização do plaqueamento em meio BHI (Infusão  
122 de cérebro-coração), sendo escolhidas as diluições  $10^{-4}$  para os grupos controle e clorexidina,  
123 e  $10^{-7}$  para o grupo triclosan, devido ao maior crescimento bacteriano nestas concentrações.

124 Subseqüentemente realizou-se a contagem de bactérias mesófilas aeróbicas, para tal as  
125 placas foram incubadas a  $30^{\circ}\text{C}$  durante cinco dias, a cada 24 horas analisou-se o crescimento  
126 bacteriano, as diferentes colônias foram contadas, enumeradas e repicadas novamente em  
127 meio BHI, almejando posterior identificação. A fim de realizar a identificação morfológica e  
128 caracterização de Gram realizou-se coloração de Gram para análise microscópica, o teste da  
129 catalase e o teste da citocromo oxidase.

130 Por último, a partir destes resultados, realizou-se teste t e calculou-se o Índice de  
131 Shannon Wiener. O teste t foi realizado, utilizando os resultados da contagem realizada  
132 anteriormente, através do programa SPSS 2.0, para a comparação das médias dos tratamentos  
133 com nível de significância de 0,05. Para a análise de diversidade da microbiota encontrada nas  
134 vísceras dos tatuzinhos, foi utilizado o cálculo do Índice de Shannon Wiener, através das  
135 características das colônias, para os três tratamentos (controle, clorexidina e triclosan),  
136 utilizando a seguinte fórmula:

$$137 \quad H' = - \sum_{i=1}^s p_i \cdot \ln p_i$$

138 Onde:  $p_i$  = número de indivíduos da espécie  $i$ /número total de amostras;  $p_i = n_i/N$ ;  $S$  = número  
139 de espécies/número de grupos;  $H_{\text{máx}}$  = máxima diversidade possível;  $E = H'/H_{\text{máx}} =$   
140 uniformidade;  $N$  = número total de indivíduos.

141

## Resultados e Discussão

142 As análises metabólicas do primeiro experimento (tabela 1) indicam que não houve  
143 diferença significativa em nenhum dos parâmetros analisados nos tratamentos em que havia  
144 solo como substrato. Porém, nos tratamentos em que não havia solo como substrato, havendo,  
145 portanto, apenas papel filtro, o tratamento clorexidina demonstrou diferença significativa em  
146 relação ao controle, tanto na taxa de assimilação quanto na eficiência de assimilação,  
147 demonstrando que o fármaco em questão apresenta-se prejudicial à *Balloniscus* spp. O  
148 triclosan apresentou alta porcentagem de mortalidade impedindo que fossem realizadas as  
149 análises, mas observa-se pelo único indivíduo sobrevivente que é possível haver diferença em  
150 relação ao controle. Em nenhum dos tratamentos houve diferença significativa na taxa de  
151 consumo.

152 No primeiro experimento (exposição de 14 dias) em solo como substrato, não  
153 ocorreram diferenças significativas, provavelmente este resultado deve-se justamente a  
154 presença do solo nos tratamentos. O solo foi coletado na mesma região onde foram coletados  
155 os animais, sendo assim, possivelmente este solo potencializou as condições necessárias para  
156 que os animais sobrevivessem a essa concentração do fármaco.

157 Parâmetros metabólicos, principalmente relacionados com a alimentação constituem  
158 em uma ótima ferramenta para a investigação de toxicidade em isópodos terrestres (Drobne  
159 1997). Portanto, o resultado significativo observado no tratamento clorexidina é de alta  
160 relevância, constituindo em um forte indicativo de toxicidade. É possível que este se deva a  
161 ausência de solo, impossibilitando a reposição de bactérias que possam estar presentes nele,  
162 não tendo, portanto, sido afetadas pelo fármaco, possivelmente, inclusive pelas características  
163 do solo. Assim, a composição bacteriana do trato digestivo deve manter-se frente ao  
164 antimicrobiano, o que segundo os resultados, sugere que não ocorreu, logo que as taxas de

165 assimilação e eficiência de assimilação foram inferiores ao controle e a presença da  
166 microbiota é essencial para a realização da digestão, considerando que estes animais realizam  
167 simbiose com estas bactérias com esta finalidade (Zimmer 2006).

168 No segundo experimento (exposto aos fármacos por quatro dias) em que foram  
169 realizadas análises da comunidade bacteriana do trato digestivo de *Balloniscus* spp. Neste  
170 caso os resultados indicam o aumento de unidades formadoras de colônias no tratamento  
171 triclosan, este resultado deve-se possivelmente a ocorrência de morte de bactérias presentes,  
172 possibilitando assim o estabelecimento de bactérias de crescimento rápido em substituição. O  
173 mesmo não ocorreu com o tratamento clorexidina onde houve diminuição do número de  
174 colônias em relação ao controle, este resultado pode ser observado na tabela 2.

175 Na tabela 3 apresenta-se uma comparação entre os tratamentos controle/clorexidina,  
176 controle/triclosan e clorexidina/triclosan, a tabela apresenta a média entre os tratamentos  
177 comparados, o desvio padrão entre estes grupos e o IC95%, além do valor de p. Os resultados  
178 da análise demonstram que a diferença entre os tratamentos é significativa, sendo o  $p \leq 0,05$ .  
179 Este resultado evidencia a alteração bacteriana nos tratamentos clorexidina e triclosan em  
180 relação ao grupo controle, demonstrando a capacidade dos fármacos de alterar a condição  
181 natural, original da microbiota de *Balloniscus* spp.

182 No entanto, apesar da diminuição da quantidade unidades formadoras de colônias no  
183 tratamento clorexidina, a diversidade (Figura I) manteve-se semelhante à encontrada no  
184 controle, sendo os valores 0,1811 decits/ind e 0,1823 decits/ind, respectivamente, clorexidina  
185 e controle. Enquanto o triclosan que apresentava um número superior quando comparado ao  
186 controle de colônias, apresentou menor diversidade, sendo esta 0,0257 decits/ind. Este  
187 resultado reforça a hipótese de que houve morte bacteriana, permitindo, portanto que bactérias  
188 de crescimento rápido ocupassem os espaços proporcionados pela morte bacteriana.

189 Um menor índice de Shannon pode ser considerado como resultado de estresse  
190 seletivo (Boyle et.al. 1990), sendo assim, na concentração de estudo, causou-se inibição ou  
191 morte de apenas algumas bactérias, permitindo crescimento de outras, como observado nos  
192 resultados do triclosan. O mesmo resultado foi encontrado por Drobne et.al. 2002, em que a  
193 exposição ao cádmio reduziu a diversidade bacteriana. Este resultado, observado em nossos  
194 experimentos, também pode se dever a maneira pela qual o triclosan age, inibindo a enzima  
195 enoil-ACP redutase (ENR), e por consequência, impedindo a síntese de ácidos graxos. Assim,  
196 em baixas concentrações haveria uma saturação, o fármaco poderia causar a morte de apenas  
197 uma quantidade restrita de bactérias.

198 No entanto a alteração da comunidade bacteriana resultante da exposição à  
199 clorexidina, não é resultado que possa ser desvalorizado, apesar da diversidade segundo o  
200 índice de Shannon permanecer semelhante ao controle, houve redução na quantidade de  
201 unidades formadoras colônias, e observa-se pela tabela 4 a ocorrência de bactérias  
202 diferenciadas do controle neste tratamento. No controle são encontrados cinco grupos  
203 diferenciados de bactérias morfolologicamente semelhantes e no tratamento clorexidina, apenas  
204 três destas são iguais às observadas no controle, além disso, são adicionadas sete bactérias  
205 morfolologicamente semelhantes diferentes das do controle, ou seja, há uma perda de dois tipos  
206 bacterianos quando observado aos que havia no controle e um ganho de sete tipos diferentes  
207 do controle. Sendo assim, o fármaco é capaz de ocasionar em alteração da microbiota de  
208 *Balloniscus* spp., sendo possível que estas bactérias diferenciadas das observadas no controle  
209 não agreguem na digestão de alimentos, prejudicando o animal, como os resultados  
210 metabólicos do primeiro experimento indicam.

211 Os resultados demonstram que as bactérias do trato digestivo de *Balloniscus* spp.  
212 assim como ele mesmo, são afetadas pela presença dos antimicrobianos, triclosan e  
213 clorexidina, havendo diferenças significativas na composição bacteriana em relação ao

214 controle, assim como na taxa de assimilação e eficiência de assimilação do tratamento  
215 clorexidina em relação ao controle. Sendo assim, mais estudos devem ser realizados a fim de  
216 determinar a real extensão da influência destes antimicrobianos sobre indivíduos deste gênero,  
217 em solo contaminado com estes fármacos.

218 Até o momento não havia relatos sobre a composição bacteriana do trato digestivo de  
219 *Balloniscus* spp. este trabalho apesar de não ter esse objetivo, trás dados sob a composição  
220 desta flora. É possível observar na tabela 4, no grupo controle, que não sofreu alteração na  
221 composição bacteriana pela presença dos fármacos, há prevalência, segundo estes resultados,  
222 de bactérias com as seguintes características: bacilos isolados, oxidase negativos, catalase  
223 positivos, gram negativas e sem motilidade em meio de cultivo.

## 224 **Conclusões**

225 1 Triclosan e Clorexidina alteram a comunidade bacteriana presente no trato digestivo de  
226 *Balloniscus* spp.;

227 2 A clorexidina ocasiona menor taxa de assimilação e eficiência de assimilação em indivíduos  
228 de *Balloniscus* spp.;

229 3 Houve aumento na quantidade de unidades formadoras de colônias e diminuição da  
230 diversidade bacteriana no tratamento triclosan;

231 4 Ocorreu, na exposição a clorexidina, redução na quantidade de unidades formadoras de  
232 colônias e aumento da diversidade bacteriana.

233

## 234 **Agradecimentos**

235 Agradeço ao Flávio, meu orientador, pela ajuda na realização deste trabalho.

236 Agradeço à Lisiane pelo empréstimo do laboratório.

237 **Referências**

238 BAILEY, A.; LONGSON, M. Virucidal activity of chlorhexidine on strains of Herpesvirus  
239 hominis, poliovirus, and adenovirus. **Journal of Clinical Pathology**, v.25, p.76-78, 1972.

240 BOYLE, T. et.al. A Sensitivity Analysis of Nine Diversity and Seven Similarity Indices.  
241 **Research Journal of the Water Pollution Control Federation**, v.62, p.749-762, 1990.

242 CARLSSON, G. et al. Toxicity of 15 veterinary pharmaceuticals in zebrafish (*Danio rerio*)  
243 embryos. **Aquatic Toxicology**, v.126, p.30–41, 2013.

244 COLAÇO, R.; PERALTA-ZAMORA, P.; GOMES, E. Poluição por resíduos contendo  
245 compostos farmacêuticamente ativos: aspectos ambientais, geração a partir dos esgotos  
246 domésticos e a situação do Brasil. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**,  
247 v.35, p.539-548, 2014.

248 CÓRDOVA-KREYLOS, A.; SCOW, K. Effects of ciprofloxacin on salt marsh sediment  
249 microbial communities. **The ISNE Journal**, v.1, p.585-595, 2007.

250 DEVRIES, S.; ZHANG , P. Antibiotics and the Terrestrial Nitrogen Cycle: A Review.  
251 **Current Pollution Reports**, v.2, p.51–67, 2016.

252 DROBNE, D. Terrestrial isopods – a good choice for toxicity testing of pollutants in the  
253 terrestrial environment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16 p. 1159–1164,  
254 1997.

255 DROBNE, D. et al. Isopod gut microflora parameters as endpoints in toxicity studies.  
256 **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.21, p.604–609, 2002.

257 HEATH, R. et al. Mechanism of Triclosan Inhibition of Bacterial Fatty Acid Synthesis. **The**  
258 **Journal of Biological Chemistry**, v.274, p.11110-11114, 1999.

259 HIOM, S. et al. Effects of chlorhexidine diacetate on *Candida albicans*, *C. glabrata* and  
260 *Saccharomyces cerevisiae*, v.72, p.335–340, 1992.

261 JESUS, F. et al. Lethal and sub lethal effects of the biocide chlorhexidine. **Ecotoxicology**,  
262 v.22, p.1348–1358, 2013.

- 263 JONES, R. et al. Triclosan: A review of effectiveness and safety in health care settings.  
264 **American Journal of Infection Control**, v.28, p.184-196, 2000.
- 265 KEMPER , N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. **Ecological**  
266 **Indicators**, v.8, p.1-13, 2008.
- 267 KOSTANJSEK, R.; STRUS, J.; AVGUSTIN, G. Genetic diversity of bacteria associated with  
268 the hindgut of the terrestrial crustacean *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). **Microbiology**  
269 **Ecology**, v.40, p.171-179, 2002.
- 270 LIN , D. et al. Potential biochemical and genetic toxicity of triclosan as an emerging pollutant  
271 on earthworms (*Eisenia fetida*). **Chemosphere**, v.81, p.1328–1333, 2010.
- 272 LIU, F. et al. Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and  
273 enzymatic activities. **Environmental Pollution**, v.157, p.1636–1642, 2009a.
- 274 LIU , F. et al. Terrestrial ecotoxicological effects of the antimicrobial agent triclosan.  
275 **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72, p.86–92, 2009b.
- 276 MIOTTO, P. et al. Medicamentos vencidos descartados no meio ambiente. **Revista**  
277 **Eletrônica Estácio Saúde**, v.4, p.41-51, 2015.
- 278 RIBEIRO, S. et al. Effect of endosulfan and parathion on energy reserves and physiological  
279 parameters of the terrestrial isopod *Porcellio dilatatus*. **Ecotoxicology and Environmental**  
280 **Safety**, v.49, p.131–138, 2001.
- 281 SENA, N. et al. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine  
282 against selected single-species biofilms. **International Endodontic Journal**, v.39, p.878-885,  
283 2006.
- 284 STEWART, M. et al. Structural basis and mechanism of enoyl reductase inhibition by  
285 triclosan. **Journal of Molecular Biology**, v.290, p.859–865, 1999.
- 286 ZIMMER, M. The role of animal-microbe interactions in isopod ecology and evolution. **Acta**  
287 **Biologica Benrodis**, v.13, p.127-168, 2006.

Tabelas e figuras

**Tabela I:** Análises metabólicas da exposição após 14 dias de tratamento, mortalidade, taxa de consumo, taxa de assimilação e eficiência de assimilação, em *Balloniscus* spp.

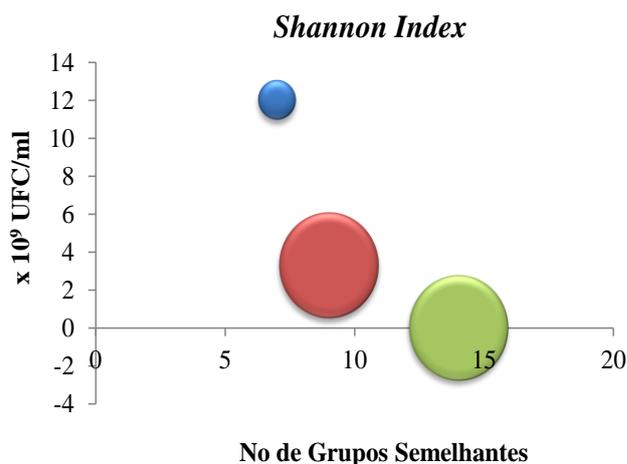
Parâmetro	Controle	Triclosan	Clorexidina
<b>Substrato: solo</b>			
Mortalidade (%)	0	60	40
Taxa de consumo	0,089 ± 0,047	0,060 ± 0,014	0,080 ± 0,02
Taxa de assimilação	0,087 ± 0,042	0,050 ± 0,014	0,068 ± 0,029
Eficiência de assimilação (%)	83,4 ± 7,7	81,8 ± 5,7	83,0 ± 7,6
<b>Substrato: filtro de papel</b>			
Mortalidade (%)	40	90	40
Taxa de consumo	0,077 ± 0,016	0,064	0,061 ± 0,008
Taxa de assimilação	0,066 ± 0,013	0,047	<b>0,047* ± 0,013</b>
Eficiência de assimilação (%)	87,00 ± 7,66	72,9	<b>71,9* ± 3,82</b>

**Tabela II:** Unidades Formadoras de Colônia Bacterianas (UFC/mL) nos quatro dias de cultivo de acordo com seus respectivos tratamentos, em *Balloniscus* spp.

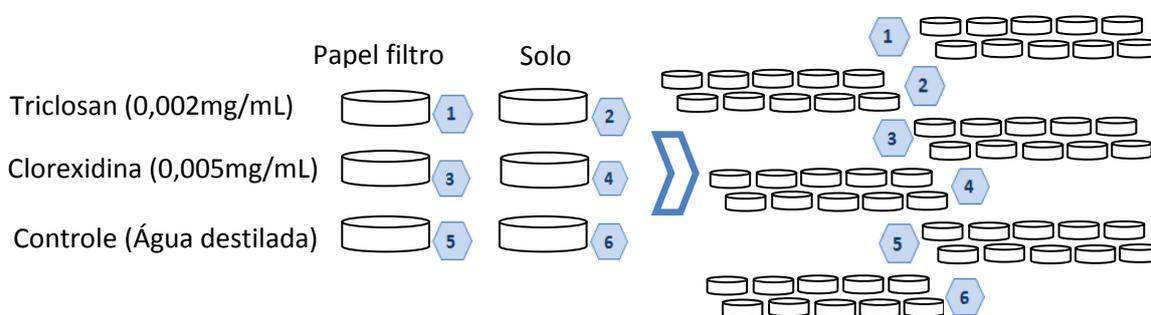
Dias de Cultivo	Tratamentos (UFC/mL)		
	Controle	Clorexidina	Triclosan
1	0,3 x 10 <sup>9</sup>	1,8 x 10 <sup>6</sup>	3,2 x 10 <sup>9</sup>
2	1,3 x 10 <sup>9</sup>	2,5 x 10 <sup>6</sup>	1,9 x 10 <sup>9</sup>
3	1,1 x 10 <sup>9</sup>	3,0 x 10 <sup>6</sup>	3,3 x 10 <sup>9</sup>
4	0,6 x 10 <sup>9</sup>	1,0 x 10 <sup>6</sup>	4,1 x 10 <sup>9</sup>
Total	3,3 x 10 <sup>9</sup>	8,3 x 10 <sup>6</sup>	1,2 x 10 <sup>10</sup>

**Tabela III:** Comparação das médias (distribuição normal) obtidas nos três tratamentos realizados, média, IC95% e valor *p*, em *Balloniscus* spp.

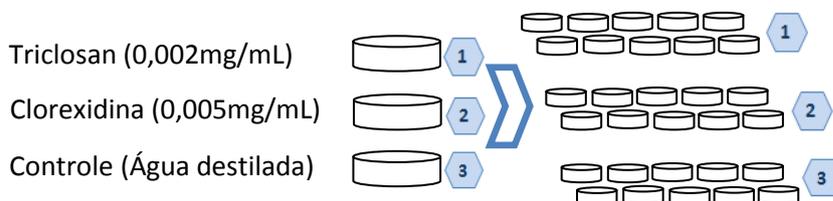
Tratamentos	Teste <i>t</i>			
	Média	Desvio Padrão	IC95%	Valor de <i>p</i>
Controle/Clorexidina	0,8229	0,4567	0,0962; 1,567	0,037
Controle/Triclosan	-2,3000	1,2517	-4,2916; -0,3083	0,035
Clorexidina/Triclosan	-3,1229	0,9111	-4,5727; -1,6731	0,006



**Figura I:** Índice de Shannon (dectis/ind) para os três tratamentos, Triclosan (azul), Controle (vermelho) e Clorexidina (verde), e suas respectivas populações bacterianas (UFC/mL) e número absoluto de grupos semelhantes, em *Balloniscus* spp.



**Figura II:** Desenho amostral do primeiro experimento (exposição durante 14 dias), demonstrando os diferentes tratamentos aos quais *Balloniscus* spp. foi exposto.



**Figura III:** Desenho amostral do segundo experimento (exposição durante 4 dias), demonstrando os diferentes tratamentos aos quais *Balloniscus* spp. foi exposto.

**Tabela IV:** Isolados bacterianos agrupados de acordo com suas respectivas características morfológicas e o seu número absoluto nos três tratamentos realizados, em *Balloniscus* spp.

Unidade Bacteriana	Característica dos Isolados						No. de grupos morfológicamente semelhante (n)		
	Morfologia	Arranjo	Coloração de Gram	Oxidase	Catalase	Motilidade	Controle	Clorexidina	Triclosan
1	bacilo	isolado	-	+	-	NR	0	0	0
2	bacilo	isolado	-	-	-	NR	0	0	0
3	bacilo	isolado	-	+	+	+	0	0	1
4	bacilo	isolado	-	-	+	-	3	3	4
5	bacilo	isolado	-	-	+	+	1	0	3
6	bacilo	isolado	+	-	+	-	4	3	0
7	bacilo	isolado	+	-	+	-	0	2	0
8	bacilo	isolado	+	+	+	-	0	1	0
9	bacilo	isolado	+		+	+	1	0	0
10	bacilo	isolado	+	-	-	+	0	1	0
11	bacilo	paliçada	+	-	+	-	0	2	0
12	bacilo	paliçada	+		-		0	0	0
13	bacilo	paliçada	-	+	+	-	0	1	0
14	bacilo	paliçada	-	-	-	-	0	1	0
15	bacilo	paliçada	-	+	-	-	0	1	0
16	bacilo	paliçada	-	-	+	+	0	0	1
17	coco	isolado	+	NR	+	-	0	0	0
18	coco	isolado	-	NR	+	-	1	1	0
19	coco	staphylo	+	NR	-	-	0	0	1

## Conclusão geral

Existem poucos estudos que demonstram as consequências da interação do TCS com os organismos do solo, não havendo nenhum com isópodos terrestres, o que justificou o desenvolvimento deste estudo para determinar se a presença deste fármaco no meio ambiente pode ser um empecilho à sobrevivência destes animais. Tratando-se do segundo fármaco, a CHX, a problemática é ainda maior, não foram encontrados estudos que relatem sua interação com os organismos de solo, tornando-se imprescindível a presença de estudos deste tipo, logo que é um fármaco largamente utilizado e comprovadamente presente no ambiente.

Os resultados permitiram concluir que há diferenças na composição bacteriana do trato digestivo dos tratamentos, TCS e CHX, em relação ao grupo controle, as alterações que estes fármacos ocasionaram aumento de UFC no tratamento TCS e diminuição no tratamento CHX em relação ao controle, assim como diminuição da diversidade bacteriana no tratamento TCS e manutenção do valor aproximado ao controle em CHX.

Observaram-se também resultados significativos nas análises metabólicas de *Balloniscus* spp. em relação ao controle no tratamento CHX cujo substrato era um filtro de papel, este resultado se deu na taxa de assimilação e eficiência de assimilação, sendo significativamente inferiores ao controle. A ausência de diferenças significativas nas taxas de assimilação, consumo e na eficiência de assimilação nos tratamentos cujo substrato era o solo, podem ser explicados justamente pela presença do solo, propiciando as condições necessárias para que o isópodo conseguisse manter-se mesmo na presença do antimicrobiano.

As diferenças observadas entre os resultados obtidos nas análises bacterianas dos dois fármacos, possivelmente podem ser explicadas por suas características, a maneira como estes atuam sobre as bactérias. Havendo diminuição da diversidade e aumento na quantidade de colônias, refletindo em um estresse seletivo no caso do TCS, sendo este capaz apenas de matar algumas bactérias permitindo que outras crescessem em substituição. O contrário ocorreu no caso da clorexidina, no entanto, este resultado não deve ser desconsiderado, pois houve alteração na composição bacteriana. A diversidade manteve-se semelhante a do controle, mas o número de colônias diminuiu, sendo assim, observa-se além de sinais na diminuição da quantidade de colônias também na alteração

dos tipos de bactéria em relação ao controle, demonstrando que a presença do fármaco atuou sob a microbiota.

O presente trabalho permitiu trazer informações sobre influência dos fármacos em questão em meio terrestre e como estes afetam estes organismos, as bactérias do trato intestinal de *Balloniscus* spp. e conseqüentemente o próprio *Balloniscus* spp. Fazendo-se necessário mais estudos para determinar com precisão as conseqüências da presença destes fármacos no solo. Além disso, o estudo apresentou as primeiras informações sobre a composição bacteriana do trato digestivo *Balloniscus* spp. sendo que até o momento não foi encontrado trabalhos que relatassem informações sobre esta, observando-se a tabela 4 que houve prevalência de bacilos, arranjo isolado, gram-negativas, oxidase negativas e ausência de motilidade. Avaliamos assim a potencialidade da continuidade de experimentos com esses organismos para os fármacos em questão e outros comumente utilizados e descartados no ambiente natural.

## **Bibliografia**

ABREU, L. et al. Manual de Biologia dos solos tropicais: amostragem e caracterização da biodiversidade. Lavras: UFLA, 2010.

AJAO, et al, 2015. Mitochondrial toxicity of triclosan on mammalian cells. Toxicology Reports, v.2, p.624–637.

ALAKI, S. et al, 2002. Preventing the transfer of Streptococcus mutans from primary molars to permanent first molars using chlorhexidine. Pediatric Dentistry, v.24, p.103-108.

ARAÚJO, P.; TAITI, S, 2007. Terrestrial Isopods (Crustacea, Oniscidea) From Rocas Atoll, Northeasterns, Brazil. Arquivos do Museu Nacional, v.65, p.347-355.

BABICH, H. et al, 1995. Anin vitro study on the cytotoxicity of chlorhexidine digluconate to human gingival cells. Cell Biology and Toxicology, v.11, p.79-88.

BAILEY, A.; LONGSON, M, 1972. Virucidal activity of chlorhexidine on strains of Herpesvirus hominis, poliovirus, and adenovirus. Journal of Clinical Pathology, v.25, p.76-78.

BHARGAVA, H.; LEONARD, P, 1996. Triclosan: Applications and safety. American Journal of Infection Control, v.24, p. 209-218.

BUTLER, E. et al, 2011. Effects of triclosan in soil microbial respiration. Environmental Toxicology and Chemistry, v.30, p.360-366.

CARLSSON, G. et al, 2013. Toxicity of 15 veterinary pharmaceuticals in zebrafish (Danio rerio) embryos. Aquatic Toxicology, v.126, p.30–41.

CHOW, A.; HIRSCH, G.; BUTTAR, H, 1977. Nephrotoxic and hepatotoxic effects of triclosan and chlorhexidine in rats. Toxicology and Applied Pharmacology, v.42,p.1-10.

COLAÇO, R.; PERALTA-ZAMORA, P.; GOMES, E, 2014. Poluição por resíduos contendo compostos farmacologicamente ativos: aspectos ambientais, geração a partir dos esgotos domésticos e a situação do Brasil. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v.35, p.539-548.

CÓRDOVA-KREYLOS, A.; SCOW, K, 2007. Effects of ciprofloxacin on salt marsh sediment microbial communities. *The ISNE Journal*, v.1, p.585-595.

CROFTON , K. et al, 2007. Short-term in vivo exposure to the water contaminant triclosan: Evidence for disruption of thyroxine. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v.24, p.194-197.

DANN , A.; HONTELA , A, 2011. Triclosan: Environmental exposure, toxicity and mechanisms of action. *Journal of Applied Physiology*, v.31, p.285-311.

DERÍSIO, J., 2000. *Introdução ao controle de poluição ambiental*. 2. ed. São Paulo: Signus.

DEVRIES, S.; ZHANG , P, 2016. Antibiotics and the Terrestrial Nitrogen Cycle: A Review, v.2, p.51–67.

FACELLI, J.; PICKETT, S., 1991. Plant litter: its dynamics and effects on plant community structure. *Botanical Review*, v.57, p.1-32.

FURLAN, S. , 1996. Indicadores biogeográficos em fragmentos de Mata Atlântica insular e continental e suas possíveis implicações paleoambientais. *Revista do departamento de Geografia*, v.10, p.13-28.

GAROFALO, C. et al, 2007. Direct detection of antibiotic resistance genes in specimens of chicken and pork meat. *International Journal of Food Microbiology*, v.113, p.75-83.

GIANNELLI, M. et al, 2008. Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: A molecular and ultrastructural investigation. *Toxicology in Vitro*, v.22, p.308–317.

HASSAL, M.; RUSHTON, S. , 1982. The role of coprophagy in the feeding strategies of terrestrial isopods. *Oecologia*, v.53, p.374-381.

HASSALL, M. et al. , 2006. Biodiversity of terrestrial isopods along a gradient of disturbance in Sabah, East Malaysia. *European Journal of soil biology*, v.42, p.197-207.

HASSALL, M.; SUTTON, S. , 1977. The role of isopods as decomposers in a dune grassland ecosystem. *Scientific proceedings of the royal Dublin society*, v.6, p.235-245.

HEATH, R. et al. , 1999. Mechanism of Triclosan Inhibition of Bacterial Fatty Acid Synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, v.274, p.11110-11114.

HEILING , I.; CHANDLER , N. , 1998. Antimicrobial effect of irrigant combinations with in dentinal tubules. *International Endodontic Journal*, v. 31, p. 8-14.

HIDALGO, E.; DOMINGUEZ, C. , 2001. Mechanisms underlying chlorhexidine-induced cytotoxicity. *Toxicology in Vitro*, v.15, p. 271-276.

HIOM, S. et al, 1992. Effects of chlorhexidine diacetate on *Candida albicans*, *C. glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology*, v.72, p.335–340.

INHEN , K.; ZIMMER , M. , 2008. Selective consumption and digestion of litter microbes by *Porcellio scaber* (Isopoda: Oniscidea). *Pedobiologia*, v.53, p.335-342.

INSTITUTO TRATA BRASIL. Ociosidade das Redes de Esgoto. 184p. Fortaleza: Reinfra, 2015. Disponível em: <<http://www.tratabrasil.org.br/datafiles/estudos/ociosidade/relatorio-completo.pdf>> Acesso em:14 de setembro de 2016.

JESUS, F. et al, 2013. Lethal and sub lethal effects of the biocide chlorhexidine. *Ecotoxicology*, v.22, p.1348–1358.

JONES, R. et al, 2000. Triclosan: A review of effectiveness and safety in health care settings. *American Journal of Infection Control*, v.28, p.184-196.

KEMPER , N. , 2008. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators*, v.8, p.1-13.

KOSTANJSEK, R.; STRUS, J.; AVGUSTIN, G. , 2002. Genetic diversity of bacteria associated with the hindgut of the terrestrial crustacean *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). *Microbiology Ecology*, v.40, p.171-179.

LATCHA, D. et al, 2003. Photochemical conversion of triclosan to 2,8-dichlorodibenzo-p-dioxin in aqueous solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v. 158, p. 63-66.

LAVELLE, P. et al, 2006. Soil invertebrates and ecosystem services. *European Journal of Soil Biology*, v.42, p.3-15.

- LAWRENCE, J. et al, 2008. Community-Level Assessment of the Effects of the Broad-Spectrum Antimicrobial Chlorhexidine on the Outcome of River Microbial Biofilm Development. *Applied and environmental microbiology*, v.74, p.3541–3550.
- LI, Y. et al, 2012. Cytotoxicity and Genotoxicity of Chlorhexidine on macrophages in vitro. *Environmental Toxicology*, v.29, p.452-458.
- LIN , D. et al, 2010. Potential biochemical and genetic toxicity of triclosan as an emerging pollutant on earthworms (*Eisenia fetida*). *Chemosphere*, v.81, p.1328–1333.
- LINSENMAIR, K, 1984. Comparative studies on the social behaviour of the desert isopod *hemilepistus reaumuri* of a *Porcellio* species. Symposium of the zoological society of London, v.53, p.423-453.
- LIU, F. et al, 2009a. Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities. *Environmental Pollution*, v.157, p.1636–1642.
- LIU , F. et al, 2009b. Terrestrial ecotoxicological effects of the antimicrobial agent triclosan. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.72, p.86–92.
- MELLO, M. et al, 2011. Uso de antibióticos e leveduras para controle de podridão-mole em couve-chinesa. *Horticultura Brasileira*, v. 29, p.78-83.
- MIOTTO, P. et al, 2015. Medicamentos vencidos descartados no meio ambiente. *Revista Eletrônica Estácio Saúde*, v.4, p.41-51.
- PINTO , G. et al, 2014. Estudo do descarte residencial de medicamentos vencidos na região de Paulínia (SP), Brasil. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v.19, p.219-224.
- PUCHER, J.; DANIEL, C, 1992. The Effects of Chlorhexidine Digluconate on Human Fibroblasts In Vitro. *Journal of Periodontology*, v.63, p.526-532.
- QUADROS , A., 2010. Os isótopos terrestres são boas ferramentas para monitorar e restaurar áreas impactadas por metais pesados no Brasil? *Oecologia Australis*, v.14, p.569-583.
- RODRICKS, J. et al, 2010. A critical review of the experimental data and development of margins of safety for consumer products. *Critical Reviews in Toxicology*, v.40, p.422-484.

RODRIGUES, P. et al, 2009. Condições de estabilidade para preparações magistrais contendo clorexidina. *Colloquium Vitae*, v.1, p. 137-142.

SANCHEZ-PRADO, L. et al, 2006. Monitoring the photochemical degradation of triclosan in water by UV light and sunlight using solid-phase microextraction. *Chemosphere*, v.65, p.1338-1347.

SARMAH, A.; MEYER, M.; BOXALL, A., 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence fate and effects of veterinary antibiotics (Vas) in the use environment. *Chemosphere*, v.65, p.725-759.

SCHMALFUSS, H., 2003. World catalog of terrestrial isopods (Isopoda: Oniscidea). Germany: Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde.

SENA, N. et al, 2006. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *International Endodontic Journal*, v.39, p.878-885.

SFENTHOURAKIS, S., 1992. Altitudinal effects on species richness of Oniscidea (Crustacea; Isopoda) of three mountains in Greece. *Global Ecology and Biogeography Letters*, v.2, p.157-164.

SIRTORI, C.; LÓPEZ, A.; RODRIGUEZ, S., 2010. Análisis de proceso de transformación biológica, foto-química y fotocatalítica de fármacos en agua. Madrid: Ciemat.

STEINBERG, D.; ROTHMAN, M., 1996. Antibacterial effect of chlorhexidine on bacteria adsorbed onto experimental dental plaque. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v.26, p.109-115.

STEWART, M. et al, 1999. Structural basis and mechanism of enoyl reductase inhibition by triclosan. *Journal of Molecular Biology*, v.290, p.859-865.

SUNDSFJORD, A.; SIMONSEN, G.; COURVALIN, P., 2001. Human infections caused by glycopeptide-resistant *Enterococcus* spp: are they a zoonosis? *Clinical Microbiology and Infection*, v.54, p.16-33.

SWEETMAN, SC., 2007. Martindale: the complete drug reference. 35. ed. London: Pharmaceutical Press.

SZLÁVECZ, K.; POBOZNY, M., 1995. Coprophagy in isopods and diplopods: a case for indirect interaction. *Acta Zoologica Fennica*, v.196, p.124-128.

TOLEDO, G. et al, 2007. Desempenho de frangos de corte alimentados com dietas contendo antibiótico e/ou fitoterápico como promotores adicionados isoladamente ou associados. *Ciência Rural*, v.37, p.1760-1764.

TORTORA, G.; FUNKE, B.; CASE, C., 2000. Controle do crescimento microbacteriano. In: TORTORA, G.; FUNKE, B.; CASE, C. *Microbiologia*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 181-206.

TUF, I.; JEŘÁBKOVÁ, E., 2008. Diurnal epigeic activity of terrestrial isopods (Isopoda: Oniscidea). *Proceedings of the International Symposium of Terrestrial Isopod Biology*, p.167-172.

WANG, Y.; BRUNE, A.; ZIMMER, A., 2007. Bacterial symbionts in the hepatopancreas of isopods: diversity and environmental transmission. *Federation of European Microbiological Societies - Microbiology Ecology*, v.61, p.141-152.

WANG, X. et al., 2014. Assessment of toxic effects of triclosan on the terrestrial snail (*Achatina fulica*). *Chemosphere*, v.108, p.225-230.

YUEH, M. et al, 2014. The commonly used antimicrobial additive triclosan is a liver tumor promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.111, p.17200-17205.

ZIMMER, M., 2003. Habitat and resource use by terrestrial isopods (Isopoda, Oniscidea). In *Oniscidea Rolling into the New Millennium: Proceedings of the 5th International Symposium on the Biology of Terrestrial Isopods*, p.243-261.

ZIMMER, M., 2006. The role of animal-microbe interactions in isopod ecology and evolution. *Acta Biologica Benrodis*, v.13, p.127-168.