



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro de Ciência e Tecnologia

Faculdade de Engenharia

Carolina Gomes Moreira

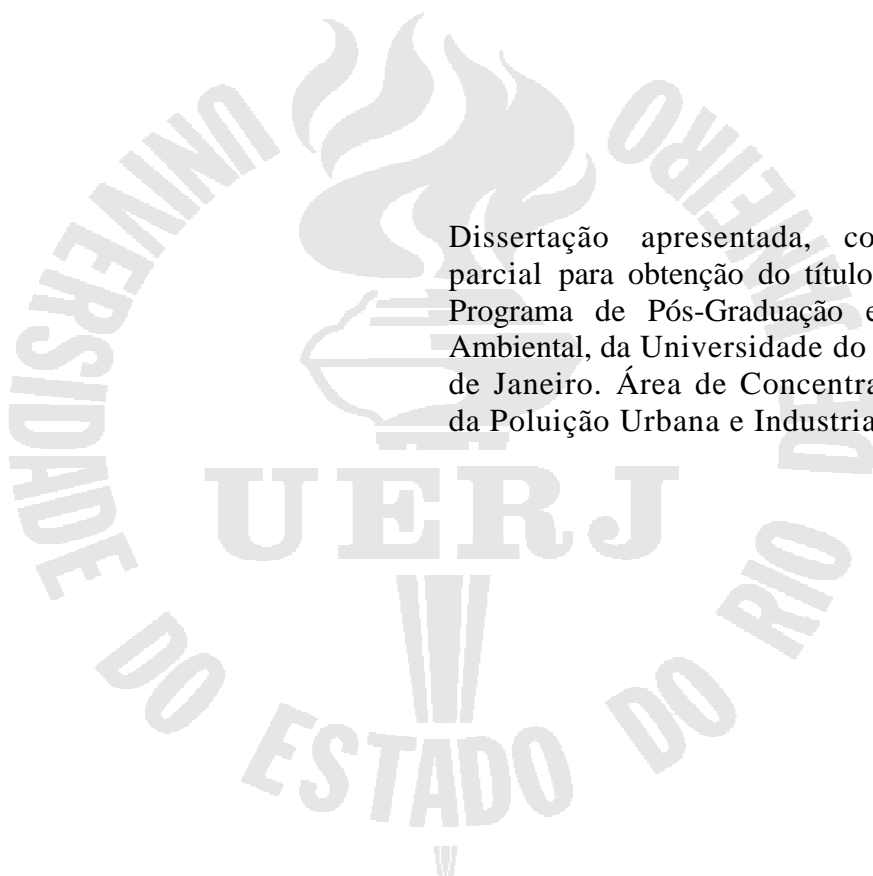
**Avaliação da presença de metilparabeno e propilparabeno no
ambiente aquático e seus potenciais estrogênicos
e a toxicidade aguda**

Rio de Janeiro

2014

Carolina Gomes Moreira

Avaliação da presença de metilparabeno e propilparabeno no ambiente aquático e seus potenciais estrogênicos e a toxicidade aguda



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de Concentração: Controle da Poluição Urbana e Industrial.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Daniele Maia Bila

Rio de Janeiro

2014

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC/B

M838 Moreira, Carolina Gomes.

Avaliação da presença de metilparabeno e propilparabeno no ambiente aquático e seus potenciais estrogênicos e a toxicidade aguda / Carolina Gomes Moreira. - 2014.

116 f.

Orientadora: Daniele Maia Bila.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Engenharia.

1. Engenharia Ambiental. 2. Contaminantes emergentes na água – Dissertações. I. Bila, Daniele Maia. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. IV. Título.

CDU 502.51:504.5

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Carolina Gomes Moreira

Avaliação da presença de metilparabeno e propilparabeno no ambiente aquático e seus potenciais estrogênicos e a toxicidade aguda

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de Concentração: Controle da Poluição Urbana e Industrial.

Aprovado em: 14 de abril de 2014.

Banca examinadora:

Prof.^a Dr.^a Daniele Maia Bila (Orientadora)
Faculdade de Engenharia - UERJ

Prof. Dr. Alexsandro Araújo da Silva
Instituto de Química - UERJ

Prof.^a Dr.^a Fabiana Valeria da Fonseca Araújo
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Rio de Janeiro

2014

DEDICATÓRIA

Dedico primeiramente este trabalho a Deus, por me amar tanto e me proporcionar mais esta conquista em minha vida, e aos meus pais, por todo amor, apoio, incentivo e confiança dedicados a mim.

AGRADECIMENTOS

Eu vou começar agradecendo àquele que está lá em cima, no céu, cujo nome é Deus, este que me abençoa todos os dias da minha vida, desde a hora em que acordo. São tantas as coisas boas que Deus me proporciona, que vão desde o simples ato de respirar ao aprender. Agradeço também pela minha saúde, pois com ela posso correr atrás dos meus sonhos e aproveitar a cada oportunidade que tenho, principalmente de crescer profissionalmente e evoluir como ser humano, para assim contribuir cada vez com a sociedade e a ciência.

A vocês, Luiz Beja Moreira e Celma Gomes Moreira que com o seu amor e dedicação me tornaram no ser humano que sou hoje. A educação que me deram não poderia ter sido melhor e também um amor gratuito e incondicional que só se recebe de pais para filho. Obrigada pela paciência, compreensão e tempo, são tantas coisas que recebi que não existem palavras para expressar tal admiração e amor que sinto por vocês. Eu só agradeço a Deus todos os dias por ter me dado esse presentão, vocês. Paizinho e mãezinha essa é pra vocês!!

Ao meu irmão, Olavo e minha cunhada, Helma pelo incentivo, apoio e torcida. Amo vocês!

A melhor orientadora do mundo, Daniele Maia Bila, esta que é realmente uma amiga, me ajudou numa das decisões mais importantes da minha vida e que graças a ela eu tive a oportunidade de concorrer a dois processos seletivos de doutorado. Muito obrigada por seu carinho, atenção, por ser tão doce e amiga e mais que tudo muito obrigada por acreditar em mim e no meu potencial. Vou fazer o doutorado na UFRJ e espero trabalhar ainda mais com a senhora porque estou saindo da UERJ, mas não do Laboratório de Engenharia Sanitária e nem da sua vida, tá?

A minha prima Pakissa Rivero que me acolheu nas horas em que eu mais precisei de um abrigo, devido a minha moradia ser muito longe fiquei por diversas vezes em sua casa e pelos últimos seis meses acabei morando. Muito obrigada pelos conselhos, puxões de orelha, palavras de consolo, colo e pelo seu cuidado

tremendo. Por mim eu não sairia nunca mais do Rio de Janeiro, aprendi a amar esse lugar, conheci pessoas maravilhosas que quero levar pro resto da vida.

Aos meus outros familiares, obrigada pelo carinho e apoio.

Aos professores e funcionários do Departamento de Ciências Ambientais da UFRRJ, por acreditarem e confiarem em mim. E também por me liberarem para cursar o Mestrado. Farei um agradecimento especial ao prof. Junior pelos conselhos e também por estar ao meu lado sempre.

Aos alunos de Iniciação Científica do Laboratório de Engenharia Sanitária (LES) que me ajudaram muito nas análises experimentais e que acabaram virando meus amigos, Artur e Tamires. Vou fazer um agradecimento especial para Louise, um ser lindo, competente, prestativo e muito inteligente, me ajudou muito e sempre com um sorriso no rosto e a quem eu costumo chamar de lindinha. Ao técnico do LES, Sidnei, o meu muito obrigada.

Aos amigos da Fiocruz, estes que conheci nos 40 minutos do segundo tempo, pessoas maravilhosas que tive a sorte de conhecer e criar laços de amizade, Renato, Glau, Tais, Carol, cada um me ajudou de uma forma. Em especial vai um agradecimento a Eline, que dedicou bastante do seu tempo em prol do meu trabalho e se não fossem vocês a cromatografia não tinha saído.

As amigas de Seropédica, Camila, Pammella, Lívia, Roberta, Vanessa, Daiane e Fabiane, muito obrigada pela amizade e pelas milhares de horas de risadas.

As amigas do Rio, Luiza, Sol, Flavinha, Paty, muito obrigada pelas risadas no carnaval e pela diversão garantida sempre.

Um agradecimento especial a Ana Carolina, minha amiga desde a infância, nunca desistiu de mim e sempre me motivou a crescer e a crer que o céu é o limite. Minha professora de carioquês, foi comigo comprar um patins e nos tornamos parceiras no esporte, me apresentou a gastronomia e os ritmos, carioca, ou seja, me tornei também graças a essa minha amiga linda uma carioca nata. Te amo muito!!!

À minha prima Mariana que me acompanhou na reta final e aturou muitas das minhas enxaquecas, TPMs e lágrimas. Obrigada pelos conselhos e a motivação para seguir em frente, minha parceira de brigadeiro, doritos e docinho de leite ninho.

À minha prima querida, Carlinha, muito obrigada pela compreensão por não ter acompanhado muito esse momento único da gravidez da minha afilhada linda e muito amada, Zoé. Eu não te conheço ainda, mas já te amo muito, Zoé, minha filhinha.

RESUMO

MOREIRA, Carolina Gomes. *Avaliação da presença de metilparabeno e propilparabeno no ambiente aquático e seus potenciais estrogênicos e a toxicidade aguda*. 2014. 116f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Sanitária e Ambiental) – Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Atualmente no cenário mundial a qualidade da água tem gerado muitas preocupações, pois milhares de produtos sintéticos são produzidos para facilitar muitas práticas industriais, domésticas e pessoais e com isso diversas substâncias químicas utilizadas para esses fins são introduzidas no meio ambiente. Os parabenos são substâncias químicas utilizadas pelas indústrias farmacêuticas, de alimentos e cosméticos e que cuja função é a conservação, sendo que há muitos questionamentos em relação a sua segurança, pois alguns relatórios têm mostrado que a exposição a esses parabenos pode modular ou perturbar o sistema endócrino e com isso gerar consequências prejudiciais à saúde humana e aos ambientes aquáticos. Esse estudo teve como objetivo avaliar a presença dos Parabenos Metilparabeno e Propilparabeno no ambiente aquático e os seus potenciais estrogênicos e a toxicidade aguda. A metodologia se desenvolveu a partir do ensaio *in vitro* YES para a determinação da atividade estrogênica, ensaios de toxicidade aguda em *Daphnia similis* e em *Aliivibrio fischeri* e a quantificação dos parabenos na água do Rio Maracanã-RJ através da cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa. Os resultados obtidos para a CE50 dos MP e PP, a partir do ensaio *in vitro* YES, foi de 18,91 mgL⁻¹ e 7 mgL⁻¹ e a magnitude da resposta foi de 10⁻⁵ e 10⁻⁴ menos potente que 17β-estradiol para o MP e o PP, respectivamente. A partir do ensaio de toxicidade aguda, os valores de CE50 obtidos em *Daphnia similis*, foi de 29,42 mgL⁻¹ e 9,94 mgL⁻¹ e em *Aliivibrio fischeri* foi de 3,047 mgL⁻¹ e 1,946 mgL⁻¹, respectivamente, com isso observou-se que o PP é mais tóxicos em todos os organismos testados, sendo mais tóxicos para um e menos para outros. A água do Rio Maracanã não foi tóxica para a *Daphnia similis* em nenhum dos dois pontos, já para o *Aliivibrio fischeri* foi tóxica em apenas um ponto. As concentrações encontradas de MP e PP foram maiores no ponto onde, de acordo com os parâmetros físico-químicos, a qualidade da água não está dentro dos padrões exigidos pela legislação, sendo quantificados na ordem de ngL⁻¹, contudo é válido ressaltar que os DEs não são encontrados no meio ambiente separados, eles interagem entre si e provocam efeitos aditivos ou sinérgicos, sendo muito difícil de prever qual o efeito, por isso é importante o conhecimento do potencial estrogênico das substâncias simples, pois em um estudo com uma matriz ambiental, pode-se observar se houve algum efeito aditivo ou sinérgico de outras substâncias.

Palavras-chave: Contaminantes emergentes; Parabenos; YES; Toxicidade aquática; Desreguladores endócrinos.

ABSTRACT

MOREIRA, Carolina Gomes. *Evaluation of the presence of methylparaben and propylparaben in the aquatic environment and their potential estrogenic and acute toxicity*. 2014. 116f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Sanitária e Ambiental) – Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Currently on the world stage water quality has generated many concerns, because thousands of synthetic products are produced to facilitate many industrial, domestic and personal practices and thereby various chemicals used for these purposes are introduced into the environment. Parabens are chemicals used by the pharmaceutical, food and cosmetic and whose function is to conserve, and there are many questions regarding its safety, as some reports have shown that exposure to these parabens can modulate or disrupt endocrine system and thereby generate harmful consequences for human health and aquatic environments. The aim of this study was to evaluate the presence of Methylparaben and Propylparaben in the aquatic environment and their potential estrogenic and acute toxicity. The methodology developed from the in vitro YES assay for the determination of estrogenic activity, acute toxicity tests with *Daphnia similis* and *Aliivibrio fischeri* and quantification of parabens in water of Maracanã River – RJ by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. The EC50 results for the PP and MP, from the in vitro YES, was 18,91 mgL⁻¹ and 7 mgL⁻¹ and the magnitude of response was less potent 10⁻⁵ and 10⁻⁴ that 17β - estradiol for MP and PP, respectively. From the acute toxicity test, the EC50 values obtained in *Daphnia similis* was 29,42 mgL⁻¹ and 9,94 mgL⁻¹, and *Aliivibrio fischeri* was 3,047 mgL⁻¹ and 1,946 mgL⁻¹, respectively, with it was observed that PP is more toxic in all organisms tested, and more toxic to one and less to others. The water of the Maracanã River was not toxic to *Daphnia similis* in either points, since for *Aliivibrio fischeri* was toxic at only one point. Found concentrations of MP and PP were higher at the point where, according to the physico-chemical parameters, water quality is not within the standards required by legislation and quantified in order ngL⁻¹, however it's worth to note that the DEs are not found in the middle separate environment, they interact with each other and cause additive or synergistic effects, it's very difficult to predict what effect, so it's important to know the estrogenic potential of simple substances, since in a study with an environmental matrix, one can observe if there were any additive or synergistic effect of other substances.

Keywords : Emerging contaminants; Parabens; YES, Aquatic toxicity; Endocrine disruptors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema do sistema de expressão estrogênio-induzível na levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Fonte: ROUTLEDGE; SUMPTER, 1996)	33
Figura 2	Placa de 96 poços contendo substâncias estrogênicas na ordem de mais concentrado para menos concentrado (Fonte: BILA, 2005).	34
Figura 3	Estrutura química do 17 β -estradiol (Fonte: BILA, 2005)	35
Figura 4	O Sistema Endócrino (Fonte: http://dugabrielcruz.blogspot.com.br/2010/10/sistema-endocrino.html , acessado em 20/01/14).	35
Figura 5	Disfunções endócrinas (Fonte: GHISELLI & JARDIM, 2007).	36
Figura 6	Estrutura química do parabeno, onde R = metil (CH ₃), etil (C ₂ H ₅), propil (C ₃ H ₇), butil (C ₄ H ₈) e benzil (CH ₂ -C ₆ H ₅) (Fonte: http://pt.wikipedia.org/wiki/Parabenos , acessado em 20 de janeiro de 2014).	40
Figura 7	Esquema sintético das reações realizadas para obtenção dos parabenos 1-5 (Fonte: FERNANDES et al., 2013).	41
Figura 8	<i>Daphnia similis</i> . (Fonte: http://cursos.unisanta.br/quimica/laborato/daphnia.html , acessado em 18/01/14).	49
Figura 9	<i>Aliivibrio fischeri</i> emitindo sua luz natural. Cada ponto representa uma colônia de 10 a 100 milhões de células cultivadas numa placa de petri (Fonte: http://labs.medmicro.wisc.edu/mcfall-ngai/media/news_fall09.html , acessado em 18/01/14).	51
Figura 10	Etapas da SPE (Fonte: CALDAS et al., 2011).	55
Figura 11	Localização dos pontos de amostragem no Rio Maracanã	62
Figura 12	Foto do ponto 1 de coleta no Rio Maracanã - Alto da Boa Vista	63

Figura 13	Foto do ponto 2 no Rio Maracanã– Descida do Alto da Boa Vista	63
Figura 14	Placa de análise do ensaio YES após o período de incubação (72h) (Fonte: BILA, 2005).	71
Figura 15	Gráfico dose-resposta ilustrando os pontos utilizados para o cálculo do CE50 (Fonte: ALEXANDER et al., 1999).	74
Figura 16	Foto dos frascos de cultivo da <i>Daphnia similis</i> na estufa de fotoperíodo.	77
Figura 17	Foto dos tubos de ensaio na estufa na realização dos testes de toxicidade aguda com <i>Daphnia similis</i> das substâncias metilparabeno e propilparabeno	79
Figura 18	Foto do equipamento Microtox SDI, 500 Analyser, utilizado no ensaio com a bactéria <i>Aliivibrio fischeri</i>	81
Figura 19	Esquema da realização das diluições seriadas das amostras sintéticas nos ensaios com <i>Aliivibrio fischeri</i>	82
Figura 20	Esquema da adição da amostra diluída à bactéria diluída em NaCl 2%, em duplicata	83
Figura 21	Foto dos aparatos de filtração à vácuo com membrana	85
Figura 22	Foto dos aparatos de extração EFS	86
Figura 23	Foto do aparato de secagem com fluxo de nitrogênio	87
Figura 24	Foto do equipamento CLAE-EM/EM	87
Figura 25	Fluxograma para a determinação dos parabenos por CLAE-EM/EM das amostras coletadas no Rio Maracanã	88
Figura 26	Foto das placas de 96 poços no ensaio YES das amostras de metilparabeno a 3,2 gL ⁻¹ , de propilparabeno a 0,2 gL ⁻¹ e do 17β-estradiol a 5,44x10 ⁻⁵ gL ⁻¹ .	92
Figura 27	Foto da placa de 96 poços no ensaio YES: linhas A e C contendo metilparabeno a 3,2 gL ⁻¹ e linhas E e G contendo propilparabeno a 0,2 gL ⁻¹	93
Figura 28	Foto da placa de 96 poços no ensaio YES: linhas A e C contendo 17β-estradiol na faixa de concentração de 5,44x10 ⁻⁵ gL ⁻¹ .	93

Figura 29	Curva dose resposta do 17 β -estradiol obtida na faixa de 5,44x10 ⁻² mgL ⁻¹ a 2,66x10 ⁻⁵ mgL ⁻¹	94
Figura 30	Curva dose resposta do parabeno Metilparabeno obtida na faixa de 3200 mgL ⁻¹ a 1,56 mgL ⁻¹ .	95
Figura 31	Curva dose resposta do parabeno Propilparabeno obtida na faixa de 200 mgL ⁻¹ a 0,098 mgL ⁻¹ .	96
Figura 32	Curva dose resposta no ensaio YES dos parabenos e do 17 β -estradiol.	97
Figura 33	Curva de Calibração preparada com solventes MeOH:H ₂ O (70:30, v/v) e padrão analítico	103
Figura 34	Curva de Calibração preparada com solventes MeOH:H ₂ O (70:30, v/v) e padrão analítico	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Descrição geral e propriedades físico-químicas dos parabeno (Fonte: SONI et al., 2005).	42
Tabela 2	Espécies de organismos-teste para ensaios ecotoxicológicos utilizados no Brasil (Fonte: ARENZON, 2011)	48
Tabela 3	Valores da CE50 dos metil- e propilparabeno em <i>Daphnia magna</i> e <i>Aliivibrio fischeri</i> encontrados na literatura	53
Tabela 4	Concentrações dos metil- e propilparabeno em águas superficiais copiladas da literatura	59
Tabela 5	Transições precursor-produto, modo de análise e tempo de retenção de cada composto	90
Tabela 6	Parâmetros físico-químicos analisados	91
Tabela 7	Valores da CE máxima, CE50, CE mínima e PR das substâncias estudadas obtidas pelo ensaio <i>in vitro</i> YES	97
Tabela 8	Valores da CE50 das substâncias MP e PP no ensaio de toxicidade aguda com o microcrustáceo <i>Daphnia similis</i>	98
Tabela 9	Toxicidade aguda das substâncias metilparabeno e propilparabeno no ensaio de toxicidade aguda com a bactéria <i>Aliivibrio fischeri</i>	99
Tabela 10	Comparação dos valores de CE50 obtidas na literatura com as obtidas nesse trabalho para as mesmas substâncias estudadas	100
Tabela 11	Resultados dos valores de CE50 do MP e do PP obtidas nos testes de toxicidade aguda em <i>Daphnia similis</i> , <i>Aliivibrio fischeri</i> e ensaio <i>in vitro</i> YES.	101
Tabela 12	Resultados dos parâmetros físico-químicos da água do Rio Maracanã na primeira e na segunda coleta	102
Tabela 13	Concentrações dos MP e PP detectadas na água do Rio Maracanã na primeira e na segunda coleta	104

Tabela 14 Valores de CE50 em *Daphnias similis* e *Aliivibrio fischeri* da 105
água da primeira e da segunda coleta do Rio Maracanã

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Compostos classificados como desreguladores endócrinos	29
Quadro 2	Condições cromatográficas do método utilizado para a determinação dos parabenos.	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CE50	Concentração efetiva a 50% dos organismos-teste
FT	Fator de toxicidade
DEs	Desreguladores endócrinos
DEs	Disruptores endócrinos
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ETA	Estação de Tratamento de Água
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
ETAR	Estação de Tratamento de Água Residuária
GRAS	Generally Recognized as Safe
IEs	Interferentes endócrinos
REh	Receptor de estrogênio humano
SCOGS	Select Committee on Generally Recognized as Safe substances
CG	Cromatografia a Gás
CL	Cromatografia a Líquido
EM	Espectrometria de Massa
TS	Termospray
API	Atmospheric pressure ionization
ESI	Electrospray ionization
APCI	Atmospheric pressure chemical ionization
SRM	Selected reaction monitoring
MRM	Multiple reaction monitoring
QqQ	Triplo quadrupolo
PI	Padrão interno
RP	Reversed-phase
LLE	Liquid-Liquid Extraction
SPME	Solid phase micro-extraction

MS-MS	Tandem Mass Spectrometry
PEs	Pertubadores endócrinos
POE	Poluentes orgânicos emergentes
POP	Produtos orgânicos persistentes
pKa	Constante de dissociação de um ácido
PPM	Partes por milhão
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food and Drug Administration
SPE	Solid Phase Extraction
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
EQ-E2	Equivalentes de Estradiol
PR	Potência Relativa
YES	Yeast Estrogen Screen
BLYES	Bioluminescence Estrogen Assay
CPRG	Clorofenol vermelho-β-D-galactopiranosida
BA	Ácido benzóico
AS	Ácido Sórbico
DHA	Ácido Desidroacético
MP	Metilparabeno
PE	Etilparabeno
PP	Propilparabeno
IPP	Isopropilparabeno
BP	Butilparabeno
IBP	Isobutilparabeno
HP	Hexilparabeno
C ₈ H ₈ O ₃	Metilparabeno
C ₉ H ₁₀ O ₃	Etilparabeno
C ₁₀ H ₁₂ O ₃	Propilparabeno
C ₁₁ H ₁₄ O ₃	Butilparabeno
-CH ₃	Metil
-C ₂ H ₅	Etil
-C ₃ H ₇	Propil
-C ₄ H ₈	Butil

$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$	Benzil
Mg	Miligrama
mgL^{-1}	Miligrama/Litro
mg/dia	Miligrama/dia
mg/Kg/dia	Miligrama/Kilograma/dia
Kg	Kilograma
Mm	Milímetro
μgL^{-1}	Micrograma/Litro
ngL^{-1}	Nanograma/Litro

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	21
1	OBJETIVOS	24
1.1	Geral	24
1.2	Específicos	24
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1	Micropoluentes	25
2.1.1	<u>Desreguladores Endócrinos</u>	26
2.1.1.1	Atividade Estrogênica	30
2.1.1.2	Ensaio <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> para a determinação da atividade estrogênica	31
2.1.2	<u>Desreguladores Endócrinos e o Sistema Endócrino</u>	35
2.1.3	<u>Desreguladores Endócrinos no Meio Ambiente</u>	37
2.2	Parabenos	39
2.2.1	<u>Descrição, propriedades e funções dos parabenos</u>	39
2.2.2	<u>Legislação e Aplicação</u>	43
2.2.3	<u>Parabenos e os Desreguladores endócrinos</u>	45
2.3	Toxicologia Aquática	47
2.3.1	<u>Ensaio de toxicidade aquática</u>	47
2.3.1.1	<i>Daphnia similis</i>	49
2.3.1.2	<i>Aliivibrio fischeri</i>	50
2.3.2	<u>Parabenos e a Toxicidade Aguda Aquática</u>	52
2.4	Método Analítico para determinação de parabenos em matrizes aquáticas	53
2.4.1	<u>Extração, limpeza (clean up) e concentração dos analitos</u>	54
2.4.2	<u>Separação e detecção</u>	56

2.4.3	<u>Alguns exemplos de concentrações dos parabenos detectados em matrizes ambientais</u>	58
3	DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO	60
3.1	Rio Maracanã	60
3.2	Amostragem	61
4	MATERIAIS E MÉTODOS	64
4.1	Ensaio YES (Yeast Estrogen Screen)	64
4.1.1	<u>Preparo das amostras sintéticas dos parabenos</u>	64
4.1.2	<u>Preparo das soluções do ensaio YES</u>	65
4.1.2.1	Meio Mínimo	65
4.1.2.2	Solução de vitamina	66
4.1.2.3	Solução de glucose	66
4.1.2.4	Solução de ácido L-aspártico	66
4.1.2.5	Solução de L-treonina	67
4.1.2.6	Solução de sulfato de cobre (II)	67
4.1.2.7	Solução de CPRG (Clorofenol vermelho β -D-Galactopiranosida)	67
4.1.2.8	Meio de cultivo	67
4.1.3	<u>Cultivo da cepa</u>	68
4.1.4	<u>Procedimento do teste YES</u>	69
4.1.4.1	Diluições das amostras dos padrões sintéticos	69
4.1.4.2	Diluições da curva padrão de 17 β -estradiol	70
4.1.4.3	Preparo do meio de análise para o teste YES	70
4.1.5	<u>Preparo das placas de teste</u>	71
4.1.6	<u>Análise dos dados do ensaio YES</u>	72
4.2	Ensaio de Ecotoxicidade Aguda	76
4.2.1	<u>Preparo das amostras sintéticas para os ensaios de ecotoxicidade aguda</u>	76

4.2.1.1	Em <i>Daphnias similis</i>	76
4.2.1.2	Em <i>Aliivibrio fischeri</i>	76
4.2.2	<u>Ensaio de toxicidade aguda com microcrustáceo <i>Daphnia similis</i></u>	77
4.2.2.1	Cultivo e preparo do organismo-teste	77
4.2.2.2	Procedimento do ensaio	78
4.2.3	<u>Ensaio de toxicidade aguda com bactéria luminescente <i>Aliivibrio fischeri</i></u>	80
4.2.3.1	Cultivo e preparo do organismo-teste	80
4.2.3.2	Procedimento do ensaio	80
4.3	Preparo das amostras coletadas para a cromatografia	84
4.3.1	<u>Limpeza das vidrarias</u>	84
4.3.2	<u>Coleta e Armazenamento das amostras</u>	84
4.3.3	<u>Preparo da amostra e extração em fase sólida (EFS)</u>	85
4.4	Determinação de metil- e propilparabeno por CLAE-EM/EM	89
4.5	Determinação dos parâmetros físico-químicos	91
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	92
5.1	Ensaio <i>in vitro</i> YES das substâncias MP e PP	92
5.2	Ecotoxicidade Aguda dos parabenos MP e PP	98
5.3	Comparação dos resultados dos ensaios de toxicidade aguda e do ensaio <i>in vitro</i> YES	101
5.4	Caracterização físico-química da água do Rio Maracanã	102
5.5	Quantificação dos MP e PP na água do Rio Maracanã	103
5.6	Ecotoxicidade Aguda da água do Rio Maracanã	105
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES	106
	CONCLUSÕES	106
	REFERÊNCIAS	107