

## INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o crescimento populacional e industrial vem ocorrendo de forma acelerada e com isso os problemas ambientais vão se tornando mais frequentes, podendo ser observado em alterações na qualidade da água, do solo e do ar (KUNZ, 2002).

Atualmente, no cenário mundial a qualidade da água tem gerado muita preocupação, sobretudo, no que tange à avaliação do esgoto bruto, do tratado, das águas destinadas ao abastecimento público e industrial, devido à presença de algumas substâncias, que mesmo em baixas concentrações de  $\mu\text{gL}^{-1}$  e  $\text{ngL}^{-1}$ , são potencialmente prejudiciais ao ambiente e aos seres vivos (BILA; DEZOTTI, 2007).

Dezenas de milhares de produtos sintéticos são produzidos para facilitar as práticas industriais, domésticas e pessoais com isso, muitas substâncias químicas utilizadas para esses fins são introduzidas no ambiente. Sendo que muitas são lançadas *in natura* nos corpos d'água, ou enviadas para as estações de tratamento de esgoto (ETE). Além disso, os processos de tratamento convencional da maioria das ETE e das estações de tratamento de água (ETA) não removem suficientemente algumas dessas substâncias que são chamadas de micropoluentes, justamente por estarem presentes em baixas concentrações, impondo assim, riscos constantes aos seres humanos e outros animais (BILA; DEZOTTI, 2003, 2007).

Dentre esses micropoluentes estão os desreguladores endócrinos que são substâncias químicas suspeitas de causarem efeitos adversos ao sistema endócrino de humanos e animais. Com isso, é crescente o interesse da comunidade científica pela presença desses micropoluentes no meio ambiente, pois são suspeitos de serem responsáveis pela incidência de anomalias no sistema endócrino de animais, câncer em humanos, a redução na quantidade de esperma, o desenvolvimento de resistências em bactérias, entre outras (BILA; DEZOTTI, 2003).

A comunidade científica ainda tem uma grande incerteza sobre se há ou não um risco significativo para a saúde humana em função dos níveis desses compostos no ambiente (BAIRD; CANN, 2011).

Pertencentes a esse grupo dos desreguladores endócrinos destacam-se os parabenos que mesmo apresentando atividade estrogênica fraca passaram a ter um interesse considerável dos seus efeitos tóxicos em uma contínua exposição a baixos níveis devido à recente descoberta de parabenos em amostras de tecidos humanos de tumores da mama (DARBRE, 2004; CANOSA, 2006).

Em relação ao meio ambiente, as informações disponíveis dos níveis e possíveis efeitos a longo prazo dos parabenos na vida selvagem ainda são escassos. Estudos de laboratório confirmaram que a presença de parabenos e outras substâncias com potenciais estrogênicos relativamente fracos (por exemplo, genisteína, benzofenona, bisfenol A, etc) em uma mesma amostra e em concentrações abaixo do seu nível de efeito não observado, pode resultar em uma considerável atividade estrogênica global para a amostra, isso devido ao efeito sinérgico que resulta em um efeito estrogênico maior nos ambientes aquáticos. Portanto, parabenos devem ser adicionados a lista de produtos químicos domésticos cujos níveis ambientais devem ser mantidos sob vigilância (CANOSA, 2006).

Águas residuais urbanas constituem uma das principais fontes dessas substâncias na biosfera e, portanto, devem ser o primeiro compartimento a ser investigado, a fim de conhecer os níveis de parabenos e compreender o seu destino nos meios aquáticos (CANOSA, 2006).

Grandes quantidades de substâncias químicas são lançadas nos corpos hídricos, provocando alterações no seu estado biológico, químico e físico. Com isso, o círculo vicioso se fecha, porque, assim como a fauna e a flora dos ecossistemas, os causadores da poluição também são prejudicados, pois precisam de água limpa para os diversos fins (KNIE; LOPES, 2004).

Devido a essa poluição hídrica fica imprescindível uma fiscalização rigorosa do manejo e da liberação de substâncias químicas no meio ambiente, bem como um controle geral e eficiente da qualidade das águas e dos caminhos da sua contaminação (KNIE; LOPES, 2004).

Nesse estudo destacou-se duas substâncias químicas, o metilparabeno e o propilparabeno, ambos utilizados como aditivos nas indústrias farmacêuticas, alimentícias e de cosméticos e que cuja função é a conservação. Soni et al. (2005), avaliaram os parabenos e observaram que há um questionamento sobre a segurança dessas substâncias. Alguns estudos mostraram que a exposição a esses parabenos pode modular ou perturbar o sistema endócrino e com isso gerar prejuízos à saúde humana.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1. Geral

- Avaliar a presença dos Metilparabeno e Propilparabeno no ambiente aquático lacustre e seus potenciais estrogênicos e toxicidade aguda.

### 1.2. Específicos

- Avaliar a atividade estrogênica do Metilparabeno e Propilparabeno;
- Avaliar a toxicidade aguda do Metilparabeno e Propilparabeno com organismos-teste de dois níveis tróficos, o microcrustáceo *Daphnia similis* e a bactéria *Aliivibrio fisheri*;
- Quantificar o Metilparabeno e o Propilparabeno na água do Rio Maracanã – RJ;
- Avaliar a toxicidade aguda da água do Rio Maracanã com organismos-teste de dois níveis tróficos, o microcrustáceo *Daphnia similis* e a bactéria *Aliivibrio fisheri*.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Micropoluentes

Nas últimas duas décadas foi identificada uma nova ameaça para a saúde de animais, e possivelmente de humanos, expostos a compostos orgânicos sintéticos no ambiente. Tem sido demonstrado que certos compostos podem afetar a saúde reprodutiva e imunológica de organismos superiores, podendo também aumentar os índices de câncer em órgãos do sistema reprodutivo (BAIRD; CANN, 2011).

Substâncias químicas denominadas contaminantes emergentes, poluentes orgânicos emergentes (POE) ou micropoluentes levantam preocupações em relação as concentrações encontradas no meio ambiente e os seus possíveis efeitos à saúde humana e à vida aquática.

Segundo a Agência de Proteção Ambiental Americana, a classe de contaminantes emergentes se divide em cinco grupos (U.S. EPA, 2008):

- Poluentes orgânicos persistentes (POP): compostos utilizados em retardantes de chama, plastificantes (e.g. éteres difenílicos polibromados), assim como ácidos orgânicos perfluorados;
- Fármacos e produtos de cuidado pessoal: incluem os fármacos de uso humano com prescrição ou venda livre, bactericidas, protetores solares e fragrâncias;
- Medicamentos veterinários: antibióticos, antifúngicos e hormônios;
- Desreguladores endócrinos: este grupo inclui hormônios naturais e sintéticos, pesticidas, alquilfenóis, etc.;
- Nanomateriais: nanotubos de carbono, dióxido de titânio particulado em nano escala, etc.

Os contaminantes emergentes são compostos químicos presentes numa variedade de produtos comerciais como medicamentos, produtos de uso veterinário, embalagens de alimentos, produtos de higiene, agrotóxicos, etc., podendo ser ainda qualquer microrganismo, que possa ser encontrado em matrizes ambientais e

biológicas, sendo que, não são usualmente monitorados ou que ainda não possuem legislação regulatória correspondente, mas que apresentam risco potencial à saúde humana e ao meio ambiente (SILVA; COLLINS, 2011).

Toneladas dessas substâncias são produzidas e comercializadas mundialmente, sendo consumidas pela população e inseridas no meio ambiente através do esgoto doméstico e em resíduos agrícolas e industriais, sendo que acabam alcançando os corpos hídricos devido à ineficiência dos tratamentos de esgoto tradicionais, além do descarte inadequado (SANSON, 2012).

Essas substâncias são encontradas no meio ambiente em concentrações muito pequenas na ordem de  $\mu\text{gL}^{-1}$  e  $\text{ngL}^{-1}$ , por isso são chamadas de micropoluentes, sendo que para algumas substâncias mesmo em quantidade reduzida é capaz de gerar efeitos deletérios nos organismos (BILA; DEZOTTI, 2007), sendo assim um estudo de seus efeitos no ambiente aquático se faz necessário.

Dentre os grupos citados será apresentada uma revisão da literatura mais aprofundada sobre os desreguladores endócrinos e uma abordagem da presença dos parabenos nessa categoria e a sua toxicologia aquática. Será abordada também técnicas para a identificação e quantificação dessas substâncias em uma matriz ambiental líquida.

#### 2.1.1. Desreguladores Endócrinos

Na década de 60, a presença dos compostos orgânicos no ambiente aquático ganhou destaque com a bióloga Rachel Carson quando publicou o livro “*Silent Spring*” (Primavera Silenciosa), onde denunciava as consequências ambientais do uso de pesticidas amplamente utilizados em todo o mundo, naquela época. E em 1997, com o livro “*Our Stolen Future*” (Nosso Futuro Roubado), Theo Colburn e colaboradores denunciaram os perigos de compostos como dietilestilbestrol, cuja ação interferia no sistema endócrino humano e animal.

Esses micropoluentes são conhecidos por diversas nomenclaturas, entre elas, Desreguladores endócrinos (DEs), Perturbadores endócrinos (PEs), Interferentes endócrinos (IEs) ou Disruptores endócrinos (DEs). Para alguns autores os DEs são somente as substâncias que se ligam a sítios receptores de hormônios, enquanto que para outros são quaisquer substâncias que causem desequilíbrio, interferência ou alteração no sistema endócrino, independentemente se atuam diretamente no sítio receptor ou não. Alguns autores definem um DE com base nos seus efeitos, ou seja, trata-se de substâncias químicas que, mesmo presentes em concentrações extremamente baixas, são capazes de interferir no funcionamento natural do sistema endócrino, podendo causar câncer e prejudicar os sistemas reprodutivos e ainda causarem outros efeitos adversos (BELFROID et al.,1999). São substâncias capazes de bloquear ou de estimular o sistema endócrino dos animais (AWWA, 2007).

Os DEs constituem um tópico internacionalmente importante, pois implicam diretamente na qualidade de vida dos seres humanos, na preservação da biota e na proteção dos recursos hídricos. A urbanização e a industrialização são os principais causadores da degradação progressiva e da má qualidade dos recursos hídricos, devido à presença desses compostos poluentes nos rios, lagos e reservatórios (AMÉRICO, et al., 2012).

No Brasil ainda existem poucos estudos sobre a ocorrência dos DEs no ambiente e os seus possíveis efeitos aos seres vivos (AMÉRICO, et al., 2012).

O sistema endócrino pode ser prejudicado pelos DEs de diversas formas, sendo as principais as seguintes: na diminuição da ação de um hormônio endógeno, como o estrogênio ou a testosterona, afetando assim as funções que esses hormônios desempenham e que são controladas; no bloqueio dos receptores hormonais nas células, impedindo assim a ação dos hormônios naturais; prejudicam a síntese, o transporte, o metabolismo e a excreção dos hormônios, afetando dessa forma as concentrações dos hormônios naturais no corpo. Essas alterações nas funções do sistema endócrino podem prejudicar a saúde do organismo, comprometendo a sua descendência ou uma (sub) população (BILA; DEZOTTI, 2003).

Alguns autores realizaram estudos sobre os efeitos que os DEs podem causar em alguns animais e concluíram que afetam na diminuição da eclosão de ovos de pássaros, peixes e tartarugas, na feminização de peixes machos, no sistema reprodutivo em peixes, répteis, pássaros e mamíferos e alteram o sistema imunológico de mamíferos marinhos. Em alguns casos esses efeitos podem conduzir ao declínio da população. Em seres humanos esses efeitos incluem a redução da quantidade de esperma, o aumento da incidência de câncer de mama, de testículo e próstata, e a endometriose (BIRKETT; LESTER, 2003).

Nesse estudo abordou-se a ação de duas substâncias sintéticas que apresentam atividade estrogênica como se fossem hormônios naturais e são chamadas de substâncias xenoestrogênicas.

Os DEs sintéticos (xenoestrogênios) são substâncias químicas de origem exógena, ou seja, de plantas, produtos sintéticos, poluentes ambientais, entre outros e que são capazes de interferirem na produção, liberação, transporte, metabolismo, ligação ou na liberação dos hormônios naturais. Podem também mimetizar a ação dos estrogênios e das moléculas atuantes em componentes do sistema endócrino (GOLOUBKOVA; SPRITZER, 2000). Estes compostos são amplamente utilizados pela sociedade moderna podendo ser encontrados também em produtos de uso pessoal, antioxidantes, plásticos, produtos industrializados e tensoativos entre outros (BILA; DEZOTTI, 2003).

Quadro 1 - Compostos classificados como desreguladores endócrinos

<b>Ftalatos</b>	<b>Pesticidas</b>
Dietilftalato (DEF) di-iso-butilftalato (DIBF) di-n-butilftalato (DBF) butilbenzilftalato (BBF) diciclohexiloftalato (DCHF) di-2-(2-etil-hexil)ftalato (DEHF) di-n-octilftalato (DOF) di-isooctilftalato (DIOF) di-iso-nonilftalato (DINF) di-iso-decilftalato (DIDF)	<b>Inseticidas</b> 2,2 bis-p-clorofenil-1,1,1-tricloroetano (DDT) 2,2 bis-p-clorofenil-1,1-dicloroetileno (DDE) Lindano Deltametrin Carbofurano <b>Herbicidas</b> Atrazina Linuron <b>Fungicidas</b> Vinclozolina Tridemorfos Carbendazina Penconazol Procloraz Procimidona Epoxiconazol
<b>Alquilfenóis</b>	
Nonilfenol (NF) Octilfenol (OF) Nonilfenol etoxilado Octilfenol etoxilado	
<b>Compostos orgânicos de estanho</b>	<b>Agentes terapêuticos e farmacêuticos</b>
Tributilestanho (TBE) Trifenilestanho (TFE)	Dietilestilbestrol (DES) 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2)
<b>Furanos e Dioxinas</b>	<b>Policlorados de bifenilas (PCB)</b>
Dibenzo-p-dioxina 2,3,7,8-tetraclorodibenzeno-p-dioxina (TCDD) 2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano (TCDF)	2,4,4'-triclorobifenil 2,2',5,5'-tetraclorobifenol 2,2',4,5,5'-pentaclorobifenil 2,3,4,4',5-hexaclorobifenil 2,2',3,4,4',5-hexaclorobifenil 2,2',3,4,4',5,5'-heptaclorobifenil
<b>Bisfenol</b>	<b>Parabenos</b>

Continuação do Quadro 1 - Compostos classificados como desreguladores endócrinos

Bisfenol A (BPA)	Benzilparabeno Butilparabeno Etilparabeno Isobutilparabeno n-propilparabeno metilparabeno
<b>Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos</b>	<b>Retardantes de chama bromados</b>
Naftalina Acenaftileno Fluoreno Fenantreno Antraceno Fluoranten Pireno Benzo[a]antraceno Criseno Benzo[b]fluoranteno Benzo[k]fluoranteno Benzo[a]pireno Indeno[123-cd]pireno Benzo[ghi]perileno	Polibromobifenila (PBB) 2,2",4,4"-tetrabromodifenil éter 2,2",4,4",5-pentabromodifenil éter 2,2",4,4",6-pentabromodifenil éter 2,2",4,4",5,5"-hexabromodifenil éter 2,2",4,4",5,6-hexabromodifenil éter 2,2",3,4,4",5,6-heptabromodifenil éter octabromodifenil éter (BDE octa) decabromociclodifenil éter (BDE 209) hexabromociclododecano (HBCD) tetrabromobisfenol A (TBBA)
<b>Metais pesados</b>	<b>Fitoestrógenos</b>
Cádmio Mercúrio Chumbo Zinco	Isoflavona: daidzeína e genisteína Lignanas: metaresinol e enterodiol

Fonte: BILA, 2005.

Como observado há uma vasta gama de substâncias classificadas como desreguladores endócrinos, sendo que estes compostos apresentam características físico-químicas distintas o que dificulta o desenvolvimento de uma única metodologia para a determinação dos mesmos em amostras ambientais (SANSON, 2012).

#### 2.1.1.1. Atividade Estrogênica

São crescentes os esforços para identificar quais substâncias químicas possuem atividade estrogênica (MILLER et al., 2001).

Nos últimos anos, tem aumentado a preocupação sobre a exposição de seres humanos a estrogênios sintéticos (SONI et al., 2005; BECK et al., 2006). Alguns

pesquisadores afirmam que as alterações funcionais do sistema imunológico, os defeitos neurológicos e o aparecimento de tumores, observados na vida adulta, podem estar ligados à exposição a agentes tóxicos, incluindo estrógenos, durante o período pré-natal. A diminuição do número de espermatozoides tem sido colocada em questão como causa da exposição a elevadas concentrações de estrogênios ou substâncias similares durante a fase embrionária e fetal (SONI, et al., 2005).

Além dos hormônios naturais, muitos produtos químicos, tais como plastificantes, produtos de degradação de surfactantes não-iônicos, ftalatos, certos pesticidas, compostos fenólicos, entre outros, tem sido relatados que apresentam atividade estrogênica (BECK et al., 2006).

Para identificar se uma determinada substância química apresenta atividade estrogênica, testes *in vitro* (cultura de células) e *in vivo* (animais de laboratórios) são usados.

#### 2.1.1.2. Ensaio *in vitro* e *in vivo* para a determinação da atividade estrogênica

Diversos ensaios são utilizados para determinar a atividade estrogênica em amostras ambientais, tais como o ensaio ELISA que é baseado em reações enzimáticas e um ensaio *in vivo* realizado através da indução da síntese de vitelogenina (VTG) no plasma de peixe (BILA; DEZOTTI, 2007). Pelo fato dos testes *in vivo* apresentarem altos custos e a demanda de tempo ser muito maior, os testes *in vitro* são mais utilizados, pois dão uma resposta a curto prazo podendo assim com o resultado verificar em um estudo mais detalhado o potencial estrogênico de tais substâncias ou amostras (ROUTLEDGE; SUMPTER, 1996).

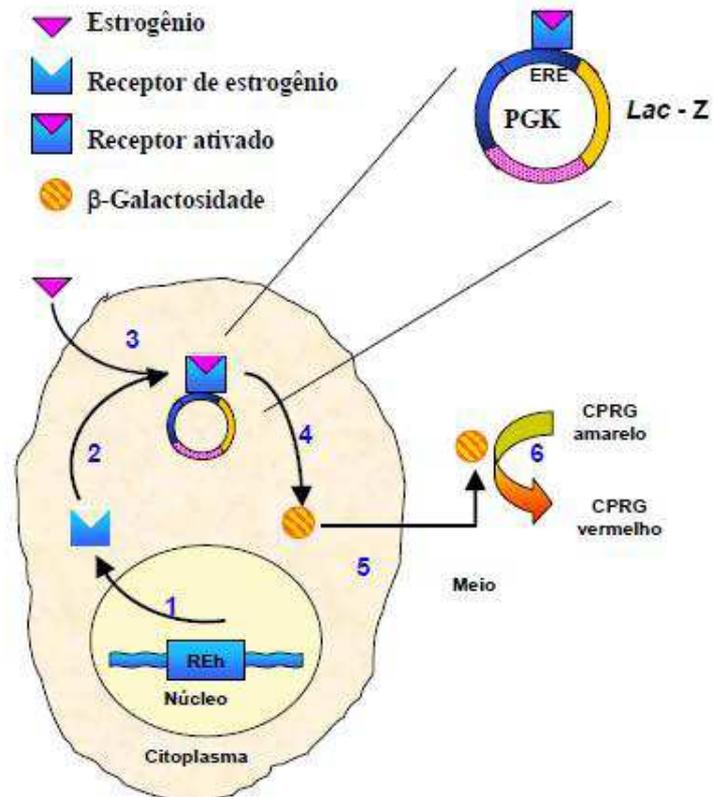
Os ensaios *in vitro* mais utilizados são o teste E-Screen, baseado na proliferação de células mamárias cancerígenas humanas (MCF-7) (SONI, et al 2005), o teste YES e algumas de suas variações, baseados na resposta do gene receptor de estrogênio humano (REh) inserido no genoma de uma cepa de levedura modificada para responder ao estrogênio (ROUTLEDGE; SUMPTER, 1996). Uma das variações do ensaio YES é o BLYES (Bioluminescence estrogen assay) que se trata de um gene bioreporter bioluminescente inserido na levedura *Saccharomyces*

*cerevisiae*, sendo utilizado para avaliar a atividade estrogênica em amostras de água (SANSEVERINO et al., 2005; JARDIM, et al., 2012).

O ensaio *in vitro* YES é prático e altamente sensível, por detectar concentrações baixas de  $17\beta$ -estradiol na ordem de  $2 \text{ ngL}^{-1}$  (ROUTLEDGE; SUMPTER, 1996). Permite a identificação de substâncias químicas que são capazes de bloquear, mimetizar, estimular ou inibir a atividade de um estrogênio produzido naturalmente pelos seres vivos. Este ensaio é realizado em microplacas de 96 poços, o que permite a análise de múltiplas amostras em uma larga faixa de concentrações e o resultado pode ser obtido após três dias. Os resultados podem ser visualizados a olho nu com uma mudança de coloração do meio. Segundo os resultados obtidos por Routledge e Sumpter (1996) o ensaio de YES mostrou-se ser altamente específico, reprodutivo e rápido, permitindo seu uso como uma análise rotineira para avaliar a atividade estrogênica de substâncias químicas e amostras ambientais.

O principal fundamento do ensaio *in vitro* YES é a interação dessas substâncias químicas com o receptor de estrogênio humano (REh) inserido em uma cepa da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A levedura foi modificada para conter este receptor, que teve a sequência de seu DNA integrado ao cromossomo principal da levedura. A levedura contém ainda plasmídeos com o gene de resposta Lac-Z, que quando expressado produz a enzima  $\beta$ -galactosidase. À medida que é secretada no meio, a  $\beta$ -galactosidase metaboliza o substrato cromogênico clorofenol vermelho- $\beta$ -D-galactopiranosida (CPRG) em lactose e em vermelho de clorofenol, o meio que antes era amarelo passa a ser vermelho, podendo ser quantificado a 540nm. Assim, a expressão da  $\beta$ -galactosidase pode ser quantificada por espectrofotometria, o que permite estimar a concentração de substâncias no meio que possuem comportamento estrogênico. No ensaio *in vitro* YES a levedura fica permanentemente transformada se o crescimento ocorrer sob condições apropriadas (ROUTLEDGE; SUMPTER, 1996).

Figura 1 - Esquema do sistema de expressão do composto estrogênio-induzível presente na levedura *Saccharomyces cerevisiae*



Fonte: ROUTLEDGE; SUMPTER, 1996.

Espera-se do ensaio que haja a alteração do meio reacional de amarelo para vermelho, sendo que com maior intensidade nas amostras mais concentradas, ou seja, as que apresentam maior concentração de estrogênios, conforme observado na Figura 2.

Figura 2 - Placa de 96 poços contendo substâncias estrogênicas na ordem de mais concentrado para menos concentrado.



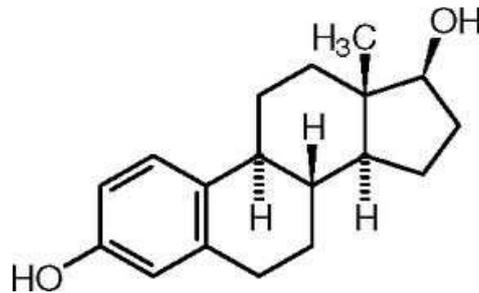
Legenda: Nas fileiras A, C, E e G contém as amostras analisadas e nas fileiras B, D, F e H os brancos, em duplicatas (somente etanol).

Fonte: BILA, 2005.

Os resultados do ensaio YES são adquiridos através de uma comparação entre a curva (absorbância x concentração) obtida das amostras com a curva do padrão. O comportamento das amostras é baseado nas suas diluições e tem-se por objetivo comparar a diluição que representa a resposta real obtida em relação ao padrão, tal mecanismo resulta na potência relativa da amostra e essa determinação é feita com base nos valores de CE50, que é o valor que elucida 50% da resposta da curva padrão de  $17\beta$ -estradiol (BILA, 2005).

Os ensaios *in vitro* e *in vivo* realizados para a determinação da atividade estrogênica utilizam o principal estrogênio humano, o  $17\beta$ -estradiol (Figura 3) como padrão de controle positivo, devido ao seu alto potencial estrogênico.

Figura 3 - Estrutura química do 17 $\beta$ -estradiol

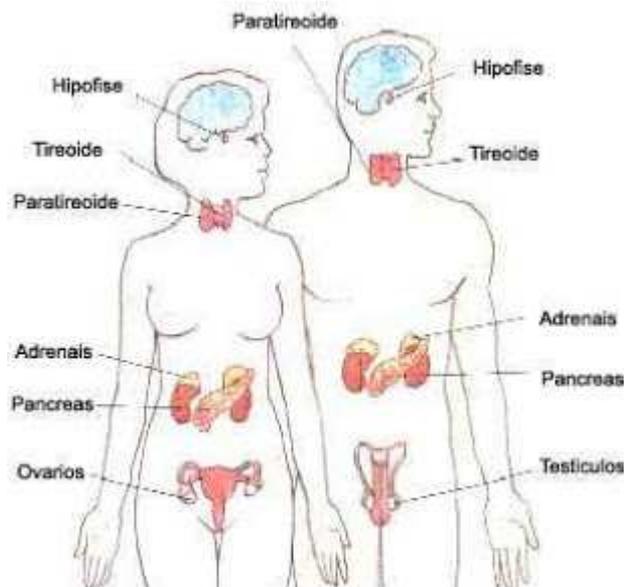


Fonte: BILA, 2005.

### 2.1.2. Desreguladores Endócrinos e o Sistema Endócrino

O sistema endócrino (Figura 4) é formado por um conjunto de glândulas localizadas em diferentes áreas do corpo humano, como a tireóide, a hipófise, as gônadas e as glândulas supra-renais e pelos hormônios por elas sintetizados, tais como a tiroxina, os estrogênios, as progesteronas, a testosterona e a adrenalina (BIRKETT; LESTER, 2003).

Figura 4 - O Sistema Endócrino

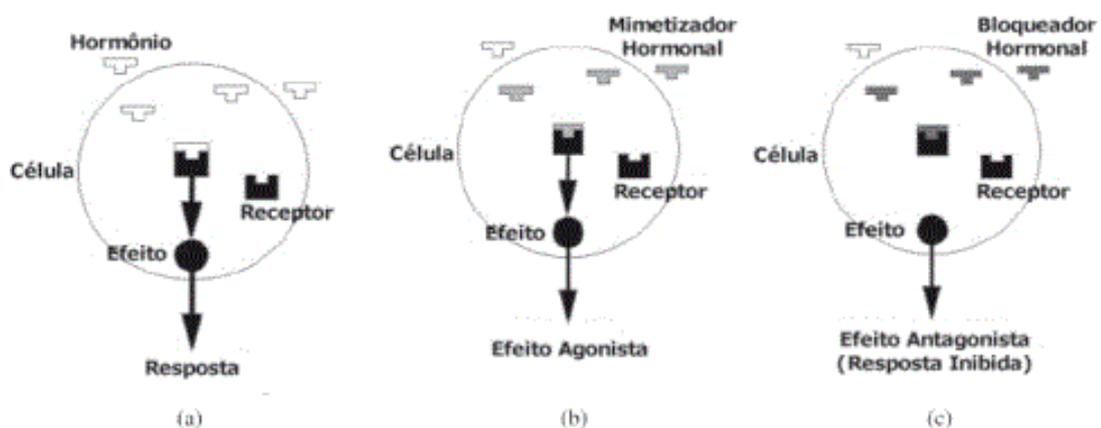


Fonte: <http://dugabrielcruz.blogspot.com.br/2010/10/sistema-endocrino.html>, acessado em 20 de janeiro de 2014.

Os hormônios desempenham papéis importantes no corpo humano, como por exemplo, controlam os níveis de sais, açúcares e líquido no sangue, atuam no crescimento, no desenvolvimento, na reprodução, na determinação das características sexuais de um determinado organismo e no uso e armazenamento de energia (BIRKETT; LESTER, 2003).

O mecanismo de ação de uma resposta natural pode ser observado na Figura 5a, onde os hormônios se encaixam perfeitamente aos receptores transmitindo sinais indispensáveis às células e o complexo formado se liga a regiões específicas do DNA presente no núcleo da célula, determinando assim a ação dos genes. Entretanto, estes receptores hormonais também podem ser ligados a outras substâncias químicas (DEs) e enviar sinais diferentes e fora de tempo às células, atuando como um mimetizador, ou seja, imitando a ação de um determinado hormônio. Tal processo é chamado de efeito agonista (Figura 5b). E se a substância química se ligar ao receptor mas nenhuma resposta for produzida, ela estará agindo como um bloqueador dos sinais normais dos hormônios que seriam enviados às células. Este processo é chamado de efeito antagonista (Figura 5c) (BIRKETT; LESTER, 2003; GHISELLI; JARDIM, 2007).

Figura 5 - Disfunções endócrinas



Legenda: a) resposta natural, b) efeito agonista, c) efeito antagonista

Fonte: GHISELLI; JARDIM, 2007.

Os DEs podem interferir no funcionamento do sistema endócrino por meio de bloqueio, mimetização, estimulação ou inibição da produção dos hormônios naturais.

A mimetização é quando um DE pode ligar-se ao receptor de um hormônio e enviar mensagens aos genes receptores, imitando a ação de um hormônio produzido naturalmente pelo organismo, como o estrogênio e a testosterona, desencadeando deste modo reações químicas semelhantes no corpo. As mensagens enviadas no momento impróprio ou a superprodução de mensagens têm efeitos adversos nas funções biológicas (BIRKETT; LESTER, 2003; GHISELLI; JARDIM, 2007).

Alguns DEs são capazes de simular a formação de mais receptores de hormônios nas células, levando a amplificação de sinais. Outros são capazes de bloquear o hormônio natural através da ocupação do receptor na célula, com isso acabam impedindo que sua função seja exercida. Isso pode aumentar ou diminuir o efeito dependendo se o bloqueador é mais ou menos potente do que o hormônio que está sendo bloqueado. E ainda tem os que podem destruir o hormônio ou a capacidade de executar sua função, afetando sua síntese, transporte, metabolismo e excreção, alterando suas concentrações nas formas naturais e a sua estrutura direta ou indiretamente, fazendo com que não se encaixe no sítio receptor (BIRKETT; LESTER, 2003; GHISELLI; JARDIM, 2007).

### 2.1.3. Desreguladores Endócrinos no Meio Ambiente

Os DEs são lançados rapidamente no ambiente e são dispersos na atmosfera a partir de duas fontes, as pontuais e as difusas, que são (BIRKETT; LESTER, 2003; GHISELLI; JARDIM, 2007):

- As descargas das estações de tratamento de esgoto nos rios;
- Escoamento e lixiviação de terras agrícolas nos rios;
- As descargas de efluentes industriais nos rios;
- Escoamento das águas das chuvas nos aquíferos;
- As descargas de esgoto doméstico nos rios;

- Combustão e incineração de determinados produtos;
- As descargas de lixiviados para as camadas subterrâneas e rios.

Dentre os DEs, os hormônios naturais e os sintéticos são os mais preocupantes e vários desses estrógenos são excretados no ambiente através da urina humana, sendo que é improvável que essas substâncias sejam reduzidas a tempo, devido à pequena quantidade com que são encontradas nas ETEs, mas mesmo assim é possível que, ao reagirem com outras substâncias (efeito sinérgico) estes possam apresentar atividade estrogênica. O tratamento convencional de esgotos não remove completamente os compostos em questão, e por isso observa-se que estes continuam presentes, ainda que em menores concentrações, no efluente despejado no corpo receptor (FATTA-KASSINOS, 2010).

Essas substâncias apresentam efeitos agudos ou crônicos que vão depender do tempo de exposição, concentração no ambiente, modo de contato com o produto e tipo de degradação, ocasionando um desequilíbrio no padrão hormonal dos reprodutores, a queda da fertilidade e até a infertilidade. A maioria dessas substâncias é persistente no meio ambiente, podendo se acumular no solo e no sedimento dos rios, sendo facilmente transportada de suas fontes por longas distâncias. Essas substâncias apresentam um sério risco à saúde dos seres vivos que se encontram no topo da cadeia alimentar por se acumularem ao longo da cadeia trófica (AMÉRICO et al., 2012).

Está claro que os DEs são capazes de provocar diversos efeitos nocivos aos seres vivos e com a evolução das pesquisas certamente outros distúrbios serão relacionados a estas substâncias. Com isso, a identificação e a quantificação desses compostos nas matrizes ambientais são de suma importância, visto que a exposição ambiental aos mesmos está intimamente relacionada aos seus efeitos (SANSON, 2012).

## 2.2. Parabenos

Diversos estudos têm mostrado que os parabenos apresentam atividade estrogênica *in vitro* (ROUTLEDGE et al., 1998; MILLER, et al., 2001) e *in vivo* (OISHI, 2002; DARBRE, et al., 2003). Apesar dos relatos sobre a atividade estrogênica dos parabenos, poucos estudos foram realizados para determinar a toxicidade aguda dos parabenos em organismos aquáticos (YAMAMOTO et al., 2011).

Routledge et al. (1998), detectaram atividade estrogênica dos parabenos utilizando o ensaio YES e encontraram uma magnitude de resposta de 2.500.000 e 30.000 menos potente que o 17 $\beta$ -estradiol para o metilparabeno e o propilparabeno, respectivamente e concluíram que a magnitude da resposta estrogênica aumentou com o tamanho da cadeia do grupo éster. Neste mesmo ensaio, os metilparabeno e o propilparabeno apresentaram atividade estrogênica em concentração molar nas potências de 10<sup>-4</sup> e 10<sup>-7</sup> vezes menos potente do que a do 17 $\beta$ -estradiol, respectivamente.

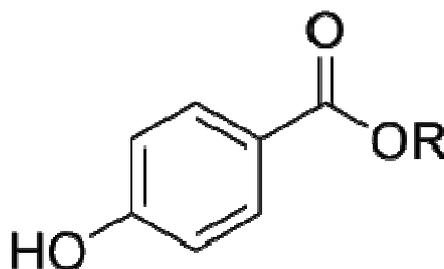
Okubo et al. (2001) *apud* SONI et al., (2005) examinaram as atividades estrogênicas do metil - , etil- , propil - , butil - , isopropil- e isobutilparabenos e observaram que todos os parabenos estimularam a proliferação das células MCF-7 de câncer de mama devido a afinidade com o receptor de estrogênio. Nesse mesmo estudo o ensaio *in vitro* YES revelou que os parabenos com a cadeia do grupo éster maiores apresentam maior afinidade com os receptores de estrogênio.

### 2.2.1. Descrição, propriedades e funções dos parabenos

Os parabenos (e/ou seus sais) são ésteres do ácido p-hidroxibenzóico (Figura 6), diferindo apenas no grupo alquil (radical substituinte), que pode ser um metil, um etil, um propil ou um grupo butil. Esses grupos alquil resultam na formação do metilparabeno, do etilparabeno, do propilparabeno e do butilparabeno. São amplamente utilizados em cosméticos, como loções para pele, cremes e shampoos (SONI et al., 2005; YAMAMOTO et al., 2011). Alguns são utilizados em alimentos,

bebidas e produtos farmacêuticos. Os mais utilizados pelas indústrias dentre as espécies de parabenos são o metilparabeno e o propilparabeno (SONI et al., 2005).

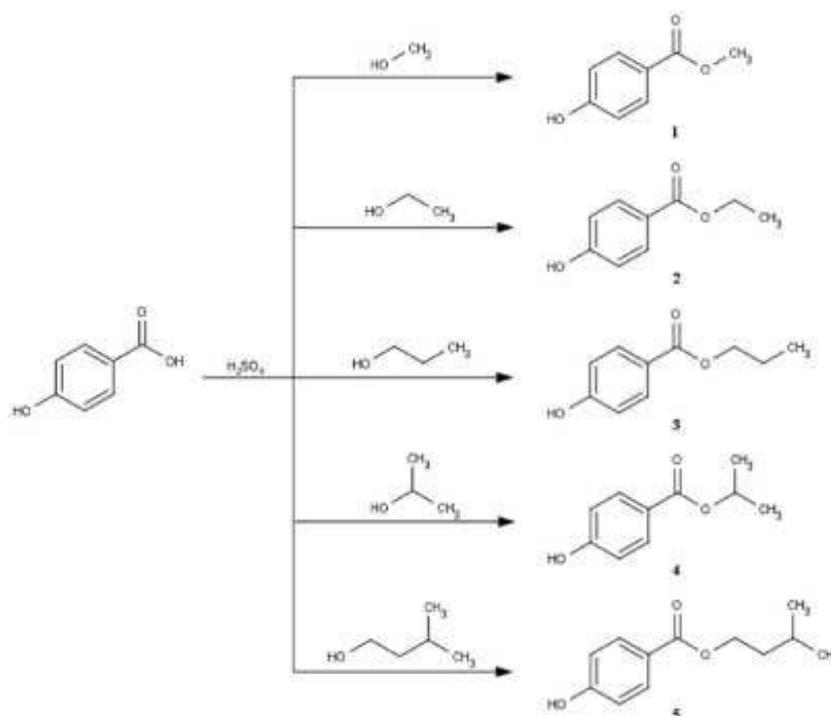
Figura 6 - Estrutura química do parabeno, onde R = metil (-CH<sub>3</sub>), etil (-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>), propil (-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>), butil (-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>) e benzil (-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)



Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Parabenos>, acessado em 20 de janeiro de 2014.

Os parabenos na forma pura são geralmente encontrados como pequenos cristais incolores ou pós-cristalinos com praticamente nenhum odor ou gosto. São preparados através da esterificação do ácido p-hidroxibenzóico com álcool em presença de um catalisador ácido (Figura 7), geralmente são estáveis ao ar e são resistentes à hidrólise em água (quente e fria) e em soluções ácidas. Quanto maior a cadeia do grupo éster do parabeno maior será a resistência à hidrólise (SONI et al., 2005).

Figura 7 - Esquema sintético das reações realizadas para obtenção dos parabenos 1-5



Fonte: FERNANDES et al., 2013.

Essas substâncias químicas são utilizadas pelas indústrias como aditivos, cujo objetivo é modificar características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais dos produtos assegurando sabor, textura e uma conservação melhor, entre outros. A indústria utiliza diversos compostos aditivos, cada um com uma função, sendo que muitas dessas substâncias, quando usadas dentro dos limites permitidos, são consideradas inócuas para a saúde do consumidor. Porém, algumas podem causar males, mesmo em pequenas doses, umas podem dar reações imediatas, outras, têm efeito cumulativo (POLÔNIO; PERES, 2009).

Os parabenos agem como antimicrobianos a partir dos mecanismos de ação através da inibição do transporte de substâncias para dentro da membrana da célula e também na interferência das funções das mitocôndrias (SONI et al., 2005).

**Tabela 1:** Descrição geral e propriedades físico-químicas dos parabenos

<b>Características</b>	<b>Metil</b>	<b>Etil</b>	<b>Propil</b>	<b>Butil</b>
CAS nº	99-76-3	120-47-8	94-13-3	94-26-8
Fórmula química	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>
Peso molecular (g)	152,16	166,18	180,21	194,23
Ponto de fusão (°C)	131	116-118	96-98	68-69
Ponto de ebulição (°C)	270-280	297-298	-	-
Índice de refração	1,525	1,505	1,505	-
pKa	8,17	8,22	8,35	8,37

Fonte: SONI et al. (2005).

Os parabenos atendem vários critérios de um conservante ideal, por possuírem um largo espectro de atividade antimicrobiana, por serem de uso seguro (relativamente não irritantes e de baixa toxicidade), por serem estáveis as diversas faixas de pH e por serem solúveis em água. (SONI et al., 2005).

Segundo Elder (1984) *apud* Soni et al. (2005), a atividade antimicrobiana está diretamente relacionada com o comprimento da cadeia do grupo éster do parabeno, já a solubilidade em água não. A ação antimicrobiana ocorre na fase aquosa, portanto a quantidade de parabeno dissolvida nesta fase determina a sua capacidade conservante, com isso os ésteres inferiores (metil e propil) são os mais utilizados na prática como parabenos em alimentos.

A Comissão Especial sobre Substâncias dos EUA, GRAS, pertencente a FDA, relataram que, em ratos, coelhos, cães, gatos e seres humanos, os parabenos (metil e propil) são absorvidos e metabolizados no trato gastrointestinal (SCOGS, 1972), não se acumulam no corpo e a maior parte é excretada através da urina. Os principais metabolitos são excretados através da urina, em ordem decrescente, foram encontrados o ácido p-hidroxibenzóico e a glicina, o ácido glucurónico e conjugados de ácidos sulfúrico do ácido p-hidroxibenzóico. O relatório da SCOGS

(1972) também afirmou que a maioria dos parabenos são metabolizados nas vias normais, no fígado e rim.

### 2.2.2. Legislação e Aplicação

A resolução formulada pela ANVISA – RDC 162/01, lista todos os conservantes e suas concentrações permitidas nos cosméticos comercializados no Brasil, seguindo o modelo utilizado na União Européia. No Brasil, as indústrias cosméticas fazem o uso dos parabenos na concentração em até 0,4% de cada, ou 0,8% de uma mistura, peso/peso, na formulação do cosmético.

Nas indústrias farmacêuticas no Brasil, não há legislação que regulamente o uso dos parabenos, sendo usualmente empregadas concentrações de 0,18% de metilparabeno e 0,02% de propilparabeno ou combinações desses parabenos de 0,1 a 0,2%, peso/peso (OLIVEIRA, M. A. & LIMA, E. M., 2006).

A ANVISA, através da RDC nº 5 de 15/1/2007, estabelece o uso desses conservantes em sucos, refrigerantes e bebidas não alcoólicas com valor máximo de 0,03g/100mL para metil e propilparabeno.

Os EUA (FDA) e o Canadá (Health Canada) recomendam o uso de parabenos igual à União Européia (concentração em até 0,4% de cada, ou 0,8% de uma mistura, peso/peso, na formulação do cosmético). No Japão o máximo permitido para uso em uma mistura é de 1% (p/p) na formulação do cosmético. Em 2011, o governo Dinamarquês decidiu adicionar uma restrição ao uso dos parabenos, proibindo o uso do propil-, isopropil-, butil- e o isobutil-parabeno em produtos de cuidados pessoais destinados a crianças menores de três anos (BLEDZKA et al., 2014).

Os conservantes sintéticos são bastante utilizados, pois evitam a contaminação microbiana em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos não permitindo que o produto degrade ou que alguma característica seja alterada e também porque são eficientes, de baixo custo e ampla disponibilidade. São exemplos de conservantes sintéticos: o ácido benzoico (BA), o ácido sórbico (AS), o

ácido desidroacético (DHA) e os ésteres de alquilo de ácido p-hidroxibenzoico (os parabenos). Os parabenos mais utilizados são o metilparabeno (MP), o etilparabeno (PE), o propilparabeno (PP), o isopropilparabeno (IPP), o butilparabeno (BP), o isobutilparabeno (IBP) e o hexilparabeno (HP) (LI et al., 2008).

Os parabenos foram adicionados aos alimentos há mais de 50 anos e, ao longo dos anos, o seu uso tem aumentado continuamente em diversas categorias de alimentos. Eles são empregados em vários alimentos processados, incluindo legumes, assados, gorduras e óleos, temperos, adoçantes, extratos de café, sucos, picles, molhos, refrigerantes e produtos lácteos congelados em concentrações entre 450 e 2000ppm. Os mais utilizados são o metilparabeno e o propilparabeno (SONI et al., 2005).

Nas indústrias cosméticas são rotineiramente utilizados como conservantes em quase todos os tipos de cosméticos e os mais utilizados também são o metilparabeno e o propilparabeno. São bastante utilizados porque não apresentam odor perceptível e gosto, não causam descoloração, possuem pH neutro, não causam endurecimento do produto, tem baixa toxicidade, largo espectro de atividade, baixo custo e biodegradabilidade. Também devido a sua estabilidade química em função do pH e da temperatura, os produtos que contêm parabenos podem ser autoclavados com segurança, pois não há perda significativa da sua função antimicrobiana. Podem ser utilizados sozinhos ou em combinações com outros compostos. Possuem eficácia contra bolores e leveduras e o seu uso têm obtido bastante sucesso há mais de meio século (SONI et al., 2005).

Os parabenos foram usados pela primeira vez como conservantes antimicrobianos pelas indústrias farmacêuticas em meados de 1920 e têm se mostrado altamente eficazes como agentes antimicrobianos e por isso estão sendo muito utilizados. Dentre os parabenos, o propilparabeno é um dos mais eficazes fungicidas utilizados nas preparações farmacêuticas, como exemplos, em supositórios, anestésicos, xaropes, soluções injetáveis, contraceptivos e vitaminas para ganho de peso. São mais eficazes quando utilizados em combinações do que individuais (SONI et al., 2005).

Esses conservantes fazem parte de cerca de 80% dos produtos de cuidados pessoais. Em um relatório em relação ao mercado dinamarquês, 36% dos 751 produtos analisados continham parabenos. E um estudo norueguês revelou que estavam presentes em 32% dos 117 produtos testados utilizados em bebês. A estimativa é que o butilparabeno está presente em 13%, enquanto que o propilparabeno e/ou metilparabeno em 48% de cosméticos e produtos de higiene pessoal (BLEDZKA et al., 2014).

O consumo dos parabenos a partir de todas as fontes (alimentícia, cosmética e farmacêutica) está estimado em 75,78 mg/dia ou 1,26 mg/Kg/dia para um indivíduo pesando 60Kg. Com base em estimativas a exposição total diária à parabenos é de 76 mg, sendo que com alimentos cerca de 1mg/dia, cosméticos e produtos de higiene pessoal, 50 mg/dia e drogas, 25 mg/dia (SONI et al., 2005).

### 2.2.3. Parabenos e os Desreguladores endócrinos

A atividade estrogênica em parabenos (metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno e butilparabenos) foi descrita pela primeira vez por Routledge, E. J. e Sumpter, J. P. (1998), que a partir de ensaios *in vitro* e em animais *in vivo*, ele levantou a questão da segurança e da toxicidade dos parabenos.

Routledge et al. (1998), mostrou que existe uma correlação direta entre o comprimento da cadeia do éster do parabeno e a estrogenicidade. Por outro lado, os parabenos foram usados para estimular a proliferação de células MCF-7 de câncer da mama (Darbre, 2006), no aumento de peso uterino e os seus efeitos no sistema reprodutor masculino (Darbre et al. 2004) . Além disso, a exposição aos parabenos (após a aplicação ou ingestão oral) pode causar outros efeitos como irritação da pele e erupção eczematosa (Soni et al ., 2005 ).

Miller et al. (2001), utilizaram o ensaio *in vitro* YES para avaliar a atividade estrogênica de 73 aditivos fenólicos que são utilizados como protetores solares, conservantes, desinfetantes, antioxidantes, aromatizantes para perfumaria, sendo que 32 desses compostos apresentaram atividade, 22 com potências relativo ao  $17\beta$ -estradiol, variando de  $1/3.000$  a  $1/3.000.000$  (metilparabeno =  $1/3.000.000$  e

propilparabeno = 1/30.000) e 10 compostos com uma resposta inadequada que não poderia ser diretamente comparado com  $17\beta$ - estradiol. As substâncias que apresentaram maior atividade estrogênica foram aquelas onde o composto fenólico o grupo-OH se encontra na posição *para* em relação aos outros substituintes e também as que apresentam peso molecular entre 140-250 (os parabenos estão inseridos nessa faixa).

Segundo Oishi (2002), em um estudo *in vivo* com ratos, o propilparabeno em concentrações acima de 0,1% e exposição por três semanas afetou a secreção de testosterona e as funções do sistema reprodutivo do macho.

Alguns estudos indicaram que a exposição aos parabenos pode modular ou perturbar o sistema endócrino, pois mostraram que estas substâncias podem mimetizar a atividade semelhante ao de um estrogênio, afetando assim a saúde dos seres vivos. Estes estudos indicaram que os parabenos possuem atividade estrogênica fraca, enquanto que em outros há a hipótese de uma associação entre o uso de cosméticos nas axilas contendo tais substâncias com o aumento da incidência de câncer de mama (SONI et al., 2005).

Estudos de laboratório confirmaram que a presença de parabenos e outras substâncias com potenciais estrogênicos relativamente fracos (por exemplo, genisteína, benzofenona, bisfenol A, etc) em uma mesma amostra e em concentrações abaixo do seu nível de efeito não observado, pode resultar em uma considerável atividade estrogênica global para a amostra, isso devido ao efeito sinérgico que resulta em um efeito estrogênico maior nos ambientes aquáticos. Portanto, parabenos devem ser adicionados à lista de produtos químicos domésticos cujos níveis ambientais devem ser mantidos sob vigilância (CANOSA, 2006).

A existência de trabalhos antigos com o ensaio YES e a ecotoxicidade dessas substâncias fez com que houvesse o interesse em aprofundar mais sobre esse assunto e também verificar se já se encontram nos corpos hídricos do Rio de Janeiro.

## 2.3. Toxicologia Aquática

Segundo Arenzon (2011), a toxicidade refere-se à capacidade de determinada substância, produto ou conjunto de substâncias de provocar efeitos danosos aos organismos com os quais entra em contato. Estes efeitos podem ser desde alterações comportamentais, alteração de crescimento ou reprodução até a morte dos organismos.

A partir do século XIX a observação do comportamento e das reações de animais e plantas no contato com contaminantes da natureza, principalmente na água, por produtos químicos, passou a ser considerado um indicador de impactos ambientais (KNIE; LOPES, 2004).

As substâncias químicas apresentam um potencial tóxico de ação que depende da sua concentração no meio aquático e os bioensaios determinam seu efeito danoso aos organismos-teste em condições experimentais específicas (KNIE; LOPES, 2004).

### 2.3.1. Ensaio de toxicidade aquática

O grau de impacto que um determinado efluente pode causar no corpo receptor pode ser determinado com a realização de ensaios de toxicidade cujo objetivo é simular, em laboratório, os efeitos que poderiam ser observados nos organismos presentes no corpo receptor após o lançamento do efluente (ARENZON, 2011).

Ensaio de Toxicidade, Ensaio Ecotoxicológico ou Testes de Toxicidade são sinônimos para denominar a principal ferramenta da Ecotoxicologia para avaliar a toxicidade de efluentes ou outras amostras.

No geral, os organismos que podem ser utilizados nos ensaios são considerados de quatro níveis tróficos, que são os organismos produtores (algas), os consumidores primários (microcrustáceos), os consumidores secundários (peixes) e os decompositores (bactérias).

Esses organismos são chamados de organismos-teste e segundo Arenzon (2011), são espécies mantidas em laboratório e cujos conhecimentos de sua biologia são suficientes para que possam ser utilizadas como indicadores da toxicidade dos efluentes. Tanto a forma de cultivo como as metodologias de ensaio para estes organismos são definidas em normas técnicas, permitindo a reprodutibilidade dos resultados.

A Tabela 2 apresenta as espécies de organismos-teste comumente utilizadas nos ensaios de toxicidade de efluentes lançados em águas continentais do Brasil, os tipos de ensaios, o tipo dos organismos utilizados e o seu nível trófico.

Tabela 2 - Espécies de organismos-teste para ensaios ecotoxicológicos utilizados no Brasil

<b>Tipos de ensaio</b>	<b>Organismo-teste</b>	<b>Tipo de organismo</b>	<b>Nível trófico</b>
Agudo	<i>Daphnia similis</i>	Microcrustáceo	Consumidor primário
Agudo	<i>Daphnia magna</i>	Microcrustáceo	Consumidor primário
Agudo e crônico	<i>Pimephales promelas</i>	Peixes	Consumidor secundário
Agudo e crônico	<i>Danio rerio</i>	Peixes	Consumidor secundário
Agudo e crônico	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Algas	Produtor
Agudo e crônico	<i>Desmodesmus subspicatus</i>	Algas	Produtor
Crônico	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Microcrustáceo	Consumidor primário
Agudo	<i>Aliivibrio fischeri</i>	Bactéria	Decompositor

Fonte: ARENZON, 2011.

Os ensaios de toxicidade aguda avaliam a capacidade do efluente de causar efeitos danosos (em geral morte ou imobilidade) aos organismos-teste após um

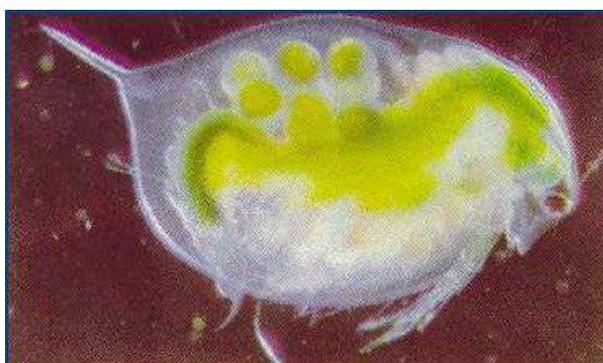
curto período de exposição à amostra (normalmente inferior a 96 horas, se for agudo). Se a amostra apresentar toxicidade aguda, significa que ela é tóxica o suficiente para matar os organismos, mesmo quando eles ficam expostos a ela por pouco tempo (ARENZON, 2011; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Os ensaios de toxicidade crônica expõem os organismos-teste às amostras de efluentes por um intervalo de tempo mais significativo em relação ao seu ciclo de vida (em geral, superior a 72 horas). Neles são avaliados os efeitos mais sutis, como alteração sobre a reprodução e o crescimento, além da morte dos organismos expostos, mesmo que ocorra de forma mais lenta (ARENZON, 2011; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

#### 2.3.1.1. *Daphnia similis*

*Daphnia similis* CLAUS, 1876 (Cladocera, Crustacea) (Figura 8) é um microcrustáceo planctônico de água doce, com tamanho de 0,5 a 5,0 mm de comprimento e uma carapaça bivalve incolor pelo corpo, possuem pernas torácicas revestidas por cerdas que permitem a retenção do alimento, que dura de 0,5 a 3 horas, um olho mediano na cabeça e antenas com 4 a 6 pares de apêndices no tronco. Nadam por meio de antenas em movimentos verticais desajeitados e depois afundam lentamente. Sua reprodução é partenogenética, gerando apenas fêmeas. Servem de alimento para os peixes (KNIE; LOPES, 2004; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008; CASTRO et al., 2010).

Figura 8 - *Daphnia similis*.



Fonte: <http://cursos.unisanta.br/química/laborato/daphnia.html>, acessado em 18 de janeiro de 2014.

A seguir a taxonomia da *Daphnia similis*:

**Reino:** Animalia

**Filo:** Crustacea

**Classe:** Branchiopoda

**Ordem:** Cladocera

**Família:** Daphniidae

**Gênero:** *Daphnia*

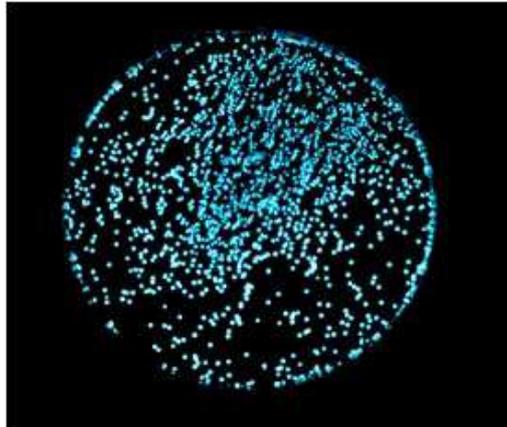
O ensaio é baseado na exposição de indivíduos jovens, neonatos (6-24 horas de idade) de *Daphnia similis* a várias concentrações do agente químico, durante 48 horas, em temperatura  $20^{\circ}\text{C}\pm 2$ , em fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro. Ao fim do ensaio, é determinado o número de organismos imóveis. Utiliza-se o programa TRIMMED SPEARMAN-LCPIN para o cálculo da concentração que provocará a inibição de 50% dos organismos-teste, o CE50.

#### 2.3.1.2. *Aliivibrio fischeri*

*Aliivibrio fischeri* (Urbanczyk, Ast, Higgins, Carson & Dunlap, 2007) com o sinônimo *Vibrio fischeri* (Beijerinck, 1889) Lehmann e Neumann, 1896 (Figura 9) é uma bactéria marinha luminescente, gram-negativa e anaeróbia facultativa. Essas bactérias em condições ambientais favoráveis emitem luz naturalmente, só que para isso necessitam de concentrações de oxigênio acima de  $0,5 \text{ mgL}^{-1}$  (KNIE; LOPES, 2004).

No final da década de 70, os ensaios com a bactéria luminescente passaram a ser usados com sucesso na determinação da toxicidade aguda de amostras aquáticas, de sedimentos e de solo (KNIE; LOPES, 2004).

Figura 9 - *Aliivibrio fischeri* 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](http://labs.medmicro.wisc.edu/mcfall-ngai/media/news_fall09.html), acessado em 18 de janeiro de 2014.

A seguir a taxonomia do *Aliivibrio fischeri*:

**Reino:** Bacteria

**Filo:** Protobacteria

**Classe:** Gammaproteobacteria

**Ordem:** Vibrionales

**Família:** Vibrionaceae

**Gênero:** *Vibrio*

O ensaio é baseado na medição da luminescência emitida pelas bactérias após exposição a uma amostra por um período de 05, 15 e 30 minutos através de um fotômetro de precisão (Microtox). A intensidade da luz das bactérias na amostra é comparada com a de um controle, onde não contém amostra. Havendo alguma substância tóxica a bioluminescência diminui, com isso a quantidade de perda de luz é proporcional à toxicidade da amostra. Essa diminuição da luminescência acontece devido à inibição dos processos metabólicos das bactérias (KNIE; LOPES, 2004). O *software* MICROTOX OMNI 4.1 acoplado ao equipamento fornece os resultados de CE50 em 5, 10 e 15 minutos.

### 2.3.2. Parabenos e a Toxicidade Aguda Aquática

Segundo Bazin et al. (2010) poucos dados estão disponíveis sobre a toxicidade aguda e crônica dos parabenos em organismos aquáticos, para mudar esse quadro eles realizaram um ensaio da toxicidade aguda dos parabenos em *Aliivibrio fischeri* e obtiveram o resultado da CE50 para o metilparabeno e o propilparabeno de  $10 \text{ mgL}^{-1}$  e  $2,6 \text{ mgL}^{-1}$ , respectivamente.

Segundo Brausch, J. M. et al. (2011), a toxicidade aguda em bactérias *Aliivibrio fischeri* pode aumentar com o aumento da cadeia do radical substituinte dos parabenos.

Dobbins et al. (2009) realizaram testes com as substâncias, metil- e propilparabeno, com o microcrustáceo *Daphnia magna* e obtiveram valores da CE50 de  $24,6 \text{ mgL}^{-1}$  e  $12,3 \text{ mgL}^{-1}$ , respectivamente.

Terasaki et al. (2008) *apud* Yamamoto et al. (2011), realizaram testes de toxicidade aguda com os metil- e propilparabeno usando *Daphnia magna*, encontrando CE50 de  $62 \text{ mgL}^{-1}$  e  $23 \text{ mgL}^{-1}$ , respectivamente. Para a bactéria *Aliivibrio fischeri* obtiveram uma CE50 de  $5,9 \text{ mgL}^{-1}$  e  $0,26 \text{ mgL}^{-1}$ , respectivamente.

Yamamoto et al. (2011) analisaram a toxicidade aguda com a *Daphnia magna* de sete tipos de parabenos, sendo que os metilparabeno e propilparabeno apresentaram CE50 de  $34 \text{ mgL}^{-1}$  e  $2 \text{ mgL}^{-1}$ , respectivamente.

Tabela 3 - Valores da CE50 dos metil- e propilparabeno em *Daphnia magna* e *Allivibrio fischeri* encontrados na literatura.

Organismo-teste	CE50 (mgL <sup>-1</sup> )		Referência
	MP	PP	
<i>Daphnia magna</i>	34	2	Yamamoto et al., 2011
	62	23	Terasaki et al., 2008
	24,6	12,3	Dobbins et al., 2009
<i>Allivibrio fischeri</i>	5,9	0,26	Terasaki et al., 2008
	10	2,6	Bazin et al., 2010

#### 2.4. Método Analítico para determinação de parabenos em matrizes aquáticas

Métodos robustos têm sido desenvolvidos visando à determinação dos micropoluentes emergentes nas mais variadas matrizes ambientais. As amostras ambientais são na maioria complexas e as concentrações dos compostos de interesse se encontram normalmente na escala de  $\mu\text{gL}^{-1}$  a  $\text{ngL}^{-1}$ , o que exige técnicas de preparo de amostras e técnicas analíticas elaboradas e eficientes. Para tal, temos as técnicas cromatográficas que utilizam equipamentos de cromatografia líquida ou de cromatografia gasosa (CALDAS, et al., 2011; SILVA; COLLINS, 2011; SANSON, 2012).

A cromatografia acoplada a detectores específicos permite identificar e quantificar concentrações de espécies químicas em uma matriz ambiental complexa e componentes desconhecidos (SILVA; COLLINS, 2011). Em ambos os casos, a quantificação dessas substâncias é feita normalmente com espectrometria de massas, dada à sua elevada seletividade e menores limites de detecção (SANSON, 2012). Devido a esses compostos se encontrarem na natureza em concentrações muito pequenas é necessário uma etapa preliminar de extração, sendo a extração em fase sólida a mais utilizada.

Segundo a IUPAC GOLDBOOK (1993) a definição de cromatografia é “cromatografia é o método físico-químico de separação no qual os componentes a serem separados se distribuem entre duas fases, uma das quais estacionária, enquanto a fase móvel se movimenta numa direção definida”.

A cromatografia líquida é uma técnica de separação onde a fase móvel é um líquido, podendo ser realizada em uma coluna ou sobre uma placa de camada fina ou delgada. Hoje é realizada utilizando partículas muito pequenas com uma pressão de entrada relativamente elevada e com um alto desempenho, sendo chamada de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (IUPAC GOLDBOOK, 1993).

A seguir uma pequena revisão na literatura científica sobre as etapas e métodos analíticos empregados na determinação de contaminantes emergentes (principalmente desreguladores endócrinos) nas águas superficiais.

#### 2.4.1. Extração, limpeza (*clean up*) e concentração dos analitos

Essa etapa é uma das mais importantes quando se realiza a determinação de contaminantes emergentes, uma vez que suas concentrações nas matrizes ambientais ou biológicas complexas são baixas, podendo chegar a  $\text{ng L}^{-1}$  (SILVA; COLLINS, 2011).

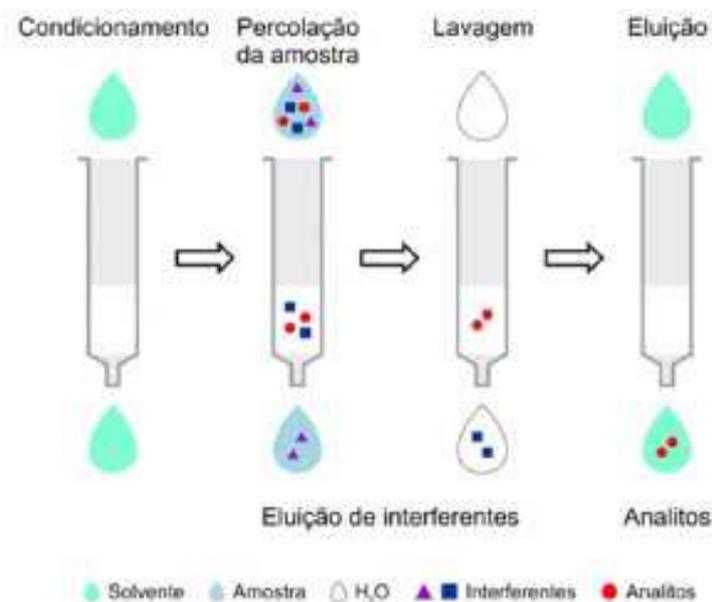
Antes dessa etapa é muito importante o conhecimento das propriedades físico-químicas dos analitos, para evitar problemas na quantificação, que podem estar relacionados a reações secundárias, a impurezas ou degradações na sua estrutura durante a aplicação do método analítico (SILVA; COLLINS, 2011).

Pelo fato dos contaminantes emergentes estarem presentes em matrizes ambientais em reduzidas concentrações faz-se necessário procedimentos de pré-concentração afim de se obter a sensibilidade necessária para a sua detecção. A extração em fase sólida - EFS (SPE, *solid phase extraction*) é atualmente a técnica mais empregada para amostras líquidas, como matrizes de águas superficiais e efluentes. Outras técnicas para concentrar analitos estão disponíveis, sendo as que estão mais em destaque à extração líquido-líquido (LLE, do inglês *Liquid-Liquid*

*Extraction*), a microextração em fase sólida (SPME, *solid phase micro-extraction*) (CALDAS, et al., 2011; SILVA; COLLINS, 2011).

A EFS extrai os analitos e os compostos interferentes contidos em uma matriz aquosa, após passarem por um cartucho contendo sorvente. Para a remoção dos interferentes geralmente é utilizado um solvente orgânico seletivo e então, outro solvente é usado para eluir os analitos de interesse (CALDAS, et al., 2011). A Figura 10 apresenta as etapas envolvidas na extração EFS.

Figura 10 - Etapas da EFS



Legenda: condicionamento do sorvente, percolação da amostra, lavagem para remoção dos interferentes e eluição do analito.

Fonte: CALDAS et al., 2011.

A escolha do sorvente é de extrema importância nos procedimentos de EFS, pois garante a eficiência da extração do analito-alvo das amostras líquidas. Os sorventes do tipo C18 ou poliméricos das marcas Oasis (Waters) e Strata-x (Phenomenex) juntamente com a técnica de EFS são os mais comumente utilizados na extração dos contaminantes emergentes. Outros parâmetros também influenciam a extração como o pH da amostra, o tempo de secagem do cartucho e o solvente de eluição (GONÇALVES, 2012).

A diminuição do pH da amostra para mais baixo que o pKa dos analitos resulta em uma maior eficiência da extração, pois permanecem na forma de não-ionizados, ou seja, se apresentam como moléculas neutras, isso se somente as formas não dissociadas se ligarem fortemente aos cartuchos de SPE (GONÇALVES, 2012). Cartuchos como o Oasis HLB e Strata-X promovem, principalmente, retenções de fase reversa.

#### 2.4.2. Separação e detecção

As propriedades físico-químicas são determinantes na escolha do método cromatográfico a ser utilizado que em geral os contaminantes emergentes são determinados por Cromatografia a Líquido (CL) ou a Gás (CG) acoplados à Espectrometria de Massa (EM) possibilitando ao método maior seletividade, sensibilidade, especificidade e qualidade dos resultados (CALDAS, et al., 2011).

A separação dos compostos orgânicos por CLAE é comumente realizada através de fases estacionárias do tipo fase reversa (RP, reversed-phase) com base de sílica e grupos ligantes C18 e C8 (SILVA; COLLINS, 2011).

Em “RP-HPLC” as fases móveis mais utilizadas são misturas de metanol:água (MeOH:H<sub>2</sub>O) ou acetonitrila:água (ACN:H<sub>2</sub>O), sendo que previamente são realizados ajustes da força cromatográfica e da seletividade da fase móvel até se obter uma resolução suficiente para que ocorra a separação de todos os picos cromatográficos no menor tempo possível de análise. Ao utilizar o espectrômetro de massas (EM) como um detector e um processo de ionização por eletronebulização (ESI, *electrospray-ionization*), a adição de modificadores, como ácido fórmico, acetato de amônio e amônia é favorável, pois auxilia e melhora o processo de ionização dos analitos através do ajuste de pH do meio, melhorando assim as interações com a fase móvel e a fase estacionária (SILVA; COLLINS, 2011).

Em EM, a sensibilidade da resposta do equipamento vai depender do tipos de fonte de ionização utilizada. Há alguns anos, a interface *termospray* (TS) era frequentemente empregada na determinação de resíduos e contaminantes.

Atualmente, a utilização desta fonte é raramente relatada, devido ao desenvolvimento de novas fontes de ionização que proporcionam melhor desempenho. A interface TS foi substituída pelas interfaces que promovem a ionização à pressão atmosférica (API - *atmospheric pressure ionization*) como, por exemplo, a ionização por eletronebulização (ESI - *electrospray ionization*) e a ionização química à pressão atmosférica (APCI - *atmospheric pressure chemical ionization*). Estas interfaces proporcionam um incremento de cerca de duas ordens de magnitude na sensibilidade, quando comparadas com a fonte de ionização TS (CHIARADIA et al., 2008; CALDAS et al., 2011; SILVA; COLLINS, 2011).

A configuração mais utilizada em CL-EM é a que resulta do acoplamento do sistema de cromatografia líquida com um analisador de massas do tipo triplo quadrupolo (QqQ) e este pode operar tanto no modo de varredura (*screening*) como no modo “MS-MS” (*tandem mass spectrometry*) utilizando o monitoramento de reações selecionadas (*selected reaction monitoring, SRM*) ou múltiplas (*multiple reaction monitoring, MRM*). A “Tandem-MS” pode ser entendida como espectrometria de massas de modo sequencial, ou seja, uma sequência de análise que envolve pelos menos três estágios. O primeiro estágio é a seleção de um íon precursor (assim chamado porque dele serão formados outros íons). O segundo estágio consiste na ruptura deste íon precursor para gerar íons-fragmentos (antigamente chamados de íons filhos numa adaptação do inglês *daughter ions*). O terceiro estágio compreende a separação e detecção destes fragmentos. Os analisadores do tipo QqQ tornaram-se os mais utilizados devido à facilidade de manuseio e tamanho reduzido (CHIARADIA et al., 2008; CALDAS et al., 2011).

As águas superficiais ou esgotos domésticos podem exercer efeitos de matriz elevados, pois podem diminuir ou aumentar o sinal do analito, principalmente quando se trabalha com sistemas de alta detectabilidade como o EM em série (EM-EM). E para evitar tal acontecimento, padrões internos (PI) com estrutura semelhante à dos compostos de interesse ou compostos isotopicamente marcados são adicionados, cuja área será comparada nas injeções das soluções padrão e nas injeções da matriz para verificar se houve alguma variação nas áreas dos compostos (SILVA; COLLINS, 2011).

### 2.4.3. Alguns exemplos de concentrações dos parabenos detectados em matrizes ambientais

Os parabenos quando são liberados nos ambientes aquáticos estão previstos para se acumularem no sedimento, sendo que alguns parabenos foram detectados na água de um rio no sul da Inglaterra em uma concentração de até  $0,15 \text{ mgL}^{-1}$ . A concentração pode ser maior em córregos onde há descarga de efluentes, podendo causar uma resposta fisiológica nos organismos aquáticos, especialmente em área residencial sem sistema de tratamento de esgoto (YAMAMOTO et al., 2011).

Lee et al. (2005) analisaram n-butilparabeno, n-propilparabeno, etilparabeno, metilparabeno em afluente e efluente da ETAR Canadenses e detectaram nas concentrações de  $2,43$  e  $0,04 \text{ mgL}^{-1}$ , respectivamente. Canosa et al. (2006) também quantificaram os quatro parabenos em esgoto do hospital, em ETAR afluente e efluente da Espanha, as concentrações encontradas no total foram próximas as encontradas no Canadá no estudo de Lee et al. (2005), de  $2,4$ ,  $2,92$ , e  $0,064 \text{ mgL}^{-1}$ , respectivamente.

Albero et al. (2012) analisaram amostras de lodo de esgoto coletados em estações de tratamento (ETAR) localizadas em várias zonas urbanas, industriais e rurais de Madrid (Espanha) e encontraram concentrações de metilparabeno variando de  $5,1$  a  $26,2 \text{ ng g}^{-1}$  e de propilparabeno de até  $44,1 \text{ ng g}^{-1}$ . González-Marino et al. (2011) detectaram em amostras de três estações de tratamento de águas residuais (ETAR) na Espanha concentrações de metil e propilparabeno variando de  $0,3$  a  $10 \text{ } \mu\text{gL}^{-1}$ . Já Ramaswamy et al. (2011) analisaram metil e propilparabeno em águas de um rio na Índia e encontraram concentrações de  $22,8 \text{ ngL}^{-1}$  e  $57,0 \text{ ngL}^{-1}$ , respectivamente.

Tabela 4 - Concentrações dos metil- e propilparabeno em águas superficiais copiladas da literatura

Local	Faixa de concentração		Referência
	MP (ngL <sup>-1</sup> )	PP (ngL <sup>-1</sup> )	
Pearl River Delta, Sul da China	NQ-1062	NQ-3142	Peng et al. (2008)
South Wales, Reino Unido	<0,3-400	<0,2-24	Kasprzyk-Hordern et al. (2008)
Galicia, Espanha	1,8-17,3	NQ-69	González-Mariño et al. (2009)
Nordeste da Suíça	3,1-17	<0,5-5,8	Jonkers et al. (2009)
Sul da Índia	ND-22,8	ND-57	Ramaswamy et al. (2011b)
Córrego urbano em Tokushima e Osaka, Japan	25-676	<0,8-207	Yamamoto et al. (2011)
Região Pacífica do Japan	2,1-5,4	4,9-25	Terasaki et al. (2012)
Pittsburgh, USA	2,2-17,3	ND-12	Renz et al. (2013)

NQ – detectado, mas não quantificado; ND – não detectado.

Não existem estudos com os parabeno realizados em águas superficiais no Rio de Janeiro, visto que é um Estado que abrange bacias hidrográficas importantes. A partir desses valores obtidos na literatura observa-se que os parabeno estão presentes em diversos corpos hídricos e principalmente em cidades bastante povoadas e industrializadas.

As concentrações de parabeno encontradas no meio ambiente são extremamente baixas e quando comparadas as concentrações obtidas através do ensaio YES onde começam a apresentar atividade estrogênica, há uma diferença grande, porém os DEs reagem entre si, através do efeito sinérgico, e com isso podem causar algum efeito nos seres humanos e animais.

### **3. DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO**

Esse trabalho tem como área de estudo o rio Maracanã que está inserido em uma das bacias de drenagem da Baía de Guanabara, a Bacia do Canal do Mangue que tem como outros principais rios, o Joana, o Trapicheiros e o Comprido.

#### **3.1. Rio Maracanã**

O rio Maracanã é o principal formador da Bacia do Canal do Mangue e esta faz parte do compartimento das Bacias do oeste da Guanabara. As principais cabeceiras se encontram na vertente norte do maciço da Tijuca, sem uma drenagem principal. Uma série de pequenas drenagens verte quase que diretamente para a baía detritos e poluentes da cidade do Rio de Janeiro e parte da região Metropolitana. As nascentes que se encontram no maciço da Tijuca são áreas protegidas por grandes extensões do Parque Nacional da Tijuca, onde contam com florestas secundárias em bom estado e mantêm uma rede complexa de canais. Nos cursos médios já na área urbana, os rios passam a correr em canais retificados completamente urbanizados (PDRH-BG, 2004).

O rio Maracanã nasce na Floresta da Tijuca, possui uma extensão de aproximadamente 7 km, que vai do Largo da usina até o Canal do Mangue, o seu curso tem direção sudeste-noroeste, é acompanhado paralelamente pela Rua Conde de Bonfim, alcançando a Avenida Maracanã, com vários pontos de inundações em ruas próximas ao canal e tem seu baixo curso em área urbana e sua nascente em área de preservação ambiental (PDRH-BG, 2004).

Segundo o Boletim Consolidado de Qualidade das Águas da Baía de Guanabara fornecido pelo INEA (2013), a qualidade da água do Canal do Mangue e do seu principal formador, o Rio Maracanã, variou nos anos de 2012 e 2013 de ruim para muito ruim, ou seja, continua sofrendo sérios impactos em virtude dos descartes de esgoto doméstico e efluentes industriais produzidos nesta região.

As áreas ocupadas pela população nesta região localizam-se em uma significativa porção da Zona Norte do município do Rio de Janeiro, entre o Maciço da

Tijuca e a Baía de Guanabara, tendo um reduzido espaço de relevo plano para um desenvolvimento urbano adequado, o que, aliás, se repete em diversas outras partes da cidade do Rio de Janeiro. (RANGEL, 2011).

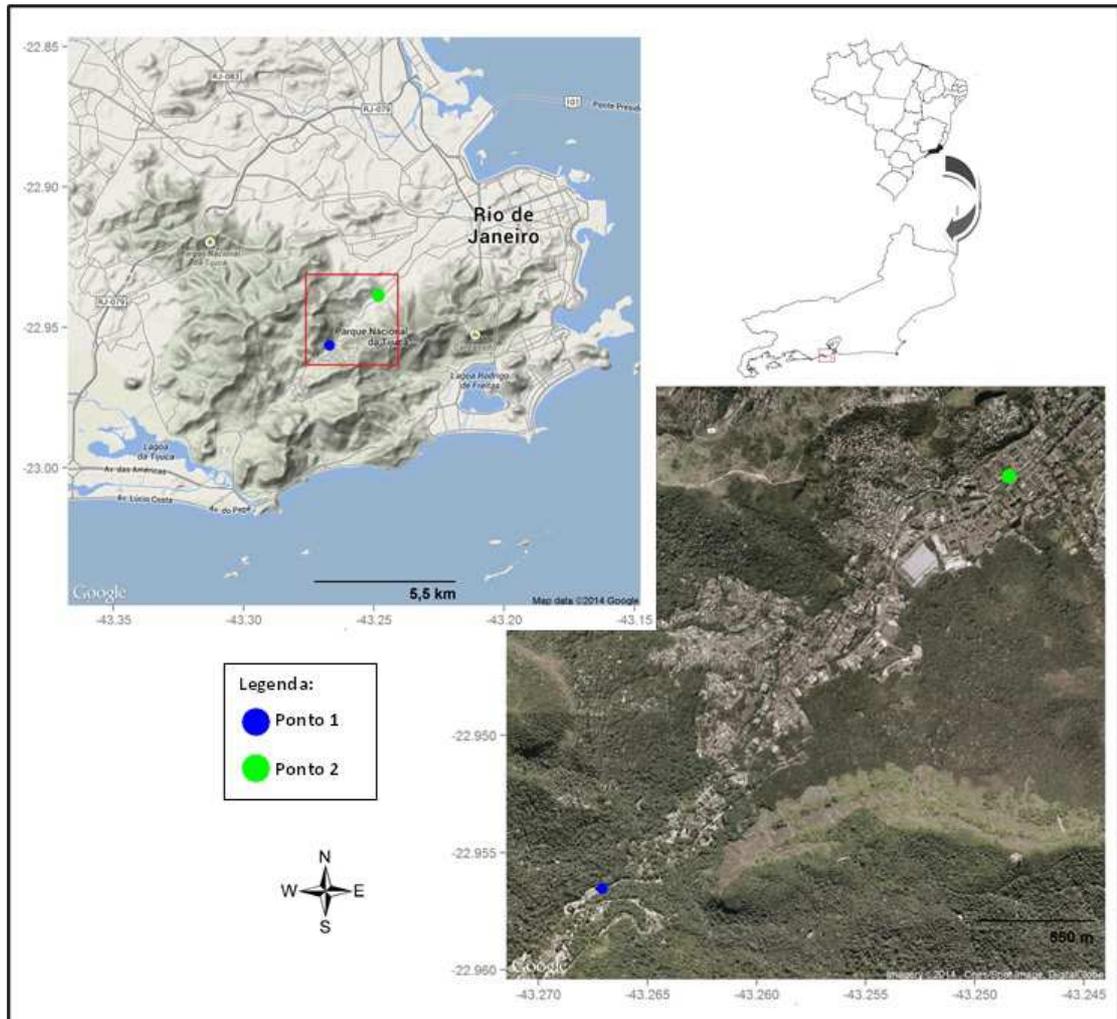
A condição climática sob a qual encontra-se a cidade do Rio de Janeiro, caracteriza-se pelas altas temperaturas e valores expressivos de umidade e precipitação, principalmente no verão, onde se tem as chuvas intensas (COELHO NETO, 1992).

### **3.2. Amostragem**

Foram realizadas duas coletas no Rio Maracanã, uma no dia 10 de fevereiro de 2014 e a outra no dia 13 de março de 2014. As coletas foram realizadas em dois pontos do rio Maracanã sendo que na primeira foram coletados 5L de água em cada ponto e na segunda foram 4L, em garrafas de vidro âmbar de 1L contendo 10 mL de metanol em cada, para evitar a degradação microbiológica dos compostos de interesse. Essas amostras foram utilizadas nas análises cromatográficas. Para a caracterização físico-química foram coletados 2L de água em cada ponto em garrafas de plástico.

A Figura 11 apresenta dois tipos de mapas da localização dos pontos de amostragem no Rio Maracanã, um com uma visão aproximada e outro com uma visão mais ampla.

Figura 11 - Localização dos pontos de amostragem no Rio Maracanã



O ponto 1 (Figura 12) está localizado no Alto da Boa vista em uma área onde aparentemente não existe nenhuma fonte de contaminação mas é uma área onde ocorrem práticas religiosas, sendo visualmente observado a presença de embalagens e resíduos de alimentos.

Figura 12 - Foto do ponto 1 de coleta no Rio Maracanã - Alto da Boa Vista



O ponto 2 (Figura 13) está localizado em área urbana, aparentemente muito poluído, e com odor muito desagradável. Ao seu redor se encontra a Comunidade do Vidigal, condomínios de apartamentos e o Hospital São Francisco da Providência de Deus.

Figura 13 - Foto do ponto 2 no Rio Maracanã– Descida do Alto da Boa Vista



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os testes de ecotoxicidade e o ensaio YES foram realizados no Laboratório de Engenharia Sanitária (LES) do Departamento de Saneamento e Meio Ambiente da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (DESMA/UERJ). As análises cromatográficas foram realizadas no Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana da Fundação Oswaldo Cruz (CESTEH/FIOCRUZ).

Na primeira parte desse estudo foram desenvolvidos ensaios para determinar a atividade estrogênica através do ensaio YES e testes para determinar a toxicidade aguda em *Daphnia similis* e em *Aliivibrio fischeri* a partir de amostras sintéticas de diferentes concentrações dos conservantes metilparabeno e propilparabeno ambos da marca Sigma-Aldrich Chemical. Os frascos contendo os conservantes em pó foram estocados a temperatura ambiente durante todo o experimento, conforme determina o fabricante.

Na segunda parte desse estudo realizou-se coletas de amostra de água do Rio Maracanã, localizado na cidade do Rio de Janeiro e a partir dessas amostras foram determinados os parâmetros físico-químicos e a análise cromatográfica pela cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa para a identificação e a quantificação dos parabenos.

### 4.1. Ensaio YES (Yeast Estrogen Screen)

#### 4.1.1. Preparo das amostras sintéticas dos parabenos

As amostras foram preparadas a partir de diferentes concentrações dos padrões sintéticos metilparabeno (MP) e propilparabeno (PP) diluídos em etanol puro (grau HPLC, Sigma-Aldrich®) e conservadas em geladeira durante todo o experimento. Inicialmente foi preparada uma solução estoque de  $1000 \text{ mgL}^{-1}$  de cada um dos parabenos e a partir dessa solução estoque foram preparados soluções em diversas concentrações, são elas,  $0,5 \text{ mgL}^{-1}$  (MP e PP),  $10 \text{ mgL}^{-1}$  (MP e PP),  $100 \text{ mgL}^{-1}$  (MP e PP),  $800 \text{ mgL}^{-1}$  (MP). Para a obtenção de uma curva

sigmoidal dos parabenos similar a curva do  $17\beta$ -estradiol (padrão de comparação) obtida no ensaio YES, realizou-se os ensaios com soluções iniciais de  $3200\text{mgL}^{-1}$  de MP e  $200\text{mgL}^{-1}$  de PP.

#### 4.1.2. Preparo das soluções do ensaio YES

A metodologia utilizada para a determinação da atividade estrogênica foi à desenvolvida por Routledge e Sumpter, (1996), seguindo as orientações e adaptações de Bila (2005).

Todo o material envolvido no preparo das soluções foi previamente limpo com Extran, água destilada, água ultrapura e rinsados com etanol (grau HPLC, Sigma-Aldrich®). A vidraria utilizada foi dedicada exclusivamente ao ensaio YES, para evitar possíveis interferências ou contaminações.

Impurezas ou contaminações podem causar falsos positivos no ensaio YES, por isso todos os reagentes, água e materiais utilizados na manipulação das soluções do teste devem ter alto grau de pureza. Todos os reagentes utilizados foram adquiridos da Sigma-Aldrich®, com alto grau de pureza, e utilizados exclusivamente para o teste. A água ultrapura foi obtida pelo sistema Mili-Q - Millipore.

As soluções foram preparadas segundo os procedimentos descritos a seguir e foram manipuladas somente na capela de fluxo laminar.

##### 4.1.2.1. Meio mínimo

O meio mínimo foi preparado adicionando-se os seguintes reagentes a 1L de água ultrapura: 13,61 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1,98 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 4,2 g de KOH; 0,2 g de  $\text{MgSO}_4$ ; 1mL de solução de  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  (40mg/50mL de água ultrapura); 50 mg de L-leucina; 50 mg de L-histidina; 50 mg de adenina; 20 mg de L-arginina; 20 mg de L-metionina; 30 mg de L-tirosina; 30mg de L-isoleucina; 30 mg de L-lisina-HCl; 25 mg de L-fenilalanina; 100 mg de ácido glutâmico; 150 mg de L-valina e 375 mg de L-serina.

Este meio foi dividido em duas alíquotas, armazenado em frascos de vidro e esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos. A solução foi então estocada à temperatura ambiente, com o cuidado de vedar a rosca do frasco de vidro com filme plástico.

#### 4.1.2.2. Solução de vitamina

A solução de vitamina foi preparada adicionando-se os seguintes reagentes a 180 mL de água ultrapura: 8 mg de tiamina; 8 mg de piridoxina; 8 mg de pantetonato de cálcio; 40 mg de inositol e 20 mL de solução de biotina (2 mg/100 mL de água ultrapura).

A solução foi esterilizada utilizando-se um kit de filtração estéril, com membrana de 0,2 µm, e armazenada a 4°C em alíquotas de 10 mL em tubos falcon estéreis, com o cuidado de vedar a rosca com filme plástico. Todo o procedimento de filtração foi realizado em capela de fluxo laminar.

#### 4.1.2.3. Solução de glucose

A solução de glucose foi preparada a 20% p/v (20 g/100 mL), dissolvendo a glucose em água ultrapura, e esterilizada em frascos de vidro em autoclave a 121°C por 10 min. A solução foi armazenada à temperatura ambiente, novamente com o cuidado de vedar a rosca do frasco de vidro com filme plástico.

#### 4.1.2.4. Solução de ácido L-aspártico

A solução de ácido L-aspártico foi preparada na concentração de 4 mgmL<sup>-1</sup>, com água ultrapura, e esterilizada em autoclave a 121°C por 10 min. A solução foi armazenada à temperatura ambiente, com o cuidado de vedar a rosca com filme plástico.

#### 4.1.2.5. Solução de L-treonina

A solução estoque foi preparada na concentração de  $24 \text{ mgmL}^{-1}$  (600 mg/25 mL) com água ultrapura e esterilizada em autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  por 10 min. Os frascos com a solução foram armazenados a  $4^{\circ}\text{C}$ , com o cuidado de vedar a rosca com filme plástico.

#### 4.1.2.6. Solução de sulfato de cobre (II)

A solução de sulfato de cobre (II) foi preparada na concentração de 20 mM (0,5g/100mL), com água ultrapura. A solução foi esterilizada utilizando-se um kit de filtração estéril com membrana de  $0,2 \mu\text{m}$ , e armazenada em tubos falcon, à temperatura ambiente, novamente, com o cuidado de vedar a rosca dos tubos com filme plástico antes do armazenamento.

#### 4.1.2.7. Solução de CPRG (Clorofenol vermelho- $\beta$ -D-galactopiranosida)

A solução de CPRG foi preparada no mesmo dia em que os testes foram realizados. A solução foi feita na concentração de  $10 \text{ mgmL}^{-1}$ , utilizando água Milli-Q. Foi armazenada em frascos de vidro âmbar estéreis, à temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ . Os frascos foram cobertos com papel alumínio, para evitar a passagem de luz para a solução.

#### 4.1.2.8. Meio de cultivo

O meio de cultivo foi preparado pela mistura de: 5 mL da solução de glucose; 1,25 mL da solução de ácido L-aspártico; 0,5 mL da solução de vitamina; 0,4 mL da solução de L-treonina;  $125 \mu\text{L}$  da solução de sulfato de cobre (II) e 45 mL de meio mínimo.

O procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar, e a solução foi armazenada em frasco de vidro estéril, à temperatura ambiente. O meio de cultivo foi utilizado dentro do prazo máximo de 2 semanas. Preferencialmente, o meio de cultivo foi preparado sempre no momento do seu uso.

#### 4.1.3. Cultivo da cepa

A cepa de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada foi gentilmente cedida pela Prof<sup>a</sup>. Marcia Dezotte (UFRJ).

O preparo da cepa foi realizado segundo o protocolo apresentado por Routledge e Sumpter (1996).

O flaconete contendo a cultura de levedura preservada com glicerol foi armazenado em freezer a -80°C até o momento da utilização.

Próximo da realização dos ensaios, a cepa foi descongelada à temperatura ambiente e centrifugada a 4°C por 10 minutos a 2000 g. O sobrenadante foi descartado, e metade das células foi ressuspendida em 5,0 mL do meio mínimo com 15% de glicerol. Esta cultura foi dividida em dois frascos de cultivo, ao qual foram adicionados 10 mL do meio de cultivo. Os frascos de cultivo foram incubados sob agitação, a 28°C e 100 rpm em incubadora de bancada com agitação orbital Quimis modelo Q816M20. A parcela restante das células foi armazenada em glicerol, e novamente congelada, para a manutenção da cepa.

O procedimento de repique foi realizado novamente após 24 horas, adicionando-se 100µL da cultura inicial a um frasco de cultivo contendo 10 mL de meio de cultivo. Todo o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar. Os frascos de cultivo foram incubados a 28°C e 100 rpm em incubadora de bancada com agitação orbital Quimis modelo Q816M20. Próximo à realização do teste, de 1 a 2 dias antes, o repique foi realizado novamente, para que a cepa pudesse ser utilizada.

#### 4.1.4. Procedimento do teste YES

As amostras foram analisadas em duplicata, juntamente com a curva de  $17\beta$ -estradiol.

O procedimento para o teste seguiu as orientações de Routledge e Sumpter (1996) e de Bila (2005). O procedimento foi realizado conforme treinamento realizado no Laboratório de Engenharia Sanitária (LES/DESMA/UERJ).

O teste foi realizado em placas de 96 poços para cultura, com fundo chato e tampa, estéreis (TPP®). Todo o material utilizado para manuseio e armazenamento de soluções durante a execução do teste foi previamente esterilizado. As ponteiras utilizadas foram limpas com água ultrapura e etanol antes de serem autoclavadas. E utilizou-se pipetas graduadas descartáveis.

##### 4.1.4.1. Diluições das amostras dos padrões sintéticos

O preparo das diluições foi realizado em uma placa de 96 poços dedicada a esta finalidade. As amostras foram diluídas na proporção 1:2, seguindo o roteiro:

- Adicionar 100 $\mu$ L de etanol (grau HPLC) nos poços da fileira de diluição da amostra, com exceção do primeiro poço;
- No primeiro poço, adicionar 200 $\mu$ L da amostra;
- No segundo poço, adicionar 100 $\mu$ L da solução do primeiro poço e agitar (a agitação foi feita com a própria pipeta automática, retirando e retornando a amostra ao poço algumas vezes);
- No terceiro poço, adicionar 100 $\mu$ L da solução do terceiro poço e agitar;
- Seguir com este procedimento até o último poço, que ficará com o volume final de 200 $\mu$ L.

As amostras diluídas foram transferidas imediatamente para a placa de análise, no volume de 10  $\mu$ L de cada amostra para cada poço, em duplicata. Deixou-se as amostras evaporarem totalmente, dentro da capela de fluxo laminar, para dar prosseguimento ao teste. Durante a preparação das placas, tomou-se o cuidado de

não encostar a ponteira na borda dos poços, para evitar contaminação dos poços vizinhos.

#### 4.1.4.2. Diluições da curva padrão de 17 $\beta$ -estradiol

O teste YES foi sempre executado com uma curva padrão de 17 $\beta$ -estradiol como referência. Esta curva abrangeu as concentrações de 17 $\beta$ -estradiol de  $2 \cdot 10^{-7}$  M a  $9,77 \cdot 10^{-11}$  M ( $54,48 \mu\text{gL}^{-1}$  a  $0,27 \text{ ngL}^{-1}$ ). Esta solução foi preparada a partir do padrão de 17 $\beta$ -estradiol (> 98%, Sigma-Aldrich®) em etanol (grau HPLC, Sigma-Aldrich®).

A diluição da curva foi realizada serialmente, na placa dedicada à diluição. O procedimento seguiu o mesmo adotado anteriormente para as amostras, realizando-se diluições 1:2, conforme apresentado.

#### 4.1.4.3. Preparo do meio de análise para o teste YES

O preparo do meio de análise para o ensaio foi realizado em tubos do tipo falcon, estéreis. Foi inicialmente preparado o meio com a levedura e em seguida o meio de análise.

Todo o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar. O preparo seguiu o roteiro apresentado:

##### 1. Preparo do meio com a cultura de levedura

Em um tubo falcon estéril de 10 mL foram adicionados 4,0 mL do meio de cultivo e 1,1 mL do cultivo da levedura (preparado de 1 a 2 dias antes do teste, conforme apresentado no item 5.1.3). Leu-se então a absorbância a 620 nm desta cultura. O procedimento foi definido conforme a faixa de absorbância atingida:

- Absorbância 0,8 a 1,0: faixa boa, cultura pronta para o uso
- Absorbância inferior a 0,8: adicionar pequenos volumes de levedura (de 0,2 a 0,2 mL) até atingir a absorbância de 0,8
- Absorbância superior a 1,0: adicionar pequenos volumes de meio de cultura.

Vale destacar que este procedimento foi todo realizado em capela de fluxo laminar. Uma vez que a cultura foi retirada da capela para a leitura de sua absorbância esta não foi mais utilizada. Portanto, o preparo desta etapa do teste YES foi sempre realizado em duplicata ou ainda em triplicata, já que pelo menos um dos tubos era descartado.

Este procedimento é uma adaptação do método original de Routledge e Sumpter (1996) para facilitar a etapa de contagem das células de levedura, e tem sido adotado com sucesso em diversas pesquisas, como Beck et al (2006) e Frische et al (2009).

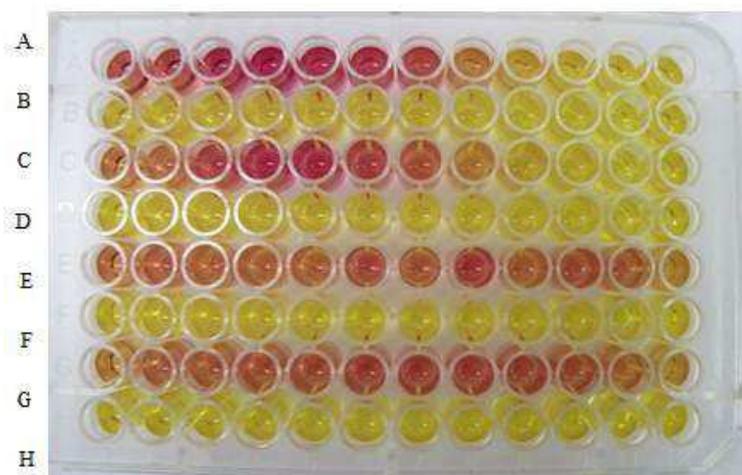
## 2. Preparo do meio de análise

Em um tubo Falcon de 50 mL foram adicionados 25 mL do meio de cultivo, 250  $\mu$ L de solução de CPRG e 25  $\mu$ L do meio com a cultura de levedura.

### 4.1.5. Preparo das placas de teste

O preparo das placas de análise foi realizado conforme exemplificado na Figura 14. As linhas A e C são a curva de  $17\beta$ -estradiol, em duplicata. As linhas E e G são da amostra analisada, em duplicata. As linhas B, D, F e H são o branco (somente etanol).

Figura 14 - Placa de análise do ensaio YES após o período de incubação (72h)



Fonte: BILA, 2005.

Em toda batelada de testes realizados foi feita uma curva de  $17\beta$ -estradiol, pelo menos em duplicata.

Para o preparo da placa de análise, inicialmente adicionou-se 10  $\mu$ L de etanol em cada poço nas linhas correspondentes aos brancos. Em seguida, foram transferidos 10  $\mu$ L de cada amostra para cada poço da linha correspondente da placa. Após a evaporação completa das amostras, foi adicionado 200 $\mu$ L do meio de análise em cada poço, tomando-se o cuidado de colocar o meio de análise primeiro nas linhas com o branco, de modo a evitar uma eventual contaminação do meio de análise. Em seguida, colocou-se o meio de análise nas linhas de amostra, com o cuidado de trocar as ponteiros a cada amostra.

As placas foram então fechadas e lacradas com fita adesiva nas laterais e foram agitadas por 2 min em um agitador de placas de 96 poços (IKA, MS-3). As placas foram incubadas em estufa aquecida a 30°C, por 72 horas. Após o tempo de incubação, as placas foram retiradas da incubadora e deixadas em repouso por 1 hora antes da leitura. Nesse estágio é possível observar a mudança na coloração dos poços, que passam de amarelo a tons de rosa, e aumento da turbidez nos mesmos, resultado da produção da  $\beta$ -galactosidase e do crescimento da levedura.

A leitura foi realizada nos comprimentos de onda de 540 nm, para cor, e 620 nm, para turbidez (ou no comprimento de onda disponível mais próximo destes), em um espectrofotômetro de 96 poços (Softmax Pro 5, SpectraMax M3).

Após a leitura as placas foram autoclavadas a 121°C por 15 min antes de serem descartadas. Vale lembrar que todo o material envolvido no teste que tenha entrado em contato com a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* foi autoclavado antes do seu descarte.

#### 4.1.6. Análise dos dados do ensaio YES

Com os valores das leituras de absorbância seguiu-se a construção dos gráficos com as curvas resposta do teste. Inicialmente, corrigiu-se os valores de absorbância, conforme Equação (1) apresentada por Bila (2005):

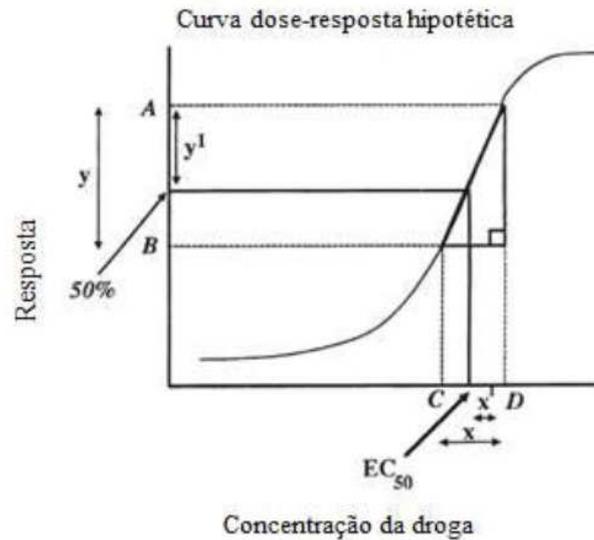
$$A_{\text{corrigida}} = A_{\text{amostra540nm}} - (A_{\text{amostra620nm}} - A_{\text{branco620nm}}) \quad (1)$$

A correção foi feita em cada amostra, utilizando os valores de absorvâncias obtidos nos dois comprimentos de onda para cada concentração na curva. Para calcular esta correção, utilizou-se a média dos valores das absorvâncias das duas fileiras de brancos correspondentes às amostras (linhas B e D ou F e H, resultando na média de 24 amostras de branco, exceto casos indicados onde foi necessário descartar alguma amostra de branco devido a contaminação). Assim, os dados apresentados correspondem à média das absorvâncias das amostras analisadas em duplicata, salvo casos indicados em que foram apresentados outros valores.

As curvas dose-resposta foram construídas relacionando-se os valores de absorvância corrigida em função da concentração das amostras em escala logarítmica. Calculou-se então o CE50 das amostras, a partir do CE50 da curva padrão de 17 $\beta$ -estradiol. O valor de CE50 corresponde àquela concentração que elucida 50% da maior resposta obtida da  $\beta$ -galactosidase no teste YES, em relação à curva padrão.

Para o cálculo do CE50 da curva utilizou-se o método apresentado por Alexander et al (1999). Optou-se por adotar este método por ele oferecer um caminho simples e preciso para o cálculo deste parâmetro, baseado nos princípios de um triângulo retângulo. O cálculo é feito a partir dos pontos apresentados na Figura 15. No caso do teste YES, o eixo y corresponde aos valores de absorvância corrigidos e o eixo x à concentração em mgL<sup>-1</sup>. Para este cálculo, assumiu-se que a porção ascendente da curva dose-resposta é linear, e que os pontos que definem este trecho correspondem à máxima e à mínima indução da  $\beta$ -galactosidase observadas no teste YES.

Figura 15 - Gráfico dose-resposta ilustrando os pontos utilizados para o cálculo do valor de CE50.



Fote: Alexander et al (1999).

Assim, calculou-se o valor de Y<sub>50</sub>, que neste caso corresponde à 50% da máxima resposta obtida, para a curva padrão de 17β-estradiol de acordo com a Equação (2):

$$Y_{50} = 50\% \text{maxresposta} = \frac{A - B}{2} + B \quad (2)$$

Em seguida, calculou-se o valor de CE<sub>50</sub>, pela Equação (3) apresentada por Alexander et al (1999):

$$EC_{50} = D - \frac{(A - 50\% \text{maxresposta}) \cdot (D - C)}{A - B} \quad (3)$$

Com isto, obteve-se o valor de CE<sub>50</sub> da curva padrão de 17β-estradiol. Para calcular o valor de CE<sub>50</sub> das amostras, realizou-se primeiramente o ajuste dos dados à curva sigmoide, segundo DE LEAN et al (1978) *apud* FISCHER (2013), pelas Equações (4) e (5):

$$y = \frac{(A - B)}{1 + \left(\frac{x_0}{x}\right)^p} + B \quad (4)$$

Onde:

$$p = \frac{A-B}{\log D - \log C} \quad (5)$$

O valor de y corresponde ao valor da absorbância corrigida da amostra (correspondente ao valor de Y50 de cada amostra); A corresponde à máxima indução da atividade estrogênica; B corresponde ao limite de detecção; p é a inclinação do trecho linear da curva (entre A e B); X corresponde ao valor de CE50 da amostra, e  $x_0$  corresponde ao valor de CE50 da curva padrão de 17 $\beta$ -estradiol.

Assim, a equação da curva, rearranjada para o cálculo do valor de x é apresentada pela Equação (6):

$$X = \frac{x_0}{\left(\frac{A-B}{Y-B} - 1\right)^{\frac{1}{p}}} \quad (6)$$

Com a Equação 6, pode-se então obter os valores de CE50 das amostras, expressas em equivalentes de estradiol (EQ-E2).

Para avaliar o potencial estrogênico de cada substância em relação ao 17 $\beta$ -estradiol, determinou-se a potência relativa estrogênica de cada uma (BILA, 2005). Esta relação é definida pela Equação (7):

$$PR = \frac{CE_{50} \text{ Estradiol}}{CE_{50} \text{ Amostra}} \quad (7)$$

Quanto mais próximo ou maior que 1 o valor de PR, significa que a amostra possui uma maior estrogenicidade. Quanto mais próximo de 0 este valor, significa que a amostra possui menor potencial estrogênico. A determinação da potência relativa em relação ao padrão de 17 $\beta$ -estradiol pode ser considerada como um ensaio biológico indireto. Neste tipo de ensaio assume-se que as amostras analisadas comportem-se como uma diluição ou uma forma mais concentrada do padrão. Assim, esta comparação direta entre as amostras é válida somente sob

algumas condições. As curvas dose-resposta do padrão e das amostras devem ser paralelas e a máxima resposta que pode ser atingida por ambas deve ser idêntica (BILA, 2005).

## **4.2. Ensaios de Ecotoxicidade Aguda**

Foram realizados ensaios ecotoxicológicos com dois organismos-teste de níveis tróficos diferentes: um consumidor primário, o microcrustáceo *Daphnia similis* e um decompositor, a bactéria luminescente *Aliivibrio fischeri*. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Engenharia Sanitária (LES) do Departamento de Saneamento e Meio Ambiente da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (DESMA/UERJ).

### 4.2.1. Preparo das amostras sintéticas para os ensaios de ecotoxicidade aguda

#### 4.2.1.1. Em *Daphnia similis*

A partir dos padrões da marca Sigma-Aldrich® dos metilparabeno e propilparabeno foram preparadas soluções estoque de  $300 \text{ mgL}^{-1}$  de cada parabeno em água de cultivo.

#### 4.2.1.2. Em *Aliivibrio fischeri*

A partir dos padrões da marca Sigma-Aldrich® dos metilparabeno e propilparabeno foram preparadas soluções estoque de  $300 \text{ mgL}^{-1}$  de cada parabeno em solução de NaCl 2%.

#### 4.2.2. Ensaio de toxicidade aguda com microcrustáceo *Daphnia similis*

##### 4.2.2.1. Cultivo e preparo do organismo-teste

O cultivo de *Daphnia similis* seguiu o procedimento descrito na norma NBR 12713 (ABNT, 2009).

No laboratório foram usados frascos de 2L com água preparada, água mineral com ajustes de parâmetros físico-químicos, chamada de água de diluição. Além dos ajustes de pH, condutividade, oxigênio dissolvido e dureza, a cultura foi mantida com a temperatura controlada ( $20^{\circ} \text{C} \pm 2$ ), em fotoperíodo (16 horas de luz e 8 horas de escuro) e com iluminação controlada (500-1000 lux). Cada frasco foi composto por 50 organismos, em média. Foram usados no cultivo dois frascos para cada etapa de idade, sendo que essas idades eram descritas por número de dias de vida: 0-7 dias, 7-14 dias, 14-21 dias e 21-28.

Figura 16 - Foto dos frascos de cultivo da *Daphnia similis* na estufa de fotoperíodo.



A água de cultivo foi substituída uma vez por semana, a fim de “trocar” as idades e manter os organismos em água limpa, sem excretas e carapaças. Ou seja, os indivíduos filhotes que completavam sete dias eram transferidos para outro frasco com *Daphnia similis* de 7-14 dias, e assim por diante. Além disso, todos os dias foram retirados os filhotes nascidos de indivíduos adultos (acima de 7 dias), além de excretas e carapaças.

As *Daphnia similis* foram alimentadas por uma espécie de alga também cultivada em laboratório, a *Monorraphydium dibowskii*.

O cultivo dessas algas foi primeiramente por repique em meio sólido (meio Chu+Agar) em placas de Petri por estriamento, e assim após uma semana de exposição à luz constante (4000 lux) à 25°C, estava pronta para repique em um Erlenmeyer para ser reproduzida em meio líquido (meio Chu), sendo que esse repique sólido em placa tem validade de 6 meses sob refrigeração de 4 a 10°C, sem presença de luz. O meio Chu líquido foi agitado por 7 dias em incubadora de bancada com agitação orbital Quimis modelo Q816M20 sob temperatura de 25° C, e rotação de 175 rpm e submetido à iluminação (4500 ± 200 lux) constante. Os conteúdos dos Erlenmeyers foram transferidos para um garrafão de vidro (± 5L) chamado fermentador, já esterilizado, onde as algas ficaram à temperatura ambiente, sob luz (4500 ± 200 lux) e aeração constante por 7 dias. Alíquotas líquidas da cultura de alga foram retiradas do fermentador para a alimentação das *Daphnia similis*. As células das algas em meio líquido foram contadas com o auxílio de uma câmara de Neubauer e no microscópio NIKON Eclipse, modelo E200, e assim foi usado um cálculo para uma proporção de volume que cada frasco de *Daphnia similis* deveria receber de alga como alimento. O meio Chu foi preparado a partir de dez soluções, conforme descrito na ABNT 12648 (ABNT, 2005).

#### 4.2.2.2.Procedimento do ensaio

Os ensaios com *Daphnia similis* foram realizados segundo a Norma NBR 12713 (ABNT, 2009). Indivíduos jovens, neonatos (6-24 horas de idade) de *Daphnia similis* provenientes de uma cultura de fêmeas, foram expostos a várias concentrações do agente químico, durante 48 horas, em temperatura 20°C±2, em

fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro. Os organismos foram retirados dos frascos de cultivo 6 horas antes da exposição dos organismos às amostras. Essa exposição ocorreu em tubos aferidos a 10 mL com 8 diluições (em quatro replicatas) e a amostra-controle (também em quadruplicatas), sendo que foram colocados 5 organismos em cada tubo (Figura 18). Antes do início do teste, foi preciso medir o pH, o oxigênio dissolvido, a condutividade e a dureza da água de cultivo e alguns parâmetros da amostra bruta (pH, condutividade, oxigênio dissolvido). Ao fim do ensaio, foi determinado o número de organismos imóveis e foram medidos o oxigênio dissolvido e o pH final das amostras e suas diluições. Utilizou-se o programa TRIMMED SPEARMAN-LCPIN para o cálculo da concentração que provocará a inibição de 50% (CE50) dos organismos-teste, o CE50. A partir das diluições e do número dos organismos que sofreram algum efeito em cada uma (mobilidade ou morte), calcula-se o FT, fator de toxicidade, que corresponde à menor diluição da amostra em que não ocorreu o efeito (mobilidade ou morte) em mais de 10% dos organismos.

Antes da realização dos ensaios ecotoxicológicos, é necessário realizar, paralelamente, ensaios de sensibilidade utilizando substâncias de referência, a fim de avaliar a sensibilidade do lote de organismos à respectiva substância padronizada. No caso de *Daphnia similis*, foi usado cloreto de potássio (KCl) em variadas diluições, e em quadruplicatas, como descrito na NBR 12713 (ABNT, 2009).

Figura 17 - Foto dos tubos de ensaio na estufa na realização dos testes de toxicidade aguda com *Daphnia similis* das substâncias metilparabeno e propilparabeno.



#### 4.2.3. Ensaio de toxicidade aguda com bactéria luminescente *Aliivibrio fischeri*.

##### 4.2.3.1. Cultivo e preparo do organismo-teste

A bactéria *Aliivibrio fischeri* foi adquirida comercialmente em forma liofilizada, por uma empresa revendedora certificada e transportada para o laboratório em isopor com gelo seco. Ao chegar ao laboratório, foi armazenada no freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso. Não foi necessário o cultivo em laboratório.

##### 4.2.3.2. Procedimento do ensaio

Para a realização dos ensaios com *Aliivibrio fischeri* foram utilizados a Norma Técnica NBR 15411-3 (ABNT, 2012) e o protocolo “Basic Test” do manual do equipamento Microtox da SDI.

O teste de sensibilidade para *Aliivibrio fischeri* foi realizado com sulfato de zinco heptahidratado ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) como substância de referência, como descrito na NBR 15411-3 (ABNT, 2012).

Foi determinada a taxa de inibição metabólica de bactérias marinhas liofilizadas a diferentes diluições de uma amostra durante determinado período. Para determinar o efeito tóxico da amostra, o *software* fez a comparação com a amostra-controle em função da luz emitida, que é menor quanto maior toxicidade da amostra. Logo a toxicidade relativa da amostra foi obtida em  $\text{mgL}^{-1}$  da substância comparada ao controle.

Foi utilizada a bactéria pura, sendo que a respectiva cultura contém  $10^8$  células por ampola, no equipamento Microtox, marca SDI, modelo 500 Analyser que consiste de um luminômetro, que possui um controle de temperatura, no qual os poços com as diluições ficam a  $15^{\circ}\text{C}$  e um compartimento separado para reconstituição da bactéria a  $3-5^{\circ}\text{C}$ . O *software* acoplado ao equipamento é o MICROTOX OMNI 4.1. Antes da realização do ensaio, o pH foi ajustado para 6,0-8,5 com HCl ou NaOH, as amostras foram diluídas com uma solução NaCl 2%, chamado diluente.

A bactéria foi utilizada diluída, conforme apresentado a seguir, devido a sua alta produção de luz quando pura (bactéria reagente). O valor de luminescência inicial da bactéria deve estar entre a faixa de 80 a 120 de luz, conforme a norma Técnica NBR 15411-3 (ABNT, 2012). Por esse motivo a concentração inicial da amostra é reduzida para  $270 \text{ mgL}^{-1}$ .

100  $\mu\text{L}$  bactéria-reagente são transferidos para 900  $\mu\text{L}$  diluente, logo:  
 $900 \div (900 + 100) = 0,9$   
 $300 \text{ mgL}^{-1} \times 0,9 = 270 \text{ mgL}^{-1}$

A princípio, foi realizada a adição da alíquota da solução de reconstituição na câmara de resfriamento e o diluente nos compartimentos a  $15^\circ \text{ C}$ , e assim permaneceu estabilizando a temperatura por 15 minutos.

Procedeu-se primeiramente a leitura no tempo zero, que foi uma leitura da luminescência das bactérias sem a presença da amostra. Após essa primeira leitura, a amostra bruta e as suas diluições foram transferidas para as cubetas onde estavam as bactérias. Assim, no próprio *software* estavam programados os tempos para leitura em 5, 15 e 30 minutos.

Figura 18 - Foto do equipamento Microtox SDI, 500 Analyser, utilizado no ensaio com a bactéria *Aliivibrio fischeri*

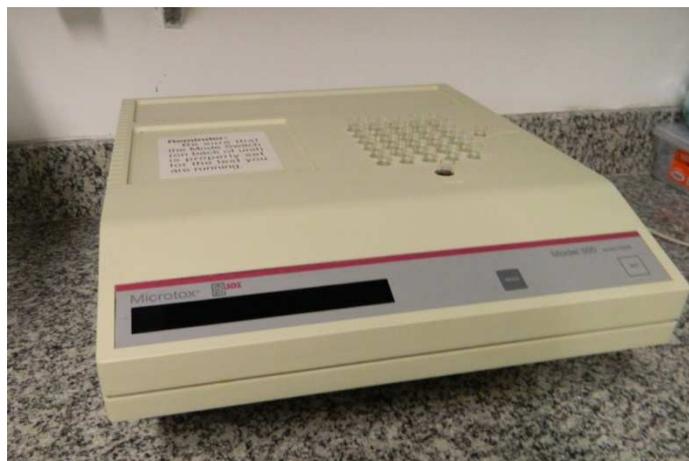


Figura 19 - Esquema da realização das diluições seriadas das amostras sintéticas nos ensaios com *Aliivibrio fischeri*

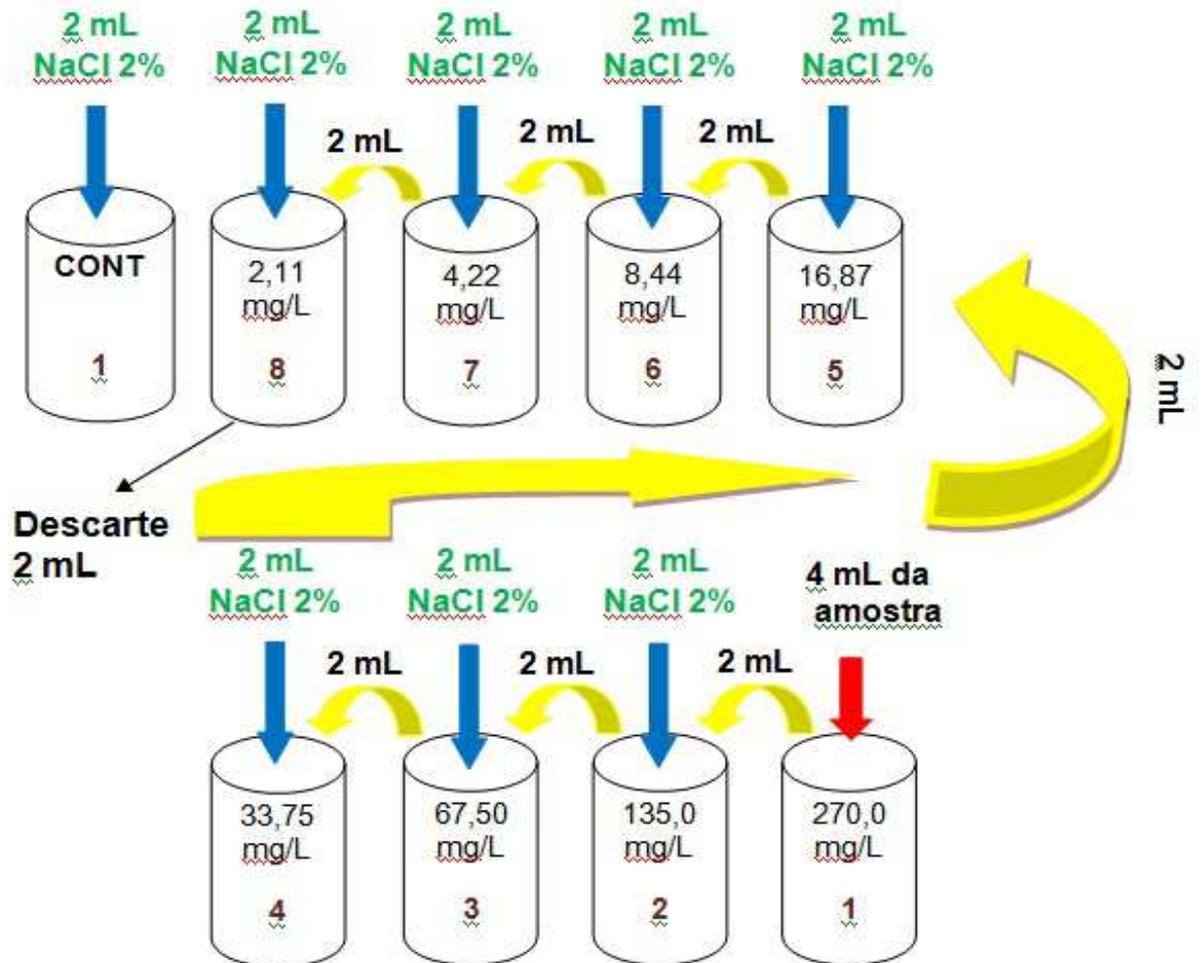
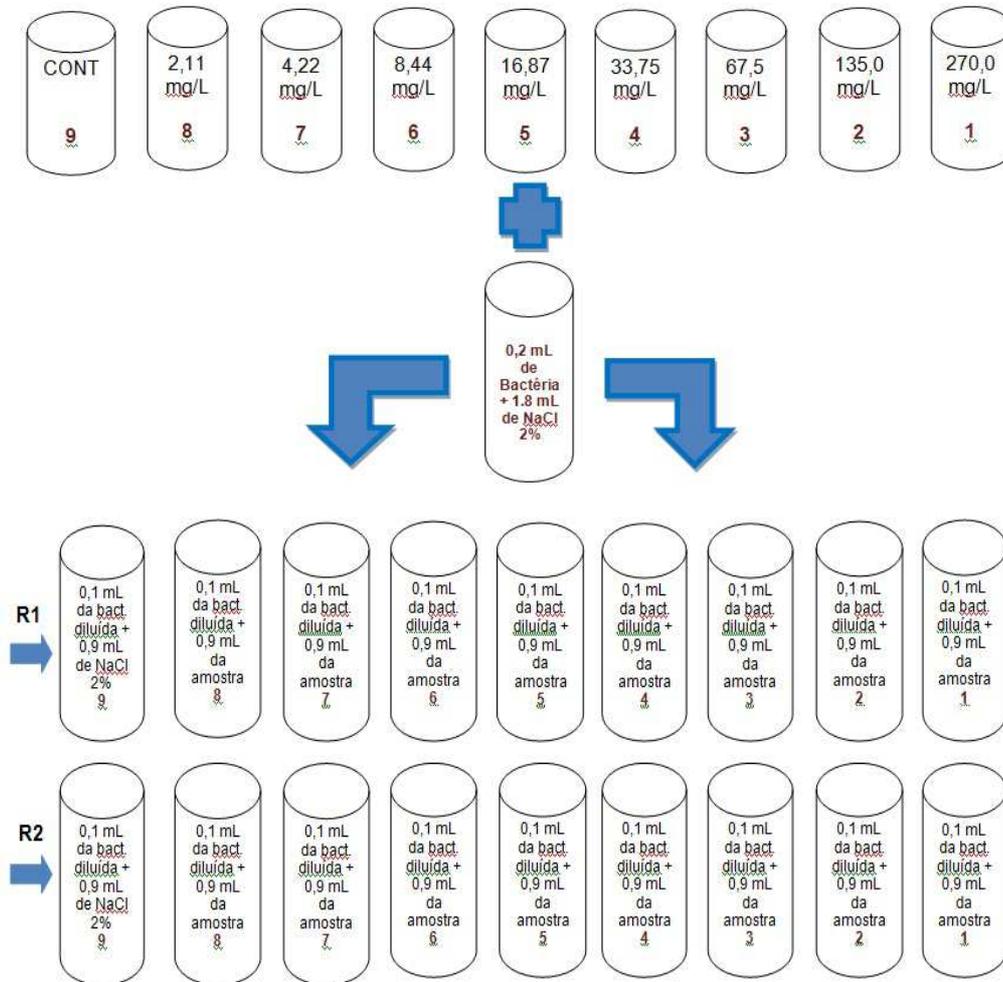


Figura 20 - Esquema da adição da amostra diluída à bactéria diluída em NaCl 2%, em duplicata.



A análise estatística foi realizada pelo *software* Microtox OMNI 4.1, que calcula a porcentagem de inibição da luminescência definida por cada diluição da amostra. A partir desse percentual o programa estima a concentração que provocará a inibição de 50% dos organismos-teste, o CE50. A partir dos percentuais de inibição obtidos em cada diluição da amostra, podemos calcular o FT, fator de toxicidade, que corresponde a menor diluição da amostra em que não ocorreu o efeito (mobilidade ou morte) em mais de 20% dos organismos.

### **4.3. Preparo das amostras coletadas para a cromatografia**

#### **4.3.1. Limpeza das vidrarias**

A análise de traços requer cuidadosos procedimentos de limpeza e descontaminação de materiais com a finalidade de se evitar qualquer contaminação. Com isso foram seguidos alguns protocolos de limpeza e armazenamento de vidrarias.

Todas as vidrarias foram limpas, inicialmente, com água potável, posterior banho com detergente (Extran®/ Merck ou Detertec®/ Vetec) diluído em água a 5%, por um período de 24 h. O resíduo de detergente foi removido com água potável, e em seguida, todas as vidrarias foram lavadas com água deionizada (por no mínimo 5 vezes) e acetona (grau P.A., Vetec).

As vidrarias não volumétricas foram aquecidas em mufla por 4 h à temperatura de 400°C. Já as vidrarias volumétricas (que não devem ser expostas à alta temperatura), foram novamente lavadas com metanol (grau P.A, Tedia) e deixadas até a secagem em ambiente limpo. Todas as vidrarias descontaminadas foram envoltas em papel alumínio, para impedir futura contaminação, e guardadas em ambiente limpo.

#### **4.3.2. Coleta e Armazenamento das amostras**

As amostras da primeira coleta foram devidamente armazenadas em gelo, transportadas e mantidas a 4°C no Laboratório de Engenharia Sanitária (LES) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, (UERJ) para a realização das análises e as amostras da segunda coleta seguiram o mesmo procedimento só que foram mantidas no laboratório de Toxicologia no Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana da Fundação Oswaldo Cruz (CESTEH/FIOCRUZ).

#### 4.3.3. Preparo da amostra e extração em fase sólida (EFS)

Em laboratório, 1 L de amostra foi filtrado em membrana de fibra de vidro de 0,7  $\mu\text{m}$  de porosidade (AP40 da marca Millipore) e em membrana de nylon com 0,45  $\mu\text{m}$  de porosidade (HNWP da marca Millipore) com o objetivo de remover o material particulado (Figura 21). O pH das amostras foi ajustado para 2 com solução de HCl 3M (grau P.A., Merck) (KASPRZYK-HORDERN, 2008). A verificação do pH foi realizada em pHmetro (Marca Marte e modelo MB10). Antes do início da extração foi adicionado 1g de EDTA (grau P.A, Vetec) para cada 1L de amostra.

Figura 21 - Foto dos aparatos de filtração à vácuo com membrana



Para a extração em fase sólida, foram utilizados os cartuchos Oasis® HLB de 6mL e 500mg de sorvente (Waters). Oasis® HLB é um sorvente polimérico de fase reversa universal e oferece mecanismos de retenção para compostos ácidos, básicos e neutros.

Os cartuchos de EFS foram condicionados com 8 mL de metanol (grau LC-MS, Tedia), 8 mL de água ultra pura e 8 mL de água ultrapura com pH ajustado para 2, com solução de HCl 3M. As amostras foram percoladas nos cartuchos sob vácuo, com vazão aproximada de 3 mL min<sup>-1</sup>. A Figura 22 mostra o aparato utilizado nas

extrações, que em resumo, consiste em uma bomba de vácuo (KNF Neuberger Laboport), Manifold Agilent (Vac Elut 12), canais e Kitassatos para coletar o rejeito.

Figura 22 - Foto dos aparatos de extração EFS



O cartucho, depois de percoladas as amostras, foi lavado com 10 mL de água ultrapura com pH igual a 2 e mantido sob vácuo por 10 minutos para a remoção do excesso de água. Em seguida, os cartuchos foram armazenados em freezer (com temperatura de -20 °C) até o momento da análise por CLAE-EM/EM.

Previamente às análises por CLAE-EM/EM, os analitos foram eluídos dos cartuchos com 10 mL de metanol e acondicionados em tubos de vidro com capacidade de 20 mL utilizando o sistema manifold sem o vácuo, sob efeito da gravidade. Depois, ligou-se a bomba de vácuo por 5 minutos para secagem dos cartuchos. Os extratos das amostras foram evaporados à secura com fluxo de nitrogênio (comercial, White Martins) (Figura 23) e reconstituídos com 1 mL de metanol:água ultrapura, 70:30 (v/v). Após a reconstituição dos analitos procedeu-se a injeção no CLAE-EM/EM. (Figura 24).

Figura 23 - Foto do aparato de secagem com fluxo de nitrogênio

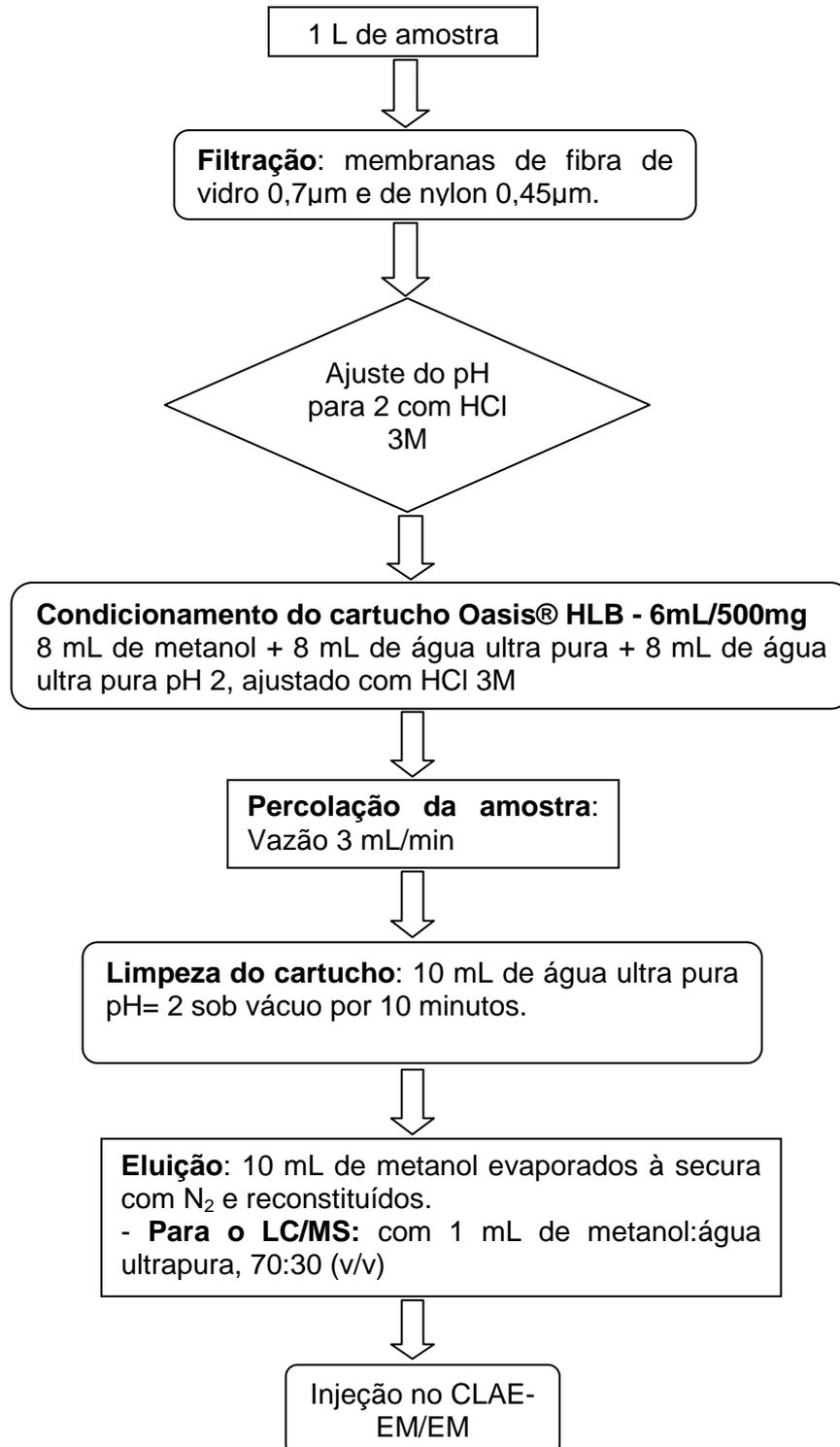


Figura 24 - Foto do equipamento CLAE-EM/EM



A Figura 25 apresenta um fluxograma de todas as etapas de preparo das amostras desde a EFS dos analitos até a obtenção do extrato final para análise no CLAE-EM/EM.

Figura 25 - Fluxograma para a determinação dos parabenos por CLAE-EM/EM das amostras coletadas no Rio Maracanã.



#### 4.4. Determinação de metil- e propilparabenos por CLAE-EM/EM

Para a identificação e quantificação de metil- e propilparabeno foi utilizado um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência pertencente ao Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana da Fundação Oswaldo Cruz (CESTEH/FIOCRUZ).

A detecção dos compostos metilparabeno e propilparabeno no espectrômetro de massa *tandem* (EM-EM) foi otimizada no modo de monitoramento de reação seletiva (MRS). A energia de colisão (“CID”) e a voltagem do tubo de lentes foram otimizados pela infusão direta com seringa no espectrômetro de massa com soluções-padrão de 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  contendo cada composto individualmente, em solução de metanol 100% (grau LC/MS, Tedia), sob o fluxo de 10  $\mu\text{L min}^{-1}$ . Já no cromatógrafo a líquido foi bombeada uma solução de metanol e água (70:30, v/v), sob o fluxo de 300  $\mu\text{L min}^{-1}$ . A técnica de ionização utilizada em todo o experimento foi a Ionização por *Electrospray* (ESI). O quadro 2 apresenta as condições otimizadas para a operação no EM.

Quadro 2 - Condições cromatográficas do método utilizado para a determinação dos parabenos.

	<b>Modo Negativo</b>
<b>Volume de Extrato Introduzido</b>	10 $\mu\text{L}$
<b>Modo de Introdução do Extrato</b>	Preenchimento parcial do loop do amostrador
<b>Coluna Cromatográfica</b>	Symmetry C18 Waters (2,1 x 150 mm column; 5 $\mu\text{m}$ de tamanho de partícula)
<b>Temperatura da Coluna</b>	25 $^{\circ}\text{C}$

Continuação do Quadro 2 - Condições cromatográficas do método utilizado para a determinação dos parabenos.

<b>Vazão do Eluente</b>	0,3 mL/min.
<b>Pressão Máxima</b>	130 bar
<b>Composição da Fase Móvel</b>	A: Metanol B: Acetato de Amônio 10 mM
<b>Gradiente de Concentração dos Eluentes</b>	Isocrático
<b>Tempo Total de Análise (CLAE-EM/EM.)</b>	6 min.

Os demais parâmetros instrumentais fixados para ambos os compostos foram: voltagem do *spray*– 4000 V; temperatura do capilar e do vaporizador – 300 °C; *sheathgas* (N<sub>2</sub>)– 20 (unidade arbitrária); gás auxiliar – 5 (unidade arbitrária); *ionsweepgas* (N<sub>2</sub>) – 0 (unidade arbitrária); Tempo de escaneamento– 0,5 s.

A identificação dos compostos nas amostras foi baseada no tempo de retenção (Tr) de seu correspondente nas soluções padrão e na detecção de ambas as transições de MRS. Foi considerada como primeira transição precursor-produto, MRS<sub>1</sub>, aquele que produz a maior intensidade de sinal quando comparada com a segunda, ou MRS<sub>2</sub>.

Na Tabela 5 são apresentados o modo de ionização, o tempo de retenção, o íon precursor e os MRS<sub>1</sub> e MRS<sub>2</sub> correspondentes aos metil- e propilparabeno.

Tabela 5 - Transições precursor-produto, modo de análise e tempo de retenção de cada composto

<b>Compostos</b>	<b>Modo de análise</b>	<b>Tr (min)</b>	<b>Íon Precursor (m/z)</b>	<b>MRS1</b>	<b>MRS2</b>
Metilparabeno	[M-H] <sup>-</sup>	1,57	151	92	136
Propilparabeno	[M-H] <sup>-</sup>	2,43	179	92	136

Para a quantificação, foram construídas as curvas de calibração para cada tipo de parabeno (concentração x área) usando metanol/água (70:30, v/v) como solvente e as concentrações do padrão variando de 5 a 500 ppb.

#### 4.5. Determinação dos parâmetros físico-químicos.

Os parâmetros físico-químicos foram determinados no LES/UERJ e estão apresentados na Tabela 6. As análises seguiram os métodos apresentados em AWWA (APHA, 2012).

Tabela 6: Parâmetros físico-químicos analisados

<b>Parâmetro</b>	<b>Equipamentos</b>	<b>APHA, 2012</b>
Temperatura	Termômetro	Método 2550
pH	pHmetro	Método 4500 –H <sup>+</sup> B
Condutividade	Condutímetro	Método 2510 B
Alcalinidade	Placa de agitação	Método 2320 B
Série sólidos <sup>1</sup>	Bomba de vácuo, estufa, mufla, balança analítica e kit de filtração	Métodos 2540 B, 2540 C, 2540 D, 2540 E, 2540 F2540 G,
DQO	Digestor de DQO e espectrofotômetro	Método 5220 D
Oxigênio Dissolvido Winkler	Modificação com azida	Método 4500-O C
Fósforo Total	Placa de aquecimento, espectrofotômetro	Método 4500 – P E
Turbidez	Turbidímetro	Método 2130 B
Cor	Espectrofotômetro	Método 2120 D
Nitrito	Espectrofotômetro	Método 4500-NO <sub>2</sub> B
Nitrogênio Amoniacal	Eletrodo Íon-seletivo de amônia	Método 4500-NH <sub>3</sub> D

DQO: Demanda Química de Oxigênio

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Ensaio *in vitro* YES das substâncias MP e PP

Foram realizados diversos ensaios YES com diferentes concentrações das amostras sintéticas dos conservantes metilparabeno e propilparabeno diluídas em etanol até a obtenção de uma curva dose resposta que caracterizasse o potencial estrogênico de cada substância estudada.

A Figura 26 apresenta as placas de 96 poços de um dos ensaios realizados para a obtenção da curva do potencial estrogênico característico de cada substância estudada, sendo esta a que melhor apresentou o formato sigmoidal, similar ao da curva do  $17\beta$ -estradiol. A placa da esquerda contém as amostras de metilparabeno, a  $3,2 \text{ gL}^{-1}$  nas linhas A e C e propilparabeno, a  $0,2 \text{ gL}^{-1}$  nas linhas E e G e a placa da direita a amostra do padrão, o  $17\beta$ -estradiol, a  $5,44 \times 10^{-5} \text{ gL}^{-1}$  nas linhas A e C. Nas Figuras 27 e 28 podemos observar as placas de 96 poços, separadamente.

Figura 26 - Foto das placas de 96 poços no ensaio YES das amostras de metilparabeno a  $3,2 \text{ gL}^{-1}$ , de propilparabeno a  $0,2 \text{ gL}^{-1}$  e do  $17\beta$ -estradiol a  $5,44 \times 10^{-5} \text{ gL}^{-1}$ .

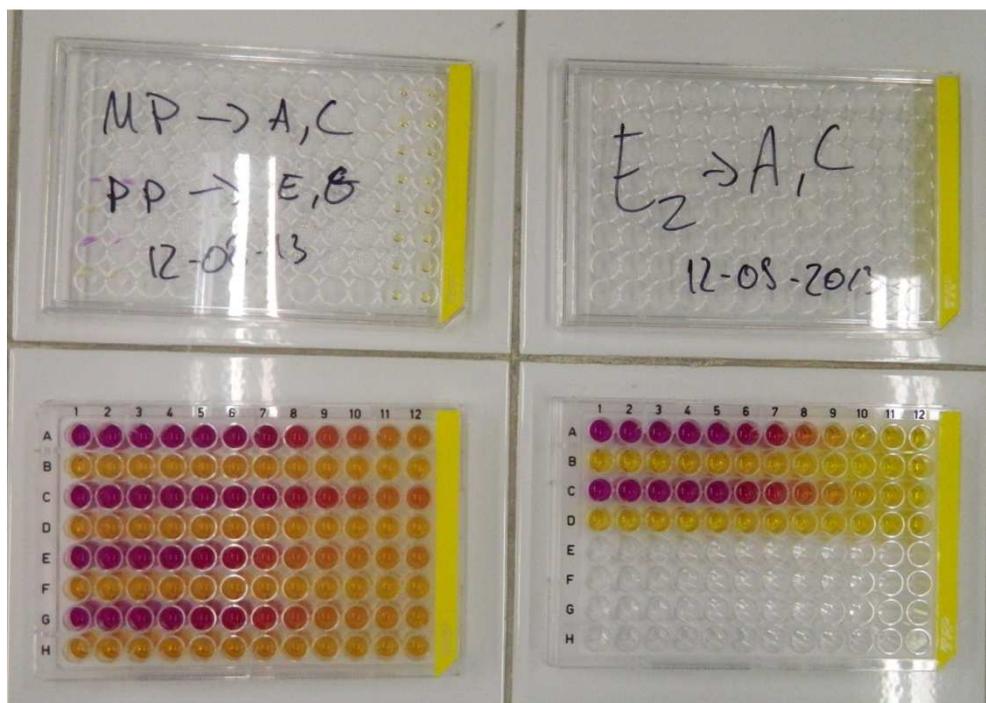
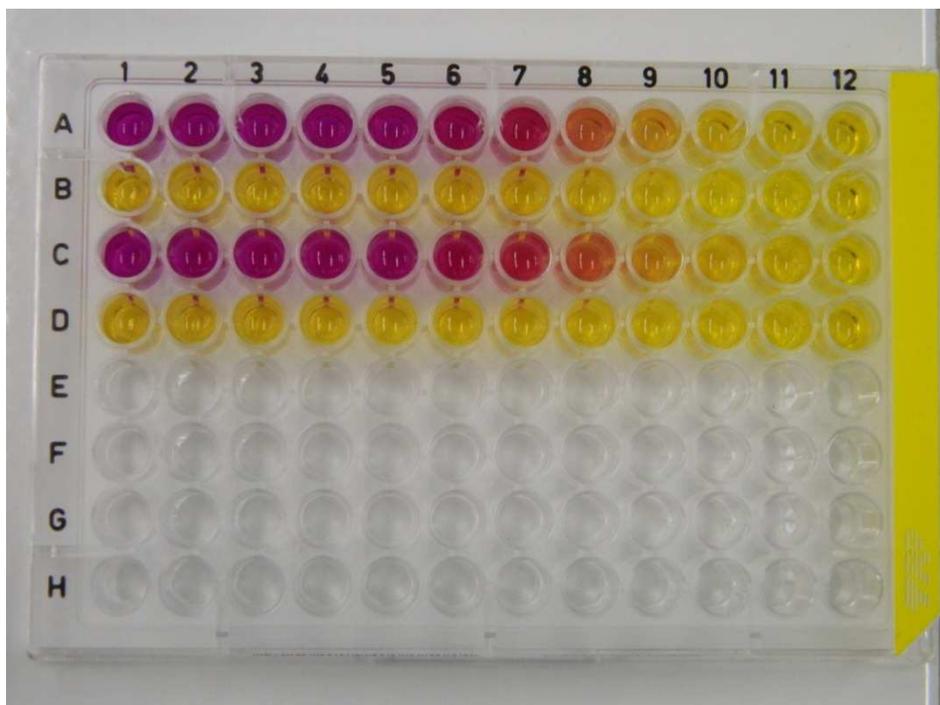


Figura 27 - Foto da placa de 96 poços no ensaio YES: linhas A e C contendo metilparabeno a  $3,2 \text{ gL}^{-1}$  e linhas E e G contendo propilparabeno a  $0,2 \text{ gL}^{-1}$ .

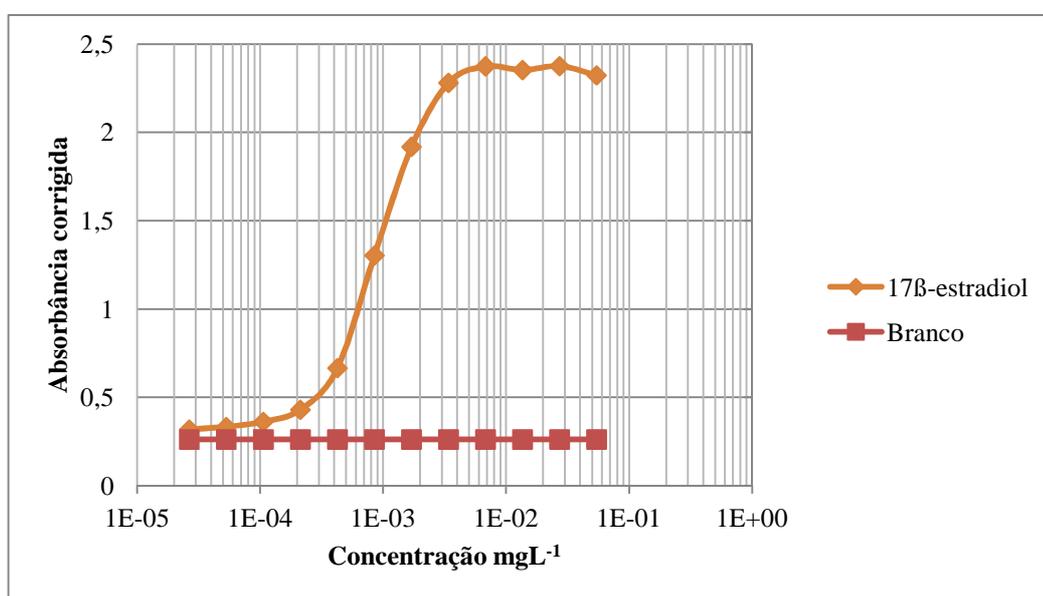


Figura 28 - Foto da placa de 96 poços no ensaio YES: linhas A e C contendo  $17\beta$ -estradiol na faixa de concentração de  $5,44 \times 10^{-5} \text{ gL}^{-1}$ .



As curvas dose-resposta do 17 $\beta$ -estradiol e das amostras do metilparabeno, do propilparabeno estão apresentadas nas Figuras 29, 30 e 31, respectivamente. Observa-se o formato sigmoidal das curvas, o que atende ao esperado como resultado do ensaio YES. A curva do 17 $\beta$ -estradiol abrangeu a faixa de concentração de  $5,44 \times 10^{-2} \text{ mgL}^{-1}$  a  $2,66 \times 10^{-5} \text{ mgL}^{-1}$ , a do MP de  $3200 \text{ mgL}^{-1}$  a  $1,56 \text{ mgL}^{-1}$  e a do PP foi de  $200 \text{ mgL}^{-1}$  a  $0,098 \text{ mgL}^{-1}$ .

Figura 29 - Curva dose resposta do 17 $\beta$ -estradiol obtida na faixa de concentração de  $5,44 \times 10^{-2} \text{ mgL}^{-1}$  a  $2,66 \times 10^{-5} \text{ mgL}^{-1}$

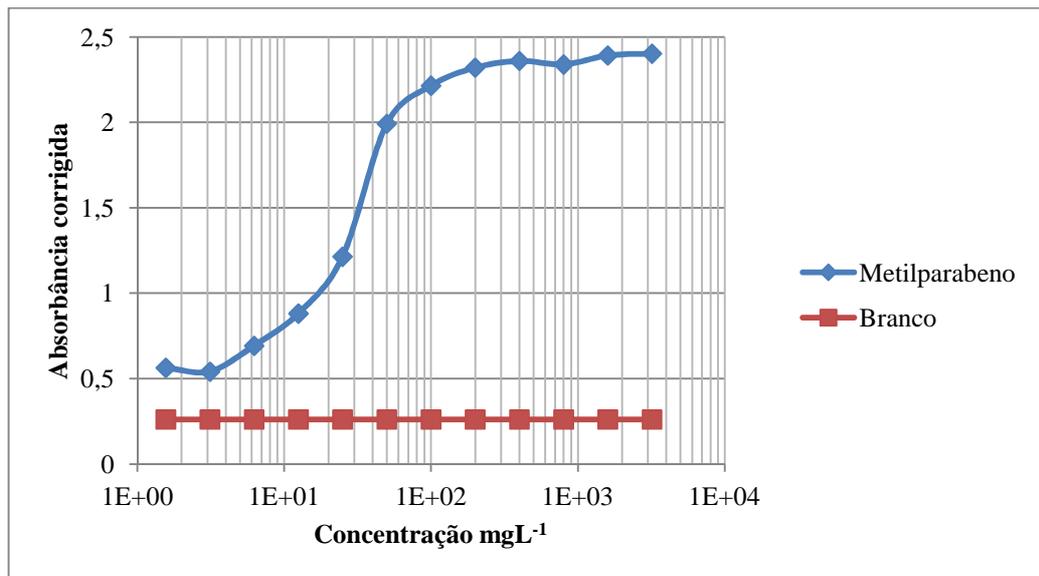


Para o cálculo do valor de CE50 e o ajuste da curva do 17 $\beta$ -estradiol, obteve-se os valores dos pontos necessários para o cálculo a partir da Figura 29, da Máxima indução da  $\beta$ -galactosidase (A), o Limite de detecção (B) e os seus respectivos valores no eixo x (C e D). Para o cálculo dos valores de Y50 e CE50 do 17 $\beta$ -estradiol utilizou-se as Equações 2 e 3. Assim resultou-se no valor calculado de Y50 de 1,29 e valor para o CE50 de  $1,06 \times 10^{-3} \text{ mgL}^{-1}$  do 17 $\beta$ -estradiol.

Com o valor de CE50 obtido para a curva de 17 $\beta$ -estradiol, de  $1,06 \times 10^{-3} \text{ mgL}^{-1}$  ( $3,9 \times 10^{-9} \text{ M}$ ) observa-se que este valor está próximo ao encontrado por Bila (2005), de  $2,13 \times 10^{-3} \text{ mgL}^{-1}$  ( $7,8 \cdot 10^{-9} \text{ M}$ ) e também pelo encontrado por Fischer (2013) de  $0,48 \times 10^{-3} \text{ mgL}^{-1}$  ( $1,7 \cdot 10^{-9} \text{ M}$ ). Todos na mesma ordem de grandeza.

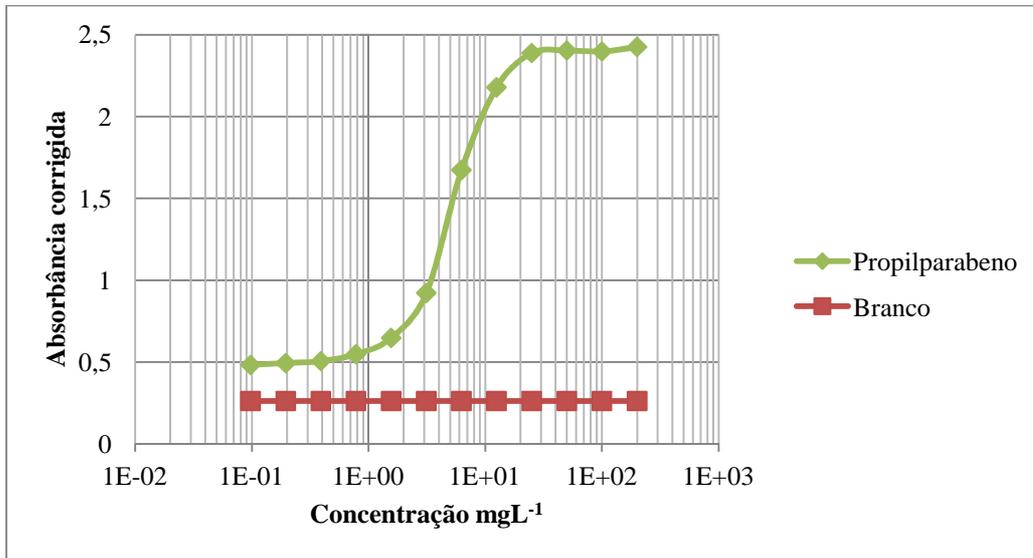
Vale ressaltar que segundo Beresford et al (2000) alguns fatores podem influenciar no valor de CE50 da curva padrão de 17 $\beta$ -estradiol, entre eles o número inicial de células da levedura no ensaio e o tempo de incubação que nesse caso tornaram o ensaio mais sensível.

Figura 30 - Curva dose-resposta do parabeno Metilparabeno obtida na faixa de concentração de 3200 mgL<sup>-1</sup> a 1,56 mgL<sup>-1</sup>.



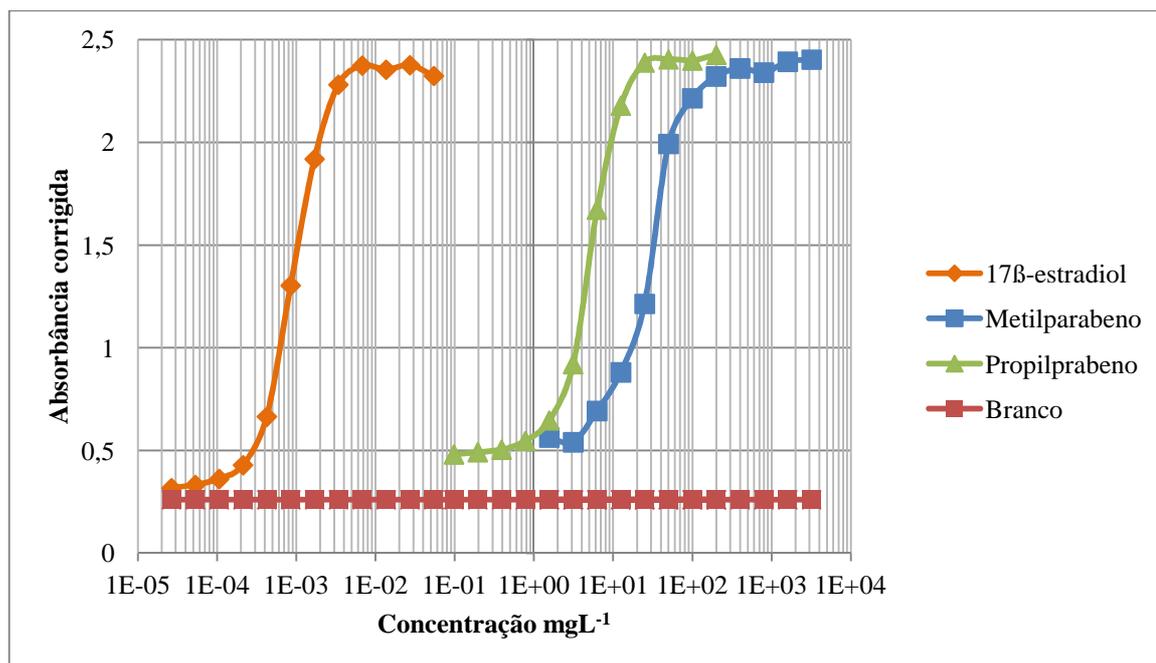
Para o cálculo do valor de CE50 do Metilparabeno, obteve-se os valores dos pontos necessários para o cálculo a partir da Figura 30, da Máxima indução da  $\beta$ -galactosidase (A), o Limite de detecção (B) e os seus respectivos valores no eixo x (C e D). Para o cálculo dos valores de Y50 e CE50, utilizou-se as Equações 2 e 3 e obteve como resultado os valores de 1,45 e 18,91 mgL<sup>-1</sup> respectivamente para o MP. Calculou-se também a PR, a partir da Equação 7, e obteve o valor de  $5,6 \times 10^{-5}$ .

Figura 31 - Curva dose-resposta do parabeno Propilparabeno obtida na faixa de 200  $\text{mgL}^{-1}$  a 0,098  $\text{mgL}^{-1}$ .



Para o cálculo do valor da CE50 do Propilparabeno, obteve-se os valores dos pontos necessários para o cálculo a partir da Figura 31, da Máxima indução da  $\beta$ -galactosidase (A), o Limite de detecção (B) e os seus respectivos valores no eixo x (C e D). Para o cálculo dos valores de Y50 e CE50, utilizou-se as Equações 2 e 3 e obteve como resultado os valores de 1,41 e 7  $\text{mgL}^{-1}$  respectivamente do PP. Calculou-se também a PR, a partir da Equação 7, e obteve o valor de  $1,51 \times 10^{-4}$ .

Na Figura 32, a curva dose resposta no ensaio YES às concentrações variáveis do metilparabeno e do propilparabeno em relação ao  $17\beta$ -estradiol.

Figura 32 - Curva dose resposta no ensaio YES dos parabenos e do 17 $\beta$ -estradiol

A partir da Figura 32, podemos observar que o MP e o PP apresentam a curva dose resposta bem similar com a do 17 $\beta$ -estradiol, com isso podemos dizer que apresentam atividade estrogênica diferindo apenas na intensidade de seus efeitos nos seres vivos, pois precisam estar presentes em concentrações maiores para causarem os mesmos efeitos do 17 $\beta$ -estradiol.

A Tabela 7 apresenta os valores de CE50 e PR obtidos através do ensaio YES para o MP, PP e o valor da CE50 do 17 $\beta$ -estradiol.

Tabela 7 - Valores da CE máxima, CE50, CE mínima e PR das substâncias estudadas obtidas pelo ensaio *in vitro* YES.

	Metilparabeno	Propilparabeno	17 $\beta$ -estradiol
CE máxima (mgL <sup>-1</sup> )	100	12,5	1,7x10 <sup>-3</sup>
<b>CE50 (mgL<sup>-1</sup>)</b>	<b>18,91</b>	<b>7</b>	<b>1,06x10<sup>-3</sup></b>
CE mínima (mgL <sup>-1</sup> )	6,25	1,56	4,25x10 <sup>-4</sup>
Potência Relativa (PR)	5,6x10 <sup>-5</sup>	1,51x10 <sup>-4</sup>	-

A atividade estrogênica apresentada pelo 17 $\beta$ -estradiol foi alta em relação aos demais compostos, mostrando assim a sua validade como padrão. Foi observada atividade positiva para todos os compostos testados.

A partir dos resultados apresentados na Tabela 7, pode-se observar que o PP apresentou maior atividade estrogênica quando comparado com o MP, pois obteve uma CE50 menor e a PR mais próxima de 1. A magnitude da resposta foi de  $10^5$  e  $10^4$  menos potente que  $17\beta$ -estradiol para o MP e o PP, respectivamente. Routledge e Sumpter (1998) realizaram o mesmo ensaio *in vitro* YES, sendo que com todos os parabenos, metil, etil, propil e butil e obtiveram magnitudes de resposta de  $10^5$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  e  $10^4$ , menos potente que  $17\beta$ -estradiol, respectivamente. Com isso, observa-se que a magnitude da resposta é igual à da literatura, só que uma resposta estrogênica fraca quando comparada a outras substâncias, como a estrona com  $10^1$  de magnitude de resposta, segundo Silva et al. (2007).

Ainda sobre a Tabela 7, observa-se que ambas as substâncias começaram a apresentar atividade estrogênica em altas concentrações, na ordem de  $\text{mgL}^{-1}$ , mostrando que possivelmente os seus resíduos ambientais não irão comprometer o sistema hormonal, sendo que se houver o consumo e contato exagerado à esses produtos que contenham parabenos, isso pode provocar alguma alteração estrogênica de intensidade semelhante ao padrão.

O MP e o PP apresentam atividade estrogênica diferindo apenas na intensidade de seus efeitos nos seres vivos, pois precisam estar presentes em concentrações maiores para causarem os mesmos efeitos do  $17\beta$ -estradiol.

## 5.2. Ecotoxicidade Aguda dos parabenos MP e PP

Serão apresentados os resultados dos ensaios de toxicidade aguda com os organismos-teste *Daphnia similis* e *Aliivibrio fischeri* dos parabenos MP e PP.

Tabela 8 - Valores da CE50 das substâncias MP e PP no ensaio de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Daphnia similis*

Organismo-teste	Substâncias	CE50 ( $\text{mgL}^{-1}$ )
<i>Daphnia similis</i>	MP	29,42
	PP	9,94

Os resultados obtidos se aproximam dos resultados obtidos por Dobbins et al. (2009) que realizaram estudos com o organismo-teste *Daphnia magna* (Straus, 1820) e obtiveram valores de CE50 para o metilparabeno e o propilparabeno de 24,6 mgL<sup>-1</sup> e 12,3 mgL<sup>-1</sup>, respectivamente. Observa-se também que o PP apresentou uma maior toxicidade com ensaios com a *Daphnia similis* do que o MP.

Tabela 9 - Toxicidade aguda das substâncias metilparabeno e propilparabeno no ensaio de toxicidade aguda com a bactéria *Aliivibrio fischeri*

Organismo-teste	Substâncias	CE50 (mgL <sup>-1</sup> )
<i>Aliivibrio fischeri</i>	MP	3,05
	PP	1,95

A partir da Tabela 9 observa-se que o PP apresentou uma maior toxicidade para o *Aliivibrio fischeri* que o MP. Segundo Brausch et al. (2011) a toxicidade aguda em bactérias pode aumentar com o aumento da cadeia do radical substituinte dos parabenos.

A partir dos valores obtidos na literatura de toxicidade aguda em *Daphnia similis* e *Aliivibrio fischeri* (Tabela 3) observa-se que o MP é menos tóxico que o PP em ambos os organismos, pois apresentou um valor de CE50 maior e nota-se também que esses valores estão muito diferentes um dos outros, mas mesmo assim são comparativos, pois se encontram na mesma ordem de grandeza.

Yamamoto et al. (2011) estudaram a toxicidade aguda dos parabenos em outros organismos-teste, tais como em algas verdes (*Pseudokirchneriella subcapitata*) e peixes da espécie medaka (*Oryzias latipes*) e obtiveram resultados de CE50 para as algas verdes de 80 mgL<sup>-1</sup> e 36 mgL<sup>-1</sup> para o MP e o PP, respectivamente. Para o peixe medaka valores da CE50 foram 63 mgL<sup>-1</sup> e 4,9 mgL<sup>-1</sup> para o MP e o PP, respectivamente. Com isso, observou-se que o PP também foi mais tóxico para esses outros organismos-teste do que o MP.

Tabela 10 - Comparação dos valores de CE50 obtidas na literatura com as obtidas nesse trabalho para as mesmas substâncias estudadas.

Organismo-teste	Substâncias	CE50 (mgL <sup>-1</sup> )	CE50 da literatura (mgL <sup>-1</sup> )
<i>Daphnia similis</i>	MP	29,42	24,6*
	PP	9,94	12,3*
<i>Aliivibrio fischeri</i>	MP	3,047	10**
	PP	1,946	2,6**

\*Dobbins *et al.* (2009) utilizou a *Daphnia magna* (Straus, 1820).

\*\* Bazin *et al.* (2010)

A partir da Tabela 10 constata-se que somente o valor de CE50 para o PP se aproxima dos resultados obtidos no teste com o *AliiVibrio fischeri* por Bazin *et al.* (2010). Já Terasaki *et al.* (2008) obtiveram o valor de CE50 para o MP de 5,9 mgL<sup>-1</sup> se aproximando mais do resultado obtido nesse estudo. Quanto aos resultados obtidos nos testes com a *Daphnia similis*, estes se aproximaram mais dos obtidos por Dobbins *et al.* (2009). Observa-se também que o propilparabeno é mais tóxico em ambos os organismos testados e que isso se deve também ao tamanho da cadeia do radical substituinte.

Observou-se também que dentre esses ensaios o organismo-teste que apresentou mais sensibilidade em ambas as substâncias foi o *AliiVibrio fischeri*, pois apresentou o valor de CE50 menor.

### 5.3. Comparação dos resultados dos ensaios de toxicidade aguda e do ensaio *in vitro* YES

Tabela 11 - Resultados dos valores de CE50 do MP e do PP obtidas nos testes de toxicidade aguda em *Daphnia similis*, *Aliivibrio fischeri* e ensaio *in vitro* YES.

Organismo-teste	Substâncias	CE50 (mgL <sup>-1</sup> )
<i>Daphnia similis</i>	MP	29,42
	PP	9,94
<i>Aliivibrio fischeri</i>	MP	3,047
	PP	1,946
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (YES)	MP	18,91
	PP	7

A partir da Tabela 11 observa-se que os valores da CE50 são bem diferentes em ambos os organismos testados para cada substância, isso por que cada organismo tem o seu metabolismo e vive em um ecossistema diferente do outro, por isso reagem de maneiras diferentes frente as substâncias tóxicas.

Os estudos realizados a partir do ensaio *in vitro* YES nos permite dizer que tais substâncias ou amostra ambiental apresentam atividade estrogênica numa determinada faixa de concentração. Existem outros ensaios, onde os mecanismos de ação permitam detectar a estrogenicidade em concentrações menores.

Os DEs não são encontrados no meio ambiente separados, eles interagem entre si e provocam efeitos aditivos ou sinérgicos, sendo este muito difícil de prever a magnitude do efeito, por isso é importante o conhecimento do potencial estrogênico das substâncias sozinhas, pois em um estudo com uma matriz ambiental, sendo esta muito complexa, pode-se observar se houve algum efeito aditivo ou sinérgico de outras substâncias.

#### 5.4. Caracterização físico-química da água do Rio Maracanã

Foi realizado uma caracterização físico-química das amostras da água do Rio Maracanã para avaliar a qualidade da água

A Tabela 12 apresenta os resultados dos parâmetros físico-químicos da água do Rio Maracanã da primeira coleta, realizada no dia 10 de fevereiro de 2014 e da segunda coleta, realizada no dia 13 de março de 2014, em ambos os pontos.

Tabela 12 - Resultados dos parâmetros físico-químicos da água do Rio Maracanã na primeira e na segunda coleta

Parâmetros	1ª coleta		2ª coleta		
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 1	Ponto 2	
Temperatura (°C)	22	30	21	34	
Oxigenio Dissolvido (mgL <sup>-1</sup> )	8	2	7	0,7	
pH	6,7	7,1	7,3	7,7	
Nitrogênio Amoniacal (mgL <sup>-1</sup> )	<1	1,6	3,4	15,6	
Nitrito (mgL <sup>-1</sup> )	0,4	2	3,5	0,6	
Fósforo Total (mgL <sup>-1</sup> )	0,1	1,1	0,1	1,3	
Condutividade (mScm <sup>-2</sup> )	55,3	164,8	122	344	
SST (mgL <sup>-1</sup> )	2	28	32	50	
SSV (mgL <sup>-1</sup> )	2	26	26	42	
SDT (mgL <sup>-1</sup> )	222	220	133	235	
DQO baixa (mgL <sup>-1</sup> )	3	47	0	35	
Cor	Verdadeira (mgPtCo)	0	50	13	28
	Aparente (mgPtCo)	0	100	193	100
Turbidez (NTU)	0,4	0,7	0,1	14	
Alcalinidade (mgCaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )	6	80	14	76,5	

SST: Sólidos Suspensos Totais; SSV: Sólidos Suspensos Voláteis; SDT: Sólidos Dissolvidos Totais; DQO: Demanda Química de Oxigênio

De acordo com a DZ-106, Diretriz de classificação dos corpos receptores da Bacia da Baía da Guanabara, o Rio Maracanã é rio de diluição de despejos, estético e para abastecimento industrial, sendo que segundo o Boletim de Qualidade das águas da região hidrográfica V – Baía de Guanabara Bacia da Baía de Guanabara (2014), as águas do Rio Maracanã já se encontram impróprias para tratamento convencional visando abastecimento público, sendo necessários tratamentos mais avançados.

Ainda não há uma determinação da classe do Rio Maracanã e para tal o artigo 42 da Resolução CONAMA nº 357 diz que “enquanto não aprovados os respectivos enquadramentos, as águas doces serão consideradas classe 2, as salinas e salobras classe 1, exceto se as condições de qualidade atuais forem melhores, o que determinará a aplicação da classe mais rigorosa correspondente.”

De acordo com a Tabela 12 e a resolução CONAMA nº 357, confirma-se o que foi escrito anteriormente, que a qualidade da água do rio Maracanã encontra-se imprópria para os usos a que foi designada, valendo ressaltar a concentração de oxigênio dissolvido que se encontra abaixo do valor exigido pela legislação ( $5 \text{ mgL}^{-1}$ ), o teor de fósforo total acima do permitido ( $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ ) e a amônia acima do permitido de  $3,7 \text{ mgL}^{-1}$  apenas no ponto 2 na segunda coleta. Tais parâmetros são característicos de que há descargas de esgoto doméstico no Rio Maracanã e a área onde se encontra o ponto 2 já está totalmente poluída, havendo a necessidade de tratamentos mais avançados na água.

### 5.5. Quantificação dos MP e PP na água do Rio Maracanã

Figura 33 - Curva de Calibração preparada com solventes MeOH:H<sub>2</sub>O (70:30, v/v) e padrão analítico MP

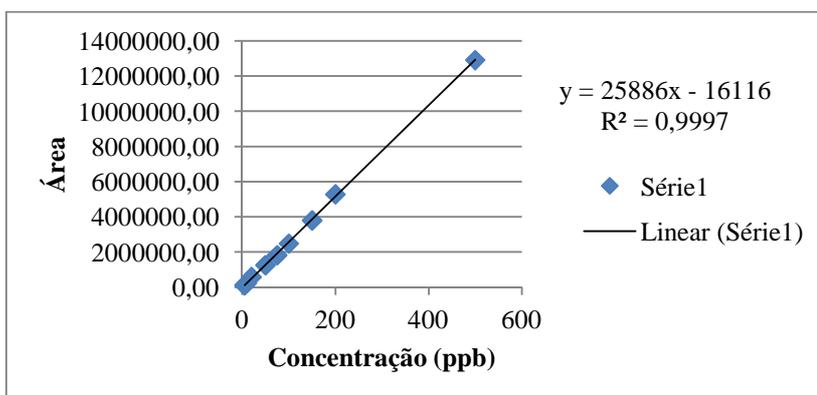
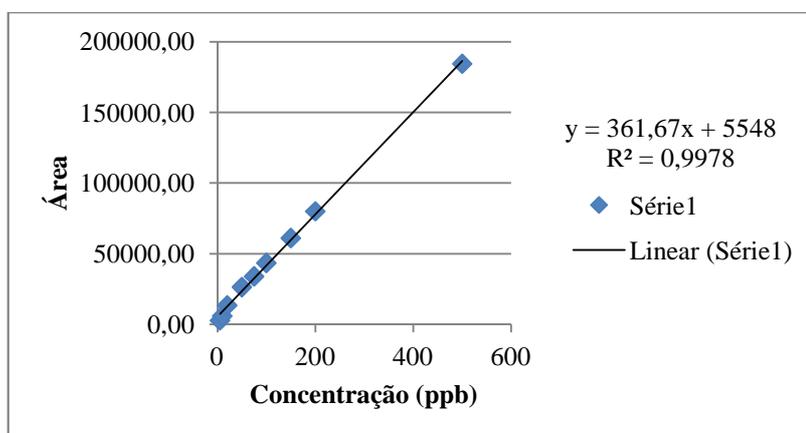


Figura 34 - Curva de Calibração preparada com solventes MeOH:H<sub>2</sub>O (70:30, v/v) e padrão analítico PP



A Tabela 13 apresenta os valores de concentrações dos MP e PP detectada na água do Rio Maracanã na primeira coleta, realizada no dia 10 de fevereiro de 2014 e na segunda coleta, realizada no dia 13 de março de 2014, em ambos os pontos, calculadas a partir das equações da reta apresentadas nas Figuras 33 e 34.

Tabela 13 - Concentrações dos MP e PP detectadas na água do Rio Maracanã na primeira e na segunda coleta

		Concentração na 1ª coleta (ngL <sup>-1</sup> )	Concentração na 2ª coleta (ngL <sup>-1</sup> )
<b>MP</b>	<b>Ponto 1</b>	2,5	8,9
	<b>Ponto 2</b>	1426	885
<b>PP</b>	<b>Ponto 1</b>	NQ	NQ
	<b>Ponto 2</b>	1496	33

NQ – detectado, mas muito baixo de ser quantificado

Com os resultados dos parâmetros físico-químicos (Tabela 12) concluiu-se que a qualidade da água do Rio Maracanã não se encontra em boas condições e observou-se também que no ponto onde a qualidade da água foi a pior (Ponto 2) a concentração de parabenos foi a mais alta encontrada, com isso podemos dizer que nos ambientes aquáticos onde há mais interferência humana, a concentração de parabenos é maior. E de acordo com os dados obtidos da literatura, o Rio Maracanã se aproxima das concentrações de MP obtidas em um Rio Chinês que segundo Peng et al. (2008) apresenta uma concentração de 1062 ngL<sup>-1</sup>, sendo que no Rio

Maracanã ainda está mais alta, com um valor de  $1426 \text{ ngL}^{-1}$  e para o PP o autor encontrou  $3142 \text{ ngL}^{-1}$ . Em outras localidades foram encontradas concentrações na faixa de  $<0,3 - 676 \text{ ngL}^{-1}$  para o MP e  $<0,2 - 207 \text{ ngL}^{-1}$  para o PP.

Os valores da CE50 obtidos através dos ensaios *in vitro* YES e de ecotoxicidade são bem maiores que as concentrações encontradas na água do Rio Maracanã, com isso pode-se dizer que os seus resíduos ambientais não irão comprometer o sistema hormonal dos seres aquáticos, mas nem por isso descarta-se o possível efeito gerado quando dois ou mais DEs reagem entre si (efeito sinérgico).

### 5.6. Ecotoxicidade Aguda da água do Rio Maracanã

A Tabela 14 apresenta os resultados de toxicidade aguda, expressos em CE50 para as *Daphnias similis* e *Allivibrio fischeri* da água do Rio Maracanã da primeira coleta, realizada no dia 10 de fevereiro de 2014 e da segunda coleta, realizada no dia 13 de março de 2014, em ambos os pontos.

Tabela 14 - Valores de CE50 em *Daphnias similis* e *Allivibrio fischeri* da água da primeira e da segunda coleta do Rio Maracanã.

	Pontos	<i>Daphnias similis</i> (CE50 %)	<i>Allivibrio fischeri</i> (CE50 %)
1ª coleta	1	NA	30,41%
	2	NA	NA
2ª coleta	1	NA	NA
	2	NA	NA

NA: Não apresentou

Ao analisar a Tabela 14, observa-se que somente na 1ª coleta no ponto 1 apresentou toxicidade aguda, só que isso não quer dizer que o outro ponto não tenha toxicidade, talvez uma toxicidade crônica possa existir.

De acordo com os resultados dos parâmetros físico-químicos, a qualidade da água do ponto 2 não está adequada, mas nem por isso apresentou toxicidade aguda

aos organismos testados. Vale ressaltar que mesmo não havendo toxicidade aguda a amostra pode apresentar uma toxicidade crônica.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES

Sugiro que o ensaio *in vitro* YES seja realizado em uma matriz ambiental real e dopada, para que possa ser estudados os efeitos que essa dopagem pode influenciar na minha curva dose resposta.

Sugiro um ensaio de toxicidade crônica com a água do Rio Maracanã.

## CONCLUSÕES

A ocorrência de contaminantes emergentes, como os parabenos, é pouco estudada em águas superficiais brasileiras, enquanto que na Europa, EUA, Ásia, China, os estudos a respeito desse tema vem crescendo. Desde o momento que foi comprovada a estrogenicidade dos parabenos, no Brasil, há poucos estudos sobre seus efeitos tanto nos seres humanos como nos ambientes aquáticos.

Com esse contexto, esse estudo teve como intuito avaliar a presença do Metilparabeno e Propilparabeno no ambiente aquático e seus potenciais estrogênicos e a toxicidade aguda. Os resultados mostraram a partir do ensaio *in vitro* YES, uma estrogenicidade de ambas as substâncias estudadas variando na potência relativa de cada um quando comparados ao 17 $\beta$ -estrdiol, o PP se mostrou mais potente estrogenicamente que o MP.

O PP se mostrou mais tóxico que o MP para ambos os organismos-teste avaliados, com isso observa-se que quanto maior a cadeia do radical substituinte no parabeno maior será a toxicidade.

As concentrações encontradas de MP e PP foram mais significativas onde a qualidade da água não está de acordo com a legislação vigente, CONAMA 357,

segundo os parâmetros físico-químicos analisados. A quantificação foi na ordem de  $\text{ngL}^{-1}$ , mesmo assim 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.

O Rio Maracanã apresentou toxicidade aguda em apenas um ensaio, mas nem por isso é descartada a possibilidade de haver toxicidade nos outros, podendo haver toxicidade crônica.

## REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução-RDC nº 162 de 11 de setembro de 2001. *Estabelece a Lista de Substâncias de Ação Conservantes para Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes*. Brasil, 2001. 7p.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução-RDC nº 5 de 15 de janeiro de 2007. Atribuição de Aditivos em bebidas não alcoólicas gaseificadas e não gaseificadas. Brasil, 2007. 8p.

ALBERO, B.; PÉREZ, R. A.; SÁNCHEZ-BRUNETE, C.; TADEO, J. L. *Occurrence and analysis of parabens in municipal sewage sludge from wastewater treatment plants in Madrid (Spain)*. Journal of Hazardous Materials 239– 240, 48– 55, 2012.

ALEXANDER, B.; BROWSE, D. J.; READING, S. J.; BENJAMIN, I. S. *A simple and accurate mathematical method for calculation of the EC50*. J Pharmacol Toxicol 41, 55–58, 1999.

AMÉRICO, J. H. P.; MESSIAS, T. G.; TORRES, N. H.; AMÉRICO, G. H. P. *Desreguladores endócrinos no Ambiente e seus Efeitos na Biota e Saúde Humana Pesticidas. r. ecotoxicol. e meio ambiente, Curitiba, v. 22, jan./dez. 2012.*

APHA; AWWA; WEF. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 22nd ed. Washington, DC: WEF: 1360 pp. 2012.

ARENZON, A.; NETO, T. J. P.; GERBER, W. *Manual sobre a toxicidade em efluentes*. CEP SENAI de Artes Gráficas Henrique d'Ávila Bertaso. Porto Alegre, 2011.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12713. *Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Aguda – Método de Ensaio com Daphnia sp (Crustacea, Cladocera)*, 3ª edição, 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15411. *Ecotoxicologia Aquática – Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de Vibrio fischeri (Ensaio de bactéria luminescente)*, 2ª edição, 2012.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12648. *Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Crônica – Método de ensaio com algas (Chlorophyceae)*, 2011.

AWWA *Removal of EDCs and pharmaceuticals in drinking and reuse treatment processes*. Washington, DC, 2007.

BAIRD, C.; CANN, M. Química Ambiental. 4ª edição, Porto Alegre: Bookman, 2011.

BAZIN, I.; GADAL, A.; TOURAUD, E.; ROIG, B. *Hydroxy Benzoate Preservatives (Parabens) in the Environment: Data for Environmental Toxicity Assessment*. Environmental Pollution. Springer, Netherlands. 16, 245-257, 2010.

BECK, I.-C.; BRUHN, R.; GANDRASS, J. *Analysis of estrogenic activity in coastal surface waters of the Baltic Sea using the yeast estrogen screen*. Chemosphere 63, 1870-1878, 2006.

BELFROID, A. C.; VAN DER HORST, A.; VETHAAK, A. D.; SCHÄFER, A. J.; RIJSR, G. B. J.; WEGENER, J.; COFINO, W. P. *Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and wastewater in The Netherlands*. The Science of the Total Environment, 225: 101-108, 1999.

BERESFORD, N. et al. *Issues arising when interpreting results from an in vitro assay for estrogenic activity*. Toxicology and Applied Pharmacology, v. 162, n. 1, p. 22-33, 2000.

BILA, D. M. *Degradação e Remoção da Atividade Estrogênica do Desregulador Endócrino 17 $\beta$ -Estradiol pelo Processo de Ozonização*. Tese - Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Rio de Janeiro, 281 p., 2005.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. *Fármacos no Meio Ambiente*. Revista Quimica Nova, V. 26, n. 4, p. 523-530, 2003.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. *Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências*. Química Nova, v.30, p.651-666, 2007.

BIRKETT, J. W.; LESTER, J. N. *Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes*. 1st Ed., Lewis Publishers. London, England, 2003.

BLEDZKA, D.; GROMADZINSKA, J.; WASOWICZ, W. *Parabens. From environmental studies to human health*. Environment international 67, 27-42, 2014.

BRAUSCH, J.M.; RAND, G.M.; *A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity*. Chemosphere 82, 1518–1532, 2011.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução Nº 357, de 17 de março de 2005. *Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências*. Diário Oficial da União, 18 de março de 2005, p. 58-63.

CALDAS, S. S. et al . *Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de díodos e por espectrometria de massas*. Quím. Nova, São Paulo , v. 34, n. 9, 2011.

CANOSA, P.; RODRÍGUEZ, I.; RUBÍ, E.; BOLLAÍN, M.H.; CELA, R. *Optimisation of a solid-phase microextraction method for the determination of parabens in water samples at the low ng per litre level*. Journal of Chromatography A, 1124, 3–10, 2006.

CASTRO, V.L.; JONSSON, C.M.; SILVA, C.M.M.; MAIA, A.H.N. *Assessing the safety of Pseudomonas putida introduction in the environment: An overview of ecotoxicological tests*. Regulatory Toxicology and Pharmacology 56, 300–305, 2010.

COELHO NETO, A.L. *O Geoecossistema da Floresta da Tijuca*. In Abreu; M.A. de (Org): *Natureza e Sociedade no Rio de Janeiro*. Rio de Janeiro, Biblioteca Carioca. Secretaria Municipal de Cultura, Turismo e esporte. Cap.5. P. 104-142. 1992.

CHIARADIA, Mariza C.; COLLINS, Carol H.; JARDIM, Isabel C. S. F.. *O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos*. Quím. Nova, São Paulo, v. 31, n. 3, 2008.

DARBRE, P.D.; BYFORD, J.R.; SHAW, L.E.; HALL, S.; COLDHAM, N.G.; POPE, G.S. *Oestrogenic activity of benzylparaben*. Journal of Applied Toxicology 23, 43–51, 2003.

DARBRE, P.D.; ALJARRAH, A.; MILLER, W.R.; COLDHAM, N.G.; SAUER, M.J.; POPE, G.S. *Concentrations of Parabens in Human Breast Tumours*. J. Appl. Toxicol. 24, 5-13, 2004.

DARBRE, P. D. *Environmental oestrogens, cosmetics and breast cancer. Best Practice & Research*. Clinical Endocrinology & Metabolism, 20, 121–143, 2006.

DOBBINS, L.L.; USENKO, S; BRAIN, R. A.; BROOKS, B. W. *Probabilistic Ecological hazard assessment of parabens using Daphnia magna and Pimephales promelas*. Environ. Toxicol.Chem. 28, 2744–2753, 2009.

FATTA-KASSINOS, D.; BESTER, K.; KUMMERER, K. *Xenobiotics in the Urban Water Cycle: Mass Flows, Environmental Processes, Mitigation and Treatment Strategies*, Environmental Pollution, Vol. 16, Springer Science, 2010.

FERNANDES, J. P. S. et al . *Estudo das relações entre estrutura e atividade de parabenos: uma aula prática*. Quím. Nova, São Paulo , v. 36,n. 6, 2013.

FISCHER, N. *Cloração de água com 17 $\beta$ -estradiol e utilização do teste YES para a avaliação de estrogenicidade*. Dissertação de Mestrado em Hidráulica e Saneamento na Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2013.

FRISCHE, T.; FAUST, M.; MEYER, W.; BACKHAUS, T. *Toxic masking and synergistic modulation of the estrogenic activity of chemical mixtures in a yeast estrogen screen (YES)*. Environ Sci Pollut Res 16, 593-603, 2009.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. *Interferentes endócrinos no ambiente*. Quím. Nova, São Paulo, v. 30, n. 3, 2007.

GOLOUBKOVA, T.; SPRITZER, P. M. *Xenoestrogênios: o exemplo do bisfenol-A*. Arq Bras Endocrinol Metab, São Paulo, v. 44, n. 4, Aug. 2000.

GONÇALVES, E. S. *Ocorrência e distribuição de fármacos, cafeína e bisfenol-A em alguns corpos hídricos no Estado do Rio de Janeiro*. Tese de doutorado em Geociências da Universidade Federal Fluminense (UFF) – Niteroi-RJ, 2012.

GONZÁLEZ-MARIÑO, I; QUINTANA, J. B; RODRÍGUEZ, I; CELA, R. *Simultaneous determination of parabens, triclosan and triclocarban in water by liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom 23, 1756–66, 2009.

GONZÁLEZ-MARIÑO, I.; QUINTANA, J. B.; RODRÍGUEZ, I.; CELA, R. *Evaluation of the occurrence and biodegradation of parabens and halogenated by-products in wastewater by accurate mass liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight-mass spectrometry (LC-QTOF-MS)*. Water research 45, 6770-6780, 2011.

Instituto Estadual do Meio Ambiente. *Boletim Consolidado de Qualidade das Águas das Regiões Hidrográficas do Estado do Rio de Janeiro*. Rio de Janeiro. 2013.

Instituto Estadual do Meio Ambiente. *Boletim de Qualidade das águas da região hidrográfica V – Baía de Guanabara Bacia da Baía de Guanabara*. Rio de Janeiro. 2014.

Instituto Estadual do Meio Ambiente. *Diretriz de classificação dos corpos receptores da Bacia da Baía de Guanabara*. Rio de Janeiro. 1977.

IUPAC GOLDBOOK. International Union of Pure and Applied Chemistry - GoldBook. 1993. Disponível em: <<http://goldbook.iupac.org/C01075.html>>. Acessado em: 15/2/2014.

JARDIM, W. F.; MONTAGNER, C. C.; PESCARA, I. C.; UMBUZEIRO, G. A.; BERGAMASCO, A. M. D. D.; ELDRIDGE, M. L.; SODRÉ, F. F. *An integrated approach to evaluate emerging contaminants in drinking water*. Separation and Purification Technology 84, 3–8, 2012.

JONKERS, N; KOHLER, H-PE; DAMMAHAUSER, A.; GIGER, W. *Mass flows of endocrine disruptors in the Glatt River during varying weather conditions*. Environ Pollut 157,714–23, 2009.

KASPRZYK-HORDERN, B.; DINSDALE, R. M.; GUWY, A. J. *The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in SouthWales, UK*. Water Res 42, 3498–518, 2008.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. *Testes Ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações*. Florianópolis: FATMA/GTZ, 289p., 2004.

KUNZ, A. et al . *Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis*. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 25, n. 1, 2002.

LEE, H.-B.; PEART, T. E.; SVOBODA, M. L. *Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1094, 122–129, 2005.

LI, X. Q.; ZHANGA, F.; SUNA, Y. Y.; YONGA, W.; CHUA, X. G.; FANGB, Y. Y.; ZWEIGENBAUMB, J. *Accurate screening for synthetic preservatives in beverage using high performance liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry.* AnalyticaChimicaActa 608, 165–177, 2008.

MILLER, D.; WHEALS, B. B.; BERESFORD, N.; SUMPTER, J. P. *Estrogenic Activity of Phenolic Additives Determined By an In Vitro Yeast Bioassay.* Environmental Health Perspectives, v. 109, n. 2, 2001.

OISHI, S. *Effects of propyl paraben on the male reproductive system.* Food Chem. Toxicol.40, 1807-13, 2002.

OLIVEIRA, M. A.; LIMA. E. M. *Identificação e Quantificação de Parabenos em Matérias-Primas Farmacêuticas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.* In: Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão da UFG - CONPEEX, 3,2006, Goiânia. Anais eletrônicos do III Seminário de Pesquisa e Pós-Graduação/ III CONPEEX [CD-ROM], Goiânia: UFG,2006.

PDRH-BG- *Plano Diretor de Recursos Hídricos da Região Hidrográfica da Baía de Guanabara.* PR-3- Relatório de Diagnóstico. 2004.

PENG, X.; YU, Y.; TANG, C.; TAN, J.; HUANG, Q.; WANG, Z. *Occurrence of steroid estrogens, endocrinedisrupting phenols, and acid pharmaceutical residues in urban riverine water of the Pearl River Delta, South China.* Sci Total Environ 397,158–66, 2008.

POLÔNIO, M. L. T.; PERES, F. *Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira* Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 25(8):1653-1666, 2009.

RAMASWAMY, B. R.; SHANMUGAM, G.; VELU, G.; RENGARAJAN, B.; JOAKIM LARSSON, D. G. *GC–MS analysis and ecotoxicological risk assessment of triclosan,*

*carbamazepine and parabens in Indian rivers*. Journal of Hazardous Materials 186, 1586–1593, 2011b.

RANGEL, C. M. A. *Variabilidade Espacial e Temporal por processos de poluição por nutrientes inorgânicos dissolvidos, fósforo sedimentar e hidrocarbonetos poli-âromáticos (HPAs) em dois sistemas fluviais distintos contribuintes à Baía de Guanabara*. Tese de doutorado em Geologia e Geofísica Marinha. Universidade Federal Fluminense (UFF) – Niteroi – RJ, 2011.

RENZ, L; VOLZ, C; MICHANOWICZ, D; FERRAR, K; CHRISTIAN, C; LENZNER, D et al. *A study of parabens and bisphenol A in surface water and fish brain tissue from the Greater Pittsburgh Area*. Ecotoxicology 22, 632–41, 2013

ROUTLEDGE, E. J.; SUMPTER, J. P. *Estrogenic Activity of Surfactants and Some of their Degradation Products Assessed Using a Recombinant Yeast Screen*. Environmental Toxicology and Chemistry, 15 (3), 241-248, 1996.

ROUTLEDGE, E. J; PARKER, J.; ODUM, J.; ASHBY, J.; SUMPTER, J.P. *Some Alkyl Hydroxy Benzoate Preservatives (Parabens) Are Estrogenic*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 153, 12-19, 1998.

SANSEVERINO, J.; GUPTA, R. K.; LAYTON, A. C.; PATTERSON, S. S.; RIPP, S. A.; SAIDAK, L.; SIMPSON, M. L.; SCHULTZ, T. W.; SAYLER, G. S. *Use of Saccharomyces cerevisiae BLYES expressing bacterial bioluminescence for rapid, sensitive detection of estrogenic compounds*. Appl. Environ. Microbiol. 71, 4455–4460, 2005.

SANSON, A. L. *Estudo da Extração e Desenvolvimento de Metodologia para Determinação Simultânea de Microcontaminantes Orgânicos em Água Superficial por GC-MS e Métodos Quimiométricos*. Dissertação de Mestrado em Engenharia Ambiental. Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) – Ouro Preto-MG, 2012.

SCOGS, 1972. Select Committee on GRAS Substances. GRAS (Generally Recognized As Safe) *Food ingredients—methyl and propyl paraben*. NTIS PB221 209.

SILVA, C. G. A.; COLLINS, C. H. *Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes*. Quím. Nova, São Paulo, v. 34, nº. 4, 2011.

SILVA, D. P.; MELO, C. F.; OLIVEIRA, J. L. M. *Avaliação in vitro da desregulação estrogênica causada por poluentes orgânicos*. Saúde & Ambiente em Revista, Duque de Caxias, v.2, nº.2, p.82-91, 2007.

SONI, M.G.; CARABIN, I.G.; BURDOCK, G.A. *Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens)*. Food and Chemical Toxicology 43, 985–1015, 2005.

TERASAKI, M; MAKINO, M; TATARAZAKO, N. *Acute toxicity of parabens and their chlorinated byproducts with Daphnia magna and Vibrio fischeri bioassays*. J Appl Toxicol 29, 242–7, 2008.

TERASAKI, M; TAKEMURA, Y; MAKINO, M. *Paraben-chlorinated derivatives in river waters*. Environ Chem Lett 10, 401, 2012.

U.S. EPA. *Aquatic life criteria for contaminants of emerging concern*. 2008.

YAMAMOTO, H. Y.; TAMURA, I.; HIRATA, Y.; KATO, J.; KAGOTA, K.; KATSUKI, S.; YAMAMOTO, A. Y.; KAGAMI, Y.; TATARAZAKO, N. *Aquatic toxicity and ecological risk assessment of seven parabens: Individual and additive approach*. Science of the Total Environment, 410-411, 102–111, 2011.

ZAGATTO, P.A. ; BERTOLLETTI, E. *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações*. Rima, São Carlos, São Paulo, 486p, 2008.