

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

JULIA CAROLINE FREIRE SOVIERZOSKI

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES APÓS EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA DE
TILÁPIAS A UMA MISTURA DE FILTROS SOLARES QUÍMICOS**

**CURITIBA
2022**

JULIA CAROLINE FREIRE SOVIERZOSKI

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES APÓS EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA DE
TILÁPIAS A UMA MISTURA DE FILTROS SOLARES QUÍMICOS**

**BIOMARKERS EVALUATION AFTER SUBCHRONIC EXPOSURE OF TILAPIA
TO A MIXTURE OF CHEMICAL UV FILTERS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Orientadora: Prof^a. Dra. Wanessa Algarte Ramsdorf Nagata
Coorientadora: Prof^a. Dra. Lucia Regina Rocha Martins

**CURITIBA
2022**



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Esta licença permite compartilhamento, remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Curitiba



JULIA CAROLINE FREIRE SOVIERZOSKI

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES APÓS EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA DE TILÁPIAS A UMA
MISTURA DE FILTROS SOLARES QUÍMICOS**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Ciência E Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Tecnologias E Processos Ambientais.

Data de aprovação: 22 de Fevereiro de 2022

Prof.a Wanessa Algarte Ramsdorf Nagata, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof.a Adriane Martins De Freitas, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof Elisa Flavia Luiz Cardoso Bailao, Doutorado - Universidade Estadual de Goiás (Ueg)

Prof.a Izonete Cristina Guiloski, Doutorado - Instituto de Pesquisa Pele Pequeno Principe - Ipppp

Prof.a Lucia Regina Rocha Martins, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 22/02/2022.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida e saúde de cada uma das pessoas mencionadas abaixo.

Às professoras Dra. Lucia Regina Rocha Martins e Dra. Wanessa Ramsdorf pela oportunidade de realizar esse trabalho tendo-as como orientadoras. Foram dias de profundo crescimento pessoal e profissional. Agradeço por todos os ensinamentos, paciência, disponibilidade e seriedade com que orientaram essa pesquisa.

Aos professores da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, em especial ao Prof. Dr. Júlio César Azevedo e à Prof^a Dra. Adriane Freitas que participaram da banca de qualificação com importantes sugestões. Às professoras Dra. Izonete Guiloski e Dra. Elisa Bailão que compuseram a banca de defesa contribuindo nos ajustes finais desse documento.

Ao coordenador do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental Charles Haminiuk, pela disponibilidade e paciência em esclarecer questões acadêmicas e institucionais.

Aos meus pais, José Dante e Edna, por me ensinarem a valorizar as alegrias da vida e comemorarem comigo cada vitória. Agradeço também pelo incentivo e por proporcionarem condições para que eu pudesse me dedicar aos meus estudos. À minha irmã e melhor amiga Anne, por sua doçura, autenticidade e companhia em todos os momentos. Vocês são meu porto seguro.

Ao meu esposo Marcos, por tornar meus dias mais felizes e repletos de amor. Sua determinação e alegria de viver me inspiram. Agradeço pelo suporte emocional durante a realização desse trabalho e também pela ajuda durante a realização dos bioensaios. Aos meus sogros Zabdi e Antônio, por sempre me receberem com um sorriso no rosto e um abraço apertado.

À minha pequena Maya, por me mostrar que, mesmo sem dormir direito, sou capaz de realizar e amar muito mais do que acreditava ser possível. O seu sorriso ilumina meu mundo.

Aos companheiros de laboratório que a vida acadêmica me proporcionou – Alysson Veloso, Alana Pellanda, Juliana Carvalho, Yohanna Karkle, Luana Mayumi, Bárbara Lima, Gabriela Reichert, Diego Moraes, Bruno Neves, Luana Moreira, Beatriz Bonk, Elaine Costa, Marcia Escrobot, Caroline Moreira, Suelen Angeli, Eduarda

Bordin, Paloma Panicio, Yorrannys Mannes e Isabela Olsemann. Obrigada por todas as risadas e conversas que tornaram os dias mais leves.

Ao companheiro de laboratório Eberton Ribas, que dividiu as angústias, frustrações e vitórias enquanto realizava também seus bioensaios e estudos. Obrigada pela parceria, pelos ensinamentos e ajuda referentes a aclimatização das tilápias, realização do ensaio cometa, teste do micronúcleo e biomarcadores bioquímicos.

À Monike Gomes por se disponibilizar a auxiliar durante a realização e interpretação das análises bioquímicas, sua ajuda foi indispensável.

Ao Laboratório Multiusuário de Equipamentos e Análises Ambientais (LAMEAA) - pela disponibilização dos equipamentos e possibilidade de realização das análises.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná pela estrutura disponibilizada e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pelo auxílio financeiro (número do processo 88882.432143/2019-01).

RESUMO

SOVIERZOSKI, Julia Caroline Freire. **Avaliação de Biomarcadores após Exposição Subcrônica de Tilápias a Filtros Solares Químicos Associados**. 94 f. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2022.

A ocorrência dos fotoprotetores químicos em ambientes aquáticos tem sido objeto de estudos científicos devido ao elevado potencial de bioacumulação dessas substâncias e seus possíveis efeitos adversos à biota, tanto em ambientes marinhos quanto dulcícolas. O objetivo do presente estudo foi avaliar efeitos subletais em tilápias expostas simultaneamente a benzofenona-3 (BP-3), octilmetoxicinamato (OMC) e octocrileno (OC), em dois níveis de concentração (0,001 e 0,5 mg·L⁻¹) sob condições laboratoriais. A estabilidade dos compostos, taxa de assimilação e concentração da exposição foram monitorados por cromatografia líquida. O método cromatográfico por LC-DAD foi desenvolvido e validado para análise das amostras aquosas, contemplando a concentração inicial e durante o período de exposição. Entre os compostos analisados, a BP-3 apresentou melhor estabilidade nas condições do bioensaio e também quando submetida à ciclos de congelamento. O armazenamento em embalagens plásticas de polipropileno demonstrou maior redução de concentração para os compostos com maiores valores de log K_{ow} (OMC e OC). As taxas de assimilação foram investigadas a partir da comparação entre a redução da concentração dos filtros da fase aquosa em aquários com e sem peixe. Foi realizado um ensaio de exposição aguda (24 h) e, para a BP-3, a presença de um indivíduo ocasionou redução da concentração 30% superior nas primeiras 3 horas de exposição, 28% após 6 h e 22% após 24 h ($p=0,0049$). Os valores bioassimilados de OMC e OC não foram significativos ($p=0,5809$ e $p=0,6115$, respectivamente), possivelmente devido a maior instabilidade observada para esses compostos em água aerada. Os valores de redução de concentração superiores a 60% para todos os compostos após 24 h foram considerados para a realização do bioensaio de exposição subcrônica (29 dias) e a renovação das concentrações ocorreu a cada 24 h (sistema semi-estático). Após o período de exposição, a mutagenicidade (teste do micronúcleo písceo) e genotoxicidade (ensaio cometa) foram avaliadas para o grupo exposto a menor concentração e demonstraram ausência de diferença estatística em relação aos grupos controle ($p=0,747$ e $p=0,364$, respectivamente). A constante de Fulton (K) não indicou diferenças significativas na saúde geral dos indivíduos de todos os grupos. Os resultados dos biomarcadores bioquímicos avaliados foram semelhantes quanto a ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos para as atividades das enzimas acetilcolinesterase (AChE) ($p=0,1312$), catalase (CAT) ($p=0,3329$) e glutathione-s-transferases (GST) ($p=0,5289$). Em relação aos níveis de peroxidação lipídica (LPO), observou-se diferença significativa ($p<0,0001$) entre os grupos expostos comparados aos grupos controle em ambas as concentrações indicando aumento da taxa de radicais livres (estresse oxidativo). Os dados demonstram que a mistura dos filtros solares avaliados pode implicar em potenciais efeitos adversos crônicos para *Oreochromis niloticus* considerando que são contaminantes emergentes constantemente presentes em ambientes aquáticos continentais.

Palavras-chave: Ecotoxicidade; Estresse oxidativo; Estabilidade de filtros solares químicos.

ABSTRACT

SOVIERZOSKI, Julia Caroline Freire. **Biomarkers Evaluation after Subchronic Exposure of Tilapia to a Mixture of Chemical UV Filters**. 94 f. Dissertation. Post Graduate Program in Environmental Science and Technology. Federal Technological University of Paraná. 2022.

The occurrence of chemical UV filters in aquatic ecosystems has been investigated due to their high bioaccumulation potential and possible adverse effects on the biota, both in marine and freshwater environments. The aim of the present study was to evaluate sublethal effects on tilapia exposed simultaneously to benzophenone-3 (BP-3), octylmethoxycinnamate (EHMC) and octocrylene (OC), at two concentration levels (0.001 and 0.5 mg·L⁻¹) under laboratory conditions. Compound stability, indirect uptake rate and exposure concentration were monitored by liquid chromatography. The LC-DAD chromatographic method was developed and validated for the analysis of aqueous samples, considering the initial concentration and during the exposure period. Among the compounds analyzed, BP-3 showed better stability under the conditions of the bioassay and also when subjected to freezing cycles. Storage in polypropylene packaging showed greater concentration reduction for compounds with higher log *k*_{ow} values (EHMC and OC). Indirect uptake rates were investigated from the comparison between concentration reduction of the filters from the water phase in aquaria with and without fish. An acute exposure test (24 h) was performed and for BP-3 the presence of one individual in the aquaria lead to a 30% higher concentration reduction in the first 3 hours of exposure, 28% after 6 h and 22% after 24 h (p=0.0049). The EHMC and OC uptake rates were not significant (p=0.5809 and p=0.6115, respectively), possibly due to the greater instability observed for these compounds in aerated water. After 24 h the concentration reduction values were greater than 60% for all compounds, therefore, in the subchronic exposure bioassay (29 days) concentrations were renewed every 24 h (semi-static system). After the exposure period, mutagenicity (piscine micronucleus test) and genotoxicity (alkaline comet assay) were evaluated for the group exposed to the lowest concentration and showed no statistical difference in relation to the control groups (p=0.747 and p=0.364, respectively). Fulton's constant (K) did not indicate significant differences in the general health of individuals in all groups. The results of the biochemical biomarkers evaluated were similar in terms of the absence of statistically significant difference between the groups for the activities of the enzymes acetylcholinesterase (AChE) (p=0,1312), catalase (CAT) (p=0,3329) and glutathione-s-transferases (GST) (p=0,5289). Regarding the levels of lipid peroxidation (LPO), a significant difference (p<0.0001) was observed between exposed groups and control groups indicating an increase in the free radicals rate (oxidative stress). Data demonstrate that the evaluated mixture might lead to potential chronic adverse effects for *Oreochromis niloticus* once they are emerging contaminants constantly present in continental aquatic environments.

Keywords: Ecotoxicity; Oxidative stress; Stability of chemical sunscreens.

Lista de Figuras e Quadros

Figura 1 - Estruturas químicas dos compostos fotoprotetores estudados neste trabalho ---	17
Figura 2 - Tilápia do Nilo, uma das principais espécies criadas no Brasil -----	39
Figura 3 - Disposição dos béqueres durante o ensaio de estabilidade. Nota: Béqueres 1, 4 e 5 sem aeração e béqueres 2,3 e 6 com aeração -----	43
Figura 4 - Grupos de indivíduos submetidos a bioensaio subcrônico -----	45
Figura 5 - Cromatograma da mistura BP-3, OMC e OC e espectros UV obtidos por cromatografia líquida-----	51
Figura 6 - Curvas de calibração (esquerda) e gráficos de resíduos (direita) dos analitos---	52
Figura 7 - Comparação gráfica das reduções de concentração dos analitos em ensaio de estabilidade (0,6 mg·L ⁻¹ ; 0,45% etanol) com e sem aeração-----	56
Figura 8 - Comparação gráfica dos percentuais de redução das concentrações dos analitos em ensaio de estabilidade com aeração vs ensaio de assimilação (exposição aguda) -----	58
Figura 9 - Representação gráfica do fator de condição de Fulton (K) obtido durante os 29 dias de exposição subcrônica de tilápias-----	60
Figura 10 - Hemácia normal (a) e exemplos de algumas células com alterações morfológicas (b,c,d,e) encontradas nos organismos analisados após realização de bioensaio subcrônico com tilápias (aumento de 1000x) -----	60
Figura 11 - Representação gráfica dos resultados mutagênicos obtidos para tilápias submetidas a bioensaio de exposição subcrônica-----	61
Figura 12 - Exemplos de nucleóides analisados e classificados (a,b,c,d,e), de acordo com o analista, em cinco classes de dano no que diz respeito à intensidade da cauda (aumento de 400 x)-----	62
Figura 13 - Representação gráfica dos escores obtidos através do ensaio cometa para tilápias após bioensaio de exposição subcrônica -----	62
Figura 14 - Representação gráfica dos resultados após análise do biomarcador de LPO em tilápias após bioensaio subcrônico de 29 dias-----	64
Figura 15 - Representação gráfica dos resultados obtidos após análise do biomarcador CAT em tilápias após bioensaio subcrônico de 29 dias-----	65
Figura 16 - Representação gráfica dos resultados obtidos após análise do biomarcador GST em tilápias após bioensaio subcrônico de 29 dias-----	65
Figura 17 - Representação gráfica dos resultados obtidos após análise do biomarcador AChE em tilápias após bioensaio subcrônico de 29 dias-----	66
Quadro 1 - Resultados após exposição de <i>Oreochromis niloticus</i> à mistura de fotoprotetores durante 29 dias-----	73

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Estudos em diferentes países e matrizes ambientais detectando BP-3, OMC e OC	19
Tabela 2 - Parâmetros físico-químicos dos fotoprotetores estudados neste projeto	28
Tabela 3 - Volumes de S.E. $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 0,6% EtOH utilizados para construção da curva analítica.	41
Tabela 4 - Informações a respeito dos animais utilizados durante ensaio de exposição aguda	44
Tabela 5 - Testes estatísticos para comprovação da linearidade do método desenvolvido por cromatografia líquida	53
Tabela 6 - Dados de repetibilidade (precisão intradia) do método desenvolvido para BP-3, OMC e OC	54
Tabela 7 - Dados de redução da concentração dos analitos durante ensaio de estabilidade ($0,6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 0,45% etanol)	55
Tabela 8 - Dados de redução da concentração dos compostos BP-3, OMC e OC após ciclos de 24h de congelamento e descongelamento em garrafas plásticas	56
Tabela 9 - Dados de redução da concentração dos compostos BP-3, OMC e OC após ciclos de 24h de congelamento e descongelamento em tubos falcon	57
Tabela 10 - Dados referentes a redução na concentração dos compostos BP-3, OMC e OC durante 24h de monitoramento do ensaio de assimilação	57
Tabela 11 - Dados referentes a redução na concentração dos compostos BP-3, OMC e OC referentes as 24h de monitoramento do bioensaio de exposição subcrônica	59
Tabela 12 - Massa dos órgãos retirados de tilápias após exposição subcrônica utilizados para análise de biomarcadores bioquímicos	63

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	OBJETIVO	14
2.1.	Objetivo Geral.....	14
2.2.	Objetivos Específicos	14
3.	REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1.	Filtros Solares.....	15
3.1.1.	Benzofenona-3 (BP-3), octilmetoxicinamato (OMC) e octocrileno (OC).....	16
3.2.	Desenvolvimento e Validação de Método Cromatográfico	20
3.2.1.	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (LC, do inglês <i>Liquid Chromatography</i>)	20
3.2.2.	Validação de Métodos Analíticos	21
3.2.2.1.	Seletividade	22
3.2.2.2.	Intervalo e Linearidade	22
3.2.2.3.	Precisão	24
3.2.2.4.	Limite de Detecção e Limite de Quantificação	25
3.2.2.5.	Exatidão	26
3.3.	Bioacumulação, bioensaios e toxicidade.....	26
3.3.1.	Bioensaios com Peixes.....	30
3.4.	Biomarcadores	30
3.4.1.	Biomarcador Somático	31
3.4.2.	Biomarcadores Genéticos.....	31
a)	Teste do Micronúcleo Písceo	32
b)	Ensaio Cometa Alcalino	33
3.4.3.	Biomarcadores Bioquímicos.....	34
3.4.3.1.	Estresse Oxidativo	35
3.4.3.2.	Neurotoxicidade	36
3.4.3.3.	Biomarcador de Biotransformação.....	37
a)	Glutathionas S-transferases (GST).....	37
3.5.	Tilápia.....	38
4.	MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1.	Testes Preliminares	40
4.1.1.	Condições Cromatográficas.....	40
4.1.2.	Validação do Método Cromatográfico – figuras de mérito.....	40
4.1.3.	Ensaios de Estabilidade.....	42
4.1.4.	Teste de Congelamento.....	43
4.2.	Bioensaios com Tilápias	43
4.2.1.	Ensaio de Assimilação (Exposição Aguda).....	44
4.2.2.	Experimento de Exposição Subcrônica.....	44
4.2.2.1.	Análise de Biomarcadores	46
4.2.2.1.a.	Fator de Condição de Fulton	46
4.2.2.1.b.	Teste do Micronúcleo Písceo.....	47
4.2.2.1.c.	Ensaio Cometa	48
4.2.2.1.d.	Procedimentos para Análise de Biomarcadores Bioquímicos	49
4.3.	Análise estatística.....	50
5.	RESULTADOS	51
5.1.	Testes Preliminares: Estudo dos Analitos.....	51

5.1.1.	Ajustes de Separação Cromatográfica.....	51
5.1.2.	Validação do Método Desenvolvido.....	51
5.1.3.	Ensaio de Estabilidade.....	55
5.1.4.	Teste de Congelamento.....	56
5.2.	Ensaio de Exposição de Tilápias	57
5.2.1.	Ensaio de Assimilação (Exposição Aguda).....	57
5.2.2.	Bioensaio de Exposição Subcrônica e Análise de Biomarcadores.....	58
5.2.2.1.	Biomarcadores	59
5.2.2.1.a.	Fator de Condição de Fulton	59
5.2.2.1.b.	Teste do Micronúcleo Písceo.....	60
5.2.2.1.c.	Ensaio Cometa	61
5.2.2.1.d.	Biomarcadores Bioquímicos	63
6.	DISCUSSÃO	67
6.1	Testes Preliminares	67
6.1.1.	Ensaio de Estabilidade	67
6.1.2.	Teste de Congelamento.....	67
6.2	Bioensaio com Tilápias.....	68
6.2.1	Ensaio de Assimilação (Exposição Aguda).....	68
6.2.2.	Bioensaio de Exposição Subcrônica.....	69
6.2.2.1	Biomarcadores	70
7.	CONCLUSÃO	74
	REFERÊNCIAS.....	76
	APÊNDICE A – Resultados do teste do micronúcleo písceo.....	89
	APÊNDICE B - Resultados do ensaio cometa alcalino	90
	ANEXO.....	91

1. INTRODUÇÃO

O uso de filtros solares é recomendado pelas autoridades de saúde como medida preventiva aos danos decorrentes da exposição humana à radiação ultravioleta (UV) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019). Diversas substâncias químicas apresentam propriedades fotoprotetoras e fazem parte da composição não apenas de protetores solares, mas também de cosméticos (RUSZKIEWICZ et al., 2017), tintas, tecidos e materiais plásticos (HUANG et al., 2021).

Os filtros solares chegam aos compartimentos ambientais por vias diretas e indiretas. A forma direta consiste na lavagem dessas substâncias da pele de banhistas em oceanos e lagos devido a seu uso na forma de protetores solares, despejos de processos industriais e descarte de produtos comerciais (SILVA, COLLINS, 2011). A entrada por vias indiretas decorre principalmente da incorporação dos filtros solares ao esgoto doméstico, que, após os tratamentos convencionais realizados nas estações de tratamento de esgoto (ETE), não são removidos completamente e atingem os corpos d'água (GAGO-FERRERO et al., 2012). Os filtros solares mais hidrofóbicos, por sua vez, sedimentam e são retidos no lodo, comumente utilizado na agricultura e recuperação de terras (BADIA-FABREGAT et al., 2012).

Além de sedimentarem e sofrerem acúmulo no solo e em sedimentos, esses compostos podem ser absorvidos por organismos aquáticos sendo acumulados em tecidos gordurosos (PENG et al., 2020), bile e músculo (ZIARRUSTA et al., 2018), fenômeno denominado bioacumulação. Benzofenona-3 (BP-3), octilmetoxicinamato (OMC) e octocrileno (OC) estão entre os filtros solares mais utilizados ao redor do mundo, sendo frequentemente detectados em peixes (CUNHA et al., 2018; DÍAZ-CRUZ et al., 2019). Uma vez absorvidas, estas substâncias podem atuar como disruptores endócrinos desregulando a homeostase hormonal, alterando funções reprodutivas, ocasionando estresse oxidativo e neurotoxicidade (HUANG et al., 2021).

Organismos que possuem boa resistência a *habitats* poluídos, como as tilápias, podem ser utilizados como bioindicadores da qualidade sanitária ou ecológica da água, além de permitirem estudos com biomarcadores que forneçam parâmetros a respeito da toxicidade de contaminantes (LINS et al., 2010; CARVALHO et al., 2012).

Tendo em vista a ampla utilização dos filtros solares e os potenciais danos à biota aquática e aos seres humanos, este trabalho objetivou investigar efeitos adversos decorrentes da exposição subcrônica de tilápias às concentrações de 0,001 mg·L⁻¹ (concentração ambiental) (BARGAR et al., 2015; DÍAZ-CRUZ et al., 2019; SANCHEZ-RODRIGUEZ et al., 2015; TSUI et al., 2014) e 0,5 mg·L⁻¹ (concentração utilizada em estudos que elucidam modo de ação) (KIM et al., 2014; CHRISTEN, ZUCCHI, FENT, 2011; BLÜTHGEN et al., 2014) de uma mistura contendo BP-3, OMC e OC por meio da análise de biomarcadores genéticos e bioquímicos.

A fim de assegurar as concentrações ao longo do período de exposição, a estabilidade dos fotoprotetores foi acompanhada previamente em condições similares às do bioensaio e utilizando cromatografia líquida. Além disso, estimou-se a bioassimilação dos compostos através de um ensaio de exposição aguda.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

Avaliação de efeitos adversos decorrentes da exposição hídrica subcrônica de tilápias a duas concentrações da mistura de filtros solares.

2.2. Objetivos Específicos

- Desenvolver e validar um método cromatográfico para a determinação dos filtros solares em água;
- Determinar a estabilidade de BP-3, OMC e OC nas condições laboratoriais de exposição e de armazenamento de amostras aquosas;
- Estimar a assimilação diária dos filtros solares por tilápias expostas em condições de bioensaio em laboratório;
- Analisar efeitos adversos mediante exposição subcrônica das misturas de filtros solares em tilápias utilizando biomarcadores (genéticos, bioquímicos e somático).

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Filtros Solares

A radiação solar é a maior fonte natural de exposição humana aos raios ultravioleta (UV). A radiação UV compreende os fótons do espectro eletromagnético que possuem comprimento de onda entre 100 e 400 nm. Dentro desta faixa de comprimento de onda, o espectro UV pode ser subdividido em três regiões: radiação UVC (100-290 nm), UVB (290-320 nm) e UVA (320-400 nm) (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2012).

Embora as radiações UV estejam envolvidas em processos como a síntese de vitamina D e funcionamento do sistema imunológico, também são responsáveis por efeitos adversos no organismo humano. A radiação UVC, apesar de ser a mais nociva, é filtrada e absorvida por moléculas e partículas atmosféricas. A radiação UVB é em grande parte filtrada na atmosfera, mas, apesar disso, a parcela de 5-10% que atinge a superfície terrestre possui energia suficiente para causar danos fotoquímicos ao DNA, sendo associada à ocorrência e desenvolvimento de câncer de pele, eritemas e catarata. A radiação UVA corresponde a cerca de 95% da radiação UV que chega à superfície da Terra e é capaz de atingir as camadas mais profundas da pele, sendo responsável pelo bronzeamento e também associada a eritemas, envelhecimento e ao desenvolvimento câncer de pele (LAUTENSCHLAGER, WULF, PITTELKOW, 2007). Desse modo, a Organização Mundial da Saúde (OMS) e demais autoridades têm incentivado o uso de filtros solares como uma das medidas preventivas aos danos supracitados (PURRÀ et al., 2014; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019).

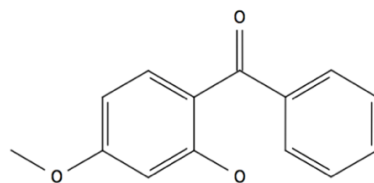
Filtros solares são formulações que contêm como ingredientes ativos substâncias fotoprotetoras capazes de reduzir a quantidade de radiação UV que atinge à pele. Tais substâncias fotoprotetoras são classificadas de acordo com sua estrutura e mecanismo de atuação (RUSZKIEWICZ et al., 2017). Os fotoprotetores classificados como orgânicos - benzofenonas, cinamatos, triazinas - agem através da absorção da radiação UV, enquanto os inorgânicos como dióxido de titânio e de zinco a refletem. Além disso, os filtros podem atuar em diferentes comprimentos de onda de acordo com sua estrutura (RAMOS et al., 2015).

3.1.1. Benzofenona-3 (BP-3), octilmetoxicinamato (OMC) e octocrileno (OC)

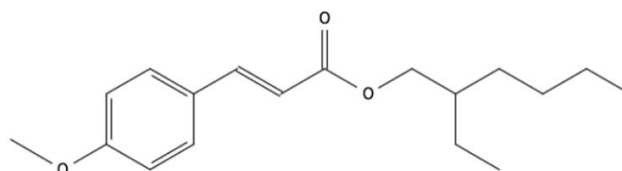
Os filtros solares orgânicos benzofenona-3 (BP-3), octilmetoxicinamato (OMC) e octocrileno (OC) estão entre os ingredientes ativos mais utilizados em protetores solares, sendo encontrados também em maquiagens e embalagens de alimentos. Tais compostos contêm anéis aromáticos e grupamentos cromóforos como a carbonila em suas estruturas (Figura 1), possibilitando a absorção da energia dos fótons que compõe a radiação UV. Cada composto absorve energia em uma faixa específica de comprimento de onda que varia de acordo com as espécies e quantidades dos demais grupamentos cromóforos presentes na molécula (NASH, TANNER, 2014).

Mediante tal absorção, as moléculas são eletronicamente excitadas e posteriormente dissipam a energia absorvida em forma de calor, através de mudanças conformacionais ou pela emissão de radiação em um comprimento de onda maior que o da radiação incidente. Devido à reversibilidade destes fenômenos, essas substâncias podem ser submetidas repetidamente aos processos de absorção e emissão de energia até que ligações sejam rompidas degradando a molécula (MANAIA et al., 2013). Dependendo dos comprimentos de onda absorvidos, os filtros solares podem ser classificados como UVA ou UVB, e, comumente, as substâncias são utilizadas em conjunto para que a faixa de absorção e proteção seja mais abrangente (ANTONIOU et al., 2008).

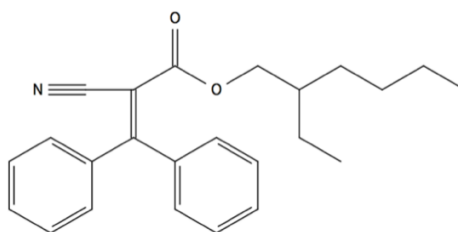
Figura 1 - Estruturas químicas dos compostos fotoprotetores estudados neste trabalho



Benzofenona-3 (BP-3)



Octilmetoxicinamato (OMC)



Octocrileno (OC)

**Fonte: National Center for Biotechnology Information
(CID 4632, CID 22571, CID 21630)
(2022)**

As benzofenonas, grupo no qual está inserida a BP-3, são cetonas aromáticas capazes de absorver radiação nos comprimentos de onda entre 270 e 350 nm (região UV AII e UV B) (BALOCH et al., 2011).

O OMC, por sua vez, é um filtro UVB (270-320 nm) pertencente à classe dos cinamatos com seu pico de absorção em torno de 311 nm (ANTONIOU et al., 2008). Estudos mostram que eficiência do composto quanto a absorção de radiação UV decresce à medida que a exposição à luminosidade aumenta, uma vez que a molécula é fotoisomerizada e muda da configuração *E* para *Z*.

Também pertencente à classe dos cinamatos, o OC é um éster que absorve entre os comprimentos de onda de 290 a 360 nm (região UV B) e parte da região UV A. Devido a sua considerável estabilidade, o OC costuma ser utilizado para estabilizar formulações contendo filtros solares menos estáveis como a avobenzona (BRIASCO et al., 2017).

Órgãos como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), *Food and Drug Administration* (FDA) e União Europeia (EU) são responsáveis por regulamentar

a utilização destes compostos e estipular as concentrações máximas permitidas. Embora os produtos contendo as substâncias fotoprotetoras sejam de uso tópico e essas não costumem exceder 10% (m/m) das formulações, estudos detectaram concentrações de BP-3, OMC e OC em sangue e urina humanos após aplicações de protetores solares na pele, levando a constatação de que esses filtros solares são capazes de romper a barreira dérmica tornando-se biodisponíveis (GONZALEZ, 2006; HILLER et al., 2019; MATTA, 2019). Após absorvidos, os compostos e seus metabólitos são eliminados através das excretas humanas e incorporados ao esgoto doméstico. Os tratamentos convencionais realizados atualmente nas Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) não promovem a total degradação destes compostos que podem permanecer em águas tratadas e atingir os diversos compartimentos ambientais. A situação é agravada em países como o Brasil, onde, em 2017, 45% da população não possuía tratamento de esgoto sendo esse despejado diretamente no meio ambiente (AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS, 2017).

Em 2005, na Suíça foi detectada a presença de BP-3, OMC e OC em águas não tratadas (0,7-7,8; 0,5-19 e 0,1-12 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente) e tratadas (0,01-0,7; <0,01-0,1 e <0,01-0,27 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente) (BALMER et al., 2005). Mais recentemente, em 2017, foi reportada a ocorrência de BP-3 e benzofenona-1 (BP-1), um de seus metabólitos, no afluente e efluente de uma estação de tratamento de água destinada ao consumo humano em Medellín, na Colômbia (ARISTIZABAL-CIRO et al., 2017).

É reportada, também, a presença de filtros solares em sedimentos, lodo, águas subterrâneas urbanas e biota (peixes, mexilhões, golfinhos, mariscos) (RAINIERI et al., 2017; MOLINS-DELGADO et al., 2018). Dessa forma, a absorção humana de filtros solares não ocorre apenas pela derme, mas também pode ocorrer através da ingestão de água ou alimentos contaminados.

A Tabela 1 reúne alguns estudos em países que detectaram a presença de filtros solares orgânicos em diferentes matrizes ambientais.

Tabela 1 - Estudos em diferentes países e matrizes ambientais detectando BP-3, OMC e OC

Local	Matriz ambiental	Filtros solares detectados	Referência
Hawaii	Tecidos de corais, águas superficiais, sedimentos	BP-3, OC	MITCHELMORE et al., 2019
China	Águas marinhas	BP-3, OC	TSUI et al., 2019
Estados Unidos	Água, sedimento e tecido de ostra	BP-3, OC, OMC	HE et al., 2019
Grécia	Água, sedimentos e peixes	BP-3, BP-1	DÍAZ-CRUZ et al., 2019
Brasil	Reservatório de água	BP-3, BP-1	POMPEI et al., 2019
Brasil	Peixes	BP-3, BP-1, OC, OMC	MOLINS-DELGADO et al., 2018
Europa	Sardinha, atum, salmão, cavala, mexilhão, camarão etc	BP-3, BP-1, OC, OMC	CUNHA et al., 2018
Brasil	Golfinhos	OC	GAGO-FERRERO et al., 2013

Fonte: Autoria própria (2022)

Tendo em vista a presença dos compostos fotoprotetores nos mais diversos compartimentos ambientais e em seres humanos, investigações utilizando animais como ratos e peixes têm sido conduzidas para elucidar possíveis consequências decorrentes da absorção destas substâncias. Ensaio de ecotoxicidade demonstram o comportamento dos filtros solares orgânicos como disruptores endócrinos, ou seja, foi possível constatar que esses compostos são capazes de alterar os níveis hormonais dos organismos mencionados (WANG et al., 2016).

Tais desequilíbrios hormonais podem ocorrer devido a mecanismos como a mimetização de hormônios naturais causando superestimulação hormonal ou a ligação da substância fotoprotetora a receptores hormonais interferindo na interação hormônio-receptor (NATIONAL INSTITUTE OF ENVIRONMENTAL HEALTH SCIENCES, 2019). Em peixes, desregulações hormonais decorrentes da exposição à BP-3 afetaram o desempenho reprodutivo dos indivíduos impactando a produção de ovos pelas fêmeas e ocasionando o aparecimento de atributos femininos em peixes machos, por exemplo (CORONADO et al., 2008, KIM et al., 2014). Recentemente, concentrações ambientais de OC também foram associadas a alterações em níveis de enzimas relacionadas ao sistema reprodutivo com

implicações no desenvolvimento do peixe *Oryzias latipes* (YAN et al. 2020). Além disso, estudos também reportam alterações em sistemas bioquímicos como indução de estresse oxidativo e neurotoxicidade mediante exposição a BP-3 e OMC isolados (TAO et al., 2020, NATARAJ et al., 2020).

A importância de avaliar a toxicidade simultânea dos filtros UV tem sido evidenciada uma vez que os compostos geralmente são encontrados juntos no ambiente e, dependendo da combinação, podem apresentar efeitos sinérgicos ou antagônicos. Quando em mistura binária, BP-3 e OMC apresentaram toxicidade aguda reduzida em comparação aos valores de CE_{50} obtidos após exposição de *Daphnia magna* aos compostos de forma isolada (MOLINS-DELGADO et al., 2016). Entretanto, no estudo de Jang et al. (2016) o oposto foi observado e os autores sugerem a ocorrência de efeito sinérgico entre os dois compostos. Para a mistura binária de OMC e OC, por sua vez, toxicidade aguda reduzida foi reportada em *D. magna* (PARK et al., 2017). Outra consideração importante é o aumento da quantidade de BP-3, OMC e OC bioacumulada quando os compostos se encontram em mistura ternária, conforme observado em peixes adultos *Danio rerio* (LI et al., 2018).

Em suma, embora as concentrações ambientais reportadas costumem estar em nível de $ng \cdot L^{-1}$, a entrada contínua dos filtros solares no meio ambiente associada à comprovação de efeitos de disrupção endócrina despertam preocupações, bem como a lacuna referente à ecotoxicidade destas substâncias quando em misturas (MA et al., 2003; RAINIERI et al., 2017; HUANG et al., 2021).

3.2. Desenvolvimento e Validação de Método Cromatográfico

3.2.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (LC, do inglês *Liquid Chromatography*)

A cromatografia é um método de separação amplamente utilizado devido a sua eficiência em matrizes simples e complexas. Os sistemas e técnicas cromatográficas, apesar de sua diversidade, possuem em comum o transporte da mistura de componentes químicos contendo o analito através de uma fase estacionária pelo fluxo

de uma fase móvel. A separação ocorre devido à diferença nas velocidades de migração dos componentes da fase móvel (SKOOG et al., 2006).

A categoria do método cromatográfico é definida a partir do estado físico da fase móvel, podendo ser líquida, gasosa ou um fluido supercrítico. Na cromatografia líquida (CL), a fase móvel é um solvente líquido contendo a amostra solubilizada. Durante a eluição do soluto, um detector costuma ser posicionado ao final da coluna para registrar sua concentração em função do tempo ou volume da fase móvel, originando picos e um gráfico denominado cromatograma. A posição dos picos no cromatograma permite a identificação dos componentes químicos presentes na amostra e a área sob os picos, sua quantificação (DONG, 2006).

A escolha do detector a ser utilizado acoplado ao cromatógrafo líquido depende de fatores tais como características da amostra, limites de detecção e quantificação e compatibilidade com o sistema do cromatógrafo. Como muitos analitos de interesse absorvem comprimentos de onda na faixa do UV visível (190–600 nm), detectores espectrofotométricos são amplamente utilizados. Dentro dessa categoria, detectores como o detector por arranjo de diodo (DAD), que permitem o ajuste do comprimento de onda de trabalho, são preferíveis, uma vez que podem operar na região de máxima absorbância do analito ou em um comprimento de onda que aumente a seletividade do método (SWARTZ, 2010).

A escolha de fase móvel e estacionária depende das características físico-químicas dos compostos a serem analisados e influenciarão no mecanismo de separação, podendo ocorrer por partição, adsorção, troca iônica, exclusão, afinidade e quiralidade (SKOOG et al., 2006; SILVA, COLLINS, 2011).

3.2.2. Validação de Métodos Analíticos

A validação de métodos analíticos objetiva garantir a confiabilidade dos resultados e é de extrema importância, visto que esses resultados impactam diretamente em sua aplicabilidade (PERIS-VICENTE, ESTEVE-ROMERO, CARDABROCH, 2015).

De acordo com os guias de validação norteadores no Brasil (ANVISA, 2017; INMETRO, 2011; MAPA, 2011) e a literatura especializada baseada em guias internacionais (BANSAL, DESTEFANO, 2007; PERIS-VICENTE, ESTEVE-

ROMERO, CARDA-BROCH, 2015; SALVATIERRA-STAMP et al., 2015) os parâmetros fundamentais a serem investigados em métodos analíticos são seletividade e especificidade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez.

3.2.2.1. Seletividade

De acordo com a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (2001), a seletividade de um método pode ser definida como a capacidade de este ser utilizado na determinação correta de um analito específico em mistura ou matriz, de maneira que os resultados não sofram interferência de substâncias que apresentem comportamento similar ao do analito.

A seletividade pode ser avaliada pelo monitoramento da presença de interferentes na região de detecção do analito de interesse em amostras branco (RIBANI et al., 2004) e por meio da comparação qualitativa dos tempos de retenção obtidos na amostra e em soluções padrão (SALVATIERRA-STAMP, 2015). Algumas interferências - denominadas de efeitos da matriz - podem ser decorrentes de espécies estranhas contidas na matriz do analito que coeluem e provocam uma resposta instrumental difícil de ser distinguida da resposta do analito (SKOOG et al., 2006). Uma tentativa de elucidar os efeitos da matriz consiste em investigar matrizes independentes e de diferentes procedências, além de comparar os picos do analito na presença e ausência da matriz (BANSAL, DESTEFANO, 2007).

3.2.2.2. Intervalo e Linearidade

O intervalo ou faixa de aplicação corresponde à faixa existente entre os limites de quantificação superior e inferior do analito, que atenda aos requisitos de precisão, exatidão e linearidade (TIWARI, TIWARI, 2010). Segundo recomendações da ANVISA (2003), para fármacos e medicamentos é especificado um intervalo entre 80% e 120% da concentração esperada do analito.

A linearidade de um método cromatográfico expressa a proporcionalidade entre o sinal obtido (área ou altura do pico cromatográfico) e a concentração do analito em um intervalo estabelecido. Essa relação matemática muitas vezes é denominada

curva de calibração ou curva analítica, sendo geralmente determinada empiricamente a partir de medições efetuadas utilizando padrões de calibração contendo o analito em concentrações conhecidas (CASSIANO et al., 2009; PERIS-VICENTE, ESTEVE-ROMERO, CARDA-BROCH, 2015). Para determinação da linearidade, a ANVISA (2003) propõe que sejam analisados, no mínimo, cinco níveis de concentração.

A partir da elaboração da curva analítica e aplicação do método matemático de regressão linear é possível obter os coeficientes de regressão, **a** e **b**, que permitem calcular o coeficiente de determinação, R^2 (PERIS-VICENTE, ESTEVE-ROMERO, CARDA-BROCH, 2015). O coeficiente de determinação possibilita estimar a qualidade da curva obtida, sendo considerados satisfatórios pela ANVISA valores de R^2 no mínimo iguais a 0,99 (ANVISA, 2003). A *European Medicines Agency* (EMA) e a agência americana *Food and Drug Administration* (FDA) recomendam que sejam utilizadas no mínimo 6 padrões de calibração com análises em duplicata para elaboração da curva, cobrindo toda a faixa de aplicação onde se observa linearidade (EMA, 2015; US-FDA, 2001). Para construção da curva, pode-se optar por três diferentes tipos de padronização de acordo com o tipo de análise e tratamento da amostra: padronização interna, externa e por adição de padrão (RIBANI et al., 2004).

Para comprovar a linearidade do método, além do coeficiente de determinação R^2 , análises visuais e estatísticas são necessárias conforme descrito no Guia n° 10 para Tratamento Estatístico da Validação Analítica da ANVISA. Inicialmente, são realizadas análises visuais a partir das representações gráficas das respostas em função da concentração dos analitos, das equações da reta de regressão de y em x estimada pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) e dos gráficos de resíduos. Em seguida, avalia-se a adequabilidade do MMQO para realização da regressão linear por meio da análise da homocedasticidade (variância constante de y), utilizando testes estatísticos como o de Cochran. Então, procede-se com a avaliação da significância do coeficiente angular por meio do teste F da ANOVA. A normalidade dos resíduos também deve ser avaliada estatisticamente.

Para realização do teste F da ANOVA, inicialmente, calcula-se a soma dos quadrados total (SQTot), da regressão (SQReg) e dos resíduos (SQRes) utilizando as equações abaixo:

$$SQTot = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 \quad (\text{Eq. 1})$$

$$SQReg = \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2 \quad (\text{Eq. 2})$$

$$SQRes = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde:

y_i = valor individual de y obtido experimentalmente em um determinado ponto

\bar{y} = média aritmética dos valores de y no centroide

\hat{y}_i = valor individual de y calculado pelo modelo (equação) em um determinado ponto

A partir da soma dos quadrados, pode-se obter os quadrados médios utilizando as equações abaixo onde “p” representa o número de parâmetros do modelo e “n” a quantidade total de dados:

$$\text{Quadrado Médio Total} = QMTot = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n-1} \quad (\text{Eq. 4})$$

$$\text{Quadrado Médio da Regressão} = QMReg = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{p-1} \quad (\text{Eq. 5})$$

$$\text{Quadrado Médio dos Resíduos} = QMRes = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-p} \quad (\text{Eq. 6})$$

Por fim, o valor de F calculado é obtido a partir da razão QMReg/QMRes e comparado com o valor de F crítico a um nível de significância de 5%, e, caso F calculado > F crítico, o modelo linear pode ser considerado adequado para explicar o comportamento dos dados obtidos.

3.2.2.3. Precisão

A precisão é determinada por meio da comparação entre resultados obtidos a partir de ensaios independentes realizados em amostras múltiplas utilizando o mesmo método (PERIS-VICENTE, ESTEVE-ROMERO, CARDA-BROCH, 2015), podendo ser entre amostras semelhantes, padrões ou ensaios repetidos em uma mesma amostra submetida a diferentes preparos (RIBANI et al., 2004).

A precisão também pode ser expressa pelo coeficiente de variação (CV) obtido a partir da Eq. 7. Normalmente, análises em macro quantidades aceitam valor de CV igual a 1% ou 2%, e, em análises a nível traço ou impurezas de amostras complexas, valores de CV até 20% são aceitos (PERIS-VICENTE, ESTEVE-ROMERO, CARDA-BROCH, 2015).

$$CV(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (\text{Eq. 7})$$

Existem três níveis em que a precisão pode ser avaliada e considerada: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. Para avaliação da precisão por repetibilidade, as análises são realizadas em um curto intervalo de tempo sob as mesmas condições de medição. O termo reprodutibilidade representa a precisão das análises quando realizadas em diferentes laboratórios, portanto, sob condições variadas, e, a precisão intermediária consiste em as análises que ocorrem no mesmo laboratório, porém em um maior espaçamento de tempo (TIWARI; TIWARI, 2010).

3.2.2.4. Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O limite de detecção (LD) ou sensibilidade do método consiste na menor quantidade do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. O limite de quantificação (LQ), por sua vez, corresponde a menor concentração do analito que pode ser quantificada pelo método com precisão e exatidão aceitáveis (TIWARI; TIWARI, 2010; PERIS-VICENTE, ESTEVE-ROMERO, CARDA-BROCH, 2015).

Os limites LD e LQ podem ser obtidos utilizando três diferentes métodos: método visual, relação sinal-ruído ou método baseado em parâmetros da curva analítica, sendo o último considerado estatisticamente mais confiável. No método visual, adicionam-se concentrações conhecidas do analito a matriz para que se possa distinguir visualmente o ruído do sinal analítico, e então determina-se a menor concentração detectável visualmente. O método da relação sinal-ruído utiliza comparações entre cromatogramas de amostras branco e amostras contendo o analito em baixas concentrações conhecidas, permitindo então que se diferencie o ruído, que deve ser mostrado na linha base, e o sinal do analito (RIBANI et al., 2004).

Para LD, as proporções sinal-ruído geralmente aceitas são de 3:1 ou 2:1 (RIBANI et al., 2004) e, para LQ, a ANVISA (2003) especifica que devem ser consideradas apenas concentrações que produzam relação sinal-ruído superior a 10:1. Os cálculos de LD e LQ utilizando a curva analítica requerem sua construção a partir de respostas do analito em concentração próxima ao LD para obtenção do valor que corresponde a estimativa do desvio padrão da resposta e o coeficiente angular da curva (RIBANI et al., 2004).

3.2.2.5. Exatidão

A exatidão é uma representação da concordância entre os resultados fornecidos pelo método e valores aceitos como referência (SKOOG et al., 2006; PERIS-VICENTE, ESTEVE-ROMERO, CARDA-BROCH, 2015).

Os valores aceitos como referência ou também chamados valores nominais podem ser fornecidos por órgãos reconhecidos responsáveis pela certificação do material e seus parâmetros, como NIST (*National Institute of Standards and Technology* - USA), LGC (*Laboratory of the Government Chemist* - UK), FAPAS (*Food Analysis Performance Assessment Scheme* - UK) e outros. Outra forma de obter valores nominais é por meio da utilização de métodos já estabelecidos como referência, processo denominado comparação de métodos (RIBANI et al., 2004).

De acordo com o FDA, devem ser utilizados no mínimo 3 amostras de controle de qualidade (CQ) analisadas em 5 replicatas com níveis de concentrações baixa (CQB), média (CQM) e alta (CQA) em relação ao intervalo de concentração da curva de calibração. Recomenda-se que CQB possua valor de concentração igual a três vezes à do limite inferior de quantificação (LIQ), CQM apresente valor de concentração próximo ao centro da curva de calibração e, CQA, uma concentração próxima ao valor mais elevado da curva de calibração (US-FDA, 2001).

3.3. Bioacumulação, bioensaios e toxicidade

O fenômeno da bioacumulação pode ser definido como o aumento da concentração na biota de contaminantes presentes no meio, sendo decorrente de absorção direta ou indireta (WANG, 2016). No ecossistema aquático, a absorção direta ou bioconcentração consiste no acúmulo de substâncias provenientes da fase aquosa, e, em peixes, se dá através da pele, brânquias ou pulmão. A absorção indireta ou biomagnificação envolve a transferência de contaminantes entre níveis tróficos, ocorrendo por meio da ingestão de água ou alimentos contaminados (ZAGATTO, BERTOLETTI, 2006; RAMSDORF, 2011).

A quantidade bioconcentrada de um agente exógeno é aquela que permanece retida no organismo após os processos de assimilação e eliminação de substâncias. O organismo pode eliminar o contaminante por meio de trocas respiratórias, excreção

fecal, biotransformação metabólica e/ou diluição resultante do crescimento. A diluição decorrente do crescimento, entretanto, é considerada um processo de "pseudo-eliminação" uma vez que não há eliminação do contaminante, mas sim a diminuição de sua concentração em decorrência do aumento no volume dos tecidos nos quais ele se encontra (COSTA et al., 2008).

Modelos cinéticos podem ser usados para estimar o fator de bioconcentração de um agente exógeno em determinado organismo. A estimativa é feita com base em regressões não lineares que permitem obter taxas de entrada e saída da substância do organismo estudado. Todavia, ao não considerarem a metabolização do contaminante, crescimento do organismo e parâmetros de adsorção, estes modelos costumam fornecer resultados imprecisos. A quantificação direta de contaminantes bioconcentrados em animais pode fornecer melhores resultados e requer o desenvolvimento de métodos bioanalíticos sensíveis e precisos (MILLER et al., 2017).

Um dos parâmetros de adsorção fundamentais nos processos de bioconcentração de compostos orgânicos é a hidrofobicidade. Este parâmetro é expresso pelo coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}) da substância e se relaciona com seu grau de acúmulo em tecidos lipídicos proveniente do nível de afinidade entre a substância e os lipídios (ZAGATTO, BERTOLETTI, 2006; AZEVEDO, CHASIN, 2004). A Tabela 2 apresenta os valores de $\log K_{ow}$ e outras informações para BP-3, OMC e OC.

Tabela 2 - Parâmetros físico-químicos dos fotoprotetores estudados neste projeto

Nome (Abreviação)	Número CAS	Massa molecular (g·mol ⁻¹)	log Kow	Solubilidade em água (mg·L ⁻¹)	Principais metabólitos identificados
Benzofenona-3 (BP-3)	131-57-7	228,24	3,79	3,7 a 20 °C ¹	2,4-dihidroxibenzona (BP-1); 2,2'-dihidroxi-4-metóxi-benzona; 2,3,4-trihidróxi-benzofenona ⁴
Octilmetoxicinamato (OMC)	5466-77-3	290,4	5,8	0,2 - 0,75 a 21°C ²	ácido 4-metóxicinâmico; 4'-metóxiacetofenona ⁵
Octocrileno (OC)	6197-30-4	361,5	6,88	0,04 a 20 °C ³	ácido 2-ciano-3,3-difenilacrilico; 2-etil-5-hidróxi-hexil-2-ciano-3,3-difenil acrilato; 2-(carboximetil)butil-2-ciano-3,3-difenilacrilato ⁶

Nota: ^{1,4}: **European Commission, 2006.**

²: **National Center for Biotechnology Information, 2022 (CID 21630).**

³: **Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS), 2021.**

⁵: **HUANG et al., 2019.**

⁶: **BURY et al., 2019.**

Fonte: Adaptado de GAGO-FERRERO, DÍAZ-CRUZ, BARCELÓ, 2012

Tendo em vista o fenômeno de bioconcentração, animais aquáticos podem ser utilizados como bioindicadores da qualidade sanitária ou ecológica da água e fornecer dados a respeito da toxicidade de contaminantes (LINS et al., 2010). O biomonitoramento ambiental permite a avaliação da qualidade do corpo de água em longo prazo e a observação da real situação do ambiente e dos organismos impactados. O elevado número de variáveis ambientais, entretanto, representa um fator dificultante quando se objetiva avaliar o impacto de um contaminante específico, sendo preferível a realização de um bioensaio em alguns casos. Os bioensaios são ensaios laboratoriais sob condições-padrão que utilizam organismos vivos ou partes deles (células, tecidos e outros) com a finalidade de avaliar a toxicidade de efluentes ou substâncias químicas específicas (RAMSDORF, 2011; VAN DER OOST, BEYER, VERMEULEN, 2003).

Estudos de toxicidade *in vitro* e *in vivo* podem ser realizados quando se objetiva identificar e avaliar em curto e longo prazo os efeitos adversos de determinada substância química (PRABU, THIRUMURUGAN, SURIYAPRAKASH, 2014).

Um ensaio de toxicidade é classificado pelo tempo de exposição dos organismos-teste ao contaminante, pela concentração de contaminante utilizada no

ensaio e o efeito observado nos organismos. Em geral, faz-se uma distinção entre as categorias de bioensaio em: ensaios de toxicidade aguda, subaguda, crônica e subcrônica. Nos ensaios de toxicidade aguda, o animal é exposto a uma dose ou concentração elevada do contaminante (dose única ou exposições múltiplas) por um período de tempo que pode variar de 24 a 96 horas, e o efeito avaliado consiste em efeito agudo como imobilidade ou morte do organismo-teste. O aparecimento de efeito é considerado até 14 dias após o ensaio e os resultados são expressos através da CE_{50} (concentração da amostra que causa efeito agudo a 50% dos organismos expostos) ou CL_{50} (concentração da amostra que causa letalidade a 50% dos organismos expostos) (RAMSDORF, 2011).

Os ensaios de toxicidade subaguda e subcrônica se diferem quanto a duração da exposição. Em ensaios de toxicidade subaguda, o período de exposição varia de 24h a 28 dias, e, em ensaios de toxicidade subcrônica o período pode durar até 90 dias desde que não exceda 10% do tempo de vida do animal. Em ambos, a administração do contaminante pode ocorrer em dose única ou exposições múltiplas (JONG, CARRAWAY, GEERTSMA, 2012). Esses estudos fornecem informações sobre os principais efeitos tóxicos dos compostos, os órgãos-alvo afetados e a severidade dos efeitos após exposições repetidas, além de permitir a inferência das doses ou concentrações a serem utilizadas nos estudos de toxicidade crônica. Tais informações podem ser obtidas investigando biomarcadores genéticos e bioquímicos, por exemplo (RAMSDORF, 2011).

Os ensaios de toxicidade crônica avaliam os efeitos de concentrações inferiores de contaminantes por um prolongado período de exposição, de 180 dias a alguns anos, dependendo do organismo-teste. Dessa forma, o ensaio abrange parte significativa do ciclo de vida do organismo e pode afetar na taxa de crescimento e reprodução do organismo-teste. Com os testes crônicos é possível analisar danos que se mostram, às vezes, somente após várias gerações. Os resultados podem ser expressos em CENO (concentração de efeito não observado), cuja definição segundo a Norma NBR13373 (2005) é a maior concentração testada da amostra que não causa efeito deletério estatisticamente significativo na sobrevivência e reprodução nas condições de ensaio, e CEO (concentração de efeito observado), que representa a menor concentração na qual se observa tal efeito (RAMSDORF, 2011; PRABU, THIRUMURUGAN, SURIYAPRAKASH, 2014).

Quando o estudo almeja simular o que de fato ocorre no meio ambiente, a administração da concentração ambiental do contaminante fornece resultados mais realistas (BOTELHO et al., 2015). Além disso, deve-se considerar o processo de biotransformação de xenobióticos, que consiste na conversão de compostos por enzimas presentes no organismo de modo a facilitar sua excreção. A biotransformação pode levar a produção de compostos secundários de maior ou menor toxicidade (RAMSDORF, 2011).

3.3.1. Bioensaios com Peixes

Os peixes são considerados uma matriz capaz de fornecer boa representatividade do ambiente aquático na análise de filtros solares. Essas substâncias tendem a se acumular nas brânquias e fígado destes animais, podendo ser metabolizadas e excretadas ou acumuladas nos tecidos (GAGO-FERRERO et al., 2012).

Em bioensaios de bioconcentração utilizando peixes, os organismos podem ser expostos aos agentes tóxicos pela dissolução destes na água, método denominado imersão. Os modos de exposição no método de contaminação por imersão podem ser: estático, semi-estático e dinâmico; e sua escolha dependerá das características físico-químicas da amostra ambiental ou substância. No método semi-estático, há a substituição, em intervalos definidos, da solução teste por outra solução com as mesmas características devido a sua baixa estabilidade, solubilidade e/ou elevada volatilidade (RAMSDORF, 2011). Os bioensaios são capazes de fornecer informações sobre os principais efeitos tóxicos dos compostos, os órgãos afetados e severidade dos efeitos (AZEVEDO, CHASIN, 2004).

3.4. Biomarcadores

Biomarcadores são utilizados em estudos de toxicologia ambiental, seja ele biomonitoramento ou bioensaio, ao fornecerem uma visão mais ampla dos efeitos tóxicos de contaminantes no organismo estudado. O termo biomarcador pode ser definido como uma medida que reflete uma interação entre um sistema biológico e um dano potencial, que pode ser químico, físico ou biológico. Fluídos corpóreos,

células, tecidos, respostas fisiológicas, comportamentais ou energéticas dos organismos expostos ao contaminante podem ser considerados biomarcadores. Além destes, parâmetros hematológicos, imunológicos, reprodutivos, endócrinos, fisiológicos, morfológicos, enzimáticos, genéticos também são amplamente utilizados (RAMSDORF, 2011).

Segundo Van Der Oost, Beyer e Vermeulen (2003), os biomarcadores podem ser subdivididos em biomarcadores de exposição, de efeito e de susceptibilidade. Biomarcadores de exposição atuam na detecção e medição de um contaminante, seu metabólito ou de alguma interação que ocorra entre o agente exógeno e componentes moleculares ou celulares do organismo. Biomarcadores de efeito são referentes a medição de alterações bioquímicas ou fisiológicas nos tecidos ou fluidos do organismo através de parâmetros que possam ser associados a efeitos adversos ou doença. Por fim, biomarcadores de susceptibilidade indicam a habilidade inerente ou adquirida de um organismo responder a exposição a um agente exógeno específico, incluindo fatores genéticos e mudanças em receptores.

3.4.1. Biomarcador Somático

A fim de avaliar se a exposição a contaminantes é capaz de afetar a saúde geral dos organismos, pode-se estimar o Fator de Condição de Fulton (K) utilizando a Eq. 8, onde W corresponde ao peso dos organismos (g) e L ao comprimento total do indivíduo (cm). O valor de K pode ser indicativo indireto das reservas energéticas do animal, refletindo aspectos nutricionais recentes (ALMEIDA et al., 2019).

$$K = W^3 / L \quad (\text{Eq. 8})$$

3.4.2. Biomarcadores Genéticos

Biomarcadores genéticos têm como finalidade detectar e avaliar o potencial genotóxico, como mutações gênicas e danos cromossômicos, decorrentes da exposição de organismos a agente exógenos (ABDELFATTAH, AUGUSTYNIAK, YOUSEF, 2017; VALENTE et al., 2017).

Algumas das consequências destes agentes em organismos aquáticos incluem defeitos de hereditariedade, declínio populacional, efeitos carcinogênicos, redução de crescimento, desenvolvimento anormal e redução da sobrevivência de embriões, larvas e adultos (RAMSDORF, 2011). A fim de minimizar ou evitar a ocorrência dos danos mencionados, agências regulamentadoras como FDA e ANVISA exigem a realização de testes de genotoxicidade no processo de validação de novos medicamentos. Dentre as ferramentas para a detecção e avaliação dos efeitos genotóxicos decorrentes da exposição de animais aquáticos a substâncias químicas, a associação do teste do micronúcleo písceo e ensaio cometa é amplamente recomendada e utilizada devido a simplicidade, alta sensibilidade e capacidade de detectar alterações nos níveis cromáticos e cromossômicos de ambas as técnicas (ARALDI et al., 2015).

a) Teste do Micronúcleo Písceo

Micronúcleos consistem em cromossomos inteiros ou parciais que, no momento da divisão celular, não foram incorporados ao núcleo da célula filha como consequência de danos ocasionados às células parentais (HILLEGASS et al., 2009).

Dessa forma, aparecem como uma pequena estrutura arredondada e escura, e sua ocorrência permite avaliar a habilidade de um contaminante de induzir dano cromossômico estrutural e/ou numérico em células em estágio de divisão (RIBEIRO, SALVADORI, MARQUES, 2003).

Faz-se necessário, no entanto, distinguir micronúcleos de anomalias nucleares para que o resultado do teste seja preciso. Anomalias nucleares podem ocasionar núcleos não ovais formados quando determinada quantidade de material fica levemente atrasada na mitose gerando uma saliência de cromatina. Dessa forma, os critérios para identificação de micronúcleo são: partículas que não excedam 1/3 do tamanho do núcleo principal, apresentem-se nitidamente separadas, com bordas distinguíveis e com mesma cor e refringência do núcleo. As alterações na forma elíptica normal dos núcleos que não se enquadrarem no conceito de micronúcleo descrito são classificadas como alterações morfológicas nucleares (LIMA et al., 2018).

Diferenças nas frequências de micronúcleos e alterações morfológicas em sangue de tilápias são relacionadas a ambientes com graus distintos de

contaminação; de modo geral, concentrações maiores de determinados contaminantes ocasionam maior frequência de alterações. Existem na literatura estudos que utilizam essa tendência como critério para avaliar a eficácia de diferentes tratamentos de efluentes (DEL-GUERCIO et al., 2017; GRISOLIA et al., 2005), tratamento de chorume (GALLAO et al., 2019) e como ferramenta para o biomonitoramento de corpos d'água (ALAM et al., 2019; JESUS et al., 2016; SOUZA, FONTANETTI, 2006; SUMMAK et al., 2010).

Comumente, o teste de micronúcleo písceo é realizado associado ao ensaio cometa de modo a possibilitar conclusões mais robustas a respeito do potencial toxicológico de substâncias em relação ao material genético. Em bioensaios, os estudos encontrados na literatura são voltados para a realização dessas análises na determinação dos danos decorrentes da exposição de tilápias a xenobióticos como metais pesados (AHMED et al. 2011; SERIANI et al., 2015), antibióticos (BOTELHO et al., 2015), hormônios (SPONCHIADO et al., 2011; WENDT, 2013) e filtros solares (ALMEIDA et al., 2019). Há de se considerar, entretanto, a resposta adaptativa que alguns organismos podem desenvolver com relação a contaminantes específicos. Por conta de tal fenômeno, nem sempre um maior tempo de exposição ao contaminante ocasionará maior frequência de danos (AHMED et al., 2011).

b) Ensaio Cometa Alcalino

Considerado um dos métodos mais simples, sensível e confiável, o ensaio cometa, ou eletroforese em gel de célula única, permite a avaliação de lesões no DNA de células individuais nucleadas (ABDELFATTAH, AUGUSTYNIAK, YOUSEF, 2017; VALENTE et al., 2017). A técnica da eletroforese em gel consiste na aplicação de um campo elétrico à célula analisada promovendo a migração do DNA celular associado a proteínas nucleares em direção ao ânodo do equipamento. Caso o DNA esteja danificado, sua migração é facilitada e ocorre a formação de uma cauda similar a um cometa. Por sua vez, células que não apresentam dano apresentam migração mais homogênea formando um círculo (AFANASIEVA, SIVOLOB, 2018).

A resposta dependerá das condições experimentais, das espécies, do tipo de célula, do contaminante e da duração da exposição ao agente passível de dano ao DNA. Deve-se, também, levar em consideração os mecanismos de reparo do DNA,

que costumam ser mais lentos em organismos aquáticos quando comparados aos mamíferos. Em peixes, o tipo de células mais comumente utilizada no ensaio cometa são eritrócitos (hemácias), que compõe cerca de 97% do sangue (RAMSDORF, 2011).

De 1995 a 2015, Lapuentes e colaboradores reportaram a realização do ensaio cometa para elucidar efeitos de agentes químicos em mais de 90 espécies de peixes e concluem que estes animais consistem nos mais utilizados em avaliações de impacto ambiental. Com relação as categorias de xenobióticos investigadas, os autores mencionam os contaminantes “tradicionais”, i.e. poluentes orgânicos persistentes, metais e pesticidas. Nos últimos anos, entretanto, contaminantes ambientais emergentes como fármacos, disruptores endócrinos, nanopartículas, biotoxinas dentre outros também passaram a ser alvo de estudo.

Em 2019, Almeida e colaboradores constataram indução de danos genotóxicos e mutagênicos em peixes fêmeas adultas da espécie *Poecilia reticulata* após exposição aguda de 96h às concentrações de 0,01, 0,1 e 1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de BP-3 dissolvida em etanol. Para esse contaminante e espécie, a frequência de danos no DNA observada após realização do ensaio cometa foi mais expressiva nos grupos expostos a 0,1 e 1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Eritrócitos contendo micronúcleos e anomalias nucleares também foram identificados a partir do teste do micronúcleo písceo, sendo significativamente maior a frequência de alterações nucleares totais, i.e. soma de todas as alterações nucleares, no grupo exposto a maior concentração do fotoprotetor.

3.4.3. Biomarcadores Bioquímicos

Os biomarcadores bioquímicos têm como finalidade avaliar alterações em sistemas bioquímicos e são considerados indicadores precoces de contaminação ambiental, uma vez que a manifestação de efeitos tóxicos nesses sistemas precede efeitos mais sérios e aparentes. Biomarcadores de estresse oxidativo, de biotransformação e neurotoxicidade configuram os principais grupos de biomarcadores bioquímicos utilizados (KROON, STRETEN, HARRIES, 2017). A investigação da atividade dessa classe de biomarcadores é considerada de

fundamental importância na compreensão dos efeitos tóxicos de contaminantes (MUTHULAKSHMI et al., 2018).

3.4.3.1. Estresse Oxidativo

Contaminantes ambientais podem acentuar processos pró-oxidativos ocasionando aumento na taxa regular de produção de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (EROs), e a esta situação dá-se o nome de estresse oxidativo. O aumento na taxa de produção dessas espécies relaciona-se a maior ocorrência de danos oxidativos como lipoperoxidação, oxidação de proteínas e o dano ao DNA (BIRBEN et al., 2012).

A lipoperoxidação ou peroxidação lipídica (LPO) é um importante biomarcador bioquímico de contaminação ambiental e permite avaliar danos celulares decorrentes do estresse oxidativo. O processo de lipoperoxidação ocasiona redução da permeabilidade e integridade das membranas celulares e interfere em processos como transporte de íons transmembrana (RAMSDORF, 2011; BIRBEN et al., 2012). O processo tem início através da reação de radicais livres com ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) que fazem parte da composição de lipoproteínas e membranas celulares. A reação inicia um processo em cadeia que resulta na formação de hidroperóxidos lipídicos e aldeídos que podem ser detectados em amostras biológicas e utilizados para avaliar o estresse oxidativo (LIMA, ABDALLA, 2001).

A catalase, por sua vez, é uma enzima antioxidante específica que promove a conversão de peróxido de hidrogênio à água e oxigênio molecular, impedindo a formação do radical hidroxila relacionada a danos oxidativos (CAMINI, 2014). O monitoramento da inibição ou indução da atividade da catalase permite avaliar condições de estresse oxidativo configurando um importante biomarcador (VAN DER OOST, BEYER, VERMEULEN, 2003).

Em peixes, grande parte dos estudos encontrados na literatura envolvendo a avaliação da atividade dessas enzimas visando investigar a toxicidade dos filtros solares consiste em ensaios agudos e subcrônicos com embriões. Recentemente, Nataraj e colaboradores (2020) investigaram a toxicidade do OMC e seus fotoprodutos, 2-etilhexanol (2-EH) e 4-metoxibenzaldeído (4-MBA), através de análise de biomarcadores bioquímicos, dentre eles LPO e CAT, em embriões (96 horas-pós-

fertilização, hpf) de *Danio rerio*. Ao nível de significância de 1%, embriões apresentaram níveis de LPO elevados quando expostos a 62 mg·L⁻¹ de OMC durante 96h. Com relação a CAT, OMC causou indução significativa de sua atividade ($p < 0,05$) nos grupos expostos as concentrações de 6,2 e 12,4 mg·L⁻¹.

Em 2018, Li e colaboradores expuseram durante 7 dias, embriões de *D. rerio* a mistura de filtros solares e, no grupo onde as concentrações eram de 0,55; 0,4 e 0,7 µg·L⁻¹ para BP-3, OMC e OC, respectivamente, houve variações na atividade da enzima catalase (CAT), relacionada ao estresse oxidativo. Em embriões de *Danio rerio* expostos apenas a BP-3 em água e > 0,1% etanol, nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 µg·L⁻¹, durante 48h, não houve alteração na atividade da CAT. Os autores mencionam que, segundo dados encontrados na literatura, BP-1, o metabólito da BP-3, poderia apresentar maior toxicidade devido a maior afinidade com receptores de estrogênio e os embriões seriam mais resistentes a BP-3 por não serem capazes de a metabolizar (FUENTES-RODRÍGUEZ et al., 2015). Dessa forma, observa-se que o estágio de vida do organismo pode ocasionar maior ou menos susceptibilidade aos xenobióticos dependendo da substância química em questão, tempo de exposição utilizado durante bioensaio, gênero dos indivíduos testados (WENDT, 2013) e capacidade de biotransformação (FUENTES-RODRÍGUEZ et al., 2015).

3.4.3.2. Neurotoxicidade

A enzima acetilcolinesterase, AChE, é reportada como um potencial biomarcador para monitorar efeitos decorrentes de xenobióticos na fisiopatologia de peixes (AL-GHAIS, 2013; GOMES, 2019). Tal enzima é responsável por hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina (ACh) atuante nas sinapses entre neurônios (sinapses colinérgicas). Algumas substâncias químicas podem atuar inibindo (pesticidas organofosforados e carbamatos, fármacos anticolinesterásicos) ou induzindo a atividade da AChE. Quando ocorre inibição de sua atividade, a AChE é incapaz de hidrolisar a ACh fazendo com que o neurotransmissor permaneça ativo por um período maior na fenda sináptica, fato que incrementa a transmissão colinérgica (ARAÚJO, SANTOS, GONSALVES, 2016).

Em organismos aquáticos, a atividade dessa enzima tem se mostrado ser de crucial importância para elucidação de efeitos neurotóxicos de contaminantes (MUTHULAKSHMI et al., 2018).

No trabalho de Nataraj e colaboradores realizado em 2020 no qual embriões de *Danio rerio* foram utilizados em exposição aguda ao OMC e seus fotoprodutos, 2-EH e 4-MBA, após análise estatística dos dados, os autores observaram não haver alterações na atividade da AChE nos grupos de embriões expostos ao OMC nas concentrações de 6,2 e 12,4 mg·L⁻¹ e ao 2-EH nas concentrações de 6,8 e 34,0 mg·L⁻¹. Entretanto, redução significativa ($p < 0,05$) da atividade dessa enzima foi observada nos grupos expostos a maior concentração de OMC (62 mg·L⁻¹) e ao 4-MBA na concentração de 3,5 mg·L⁻¹. Além disso, um aumento significativo ($p < 0,05$) na atividade da AChE foi observado nos grupos expostos ao 2-EH (3,4 mg·L⁻¹) e 4-MBA (0,35; 0,7 mg·L⁻¹).

3.4.3.3. Biomarcador de Biotransformação

O processo de biotransformação de xenobióticos consiste na conversão de compostos apolares em compostos polares de mais fácil excreção pelo organismo. Uma série de sistemas enzimáticos atua nos processos de biotransformação de acordo com o agente químico a ser transformado, e a monitoração dos níveis e atividades das enzimas envolvidas caracteriza um procedimento de considerável sensibilidade que permite avaliar danos decorrentes da exposição ao composto químico (RAMSDORF, 2011; KROON, STRETEN, HARRIES, 2017).

a) Glutathionas S-transferases (GST)

As Glutathionas S-transferases (GST) são enzimas diméricas capazes de se ligarem covalentemente a compostos eletrofilicos impossibilitando que estes se liguem ao DNA e outras moléculas, desempenhando um papel importante na proteção contra danos oxidativos e formação de produtos peroxidativos. Dessa forma, a toxicidade de contaminantes pode ser avaliada pela observação das variações na atividade da GST mediante exposição do organismo a substância exógena (VAN DER OOST, BEYER, VERMEULEN, 2003).

Dependendo do contaminante avaliado, as alterações observadas podem ser de aumento ou diminuição da atividade da GST. Estudos prévios demonstraram aumento na atividade da GST após exposição de peixes a fungicidas, formulação comercial de glifosato, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, bifenilas policloradas e organoclorados. Em contrapartida, em estudos com dibenzodioxinas policloradas, pesticidas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos constatou-se redução da atividade da GST (RAMSDORF, 2011).

No trabalho de Nataraj e colaboradores realizado em 2020, os autores também avaliaram a atividade da GST em grupos de embriões de *Danio rerio* expostos ao OMC e seus fotoprodutos, 2-EH e 4-MBA. O estudo demonstrou haver indução significativa ($p < 0,05$) de sua atividade nos embriões expostos a maior concentração de OMC, $62 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e as concentrações de $0,7$ e $3,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 4-MBA. Segundo os autores, a indução da GST corrobora com o observado por Quintaneiro e colaboradores (2019) após exposição a $0,44 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 4-MBC utilizando também embriões de *Danio rerio*. Mencionam, também, os estudos de Martins e colaboradores (2017) e Campos e colaboradores (2017) no qual indução da atividade da GST foi observada na rã *Pelophylax perezii* e no mosquito *C. riparius* mediante exposição ao 4-MBC, respectivamente. Em relação a exposição isolada a BP-3 e OC, Campos e colaboradores (2017) constataram ausência de alterações na atividade de GST em *C. riparius*, (CAMPOS et al., 2017). Por fim, Nataraj e colaboradores (2020) acrescentam que o aumento da atividade da GST pode indicar o desenvolvimento de uma resposta adaptativa dos organismos avaliados a esses contaminantes.

3.5. Tilápia

A tilápia (Figura 2) é o peixe de água doce mais cultivado no mundo, possuindo elevada importância comercial uma vez que constitui parte da dieta humana. No Brasil, o animal é disseminado em todas as bacias hidrográficas e representa mais de 60% do cultivo em viveiro no país (BRUM et al., 2018).

Alimentando-se de insetos, microcrustáceos, sementes, frutos, raízes, algas, plâncton e pequenos peixes, o animal possui a capacidade de sobreviver em habitats altamente poluídos e/ou eutrofizados (RIBEIRO, 2014; BRUM et al., 2018). Por conta disso, poluentes lipofílicos tendem a se acumular em tecidos gordurosos do peixe,

que em geral apresenta aumento do conteúdo lipídico conforme o crescimento. O fígado é o principal órgão responsável pela acumulação, biotransformação e excreção de contaminantes. O músculo, por sua vez, tem valor biológico elevado e consiste em uma importante fonte de proteína animal (MARTINS et al., 2009; CARVALHO et al., 2012).

Figura 2 - Tilápia do Nilo, uma das principais espécies criadas no Brasil



Fonte: Autoria própria (2022)

Além das razões já mencionadas, Ezemonye, Ogeleka e Okieimen (2008) justificam a utilização de tilápias em bioensaios por conta de sua disponibilidade durante todo o ano, elevada proliferação e pela facilidade de adaptação e manutenção dos animais em condições laboratoriais.

Como resultado da importância comercial e ecológica da tilápia, estudos têm sido conduzidos de modo a avaliar o efeito tóxico de poluentes ambientais nestes animais bem como sua bioconcentração. Alguns dos contaminantes avaliados nos últimos anos incluem antibióticos (BOTELHO et al., 2015), detergentes, inibidores de corrosão industriais (EZEMONYE, OGELEKA, OKIEMEN, 2008) e o inseticida clorpirifós (GUL, 2005). Em geral, a escolha dos poluentes avaliados provém de seu uso intensivo e da constatação de que estão sendo encontrados nos mais diversos compartimentos ambientais. Embora muitas vezes se apresentem nestes compartimentos em baixas concentrações, a maior preocupação se origina da exposição a longo prazo a qual os organismos aquáticos estão susceptíveis em lagos, rios e mares (RAINIERI et al., 2017). Com relação aos filtros solares, há uma lacuna referente a avaliação dos efeitos decorrentes da exposição desses em tilápias e, até o presente momento, não foram encontrados estudos na literatura.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Testes Preliminares

4.1.1. Condições Cromatográficas

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido (Prominence, Shimadzu) equipado com bomba quaternária LC-2AT, degaseificador DGU-20A, forno CTO-20A, detector de arranjo de diodos SPD-M20A (190-400 nm) e controladora CBM-20A, sendo o sistema operado pelo software LCSolution para aquisição e processamento dos dados.

A separação da mistura dos fotoprotetores BP-3, OMC e OC em água foi desenvolvida em coluna analítica fenil-hexil (Luna[®], Phenomenex, 150 x 4,6 mm d.i., 5 µm de diâmetro de partícula) mantida a 35 °C e a fase móvel utilizada foi composta por acetonitrila (*JT Baker*[®]) e água ultrapura fortificadas com 0,1% ácido fórmico (*Honeywell*[®]), na proporção 65:35 v/v, em modo isocrático de eluição a 1 mL·min⁻¹. Os padrões analíticos dos filtros solares utilizados para desenvolvimento, validação do método e demais ensaios foram adquiridos na *Sigma-Aldrich*[®].

4.1.2. Validação do Método Cromatográfico – figuras de mérito

O método foi validado para posterior realização dos ensaios de estabilidade, congelamento, assimilação e monitoramento do bioensaio de acordo com a resolução Nº 166, de 24 de julho 2017, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA RDC). Os parâmetros avaliados foram:

a) Linearidade: determinada a partir de curva de calibração (padronização externa) construída com as concentrações de 0,06; 0,1; 0,4; 0,8 e 1,2 mg·L⁻¹ dos analitos em triplicata e volume de injeção em cromatógrafo líquido de 50 µL. Para o preparo de soluções contendo os fotoprotetores nas concentrações da curva analítica, inicialmente, pesou-se 0,05 g de cada um dos compostos em balões volumétricos de 50 mL e esses foram dissolvidos em 35 mL de etanol (EtOH), sendo o volume do balão posteriormente completado com água ultrapura resultando em soluções

individuais de $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e EtOH/água (70:30). Alíquotas de 0,3 mL foram retiradas de cada uma das soluções, misturadas em balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com água ultrapura, resultando em solução estoque (S.E.) $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ dos três compostos e 0,6% EtOH. Em seguida, a partir dessa S.E., foram realizadas diluições de modo a obter soluções com as concentrações da curva de calibração e 0,6% EtOH, visando assegurar a solubilidade dos compostos. A Tabela 3 demonstra os volumes de S.E. e EtOH utilizados no preparo de 10 mL de cada concentração da curva. O menor ponto da curva encontra-se acima da concentração ambiental utilizada no bioensaio de exposição subcrônica ($0,001 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) visto que o método cromatográfico desenvolvido não contempla e a otimização de uma técnica de pré-concentração será necessária, portanto, as amostras referentes a essa concentração foram armazenadas e serão analisadas posteriormente.

Tabela 3 - Volumes de S.E. $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 0,6% EtOH utilizados para construção da curva analítica

Concentração ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Vol. S.E. (mL)	Vol. EtOH adicionado (mL)
1,2	4	0,04
1	3,3	0,04
0,8	2,7	0,05
0,4	1,3	0,05
0,1	0,3	0,06
0,06	0,2	0,06

Fonte: Autoria própria (2022)

Para analisar estatisticamente a linearidade do método, os testes apropriados foram realizados utilizando os softwares BioEstat 4.0, Prism e SciDavis.

b) Precisão e exatidão: foram avaliadas por meio de 9 determinações em 3 dias não consecutivos, concentrações em 3 níveis: baixo (0,2 ppm), médio (0,6 ppm) e alto (1 ppm), com 3 réplicas em cada nível. O desvio padrão relativo (DPR) foi calculado para os dados obtidos entre as análises no mesmo dia (repetibilidade) e entre as análises dos 3 dias (precisão intermediária). A exatidão foi obtida através da equação (Eq. 9).

$$Exatidão = \left(\frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 9})$$

c) LD e LQ: calculados utilizando as Eq. 10 e 11 a partir dos parâmetros δ (estimativa do desvio padrão da resposta obtida para a menor concentração da curva analítica construída) e S (coeficiente angular da curva analítica) obtidos através da regressão linear (RIBANI et al., 2004).

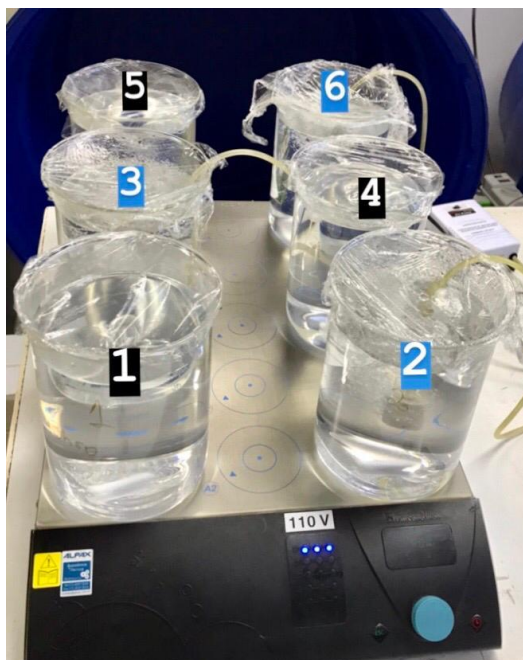
$$LD = 3,3 \cdot \frac{\delta}{S} \quad (\text{Eq. 10})$$

$$LQ = 10 \cdot \frac{\delta}{S} \quad (\text{Eq. 11})$$

4.1.3. Ensaio de Estabilidade

Para realização do ensaio de estabilidade, seis béqueres de vidro (2 L) foram dispostos aleatoriamente em bancada e mantidos sob agitação magnética constante e temperatura ambiente, com exposição a luz artificial por um período de 12h (Figura 3). Também de forma aleatória, foram montados sistemas de aeração em 3 béqueres a partir de bombas com difusores (pedras porosas), enquanto os demais foram mantidos sem aeração. Em cada béquer, foi adicionado 12 mL de solução estoque 91% EtOH contendo 100 ppm de BP-3, OMC e OC e o volume foi completado para 2 L com água filtrada, resultando em béqueres contendo 0,6 ppm dos compostos e 0,5% EtOH. A superfície dos béqueres foi coberta com papel filme. Alíquotas de 1,5 mL foram retiradas de cada um dos béqueres nos tempos 0, 3, 6 e 24 h, e, em seguida, foram injetadas em cromatógrafo líquido. Os béqueres foram visualmente monitorados durante 72h quanto à formação de precipitado ou presença de partículas em suspensão.

Figura 3 - Disposição dos béqueres durante o ensaio de estabilidade



Nota: Os béqueres 1, 4 e 5 não receberam aeração (grupo: sem aeração), os béqueres 2,3 e 6 foram aerados (grupo: com aeração).

Fonte: Autoria própria (2022)

4.1.4. Teste de Congelamento

A partir de 12 mL de solução 91% EtOH contendo 100 ppm de BP-3, OMC e OC, preparou-se 2 L (em balão volumétrico) de solução estoque (S.E.) com água ultrapura de concentração final igual a 0,6 ppm e 0,5% EtOH. Em garrafas plásticas de 500 mL, foram armazenados 400 mL da S.E. e, em tubos *falcon* de 50 mL, a mesma solução foi armazenada a um volume de 40 mL em cada tubo. Os materiais foram então envoltos em papel alumínio, congelados em ultrafreezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e mantidos por 96h (garrafas plásticas) e 48h (tubos *falcon*), sendo descongelados, analisados e congelados novamente a cada ciclo de 24h. O descongelamento foi realizado a temperatura ambiente e ao abrigo de luz, posteriormente, as amostras foram mantidas em geladeira até o momento de análise.

4.2. Bioensaios com Tilápias

Foram adquiridos 50 exemplares de tilápias de fornecedores comerciais locais (Peixes e Peixes – Comércio de Alevinos – Ceasa) (Curitiba, Paraná) após aprovação

do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (CEUA/UTFPR) (Processo 23064.037216/2018-19 - ANEXO). Os animais foram aclimatados por 50 dias no Laboratório de Ecotoxicologia da UTFPR (ECOTOX) em tanques de 250 L sob condições controladas (aeração constante, temperatura ambiente, ciclos de 12h claro/escuro, alimentação com ração comercial flutuante (teor de proteína entre 36% e 40%) e limpeza diária do tanque). Durante o período de aclimação, pH e temperatura foram monitorados diariamente e os valores médios obtidos foram de 20 ± 2 °C e $7,4 \pm 0,3$, respectivamente.

4.2.1. Ensaio de Assimilação (Exposição Aguda)

Cinco béqueres de 2 L foram mantidos em condições controladas (aeração constante, temperatura ambiente, ciclos de 12h claro/escuro, alimentação com ração comercial flutuante (teor de proteína entre 36% e 40%) e tiveram adição única de 12 mL de uma solução alcóolica 91% contendo mistura dos filtros BP-3, OMC e OC nas concentrações de 165 ppm, 100 ppm e 133 ppm, respectivamente. Posteriormente, os volumes foram completados para 2 L resultando em béqueres contendo 0,5% EtOH e 1 ppm de BP-3, 0,6 ppm de OMC e 0,8 ppm de OC. Em cada um dos béqueres, foi inserido um organismo de massa conhecida e apresentada na Tabela 4. Alíquotas de 1 mL foram retiradas de cada um dos béqueres nos tempos 0, 3, 6 e 24 h, e, em seguida, foram analisadas em cromatógrafo líquido.

Tabela 4 - Informações a respeito dos animais utilizados durante ensaio de exposição aguda

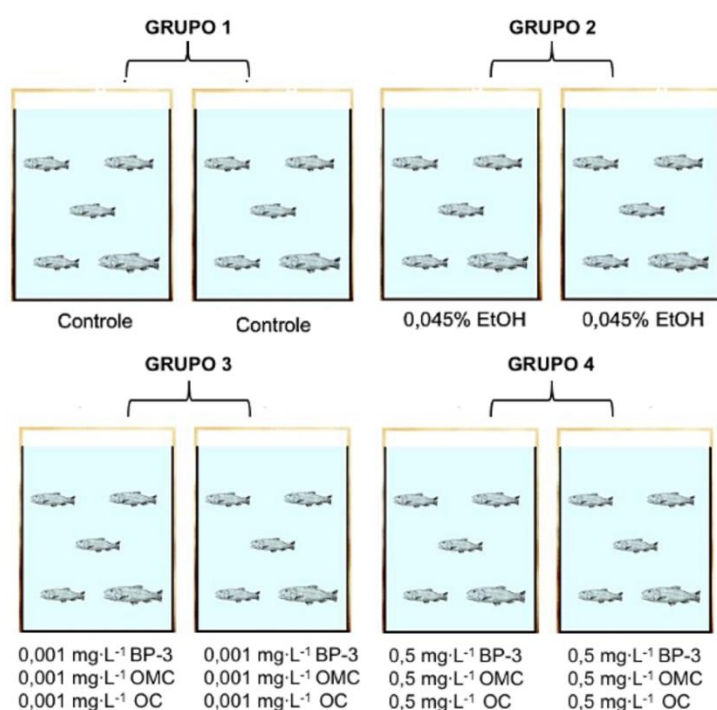
Béquer	Massa corporal (g)
1	10,16
2	9,50
3	8,15
4	11,50
5	10,76
Média	10,01
Desvio padrão	1,28

Fonte: Autoria própria (2022)

4.2.2. Experimento de Exposição Subcrônica

Após o período de aclimação, os organismos tiveram sua massa aferida e foram divididos em 8 aquários de vidro de 24 L com 5 indivíduos juvenis em cada um deles para exposição subcrônica e semi-estática (com renovação periódica dos contaminantes), totalizando 4 grupos teste de 10 indivíduos cada (Figura 4). A exposição teve duração de 29 dias, com base no trabalho de Liu et al. (2015).

Figura 4 - Grupos de indivíduos submetidos a bioensaio subcrônico



Fonte: Autoria própria (2022)

Todos os aquários foram preenchidos com 24 L de água filtrada, e os grupos 3 e 4 receberam concentrações diárias e distintas da mistura de filtros solares, visando manter a estabilidade das concentrações. Os indivíduos do Grupo 3 foram expostos a 0,001 mg·L⁻¹ e do Grupo 4 a 0,5 mg·L⁻¹ dos compostos. Aos aquários do Grupo 4, adicionou-se 12 mL de solução estoque (S.E.) 1000 ppm BP-3, OMC e OC e 91% EtOH. A partir de 15 mL da S.E., preparou-se 150 mL de uma solução 100 ppm BP-3, OMC e OC e 91% EtOH que foi adicionada aos aquários do Grupo 3, no volume de 0,24 mL. Durante as primeiras 24 h de ensaio, alíquotas de 1,5 mL foram retiradas nos tempos 0 e 24 h dos aquários do Grupo 4 a fim de monitorar as concentrações dos contaminantes desse grupo. Os aquários do Grupo 3, por sua vez, tiveram 1 L de água retirada de cada um dos dois aquários após adição dos filtros solares e armazenada em ultrafreezer para análises posteriores visto que o método

cromatográfico desenvolvido não contempla a concentração de $0,001 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ dos compostos e a otimização de uma técnica de pré-concentração será necessária.

O Grupo 2 configurou o grupo de controle do solvente, e recebeu diariamente um volume de 11 mL de EtOH P.A., quantia igual ao volume de EtOH no Grupo 1 resultando em 0,045% EtOH nos aquários. O grupo 4, por sua vez, representou o controle negativo (ausente de solvente e fotoprotetores).

O procedimento de renovação diária da água foi realizado para todos os aquários e consistiu na retirada e reposição de 16 L. No 15º dia de ensaio, os animais foram transferidos para novos aquários, com renovação total da água.

Ao término do período de exposição, os peixes foram eutanasiados individualmente mediante prévia anestesia por imersão (benzocaína 10%, Merck), pesados, medidos, e tiveram sangue, fígado, cérebro e músculo retirados.

4.2.2.1. Análise de Biomarcadores

Ao término do bioensaio, 34 animais tiveram seu comprimento e massa aferidos para análise de biomarcador somático. Em seguida, os animais tiveram seu sangue retirado e mantido em soro bovino fetal, refrigerado e na ausência de luz, segundo procedimento descrito por Ramsdorf (2011). O sangue coletado foi empregado no ensaio cometa e teste do micronúcleo píceo. Além disso, os animais tiveram fígado, cérebro e músculo removidos e congelados em ultrafreezer a -70°C até o momento de realização da análise de biomarcadores bioquímicos, momento em que os órgãos tiveram sua massa aferida.

4.2.2.1.a. Fator de Condição de Fulton

Ao término do período de 29 dias de exposição hídrica e subcrônica, os indivíduos foram retirados dos aquários um a um e após anestesiados tiveram massa e comprimento aferidos. Os dados obtidos foram utilizados para estimar o Fator de Condição de Fulton (K) através da Eq. 8, onde W corresponde a massa dos organismos (g) e L ao comprimento total do indivíduo (cm).

$$K = W^3 / L$$

(Eq. 12)

4.2.2.1.b. Teste do Micronúcleo Písceo

O teste do micronúcleo písceo foi realizado de acordo com a técnica descrita por Heddle (1973) e Schmid (1975). O passo a passo do procedimento realizado está descrito a seguir:

- a) As lâminas foram limpas com etanol P.A. e identificadas, sendo destinada uma lâmina para cada peixe;
- b) O sangue do organismo foi retirado com capilar heparinizado e uma gota depositada sobre a lâmina;
- c) A gota de sangue depositada na lâmina foi espalhada por toda sua superfície cuidadosamente com o auxílio de uma lamínula, procedimento denominado esfregaço (técnica de extensões sanguíneas);
- d) As lâminas foram mantidas na posição horizontal para secagem ao ar;
- e) Após secagem, as lâminas foram fixadas em etanol P.A. por 30 minutos em cubetas;
- f) Por fim, as lâminas foram coradas com Giemsa 10% diluída em tampão fosfato (pH 8,6) por 10 minutos, lavadas em água corrente e deixadas em posição vertical para secagem ao ar.

Após o preparo das lâminas, foram avaliadas 2000 células de cada indivíduo dos grupos 1, 2 e 4, em teste cego, sendo consideradas apenas hemácias não-aglomeradas, nucleadas com membrana nuclear e citoplasmática intactas. A análise visou detectar micronúcleos, i.e. partículas que, em relação ao núcleo principal, não excederam 1/3 do seu tamanho, apresentavam-se nitidamente separadas do núcleo, com bordas distinguíveis e com mesma cor e refringência do núcleo. Além disso, alterações na forma elíptica normal dos núcleos das hemácias que não configuravam micronúcleo foram também analisadas e enquadradas como alterações morfológicas nucleares.

Devido a dificuldades na coleta de sangue dos indivíduos do Grupo 4, expostos a maior concentração da mistura de BP-3, OMC e OC, a análise do teste do micronúcleo písceo para esse grupo não foi realizada.

4.2.2.1.c. Ensaio Cometa

Baseado no trabalho de Ramsdorf (2011), 10 μL do sangue armazenado em 1 mL de soro bovino fetal foi diluído em 120 μL de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) e colocado em uma lâmina previamente limpa com etanol e coberta por agarose normal. Após esta etapa de adição da suspensão celular na lâmina, foi evitada a exposição a luz direta.

As lâminas foram então mantidas em solução de lise durante 24h, a 4°C e ao abrigo de luz. Sendo a solução de lise estoque composta por NaCl (2,5 M), EDTA (100 mM), Tris (10 mM), NaOH (0,8%), N-lauril-sarcosinato (1%) e, para a solução de lise uso, triton X100 (1%) e DMSO (10%) foram adicionados à solução de lise estoque.

Na etapa seguinte, para a desnaturação do DNA, as lâminas foram primeiramente imersas em uma solução tampão de pH 13 composta por NaOH (10 N) e EDTA (200 mM) durante 30 minutos. Na sequência, iniciou-se o procedimento de eletroforese a 300 mA, 25 V por 25 min. Durante o procedimento, a cuba de eletroforese foi mantida em gelo a aproximadamente 4°C.

Ao término da eletroforese, as lâminas foram retiradas para neutralização com tampão tris, secagem na posição vertical e foram então fixadas com etanol P.A. por 10 minutos. Para realização da leitura das lâminas em microscópio de epifluorescência Leica DMLS2, as mesmas foram coradas com 20 μL de brometo de etídeo 0,02 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, cobertas com lamínula, mantidas ao abrigo de luz e analisadas imediatamente.

Cem nucleóides em cada lâmina foram classificados visualmente como pertencendo a uma das cinco classes, predefinidas no que diz respeito à intensidade da cauda, e a cada nucleóide foi atribuído um valor de 0, 1, 2, 3, ou 4 (de não danificado - 0 - ao dano máximo - 4). O escore foi obtido através do somatório das multiplicações do número de danos pelo valor do dano.

Devido a dificuldades na coleta de sangue dos indivíduos do Grupo 4, expostos a maior concentração da mistura de BP-3, OMC e OC, a análise do ensaio cometa para peixes desse grupo não foi realizada.

4.2.2.1.d. Procedimentos para Análise de Biomarcadores Bioquímicos

A análise de biomarcadores bioquímicos foi realizada para os indivíduos dos grupos 1, 2, 3 e 4.

Baseado no trabalho de Ramsdorf (2011), as amostras de fígado tiveram sua massa aferida, foram homogeneizadas em tampão Tris-HCl 20 mM, EDTA 1,0 mM (pH 7,6) e em seguida centrifugadas a 12000 xg por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi separado e armazenado em ultrafreezer durante 12h, sendo posteriormente descongelado e utilizado para as análises de Peroxidação Lipídica (LPO), Glutathione S-transferase (GST) e catalase (CAT).

As amostras de cérebro tiveram sua massa aferida, foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,5) e centrifugadas a 12000 xg por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi separado e armazenado em ultrafreezer durante 12h, sendo posteriormente descongelado e utilizado para análise de acetilcolinesterase (AChE).

Anteriormente às análises de biomarcadores bioquímicos, os sobrenadantes de todas as amostras de fígado e cérebro tiveram sua concentração de proteínas determinada utilizando o método Bradford (BRADFORD, 1976). Para tal, foi construída uma curva de calibração ($r^2 > 0,99$) utilizando o reativo de Bradford e albumina de soro bovina (BSA) em PBS como padrão nas concentrações de 0; 0,125; 0,250; 0,500 e 1 mg BSA·mL⁻¹ de PBS. Na sequência, os sobrenadantes dos fígados e cérebros foram diluídos em seus respectivos tampões, utilizados na homogeneização das amostras, de modo que se encaixassem na curva construída e, então, a absorbância foi medida a 595 nm em espectrofotômetro de microplacas. A partir da equação da reta obtida por meio da curva de calibração, das absorbâncias medidas para as amostras e considerando o fator de diluição utilizado, foram obtidas as concentrações de proteínas.

Em seguida, os sobrenadantes das amostras tiveram sua concentração de proteínas normalizada para 1 mg·mL⁻¹ para as análises de GST, CAT e AChE e 5 mg·mL⁻¹ para LPO.

A atividade global de GST nos sobrenadantes das amostras de fígado foi medida em espectrofotômetro utilizando como meio de reação 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 3 mM e glutathione reduzida (GSH) 3 mM. A leitura das

microplacas foi efetuada a 340 nm durante 5 minutos com intervalos de 20 segundos. Esse método foi baseado no trabalho de Keen, Habig e Jakoby (1976).

Para as análises de LPO em fígado, o meio de reação (laranja de xilenol dissódico 0,1 mM, ácido sulfúrico 25 mM, sulfato ferroso amoniacal 0,25 mM e hidroxitolueno butilado - BHT 4 mM) foi adicionado aos sobrenadantes normalizados para 5 mg·mL⁻¹ ainda congelados. Os tubos foram então fechados e mantidos a temperatura ambiente durante 20 minutos, sendo agitados por inversão a cada 3 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 9000 xg durante 10 minutos a temperatura ambiente. Por fim, os sobrenadantes tiveram sua absorvância medida a 550-570 nm (JIANG et al., 1991, 1992).

Tendo como base os trabalhos de Aebi (1984) e Vicentini (2017), para avaliar a atividade da catalase em microplacas 5 µL de amostra foram pipetados e foi adicionado 295 µL de solução reação (Tampão Tris 1M / EDTA 5mM pH 8,0; peróxido de hidrogênio 30% e água). As amostras foram então lidas durante 1 minuto em espectrofotômetro a 240 nm.

A atividade da AChE nas amostras de cérebro foi determinada utilizando como meio de reação o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) 0,75 mM e iodeto de acetilcolina 9 mM. A absorvância foi medida a 405 nm durante 7 minutos com intervalos de 50 segundos (ELLMAN et al., 1961).

4.3. Análise estatística

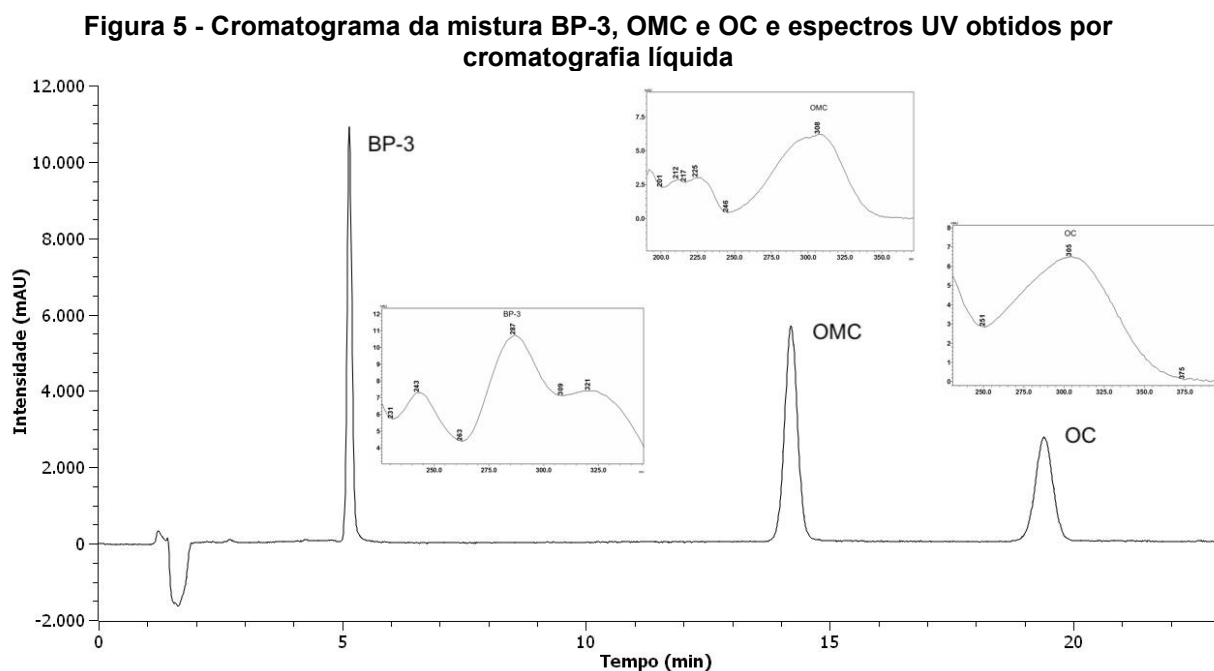
Inicialmente a normalidade de todos os dados foi avaliada utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Em seguida, os dados paramétricos foram analisados aplicando ANOVA seguido do teste de Bonferroni como *post hoc* ($p < 0,05$). Os dados não paramétricos foram analisados a partir do teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn como *post hoc* ($p < 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas com o pacote estatístico gratuito BioEstat® 5.0.

5. RESULTADOS

5.1. Testes Preliminares: Estudo dos Analitos

5.1.1. Ajustes de Separação Cromatográfica

Os tempos de retenção para BP-3, OMC e OC no método desenvolvido foram de 5,0; 14,3 e 19,4 minutos, respectivamente. A Figura 5 mostra o cromatograma obtido, associado com os respectivos espectros de absorção UV de cada um dos analitos.

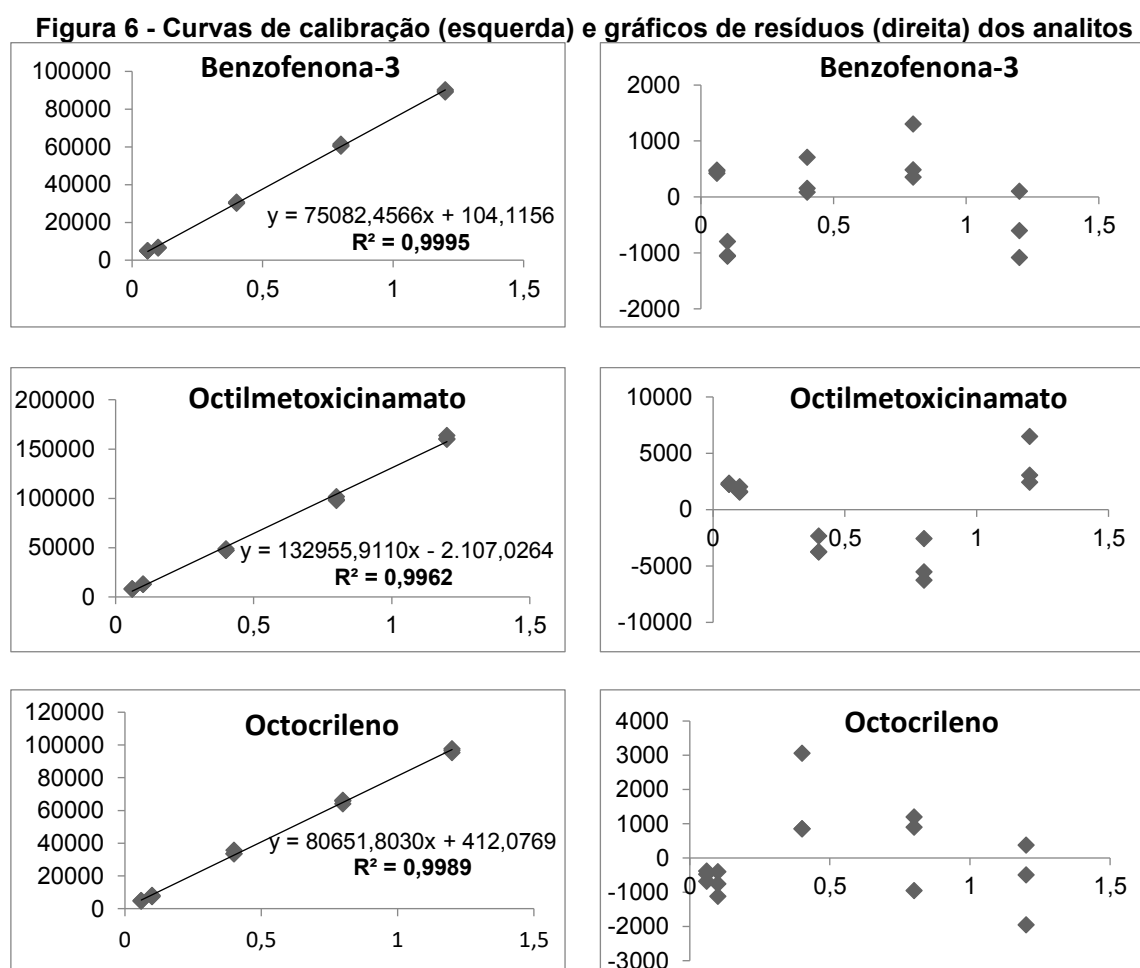


Fonte: Autoria própria (2022)

Durante essa etapa, a seletividade foi também avaliada por meio da determinação da pureza dos picos, visto que o detector DAD é capaz de varrer diversos comprimentos de onda simultaneamente evidenciando possíveis impurezas. Os valores de pureza dos picos foram iguais a 100% e, portanto, satisfatórios.

5.1.2. Validação do Método Desenvolvido

a) Linearidade: A Figura 6 apresenta as representações gráficas das respostas em função da concentração dos analitos, as equações da reta de regressão de y em x estimada pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) e o gráfico de resíduos para cada um dos filtros solares analisados. Os coeficientes de correlação das curvas analíticas elaboradas apresentaram valores satisfatórios ($R^2 > 0,99$) e a análise visual dos resíduos indicou boa dispersão.



Fonte: Autoria própria (2022)

Os resultados para as análises estatísticas de linearidade conforme preconizam os principais documentos de validação de métodos analíticos no Brasil emitidos pela ANVISA (Resolução RDC N° 166, de 24 de julho de 2017), Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) (DOQ-CGCRE-008, de 2011) e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2011) são apresentados na Tabela 5. Para todos os compostos, C calculado foi menor que C crítico. Dessa forma, pode-se concluir através do Teste de Cochran que os dados são

homocedásticos e a utilização do MMQO é apropriada. O teste F da ANOVA, por sua vez, comprovou a significância dos coeficientes angulares. Com valores de F calculado maiores que F crítico, pode-se afirmar que “y” efetivamente varia em função de “x” para todos os compostos. A normalidade dos resíduos foi também aceita visto que os valores de p para todos os compostos foram maiores que 0,05.

Tabela 5 - Testes estatísticos para comprovação da linearidade do método desenvolvido por cromatografia líquida

	BP-3	OMC	OC
Teste de Cochran			
C calculado	0,468	0,511	0,360
C crítico (p < 0,05)	0,684	0,684	0,684
Teste F da ANOVA			
F calculado	27218	3390	11376
F crítico (p < 0,05)	4,67	4,67	4,67
Teste D'Agostino Skewness			
P	0,6383	0,6087	0,094

Fonte: A autoria própria (2022)

b) Precisão e exatidão: A Tabela 6 apresenta os valores experimentais para cada concentração de BP-3, OMC e OC, o coeficiente de variação (CV) e os valores de exatidão/recuperação obtido para cada um dos filtros nos 3 dias não consecutivos de análise.

Tabela 6 - Dados de repetibilidade (precisão intradia) do método desenvolvido para BP-3, OMC e OC

	Analito	Conc. teórica (mg·L ⁻¹)	Média das conc. experimentais (mg·L ⁻¹)	CV (%)	Exatidão (%)
DIA 1	BP-3	0,2	0,019 ± 0,009	4,9	95
		0,6	0,61 ± 0,02	3,6	101
		1	1,05 ± 0,02	2,3	105
	OMC	0,2	0,200 ± 0,009	4,7	100
		0,6	0,58 ± 0,01	2,4	96
		1	0,96 ± 0,01	1,3	96
	OC	0,2	0,200 ± 0,005	4,4	94
		0,6	0,58 ± 0,01	2,4	97
		1	0,95 ± 0,02	1,6	95
DIA 2	BP-3	0,2	0,20 ± 0,07	3,6	101
		0,6	0,58 ± 0,01	2,3	96
		1	1,02 ± 0,01	1	102
	OMC	0,2	0,190 ± 0,003	1,9	94
		0,6	0,60 ± 0,02	3,3	100
		1	0,95 ± 0,03	0,4	95
	OC	0,2	0,201 ± 0,005	2,3	101
		0,6	0,609 ± 0,002	0,4	101
		1	1,005 ± 0,004	0,4	100
DIA 3	BP-3	0,2	0,20 ± 0,01	3,9	98
		0,6	0,581 ± 0,005	0,8	97
		1	0,99 ± 0,03	2,7	99
	OMC	0,2	0,187 ± 0,007	3,8	94
		0,6	0,58 ± 0,02	4,3	97
		1	0,981 ± 0,002	0,3	98
	OC	0,2	0,191 ± 0,003	1,6	95
		0,6	0,591 ± 0,003	0,5	99
		1	1,003 ± 0,003	0,3	100

Fonte: Autoria própria (2022)

Os resultados para repetibilidade se mostraram satisfatórios de acordo com os guias da ANVISA, MAPA e INMETRO visto que todos os valores de CV permaneceram abaixo de 5%. Considerando todos os dados e avaliando a precisão interdia (intermediária), CV também se manteve abaixo de 5% para todos os analitos e níveis de concentração. Quanto aos valores de exatidão, estes permaneceram entre 94% e 102% indicando bom grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação aos valores teóricos aceitos como valores verdadeiros.

c) LQ e LD: esses parâmetros foram determinados a partir das curvas analíticas construídas. Para os três fotoprotetores, o desvio padrão (δ) das respostas para a menor concentração da curva de calibração, 0,06 mg·L⁻¹, foi calculado. Considerando

os coeficientes angulares para cada composto, LQ e LD foram obtidos teoricamente. Para BP-3, OMC e OC os valores de LQ são 0,004; 0,005 e 0,02 mg·L⁻¹ e de LD 0,001; 0,002 e 0,006 mg·L⁻¹, respectivamente.

5.1.3. Ensaio de Estabilidade

A Tabela 7 demonstra a média das reduções de concentração (%) para os fotoprotetores BP-3, OMC e OC em ambiente sem e com aeração. Procedeu-se com o teste t para avaliar se as diferenças entre os decaimentos dos filtros solares nos dois ambientes distintos são consideradas estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Para a BP-3, avaliaram-se os dados durante as 24h de ensaio e o valor de p resultante foi de 0,00178. Para OMC e OC, valores de p foram, respectivamente, 0,0000448 e 0,00328. Dessa forma, conclui-se que a aeração consiste em um parâmetro que interfere de maneira significativa na estabilidade dos três compostos fotoprotetores avaliados.

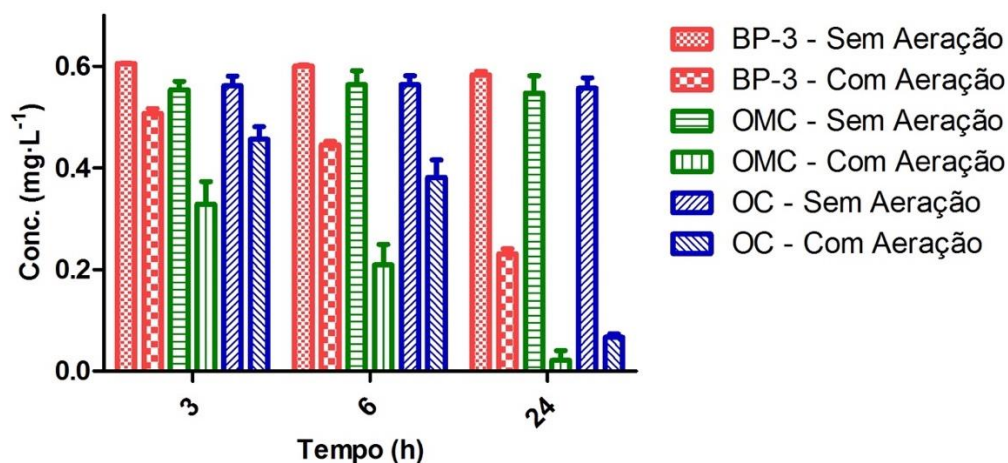
Tabela 7 - Dados de redução da concentração dos analitos durante ensaio de estabilidade (0,6 mg·L⁻¹; 0,45% etanol)

Tempo (h)	ANALITO	BP-3	OMC		OC		Média das reduções de conc. (%)
	Béqueres	Média das conc. (mg·L ⁻¹)	Média das reduções de conc. (%)	Média das conc. (mg·L ⁻¹)	Média das reduções de conc. (%)	Média das conc. (mg·L ⁻¹)	
0	Sem Aeração	0,62 ± 0,02		0,60 ± 0,02		0,57 ± 0,02	
0	Com Aeração	0,61 ± 0,01		0,60 ± 0,01		0,56 ± 0,01	
3	Sem Aeração	0,605 ± 0,001	1,8 ± 2	0,55 ± 0,03	6 ± 2	0,56 ± 0,03	2 ± 2
3	Com Aeração	0,51 ± 0,02	17 ± 2	0,3 ± 0,1	43 ± 13	0,46 ± 0,04	19 ± 6
6	Sem Aeração	0,600 ± 0,003	2,5 ± 2,5	0,56 ± 0,05	5 ± 5	0,56 ± 0,03	1,3 ± 1,3
6	Com Aeração	0,45 ± 0,01	27 ± 2	0,21 ± 0,07	64 ± 12	0,38 ± 0,06	32 ± 9
24	Sem Aeração	0,58 ± 0,01	5 ± 4	0,55 ± 0,06	8 ± 7	0,56 ± 0,04	2 ± 3
24	Com Aeração	0,23 ± 0,02	62 ± 2	< 0,02 ± 0,03	> 96 ± 6	< 0,07 ± 0,01	88 ± 2

Fonte: Autoria própria (2022)

A Figura 7 representa graficamente os resultados e evidencia o impacto da presença de aeração no meio, sendo esse mais pronunciado para o OMC.

Figura 7 - Comparação gráfica das reduções de concentração dos analitos em ensaio de estabilidade ($0,6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $0,45\%$ etanol) com e sem aeração



Fonte: Autoria própria (2022)

5.1.4. Teste de Congelamento

Os resultados após realização do teste de congelamento em garrafas plásticas são apresentados na Tabela 8 e demonstram boa conservação dos 3 compostos fotoprotetores em garrafas plásticas após o primeiro ciclo de congelamento e descongelamento. Entretanto, as concentrações começaram a apresentar decaimento a partir do segundo ciclo de congelamento, sendo tal decaimento mais pronunciado para os compostos com valores maiores de $\log k_{ow}$, OMC e OC.

Tabela 8 - Dados de redução da concentração dos compostos BP-3, OMC e OC após ciclos de 24 h de congelamento e descongelamento em garrafas plásticas

ANALITO	BP-3		OMC		OC	
	Média das conc. ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Média das reduções de conc. (%)	Média das conc. ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Média das reduções de conc. (%)	Média das conc. ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Média das reduções de conc. (%)
0	$0,58 \pm 0,01$		$0,56 \pm 0,02$		$0,54 \pm 0,02$	
24	$0,541 \pm 0,006$	6 ± 1	$0,563 \pm 0,008$	$0,8 \pm 1,4$	$0,53 \pm 0,01$	4 ± 4
48	$0,53 \pm 0,01$	$8 \pm 0,8$	$0,434 \pm 0,009$	22 ± 3	$0,43 \pm 0,03$	17 ± 6
72	$0,54 \pm 0,01$	7 ± 1	$0,46 \pm 0,03$	17 ± 9	$0,46 \pm 0,02$	13 ± 4
96	$0,528 \pm 0,008$	$8,5 \pm 0,8$	$0,40 \pm 0,02$	28 ± 7	$0,39 \pm 0,03$	25 ± 5

Fonte: Autoria própria (2022)

Os resultados oriundos do armazenamento das amostras em tubo *falcon*, apresentados na Tabela 9, tiveram decaimento mais evidente quando comparados aos dados da Tabela 8 e novamente a BP-3 apresentou uma taxa menor de decaimento.

Tabela 9 - Dados de redução da concentração dos compostos BP-3, OMC e OC após ciclos de 24 h de congelamento e descongelamento em tubos *falcon*

ANALITO	BP-3		OMC		OC	
	Média das conc. (mg·L ⁻¹)	Média das reduções de conc. (%)	Média das conc. (mg·L ⁻¹)	Média das reduções de conc. (%)	Média das conc. (mg·L ⁻¹)	Média das reduções de conc. (%)
0	0,55 ± 0,01		0,62 ± 0,04		0,57 ± 0,01	
24	0,50 ± 0,02	7 ± 5	0,36 ± 0,03	42 ± 1	0,39 ± 0,03	33 ± 3
48	0,281 ± 0,005	47 ± 2	< 0,029 ± 0,003	> 95 ± 0,7	0,08 ± 0,01	86 ± 2

Fonte: Autoria própria (2022)

5.2. Ensaios de Exposição de Tilápias

5.2.1. Ensaio de Assimilação (Exposição Aguda)

Os resultados oriundos do experimento de assimilação estão apresentados na Tabela 10. Durante o experimento, houve a morte do peixe no béquer 3 e perda do peixe do béquer 5.

Tabela 10 - Dados referentes a redução na concentração dos compostos BP-3, OMC e OC durante 24 h de monitoramento do ensaio de assimilação

Tempo (h)	BP-3		OMC		OC	
	Média das conc. (mg·L ⁻¹)	Média das reduções de conc. (%)	Média das conc. (mg·L ⁻¹)	Média das reduções de conc. (%)	Média das conc. (mg·L ⁻¹)	Média das reduções de conc. (%)
0	0,95 ± 0,01		0,56 ± 0,03		0,78 ± 0,06	
3	0,51 ± 0,04	47 ± 4	0,22 ± 0,04	60 ± 5	0,45 ± 0,03	42 ± 6
6	0,43 ± 0,07	55 ± 6	0,16 ± 0,05	71 ± 8	0,42 ± 0,05	45 ± 8
24	0,15 ± 0,02	84 ± 2	< 0,061	> 88	0,22 ± 0,09	71 ± 10

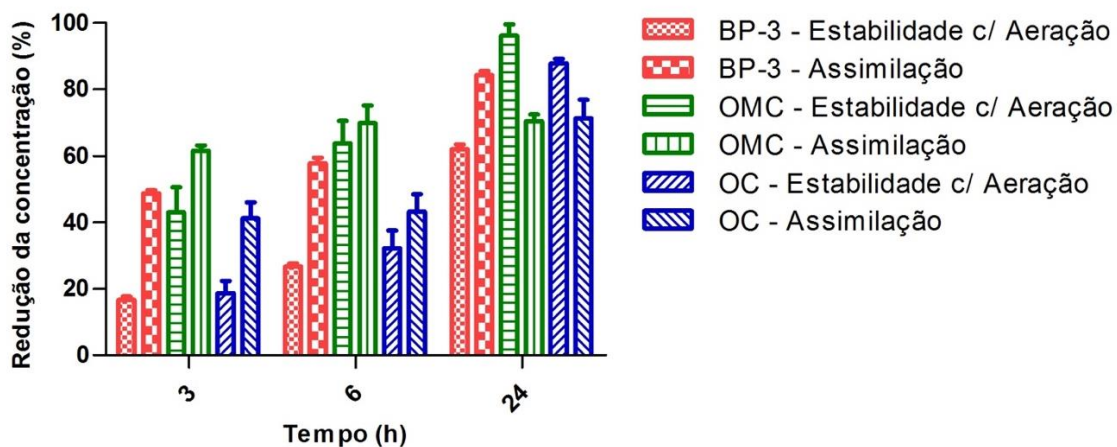
Fonte: Autoria própria (2022)

Durante as primeiras 3h do ensaio de assimilação, a BP-3 alcançou redução média de 49% de sua concentração e de 17% no ensaio de estabilidade, cerca de 2,9 vezes menor. Após 6h, a redução na concentração de BP-3 esteve em torno de 58%

durante o ensaio de assimilação e 27% no ensaio de estabilidade, aproximadamente metade. Após as 24h, o composto alcançou redução média de 84% no ensaio de assimilação *versus* 62% no ensaio de estabilidade (1,4 vezes menor) (Figura 8). Diferença significativa a um nível de 5% foi constatada nas reduções de concentração entre os dois grupos ($p=0,005404$).

Com relação ao OMC, a redução média alcançada após 3h de teste de assimilação e estabilidade foi de 62% e 43%; após 6h, 69% e 64% e após 24h 74% e >89%, respectivamente. O teste t não indicou diferença significativa a um nível de 5% nas reduções de concentração entre os dois grupos ($p=0,583$). Com relação ao OC, a redução média alcançada após 3h de teste de assimilação e estabilidade foi de 41% e 19%; após 6h, 43% e 32% e, após 24h, 73% e 85%, respectivamente. De acordo com o teste t, não houve diferença significativa a um nível de 5% nas reduções de concentração entre os dois grupos ($p=0,614$).

Figura 8 - Comparação gráfica dos percentuais de redução das concentrações dos analitos em ensaio de estabilidade com aeração vs ensaio de assimilação (exposição aguda)



Fonte: Autoria própria (2022)

5.2.2. Bioensaio de Exposição Subcrônica e Análise de Biomarcadores

Durante as primeiras 24h de exposição subcrônica, foi realizado o monitoramento das concentrações dos contaminantes no Grupo 4 por LC-DAD (Tabela 11).

Tabela 11 - Dados referentes a redução na concentração dos compostos BP-3, OMC e OC referentes as 24 h de monitoramento do bioensaio de exposição subcrônica

Tempo (h)	ANALITO		BP-3		OMC		OC	
	Aquário	Conc. (mg·L ⁻¹)	Redução da conc. (%)	Conc. (mg·L ⁻¹)	Redução da conc. (%)	Conc. (mg·L ⁻¹)	Redução da conc. (%)	
0	7	0,6		0,5		0,5		
0	8	0,7		0,6		0,6		
24	7	0,2	71	0,1	80	0,1	83	
24	8	0,2	70	< 0,06	> 88	< 0,06	> 88	

Fonte: Aatoria própria (2022)

Durante os 29 dias de bioensaio 6 mortes foram reportadas (Tabela 12). Maior número de mortes foi observado no grupo 4 (indivíduos expostos a maior concentração dos fotoprotetores), tendo ocorrido a morte de um indivíduo no início do bioensaio (11° dia) e duas mortes ao final desse (27° e 28° dias). As demais mortes são referentes a um indivíduo do grupo 3 (11° dia), exposto a menor concentração dos fotoprotetores, um indivíduo do grupo 2 (20° dia, grupo controle de EtOH), e 1 indivíduo do grupo 1 (15° dia, grupo controle negativo).

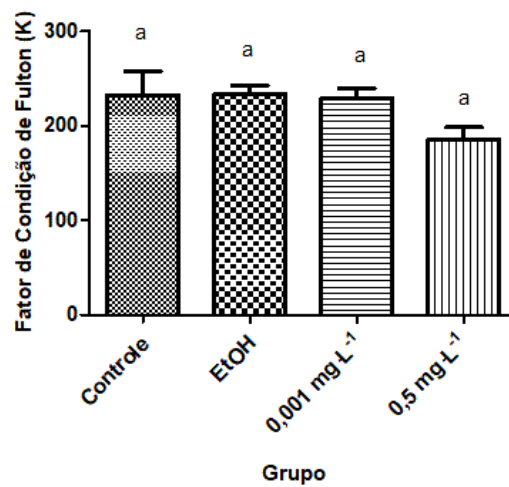
Ao término do bioensaio, os animais foram anestesiados e tiveram massa e comprimento aferidos, apresentando massa média de $12,5 \pm 1,1$ g e comprimento médio de $9,0 \pm 0,4$ cm. Esses dados foram avaliados por ANOVA e, ao nível de significância de 5%, as massas ($p=0,1544$) e comprimentos ($p=0,1306$) entre grupos não apresentaram diferença estatística.

5.2.2.1. Biomarcadores

5.2.2.1.a. Fator de Condição de Fulton

A representação gráfica dos valores de Fator de Condição de Fulton (K) obtidos para cada indivíduo é apresentada na Figura 9. Os valores de média e desvio padrão obtidos para os grupos 1 (controle), 2 (0,045% EtOH), 3 (0,001 mg·L⁻¹) e 4 (0,5 mg·L⁻¹) foram, respectivamente, 185 ± 34 , 229 ± 31 , 234 ± 26 e 233 ± 76 g³·cm⁻¹. Não houve diferença estatística significativa ($p=0,1704$) entre os grupos ao nível de significância de 5% (Figura 9).

Figura 9 - Representação gráfica do fator de condição de Fulton (K) obtido durante os 29 dias de exposição subcrônica de tilápias



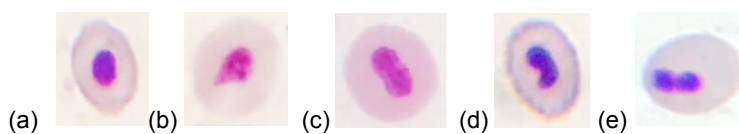
Nota: Letras iguais indicam ausência de diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Fonte: Autoria própria (2022)

5.2.2.1.b. Teste do Micronúcleo Písceo

Realizado para elucidar possíveis danos mutagênicos decorrentes da exposição dos indivíduos a mistura dos compostos fotoprotetores, o teste do micronúcleo písceo permitiu a identificação microscópica de alterações nucleares em eritrócitos (Figura 10) e demonstrou ausência de indivíduos com micronúcleos nos grupos analisados (Grupos 1, 2 e 3). Devido às dificuldades na coleta de sangue dos indivíduos do Grupo 4, exposto a maior concentração da mistura de BP-3, OMC e OC, a análise mutagênica não foi possível visto que as lâminas continham tecido, bile e poucas ou nenhuma hemácia.

Figura 10 - Hemácia normal (a) e exemplos de algumas células com alterações morfológicas (b,c,d,e) encontradas nos organismos analisados após realização de bioensaio subcrônico com tilápias (aumento de 1000x)

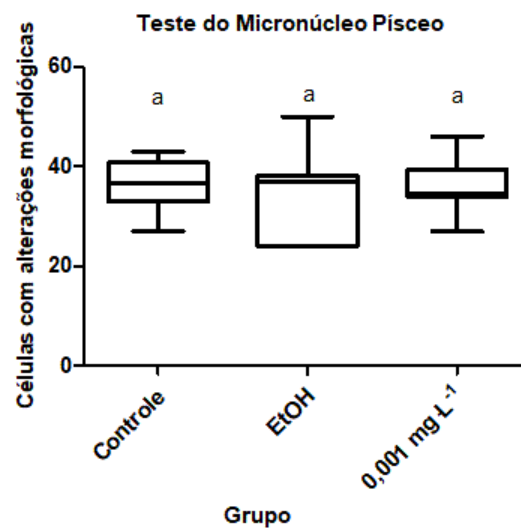


Fonte: Autoria própria (2022)

Os resultados referentes à análise em microscopia para os indivíduos do grupo 1 (controle, ausente de filtros solares e solvente), grupo 2 (controle de EtOH) e grupo 3 (exposto a menor concentração da mistura de fotoprotetores) após análise de 2000 células por indivíduo, são mostrados no Apêndice A.

Não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos 1, 2 e 3 ($p=0,747$) (Figura 11).

Figura 11 - Representação gráfica dos resultados mutagênicos obtidos para tilápias submetidas a bioensaio de exposição subcrônica



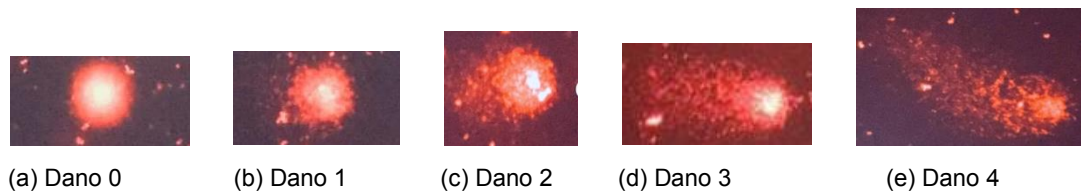
Nota: Letras iguais indicam ausência de diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$).

Fonte: Autoria própria (2022)

5.2.2.1.c. Ensaio Cometa

A avaliação de lesões no DNA de células individuais nucleadas foi conduzida através do ensaio cometa. A Figura 12 demonstra a classificação de danos utilizada durante avaliação da genotoxicidade e os exemplos apresentados consistem em células encontradas durante a análise em microscópio de epifluorescência.

Figura 12 - Exemplos de nucleóides analisados e classificados (a,b,c,d,e), de acordo com o analista, em cinco classes de dano no que diz respeito à intensidade da cauda (aumento de 400 x).

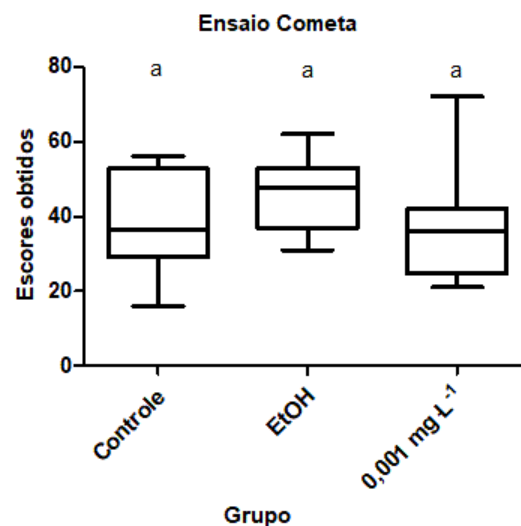


Fonte: Autoria própria (2022)

Devido a dificuldades na coleta de sangue de alguns indivíduos, a análise não foi possível visto que as lâminas continham tecido, bile e poucas ou nenhuma hemácia. No Apêndice B, a tabela evidencia os escores obtidos para cada indivíduo considerando o número de danos 0, 1, 2, 3 e 4 observados após contagem de 100 nucleóides por organismo.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos 1, 2 e 3 ($p=0,364$) (Figura 13). O grupo 4 foi desconsiderado da investigação estatística visto que o baixo número de lâminas analisadas ($n=2$ lâminas), poderia comprometer a comparação.

Figura 13 - Representação gráfica dos escores obtidos através do ensaio cometa para tilápias após bioensaio de exposição subcrônica



Nota: Letras iguais indicam ausência de diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$).

Fonte: Autoria própria (2022)

5.2.2.1.d. Biomarcadores Bioquímicos

As massas de fígado e de cérebro aferidas anteriormente ao início das análises são apresentadas na Tabela 15.

Tabela 12 - Massa dos órgãos retirados de tilápias após exposição subcrônica utilizados para análise de biomarcadores bioquímicos

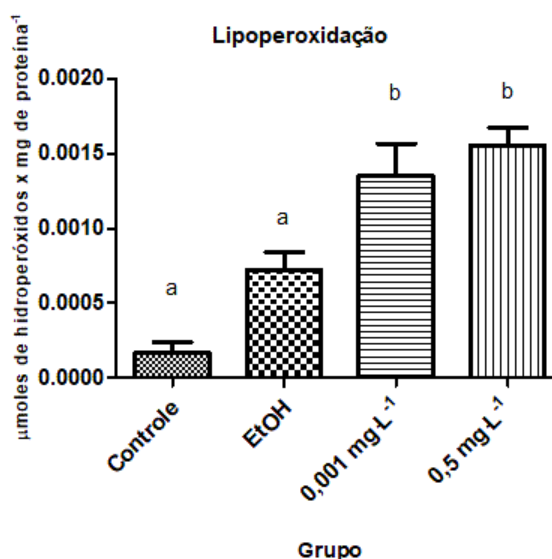
Grupo	Aquário (Tratamento)	Indivíduo	Massa do fígado (g)	Massa do cérebro (g)
GRUPO 1	1 (Controle)	1	0,0727	0,0444
	1 (Controle)	2	0,0514	0,0616
	1 (Controle)	3	0,0351	0,0627
	1 (Controle)	4	0,0385	0,0606
	1 (Controle)	5	0,0630	0,0380
	2 (Controle)	6	0,0623	0,0713
	2 (Controle)	7	0,0299	0,0330
	2 (Controle)	8	0,0433	0,0629
	2 (Controle)	9	0,0586	0,0610
GRUPO 2	3 (0,045% etanol)	10	0,0527	0,0525
	3 (0,045% etanol)	11	0,0315	0,0605
	3 (0,045% etanol)	12	0,0615	0,0515
	3 (0,045% etanol)	13	0,0159	0,0609
	4 (0,045% etanol)	14	0,0307	0,0529
	4 (0,045% etanol)	15	0,0355	0,0565
	4 (0,045% etanol)	16	0,0483	0,0492
	4 (0,045% etanol)	17	0,0324	0,0452
4 (0,045% etanol)	18	0,0200	0,0636	
GRUPO 3	5 (0,001 mg·L ⁻¹)	19	0,0466	0,0626
	5 (0,001 mg·L ⁻¹)	20	0,0544	0,0521
	5 (0,001 mg·L ⁻¹)	21	0,0292	0,0534
	5 (0,001 mg·L ⁻¹)	22	0,0577	0,0442
	5 (0,001 mg·L ⁻¹)	23	0,4920	0,0601
	6 (0,001 mg·L ⁻¹)	24	0,0390	0,0584
	6 (0,001 mg·L ⁻¹)	25	0,0439	0,0662
6 (0,001 mg·L ⁻¹)	26	0,0282	0,0659	
6 (0,001 mg·L ⁻¹)	27	0,0416	0,0463	
GRUPO 4	7 (0,5 mg·L ⁻¹)	28	0,0507	0,0777
	7 (0,5 mg·L ⁻¹)	29	0,0097	0,0611
	8 (0,5 mg·L ⁻¹)	30	0,0296	0,0553
	8 (0,5 mg·L ⁻¹)	31	0,0495	0,0490
	8 (0,5 mg·L ⁻¹)	32	0,0626	0,0623
	8 (0,5 mg·L ⁻¹)	33	0,0144	0,0433
8 (0,5 mg·L ⁻¹)	34	0,0159	0,0531	

Fonte: Autoria própria (2022)

Após a aferição das massas e preparo das amostras, foram realizados os testes bioquímicos para detecção de possíveis alterações nos níveis de LPO e na atividade das enzimas CAT, GST em fígado e AChE em cérebro decorrente da exposição subcrônica de tilápias a 0,5 mg·L⁻¹ e 0,001 mg·L⁻¹ da mistura de BP-3, OMC e OC, a 0,045% EtOH e grupo controle negativo após 29 dias de exposição.

Para o biomarcador LPO, a ANOVA indicou haver diferenças significativas ($p < 0,0001$) entre os grupos avaliados após bioensaio de exposição subcrônica (Figura 14). A fim de definir em quais grupos essas diferenças residem foi realizado o teste *Post hoc* de Bonferroni. O teste indicou não haver diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos controle negativo e controle de solvente (EtOH 0,045%). Diferenças significativas a 5% foram comprovadas entre os grupos $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ vs EtOH 0,045%, $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ vs controle, $0,001 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ vs EtOH, 0,045%, $0,001 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ vs controle negativo e ausência de diferença significativa entre os grupos $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ vs $0,001 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Tais resultados são indícios de que os fotoprotetores são capazes de induzir a formação de radicais livres e, posteriormente, hidroperóxidos lipídicos e aldeídos em ambas as concentrações avaliadas.

Figura 14 - Representação gráfica dos resultados após análise do biomarcador de LPO em tilápias após bioensaio subcrônico de 29 dias



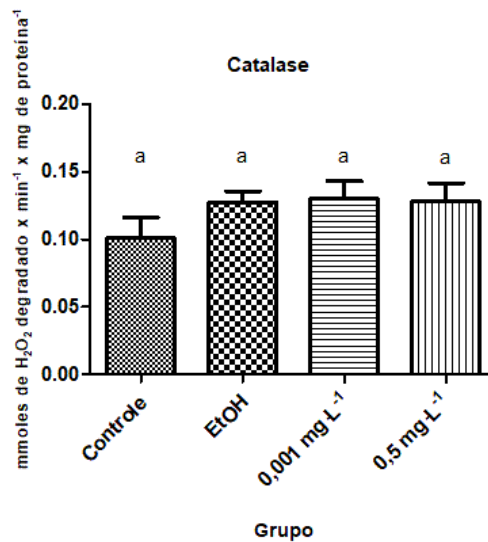
Nota: Letras iguais indicam ausência de diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$)

Fonte: Autoria própria (2022)

Após análise das atividades das enzimas catalase (CAT) (Figura 15), glutionas s-transferases (GST) (Figura 16) e acetilcolinesterase (AChE) (Figura 17) não foram constatadas diferenças significativas (a nível de significância de 5%) entre os grupos submetidos a exposição subcrônica a $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e $0,001 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ da mistura de BP-3, OMC e OC, a 0,045% EtOH e grupo controle negativo após 29 dias de

exposição. Os valores de p obtidos para CAT, GST e AChE foram, respectivamente, $p=0,3329$, $p=0,5289$ e $p=0,1312$.

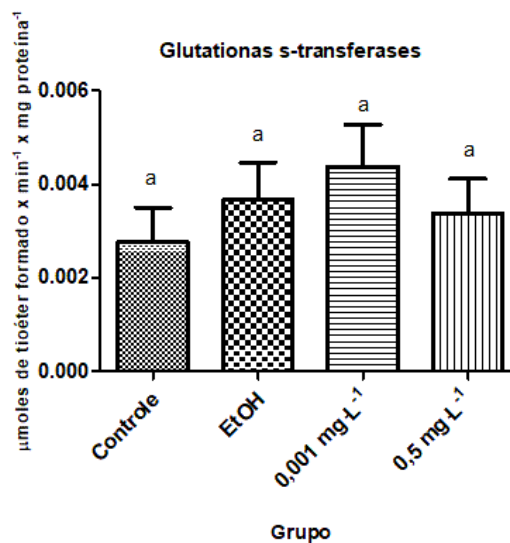
Figura 15 - Representação gráfica dos resultados obtidos após análise do biomarcador CAT em tilápias após bioensaio subcrônico de 29 dias



Nota: Letras iguais indicam ausência de diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$).

Fonte: Autoria própria (2022)

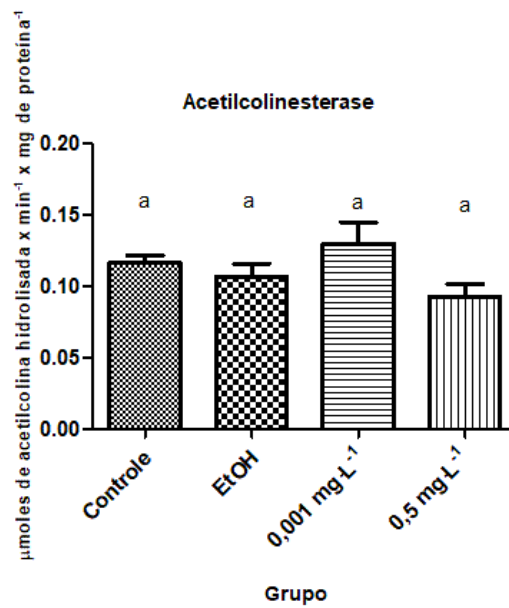
Figura 16 - Representação gráfica dos resultados obtidos após análise do biomarcador GST em tilápias após bioensaio subcrônico de 29 dias



Nota: Letras iguais indicam ausência de diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$).

Fonte: Autoria própria (2022)

Figura 17 - Representação gráfica dos resultados obtidos após análise do biomarcador AChE em tilápias após bioensaio subcrônico de 29 dias



Nota: Letras iguais indicam ausência de diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Fonte: Autoria própria (2022)

6. DISCUSSÃO

6.1 Testes Preliminares

6.1.1. Ensaio de Estabilidade

A realização do ensaio de estabilidade teve como principal objetivo avaliar a redução de concentração dos fotoprotetores em água e determinar a influência da aeração no meio, permitindo a obtenção de dados que norteassem os bioensaios realizados posteriormente.

De acordo com a literatura, BP-3, OMC e OC podem ser considerados estáveis na ausência de agentes oxidantes e de radiação UV, sendo de difícil remoção até mesmo em estações de tratamento de água (YANG et al., 2018). Em água ultrapura, na ausência de aeração e mediante exposição solar por 50 dias, Liu et al. (2011) observaram redução de apenas 8% na concentração de BP-3. Quando soluções aquosas contendo BP-3, OMC e OC isolados e dissolvidos em metanol foram expostas a radiação UV por 72h, BP-3 e OC se mostraram altamente estáveis durante todo o período. O OMC, entretanto, apresentou maior instabilidade sofrendo rápida fotoisomerização de *trans* para *cis* (RODIL et al., 2009), conforme também observado em ensaio realizado por Pattanaargson e Limphong (2001). Segundo Vidal-Linan (2018), em águas marinhas, na ausência de luz e com aeração constante o BP-3 apresentou diminuição em sua concentração de 18,1% após 48h, enquanto a concentração de OC apresentou redução de 31,8%.

Desse modo, embora estudos nas mesmas condições do ensaio realizado neste trabalho não tenham sido encontrados na literatura, os resultados corroboram com a maior estabilidade da BP-3 e menor estabilidade do OMC reportadas nos estudos supracitados. Os resultados também confirmam a menor estabilidade dos compostos quando há oxidante no meio, indicando ser a aeração um parâmetro que interfere de maneira estatisticamente significativa na redução de concentração dos fotoprotetores.

6.1.2. Teste de Congelamento

O teste de congelamento foi realizado a fim de assegurar boa preservação dos fotoprotetores em água quando amostras são armazenadas em recipientes de polipropileno e submetidas a ciclos de congelamento e descongelamento. Tal informação é essencial visto que, durante bioensaios, amostras são retiradas dos aquários e armazenadas em *ultrafreezer* para análises posteriores, estando a validade destas análises atrelada a estabilidade da amostra nestas condições. Essa avaliação criteriosa também tem utilidade em trabalhos de monitoramento ambiental, no qual amostras são coletadas em campo, transportadas e armazenadas para estudo.

Embora as garrafas plásticas e os tubos *falcon* sejam constituídos do mesmo material, o polipropileno, diferenças no processo de fabricação de recipientes plásticos podem ocasionar maior compactação ou não do material, originando recipientes que apresentam características como densidade e porosidade distintas (UGBOLUE, 2017), e, conseqüentemente, interação de maneira diferente com compostos orgânicos (FRIES, ZARFL, 2012).

Tendo em vista a ocorrência da adsorção de compostos orgânicos em materiais plásticos (UBER et al., 2019), as reduções de concentração observadas neste trabalho indicam que houve adsorção dos filtros solares ao material plástico do tubo (polipropileno) devido a seu caráter hidrofóbico. Os dados demonstram adsorção mais expressiva nos tubos *falcon*, sendo, portanto, indicado o armazenamento de água contendo os fotoprotetores em garrafas plásticas podendo a amostra ser submetido a um ciclo de congelamento e descongelamento.

6.2 Bioensaio com Tilápias

6.2.1 Ensaio de Assimilação (Exposição Aguda)

Além de elucidar a influência da aeração na estabilidade dos fotoprotetores em água (ensaio de estabilidade) buscando determinar de maneira adequada o tempo de reposição dos fotoprotetores durante bioensaio, a influência da presença de um organismo no béquer sob as mesmas condições também foi investigada por meio do ensaio de assimilação.

Para a BP-3, a presença de um indivíduo no meio exerceu impacto estatisticamente significativo quando os decaimentos observados foram comparados aos valores obtidos durante ensaio de estabilidade. O composto apresentou redução de concentração superior em 30% nas primeiras 3h, 28% após 6h e 22% após 24h. Os valores superiores de decaimento representam uma aproximação da quantidade bioassimilada pelo indivíduo, embora parâmetros como adsorção do analito aos excrementos não tenham sido avaliados e estudos adicionais sejam necessários.

Para o OMC e o OC, a presença de um indivíduo não ocasionou reduções estatisticamente significativas nas concentrações. O menor tempo de permanência destes compostos em água aerada por conta de sua maior instabilidade é, possivelmente, um dos fatores que reduz a assimilação.

6.2.2. Bioensaio de Exposição Subcrônica

O protocolo de exposição utilizado durante bioensaio de exposição subcrônica foi similar ao utilizado durante ensaio de assimilação (exposição aguda) no que tange ao uso de tilápias, presença de aeração, tempo de exposição a luz artificial e material dos aquários/béqueres. Além dos grupos 3 e 4, os grupos controle negativo (Grupo 1) e controle de solvente (Grupo 2) também foram investigados a fim de garantir que os efeitos observados eram decorrentes apenas dos fotoprotetores e não da presença de EtOH no meio ou das demais variáveis como densidade de estocagem e aeração.

O bioensaio de exposição subcrônica foi realizado com 5 indivíduos por aquário (densidade de estocagem de aprox. 2,5 g/L) de modo a minimizar os níveis de estresse ocasionado por disputas de espaço mínimos, visto que a exposição ocorreu por um maior período de tempo em comparação com o bioensaio de exposição aguda. O valor de 2,5 g·L⁻¹ teve como base o valor de 2 g·L⁻¹ indicado para criação de lambaris que consta no documento do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA (2017).

A partir dos dados obtidos em ensaio de estabilidade e ensaio de assimilação, determinou-se que repor os fotoprotetores 1 vez a cada 24h seria suficiente para manter a estabilidade das concentrações para o Grupo 4, exposto a 0,5 mg·L⁻¹ de BP-3, OMC e OC. Para o Grupo 3, embora a concentração de exposição de 0,001 mg·L⁻¹ dos filtros solares não tenha sido avaliada por cromatografia líquida visto

que o método não contempla tal concentração, foram consideradas as mesmas reduções de concentração observadas a $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, e a reposição também ocorreu a cada 24h.

A duração do bioensaio foi norteadada pelo trabalho de Liu e colaboradores (2015) e pelo número de mortes observado, optando-se por interromper o teste após 29 dias de exposição visando evitar o comprometimento estatístico das análises.

6.2.2.1 Biomarcadores

Durante os 29 dias de bioensaio, foram constatadas alterações nos padrões de alimentação além da ocorrência de maior número de mortes em tilápias expostas a maior concentração dos filtros solares. Apesar disso, os resultados para constante de Fulton (K) indicam que, a um nível macro, os peixes expostos aos fotoprotetores e ao etanol 0,045% não tiveram alterações em relação a saúde geral e nutrição quando em comparação ao grupo controle. Estudos envolvendo a avaliação deste parâmetro em indivíduos expostos às mesmas condições experimentais dos organismos deste trabalho não foram encontrados até o presente momento. Apesar disso, em bioensaio de 14 dias realizado utilizando os indivíduos da espécie *Sparus aureata* (massa média de 14 g; comprimento médio de 13 cm), BP-3 isolada a $0,05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ dissolvida em metanol (concentração $< 0,005\%$) com fortificação contínua durante o experimento, os valores de K também não apontaram alterações na saúde geral dos organismos (ZIARRUSTA, 2018).

Os valores de p oriundos do teste do micronúcleo písceo e ensaio cometa são indicativos de que a exposição a menor concentração da mistura dos filtros solares e a exposição ao EtOH na concentração de 0,045% não ocasionam danos genotóxicos e mutagênicos aos organismos após 29 dias de exposição. Esses resultados diferem dos danos mutagênicos constatados em fêmeas adultas da espécie de peixe *Poecilia reticulata* expostas às concentrações de 0,01, 0,1 e $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de BP-3 durante 96h (ALMEIDA et al., 2019) e dos danos genotóxicos observados por Almeida e Vieira (2013) após exposição de *Astyanax sp.* a BP-3 e OMC, simultaneamente, durante 21 dias.

Em se tratando de biomarcadores, entretanto, é importante ressaltar que as respostas podem variar de acordo com a sensibilidade da espécie utilizada durante

bioensaio, capacidade de metabolização, estágio do desenvolvimento, concentração do contaminante e duração da exposição (FUENTES-RODRÍGUEZ et al., 2015). Além disso, os filtros solares BP-3, OMC e OC podem apresentar diferentes efeitos toxicológicos isolados ou em mistura (LI et al., 2018). Em meios contendo apenas BP-3, por exemplo, a capacidade de adaptação de indivíduos é reportada na literatura fazendo com que alterações em curto prazo se normalizam após um período maior de exposição (LIU et al., 2015).

A análise de biomarcadores bioquímicos, por sua vez, foi realizada a fim de elucidar possíveis efeitos precoces de alterações nos sistemas bioquímicos das tilápias decorrentes da exposição hídrica e subcrônica à mistura de BP-3, OMC e OC. As atividades das enzimas GST e CAT não apresentaram alterações significativas em relação aos grupos controle. Esses dados corroboram com os resultados demonstrados por Liu e colaboradores (2015) após exposição de indivíduos *Carassius auratus* a BP-3 isolado nas concentrações de $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. As análises de biomarcadores foram realizadas após 7, 14 e 28 dias de exposição. Após 7 dias de exposição, diminuição na atividade da CAT foi observada em ambos os grupos expostos ao fotoprotetor. Tal redução, conforme discutido pelos autores, foi provavelmente ocasionada pelo aumento na produção de EROs excedendo a capacidade de remoção destas pela enzima, a inibindo. Após 28 dias de exposição, a atividade da CAT foi normalizada e retornou gradualmente ao valor do branco, indicando uma resposta adaptativa dos indivíduos e desenvolvimento de um mecanismo compensatório para combater o estresse oxidativo. Os autores também avaliaram, durante o estudo descrito acima, a atividade da GST que apresentou um aumento após 7 dias de exposição que se manteve após 14 dias. Tal comportamento sugere que a enzima está envolvida na transformação dos fotoprotetores e/ou na defesa antioxidante, havendo formação da enzima GSH e complexos de benzofenona como mecanismos de eliminação/detoxificação. Após 28 dias de exposição, entretanto, a atividade de GST foi normalizada e retornou ao valor do branco.

Apesar da ausência de alterações significativas nas atividades de GST e CAT após 28 dias de exposição aos fotoprotetores, os níveis de LPO apresentaram variações significativas indicando a ocorrência de estresse oxidativo mediante exposição a ambas as concentrações da mistura. A desestruturação da membrana celular decorrente da lipoperoxidação consiste em um processo irreversível que, em

última instância, pode levar a morte celular (VAN DER OOST, BEYER, VERMEULEN, 2003). De acordo com a literatura, após tratamento com 6,2, 12,4 e 62 mg.L⁻¹ de OMC durante 96 h, apenas zebrafish expostos a maior concentração do fotoprotetor isolado apresentaram níveis de LPO aumentados (NATARAJ et al., 2020). Tal resultado pode indicar a ocorrência de efeito sinérgico quando indivíduos são expostos a BP-3, OMC e OC simultaneamente.

Os efeitos de neurotoxicidade decorrentes da exposição de tilápias a mistura de fotoprotetores foram investigados a partir da atividade da enzima AChE. Os resultados não demonstraram alterações significativas quando os grupos expostos foram comparados aos grupos controle. Esses resultados corroboram com a resposta de *Chironomus riparius* expostos a sedimentos contaminados com BP-3 e OC isolados por 28 dias (CAMPOS et al., 2017). Em embriões de *D. rerio*, apenas a exposição aguda a elevada concentração de 62 mg.L⁻¹ de OMC ocasionou diminuição na atividade da AChE (NATARAJ et al., 2020). Até o presente momento, não foram encontrados estudos na literatura avaliando a atividade da AChE em peixes adultos.

O Quadro 1 sintetiza os biomarcadores avaliados e os resultados. Além disso, apresenta biomarcadores adicionais que poderiam agregar em estudos futuros visando investigar danos decorrentes da exposição de indivíduos à mistura de fotoprotetores.

Quadro 1 - Resultados após exposição de *Oreochromis niloticus* à mistura de fotoprotetores durante 29 dias

Parâmetro	0,001 mg·L ⁻¹ de BP-3, OMC, OC	0,5 mg·L ⁻¹ de BP-3, OMC, OC
Índices somáticos		
Fator de Condição		
Biomarcadores genéticos		
Teste do micronúcleo pisco		
Ensaio cometa		
Biomarcadores enzimáticos e não enzimáticos - fígado		
Catalase		
Glutathiona s-transferase		
Lipoperoxidação		
Biomarcadores enzimáticos e não enzimáticos - cérebro		
Acetilcolinesterase		

Nota: A cor azul indica ausência de diferença estatisticamente significativa; Vermelho: diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação aos grupos controle.

Fonte: Autoria própria (2022)

7. CONCLUSÃO

O método cromatográfico para análise de BP-3, OMC e OC em amostras de água foi desenvolvido em cromatógrafo líquido acoplado a detector por arranjo de diodos e sua validade assegurada por figuras de mérito e critérios de aceitabilidade preconizados nos principais documentos norteadores de validação analítica do Brasil (INMETRO, ANVISA e MAPA). A aplicação do método em testes preliminares, ensaio de estabilidade e teste de congelamento, demonstrou haver maior redução de concentração da mistura de filtros solares em ambiente com aeração e evidenciou que a melhor forma de armazenamento de água contendo os fotoprotetores se dá em garrafas plásticas, havendo boa preservação das amostras após um ciclo de congelamento e descongelamento. Os resultados de ambos os testes também corroboram com estudos similares encontrados na literatura no que diz respeito a maior estabilidade da BP-3 frente aos demais compostos.

O método cromatográfico validado também foi utilizado no monitoramento de ensaio de exposição aguda de tilápias (ensaio de assimilação) e permitiu a determinação do tempo de reposição dos contaminantes durante bioensaio de exposição subcrônica (renovação periódica a cada 24h) assegurando que a concentração de exposição apresentasse constância durante os 29 dias de ensaio.

Os resultados após ensaio cometa e teste do micronúcleo pisco realizados para os grupos expostos a menor concentração da mistura de fotoprotetores, grupo controle de solvente e grupo controle negativo não apresentaram diferenças significativas, indicando não haver danos mutagênicos e genotóxicos significativos decorrentes da exposição de 29 dias aos fotoprotetores e solvente nessas concentrações.

A exposição subcrônica de tilápias à mistura contendo BP-3, OMC e OC nas concentrações de $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e $0,001 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (concentração ambiental) e ao solvente etanol a 0,045% (grupo controle de solvente), demonstrou não haver alteração significativa ($p < 0,05$) na atividade dos biomarcadores GST, CAT e AChE decorrente da presença dos contaminantes e solvente no meio. Os dados são concordantes com ensaio encontrado na literatura e podem indicar comportamento adaptativo desses indivíduos aos contaminantes. Para o biomarcador de estresse oxidativo LPO, foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos expostos a $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ vs

EtOH, 0,5 mg·L⁻¹ vs controle, 0,001 mg·L⁻¹ vs EtOH, 0,001 mg·L⁻¹ vs controle e ausência de diferença significativa entre os grupos 0,5 mg·L⁻¹ vs 0,001 mg·L⁻¹, indicando haver a formação de radicais livres e, posteriormente, hidroperóxidos lipídicos e aldeídos, após 29 dias de exposição em ambas as concentrações de fotoprotetores avaliadas. Tendo em vista a ocorrência de estresse oxidativo induzida pela mistura de filtros solares em alta concentração e em concentração ambiental observada nesse trabalho em indivíduos *Oreochromis niloticus*, recomenda-se que tais compostos sejam incluídos em programas de monitoramento ambiental e estudos ecotoxicológicos utilizando outras espécies de organismos aquáticos.

REFERÊNCIAS

- ABDELFATTAH, E; AUGUSTYNIAC, M.; YOUSEF, H. Biomonitoring of genotoxicity of industrial fertilizer pollutants in *Aiolopus thalassinus* (Orthoptera: Acrididae) using alkaline comet assay. **Chemosphere**. Vol. 182, 2017.
- ABID, A; MARCINIAC, B; PEDZINSKI, T; SHAHID, M. Photo-stability and photo-sensitizing characterization of selected sunscreens' ingredients. **Journal of Photochemistry and Photobiology A Chemistry**. 2017.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**. Vol. 105, p. 121-126, 1984.
- AFANASIEVA, K.; SIVOLOB, A. Physical principles and new applications of comet assay. **Biophysical Chemistry**. Vol. 238, 2018.
- AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS – ANA. **Atlas Esgotos: Despoluição das Bacias Hidrográficas**, 2017. Disponível em: < <http://atlassesgotos.ana.gov.br>>
- AHMED, M; HABIBULLAH-AL-MAMUN, M; HOSSAIN, M; ARIF, M; PARVIN, E; AKTER, M; KHAN, M; ISLAM, M. Assessing the genotoxic potentials of arsenic in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) using alkaline comet assay and micronucleus test. **Chemosphere**. Vol. 84, p. 143-149, 2011.
- ALAM, Z; CONCEPCION, C; ABDULRAHMAN, J; SANCHEZ, M. Biomonitoring of Water Bodies in Metro Manila, Philippines Using Heavy Metal Analysis and Erythrocyte Micronucleus Assay in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Nature Environment and Pollution Technology**. Vol. 18, p. 685-696, 2019.
- ALMEIDA, S; ROCHA, T; QUALHATO, G; OLIVEIRA, L; AMARAL, C; CONCEIÇÃO, E; SABÓIA-MORAIS, S; BAILÃO, E. Acute exposure to environmentally relevant concentrations of benzophenone-3 induced genotoxicity in *Poecilia reticulata*. **Aquatic Toxicology**. Vol. 216, 2019.
- AL-GHAIS. Acetylcholinesterase, glutathione and hepatosomatic index as potential biomarkers of sewage pollution and depuration in fish. **Marine Pollution Bulletin**. Vol. 74, p. 183-186, 2013.
- ANTONIOU, C; KOSMADAKI, M; STRATIGOS, A; KATSAMBAS, A. Sunscreens – what's important to know. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**. Vol. 22, n. 9, p.1110-1118, 2008.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia nº 10 para Tratamento Estatístico da Validação Analítica**. Versão 1, de 30 de agosto de 2017.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, 24/07/2017. **Guia para validação de métodos analíticos**. 2017.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 2003. **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**. 2003.

ARALDI, R; MELO, T; MENDES, T; JUNIOR, P; NOZIMA, B; ITO, E; CARVALHO, R; SOUZA, E; STOCCO, R. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. **Biomedicine and Pharmacotherapy**. Vol. 72, p. 74-82, 2015.

ARAÚJO, C; SANTOS, V; GONSALVES, A. Acetilcolinesterase - AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico. **Revista Virtual de Química**. Vol. 8, nº 6, p. 1818-1834, 2016.

ARISTIZABAL-CIRO, C; BOTERO-COY, A; LOPEZ, F; PENUELA, G. Monitoring pharmaceuticals and personal care products in reservoir water used for drinking water supply. **Environmental Science and Pollution Research**. Vol. 24, p. 7335-7347, 2017.

AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A.A. **As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia**. São Carlos: Rima, 2004.

BADIA-FABREGAT, M; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, C; GAGO-FERRERO, P; OLIVARES, A; PINA, B; DIAZ-CRUZ, M; VICENT, T; BARCELO, D; CAMINAL, G. Degradation of UV filters in sewage sludge and 4-MBC in liquid medium by the ligninolytic fungus *Trametes versicolor*. **Journal of Environmental Management**. Vol. 104, 2012.

BALMER, M; BUSER, H; MULLER, M; POIGER, T. Occurrence of some organic UV filters in wastewater, in surface waters, and in fish from Swiss lakes. **Environmental Science & Technology**. Vol. 39, p. 953–962, 2005.

BANSAL, S.; DESTEFANO, A. Key elements of bioanalytical method validation for small molecules. **AAPS Journal**, p. E109–E114, 2007.

BARGAR, T; ALVAREZ, D; GARRISON, V. Synthetic ultraviolet light filtering chemical contamination of coastal waters of Virgin Islands national park, St. John, U.S. Virgin Islands. **Marine Pollution Bulletin**. Vol. 101 (1), p. 193–199. 2015.

BIRBEN, E; SAHINER, U; SACKESEN, C; ERZURUM, S; KALAYCI, O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **World Allergy Organization Journal**, 2012.

BLÜTHGEN, N.; MEILI, N.; CHEW, G.; ODERMATT, A.; FENT, K. Accumulation and effects of the UV-filter octocrylene in adult and embryonic zebrafish (*Danio rerio*). **Science of the Total Environment**. Vol. 19, 476–477, 207–217, 2014.

BOTELHO, R; CHRISTOFOLETTI, C; CORREIA, J; ANSOAR, Y; OLINDA, R; TORNISIELO, V. Genotoxic responses of juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to florfenicol and oxytetracycline. **Chemosphere**. Vol. 132, p. 206-212, 2015.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. Vol.72, p.248-254, 1976.

BRIASCO, B; CAPRA, P; MANNUCCI, B; PERUGINI, P. Stability Study of Sunscreens with Free and Encapsulated UV Filters Contained in Plastic Packaging. **Pharmaceutics**. 2017.

BRUM, A; PEREIRA, S; CARDOSO, L; CHAGAS, E; CHAVES, F; MOURINO, J; MARTINS, M. Blood biochemical parameters and melanomacrophage centers in Nile tilapia fed essential oils of clove basil and ginger. **Fish and Shellfish Immunology**. Vol. 74, 2018.

BURY, D; MODICK-BIERMANN, H; LEIBOLD, E; BRUNING, T; KOCH, H. Urinary metabolites of the UV filter octocrylene in humans as biomarkers of exposure. **Archives of Toxicology**. Vol. 93, p. 1227–1238, 2019.

CAMPOS, D; GRAVATO, C; QUINTANEIRO, C; GOLOVKO, O; ZLABEK, V; SOARES, A; PESTANA, J. Toxicity of organic UV-filters to the aquatic midge *Chironomus riparius*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. Vol. 143, p. 210-216, 2017.

CAMINI, F.C. **Avaliação dos marcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes em fígado de camundongos após infecção pelo vírus Caraparu**. 83f. Dissertação. Núcleo de pesquisa em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2014.

CARVALHO, C; BERNUSSO, V; ARAUJO, H; ESPINDOLA, E; FERNANDES, M. Biomarker responses as indication of contaminant effects in *Oreochromis niloticus*. **Chemosphere**. Vol. 89, 2012.

CASSIANO, N.; BARREIRO, J.; MARTINS, L.; OLIVEIRA, R.; CASS, Q.. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**. Vol. 32, nº 4, São Paulo, 2009.

CHRISTEN, V.; ZUCCHI, S.; FENT, K. Effects of the UV-filter 2- ethyl-hexyl-4-trimethoxycinnamate (EHMC) on expression of genes involved in hormonal pathways in fathead minnows (*Pimephales promelas*) and link to vitellogenin induction and histology. **Aquatic Toxicology**. Vol. 102, p. 167–176, 2011.

COLLINS, C; SILVA, C. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química Nova**. Vol. 34, n. 4, 2011.

Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. Seção I, Resolução Normativa nº 34, de 27 de julho de 2017. **Peixes mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica para fins de estudo biológico ou biomédico I - Lambari (Astyanax), Tilápia (Tilapia, Sarotherodon e Oreochromis) e Zebrafish (Danio rerio)" do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica**. 2017.

CORONADO, M., DE HARO, X., DENG, M., REMPEL, R., LAVADO, D., SCHLENK, D. Estrogenic activity and reproductive effects of the UV-filter oxybenzone (2-hydroxy-

4-methoxyphenyl-methanone) in fish, **Aquat. Toxicol.** Vol. 90 (November (3), 182–187., 2008.

COSTA, C; OLIVI, P; BOTTA, C; ESPINDOLA, E. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova.** Vol. 31, 2008.

CUNHA, S; TRABALON, L; JACOBS, S; CASTRO, M; FERNANDEZ-TEJEDOR, M; GRANBY, K; VERBEKE, W; KWADIJK, C; FERRARI, F; ROBBENS, J; SIOEN, I; POCURULL, E; MARQUES, A; FERNANDES, J; DOMINGO, J. UV-filters and musk fragrances in seafood commercialized in Europe Union: Occurrence, risk and exposure assessment. **Environmental Research.** Vol. 161, 2018.

DEL-GUERCIO, A; CHRISTOFOLETTI, C; FONTANETTI, C. Avaliação da eficiência do tratamento de esgoto doméstico pelo teste do micronúcleo em *Oreochromis niloticus* (Cichlidae). **Engenharia Sanitária Ambiental.** Vol.22, n.6, p. 1121-1128, 2017.

DÉVIER, M; MAZELLIER, P; AIT-AISSA, S; BUDZINSKI, H. New challenges in environmental analytical chemistry: Identification of toxic compounds in complex mixtures. **Comptes Rendus Chimie.** Vol. 14 (7–8), p. 766-779, 2011.

DÍAZ-CRUZ, M; MOLINS-DELGADO, D' SERRA-ROIG, M; KALOGIANNI, E; SKOULIKIDIS, N; BARCELOS, D. Personal care products reconnaissance in EVROTAS river (Greece): Water-sediment partition and bioaccumulation in fish. **Science of the Total Environment.** Vol. 651, p. 3079-3089, 2019.

DONG, M. **Modern HPLC for Practicing Scientists.** Wiley Online Library, 2006.

ELLMANN, G.L.; COUTNEY, K.O.; ANDRES, V. & FEATHERSTONE, R.M.A. New and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.** Vol. 7, p. 88-95, 1961.

European Commission. **Opinion on Benzophenone-3.** Report SCCP/1069/06 (Dec 2006). European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Disponível em: <https://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_078.pdf>. Acesso em 22 de janeiro de 2021.

European Medicines Agency (EMA): EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 - **Guideline on bioanalytical method validation.** 2015.

EZEMONYE; OGELEKA; OKIEIMEN. Lethal toxicity of industrial chemicals to early life stages of *Tilapia guineensis*. **Journal of Hazardous Materials.** Vol. 157, Issue 1, p. 64-68, 2008.

FUENTES-RODRÍGUEZ, G; SANDOVAL-GIO, J; ARROYO-SILVA, A; NORENA-BARROSO, E; ESCALANTE-HERRERA, K; OLVERA-ESPINOSA, F. Evaluation of the estrogenic and oxidative stress effects of the UV filter 3-benzophenone in zebrafish (*Danio rerio*) eleuthero-embryos. **Ecotoxicology and Environmental Safety.** Vol.115, p. 14–18, 2015.

FRIES, E., ZARFL, C. Sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to low and high density polyethylene (PE). **Environmental Science and Pollution Research**. Vol. 19(4), p. 1296–1304, 2012.

GAGO-FERRERO, P; DÍAZ-CRUZ, M; BARCELÓ, D. An overview of UV-absorbing compounds (organic UV filters) in aquatic biota. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. Vol. 404, p. 2597-2610, 2012.

GAGO-FERRERO, P; ALONSO, M; BERTOZZI, C; MARIGO, J; BARBOSA, L; CREMER, M; SECCHI, E; DOMIT, C; AZEVEDO, A; LAILSON-BRITO, J; TORRES, J; MALM, O; ELJARRAT, E; DIAZ-CRUZ, M; BARCELO, D. First Determination of UV Filters in Marine Mammals. Octocrylene Levels in Franciscana Dolphins. **Environmental Science and Technology**. Vol. 47, p. 5619-5625, 2013.

GAGO-FERRERO, P; BADIA-FABREGAT, M; OLIVARES, A; PINA, B; BLANQUEZ, P; VICENT, T; CAMINAL, G; DIAZ-CRUZ, M; BARCELO, D. Evaluation of fungal- and photo-degradation as potential treatments for the removal of sunscreens BP3 and BP. **Science of the Total Environment**, p. 427–428, 2012.

GALLAO, M; GNOCCHI, K; CARVALHO, L; SILVA, B; BARBOSA, A; CHIPPARI-GOMES, A. The Impact of Sublethal Concentrations of Treated Leachate on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. Vol. 102, p. 519-524, 2019.

GOMES, M. **Avaliação dos efeitos de triclosan, triclocarban e suas misturas em diferentes bioindicadores**. 85 f. Dissertação. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2019.

GONZALEZ, H. Percutaneous absorption of the sunscreen benzophenone-3 after repeated whole-body applications, with and without ultraviolet irradiation. **British Journal of Dermatology**. Vol. 154, p. 337-340, 2006.

GRISOLIA, C; OLIVEIRA, A; BONFIM, H; KLAUTAU-GUIMARAES, M. Genotoxicity evaluation of domestic sewage in a municipal wastewater treatment plant. **Genetics and Molecular Biology**. Vol. 28, n. 2, 2005.

GUL, A. Investigation of acute toxicity of chlorpyrifos-methyl on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) larvae. **Chemosphere**. Vol. 59, p. 163-166, 2005.

HE, K; HAIN, E; TIMM, A; TARNOWSKI, M; BLANEY, L. Occurrence of antibiotics, estrogenic hormones, and UV-filters in water, sediment, and oyster tissue from the Chesapeake Bay. **Science of The Total Environment**. Vol. 650, p. 3101-3109, 2019.

HEDDLE, J. A. A rapid in vivo test for chromosome damage. **Mutation Research**. Vol. 18, p. 187- 192, 1973.

HILLEGASS, J; SHUKLA, A; LATHROP, S; MACPHERSON, M; FUKAGAWA, N; MOSSMAN, B. Assessing nanotoxicity in cells in vitro. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, p. 219-231, 2009.

HILLER, J; KLOTZ, K; MEYER, S; UTER, W; HOF, K; GREINER, A; GOEN, T; DREXLER, H. Systemic availability of lipophilic organic UV filters through dermal sunscreen exposure. **Environment International**. Vol. 132, 2019.

HUANG, Y; LAW, J; LAM, T; LEUNG, K. Risks of organic UV filters: a review of environmental and human health concern studies. **Science of The Total Environment**. Vol. 755, 2021.

HUANG, Y; LAW, J; ZHAO, Y; SHI, H; ZHANG, Y; LEUNG, K. Fate of UV filter Ethylhexyl methoxycinnamate in rat model and human urine: Metabolism, exposure and demographic associations. **Science of The total Environment**. Vol. 686, p. 729-736, 2019.

Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). Coordenação Geral de Acreditação. **ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS. DOQ-CGCRE-008**. 2011.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, **Radiation: Solar and Ultraviolet Radiation**. No. 100D, 2012.

International Union of Pure and Applied Chemistry Recommendations. Selectivity in Analytical Chemistry. **Chemistry International -- Newsmagazine for IUPAC**. Vol. 24, p. 21-22, 2001.

JANG, G; PARK, C; KANG, B; KIM, Y; LEE, K. Sequential assessment via daphnia and zebrafish for systematic toxicity screening of heterogeneous substances. **Environmental Pollution**. Vol. 216, p. 292–303. 2016.

JESUS, I; CESTARI, M; BEZERRA, M; AFFONSO, P. Genotoxicity Effects in Freshwater Fish from a Brazilian Impacted River. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. Vol. 96, p. 490-495, 2016.

JIANG, Z; HUNT, J; WOLFF, S. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**. Vol. 202, p.384- 389, 1992.

JIANG, Z; WOOLLARD, A; WOLFF, S. Lipid hydroperoxides measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**. Vol. 26, p.853-856, 1991.

JONG, W; CARRAWAY, J; GEERTSMA, R. In vivo and in vitro testing for the biological safety evaluation of biomaterials and medical devices. **Biocompatibility and Performance of Medical Devices**. Woodhead Publishing Series in Biomaterials, p. 120-158, 2012.

KEEN, J; HABIG, W; JAKOBY, W. Mechanism for several activities of the glutathione S- transferases. **Journal of Biological Chemistry**. Vol. 251, p.6183–6188, 1976.

KIM, S. JUNG, D. KHO, Y., CHOI, K. Effects of benzophenone-3 exposure on endocrine disruption and reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*)—a two generation exposure study. **Aquatic Toxicology**. Vol. 155 (October), 244–252, 2014.

KROON, F; STREten, C; HARRIES, S. A protocol for identifying suitable biomarkers to assess fish health: A systematic review. **Public Library of Science (PLOS One)**. Vol. 12, 2017.

LAPUENTES, J; LOURENÇO, J; MENDO, S; BORRAS, M; MARTINS, M; COSTA, P; PACHECO, M. The Comet Assay and its applications in the field of ecotoxicology: a mature tool that continues to expand its perspectives. **Frontiers in Genetics**. Vol. 6, 2015.

LAUTENSCHLAGER, S; WULF, H; PITTELKOW, M. Photoprotection. **The Lancet**. Vol. 370, p. 528-537, 2007.

LI, A; LAW, J; CHOW, C; HUANG, Y; LI, K; LEUNG, K. Joint Effects of Multiple UV Filters on Zebrafish Embryo Development. **Environmental Science and Technology**. Vol. 52(16), p. 9460-9467. 2018.

LIMA, E; ABDALLA, D. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. Vol. 37, nº 3, 2001.

LIMA, L; MORAIS, P; ANDRADE, R; MATTOS, K; MORON, M. Use of biomarkers to evaluate the ecological risk of xenobiotics associated with agriculture. **Environmental Pollution**, p. 611-624, 2018.

LIU, V; GUANG-GUO, Y; SHAREEF, A; KOOKANA, R. Photostability of the UV filter benzophenone-3 and its effect on the photodegradation of benzotriazole in water. **Environmental Chemistry**, p. 581-588, 2011.

LIU, H; SUN, P; LIU, H; YANG, S; WANG, L; WANG, Z. Hepatic oxidative stress biomarker responses in freshwater fish *Carassius auratus* exposed to four benzophenone UV filters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. Vol. 119, , p. 116-122, 2015.

LORIGO, M.; MARIANA, M.; CAIRRAO, E. Photoprotection of ultraviolet-B filters: Updated review of endocrine disrupting properties. **Steroids**. Vol. 131, 2018.

MA, R; COTTON, B; LICHTENSTEIGER, W; SCHLUMPF, M. UV Filters with Antagonistic Action at Androgen Receptors in the MDA-kb2 Cell Transcriptional-Activation Assay. **Toxicological Sciences**. p. 43-50, 2003.

MANAIA, E; KAMINSKI, R; CORREA, M; CHIAVACCI, L. Inorganic UV filters. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. Vol. 49, n. 2, 2013.

MACMANUS-SPENCER, L; TSE, M; KLEIN, J; KRACUNAS, A. Aqueous Photolysis of the Organic Ultraviolet Filter Chemical Octyl Methoxycinnamate. **Environmental Science & Technology**. Vol. 45(9), p. 3931–3937, 2011.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Manual de Garantia da Qualidade Analítica: Resíduos e Contaminantes em Alimentos**. Brasília, 2011.

MARTINS, T; SANTOS, B; VIDEIRA, P; SILVA, T. Variação da composição química corporal de tilápias (*Oreochromis niloticus*) com o crescimento. **Colloquium Vitae**, Vol. 1(2), p. 117-122, 2010.

MATTA, M; ZUSTERZEEL, R; PILLI, N; PATEL, V; VOLPE, D; FLORIAN, J; OH, L; BASHAW, E; ZINEH, I; SANABRIA, C; KEMP, S; GODFREY, A; ADAH, S; COELHO, S; WANG, J; FURLONG, L; GANLEY, C; MICHELE, T; STRAUSS, D. Effect of Sunscreen Application under Maximal Use Conditions on Plasma Concentration of Sunscreen Active Ingredients: A Randomized Clinical Trial. **Journal of the American Medical Association**. Vol. 321, p. 2082-2091, 2019.

MILLER, T; BURY, N; OWEN, S; BARRON, L. Uptake, biotransformation and elimination of selected pharmaceuticals in a freshwater invertebrate measured using liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Chemosphere**, p. 389-400, 2017.

MITCHELMORE, C; HE, K; GONSIOR, M; HAIN, E; HEYES, A; CLARK, C; YOUNGER, R; SCHMITT-KOPPLIN, P; FEERICK, A; CONWAY, A; BLANEY, L. Occurrence and distribution of UV-filters and other anthropogenic contaminants in coastal surface water, sediment, and coral tissue from Hawaii. **Science of The Total Environment**. Vol. 670, p. 398-410, 2019.

MOLINS-DELGADO, D; MUNOZ, R; NOGUEIRA, S; ALONSO, M; TORRES, J; MALM, O; ZIOLLI, R; HAUSER-DAVIS, R; ELJARRAT, E; BARCELO, D; DIAZ-CRUZ, M. Occurrence of organic UV filters and metabolites in lebranche mullet (*Mugil liza*) from Brazil. **Science of the Total Environment**. Vol. 618, p. 451-459, 2018.

MOLINS-DELGADO, D; GAGO-FERRERO, P; DIAZ-CRUZ, M; BARCELO, D. Single and joint ecotoxicity data estimation of organic UV filters and nanomaterials toward selected aquatic organisms. Urban groundwater risk assessment. **Environmental Research**. Vol. 145, p. 126–134. 2016.

MUTHULAKSHMI, S; MAHARAJAN, K; HABIBI, H; KADIRVELU, K; VENKATARAMANA, M. Zearalenone induced embryo and neurotoxicity in zebrafish model (*Danio rerio*): Role of oxidative stress revealed by a multi biomarker study. **Chemosphere**. Vol. 198, p. 111-121, 2018.

NASH, J., TANNER, P. Relevance of UV filter/sunscreen product photostability to human safety. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**. Vol. 30, p. 88-95, 2014

NATARAJ, B; MAHARAJAN, K; HEMALATHA, D; RANGASAMY, B; ARUL, N; RAMESH, M. Comparative toxicity of UV-filter Octyl methoxycinnamate and its

photoproducts on zebrafish development. **Science of The Total Environment**. Vol. 718, 2020.

National Center for Biotechnology Information. **PubChem Compound Summary for CID 22571, Octocrylene**. 2022. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Octocrylene>>. Acesso em: 13 de janeiro de 2022.

National Center for Biotechnology Information. **PubChem Compound Summary for CID 21630, Octyl methoxycinnamate**. 2022. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Octyl-methoxycinnamate>>. Acesso em: 13 de janeiro de 2022.

National Center for Biotechnology Information. **PubChem Compound Summary for CID 4632, Oxybenzone**. 2022. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Oxybenzone>>. Acesso em: 13 de janeiro de 2022.

National Institute of Environmental Health Sciences. **Endocrine Disruptors**. U.S. Department of Health and Human Science, Research Triangle Park, 2019. Disponível em: <<https://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/endocrine/index.cfm>>. Acesso em 10 de dezembro de 2019.

PARK, C; JANG, J; KIM, S; KIM, Y. Single and mixture toxicity of three organic UV-filters, ethylhexyl methoxycinnamate, octocrylene, and avobenzone on *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. Vol. 137, p. 57–63. 2017.

PATTANAARGSON, S; LIMPHONG, p. Stability of octyl methoxycinnamate and identification of its photo-degradation product. **International Journal of Cosmetic Science**. Vol. 23, p. 153-160, 2001.

PERIS-VICENTE, ESTEVE-ROMERO, CARDA-BROCH. Validation of Analytical Methods Based on Chromatographic Techniques: An Overview. **Analytical Separation Science**. 1 ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. First Edition. 2015.

POMPEI, C; CAMPOS, L; SILVA, B; FOGO, J; VIEIRA, E. Occurrence of PPCPs in a Brazilian water reservoir and their removal efficiency by ecological filtration. **Chemosphere**. p. 210-219, 2019.

PRABU, S; THIRUMURUGAN, R; SURIYAPRAKASH, T. The Role of the Drug Discovery, Clinical, and Regulatory Affairs Teams in Turning a Potent Agent into a Registered Product. **Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering**, 2014.

PURRÀ, M; CINCA, R; LEGAZ, J; NUNEZ, O. Solid-phase extraction and field-amplified sample injection–capillary zone electrophoresis for the analysis of benzophenone UV filters in environmental water samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2014.

PLOTKA-WASYLKA, J; RUTKOWSKA, M; OWCZAREK, K; TOBISZEWSKI, M; NAMIESNIK, J. Extraction with environmentally friendly solvents. **Trends in Analytical Chemistry**. Vol. 91, p. 12-25, 2017.

RAI, R; SHANMUGA, S; SRINIVAS, C. Update on Photoprotection. **Indian Journal of Dermatology**, Vol. 57(5). 2012.

RAINIERI, S; BARRANCO, A; PRIMEC, M; LANGERHOLC, T. Occurrence and toxicity of musks and UV filters in the marine environment. **Food and Chemical Toxicology**, p. 57-68, 2017.

RAMOS, S; HOMEM, V; ALVES, A; SANTOS, L. Advances in analytical methods and occurrence of organic UV-filters in the environment — A review. **Science of The Total Environment**. Vol. 526, p. 278-311, 2015.

RAMSDORF, W. **Avaliação da toxicidade dos compostos fipronil, nitrato de chumbo e naftaleno em peixes**. 154 f. 2011. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Paraná, 2011.

RIBANI, M; BOTTOLI, C; COLLINS, C; JARDIM, I; MELO, L. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**. Vol. 27, nº 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, F; FERREIRA, M; MORANO, S; SILVA, L; SCHNEIDER, R. Validation spreadsheet: a new tool for estimating the analytical figures of merit for the validation of univariate methods. **Química Nova**. Vol. 31, n 1, 2008.

RIBEIRO, G. **Desenvolvimento e validação de método analítico para análise de parabenos em tecido de peixes**. 2014. 65 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2014.

RIBEIRO, L; SALVADORI, D; MARQUES, E. **Mutagênese Ambiental**. Editora da ULBRA, 2003.

RIVERO-WENDT, c; MIRANDA-VILELA, A; FERREIRA, M; BORGES, A; GRISOLIA, C. Cytogenetic toxicity and gonadal effects of 17 α -methyltestosterone in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) and *Oreochromis niloticus* (Cichlidae). **Genetics and Molecular Research**. Vol. 12, p. 3862-3879, 2013.

ROCHA, B; OLIVEIRA, S; SILVA, R; BARCELOS, G; OLIVEIRA, A; BARBOSA, F. An eco-friendly sample preparation procedure base on low-density solvent-based air-assisted liquid-liquid microextraction for the simultaneous determination of 21 potential endocrine disruptors in urine samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Microchemical Journal**. Vol. 147, p. 207-214, 2019.

RODIL, R; MOEDER, M; ALTENBURGER, R; SCHMITT-JANSEN, M. Photostability and phytotoxicity of selected sunscreen agents and their degradation mixtures in water. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. Vol. 395(5), p. 1513-1524, 2009.

RUSZKIEWICZ, J; PINKAS, A; FERRER, B; PERES, T; TSATSAKIS, A; ASCHNER, M. Neurotoxic effect of active ingredients in sunscreen products, a contemporary review. **Toxicology Reports**. Vol. 4, p. 245-259, 2017.

SALVATIERRA-STAMP, V; CEBALLOS-MAGANA, S; GONZALEZ; J; IBARRA-GALVAN, V; MUNIZ-VALENCIA, R. Analytical method development for the determination of emerging contaminants in water using supercritical-fluid chromatography coupled with diode-array detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. Vol. 407, p. 4219-4226, 2015.

SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, A; RODRIGO SANZ, M; BETANCORT RODRÍGUEZ, J. Occurrence of eight UV filters in beaches of Gran Canaria (Canary Islands). An approach to environmental risk assessment. **Chemosphere**. Vol. 131, p. 85–90. 2015.

Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS). **Opinion on Octocrylene (CAS No 6197-30-4, EC No 228-250-8), preliminary version of 15 January 2021, final version of 30-31 March 2021, SCCS/1627/21.**

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**. Vol. 31, p. 9-15, 1975.

SPONCHIADO, G; REYNALDO, E; ANDRADE, A; VASCONCELOS, E; ADAM, M; OLIVEIRA, C. Genotoxic Effects in Erythrocytes of *Oreochromis niloticus* Exposed to Nanograms-per-Liter Concentration of 17 β -Estradiol (E₂): An Assessment Using Micronucleus Test and Comet Assay. **Water Air Soil Pollut**, 2011.

SKOOG, D; HOLLER, J; DONALD, W; CROUC, S. **Fundamentos da Química Analítica**. Cengage Learning, 8 ed, 2006.

SOUZA, T; FONTANETTI, C. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. Vol. 605, p. 87-93, 2006.

SUMMAK, S; AYDEMIR, N; VATAN, O; YILMAZ, D; ZORLU, T; BILALOGLU, R. Evaluation of genotoxicity from Nilufer Stream (Bursa/Turkey) water using piscine micronucleus test. **Food and Chemical Toxicology**. Vol. 48, p. 2443-2447, 2010.

SWARTZ, M. HPLC Detectors: A Brief Review. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**. Vol. 33, p. 1130–1150, 2010.

TAO, J; BAI, C; CHEN, Y; ZHOU, H; LIU, Y; SHI, Q; PAN, W; DONG, H; LI, L; XU, H; TANGUAY, R; HUANG, C; DONG, Q. Environmental relevant concentrations of benzophenone-3 induced developmental neurotoxicity in zebrafish. **Science of the Total Environment**. Vol. 721. 2020.

TIWARI, G.; TIWARI, R. Bioanalytical method validation: An updated review. **Pharmaceutical Methods**. p. 25–38, 2010.

TSUI, M; CHEN, L; HE, T; WANG, Q; HU, C; LAM, J; LAM, P. Organic ultraviolet (UV) filters in the South China sea coastal region: Environmental occurrence, toxicological

effects and risk assessment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. Vol. 181, p. 26-33, 2019.

TSUI, M; LEUNG, H; WAI, T; YAMASHITA, N; TANIYASU, S; LIU, W; LAM, P; MURPHY, M. Occurrence, distribution and ecological risk assessment of multiple classes of UV filters in surface waters from different countries. **Water Research**. Vol. 67, p. 55–65. 2014.

UBER, T; HUFFER, T; PLANITZ, S; SCHMIDT, T. Characterization of sorption properties of high-density polyethylene using the poly-parameter linear free-energy relationships. **Environmental Pollution**. Vol. 248, p. 312-319. 2019.

UGBOLUE, S. **Polyolefin Fibres: Structure, Properties and Industrial Applications**. 2nd edition. Woodhead Publishing, 2017.

United States Food and Drug Administration (US-FDA); **Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation**, 2001.

VALENTE, D; COSTA-AMARAL, I; CARVALHO, L; SANTOS, M; CASTRO, V; RODRIGUES, D; FALCO, A; SILVA, C; NOGUEIRA, S; GOLÇALVES, E; MOREIRA, J; ANDRÉ, L; TEIXEIRA, L; SARCINELLI, P; SISENANDO, H; OLIVEIRA, M; PERINI, J; MATTOS, R; LARENTIS, A. Utilização de biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**. Vol. 42, 2017.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. Vol. 13, p. 57-149, 2003.

VICENTINI, M. **Cádmio e seu potencial efeito tóxico em fêmeas de *Rhamdia quelen* (SILURIFORMES: HEPTAPTERIDAE), com ênfase no eixo reprodutivo**. 2017. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2017.

VIDAL. Tilápias: Manual Prático de Criação. **Centro de Produções Técnicas**. Acesso em 03/2020: < <http://cptstatic.s3.amazonaws.com/pdf/cpt/piscicultura/tilapias-cursos-cpt.pdf>>

VIDAL-LINAN, L; VILLAVERDE-DE-SÁA, E; RODIL, R; QUINTANA, J; BEIRAS, R. Bioaccumulation of UV filters in *Mytilus galloprovincialis* mussel. **Chemosphere**. Vol. 190, p. 267–271, 2018.

ZAGATTO, P; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. São Carlos: Rima, 2006.

ZIARRUSTA, H; MIJANGOS, L; MONTES, R; RODIL, R; ANAKABE, E; IZAGIRRE, U; PRIETO, A; ETXEBARRIA, N; OLIVARES, M; ZULOAGA, O. Study of bioconcentration of oxybenzone in gilt-head bream and characterization of its by-products. **Chemosphere**. Vol. 208, p. 308-407. 2018.

WANG, J; PAN, L; WU, S; LU, L; XU, Y; ZHU, Y; GUO, M; ZHUANG, S. Recent Advances on Endocrine Disrupting Effects of UV Filters. **International Journal of Environmental Research on Public Health**. Vol. 13, 2016.

WANG, W. Bioaccumulation and Biomonitoring. **Marine Ecotoxicology Current Knowledge and Future Issues**, p. 99-119, 2016.

WENDT, C. **Avaliação toxicológica do hormônio 17 Alfa metiltestosterona em espécies aquáticas**. 2013. 198 f., il. Tese (Doutorado em Patologia Molecular)—Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

World Health Organization. **Ultraviolet Radiation (UV): Individual protection against UV**. Disponível em: <<https://www.who.int/uv/faq/protect/en/index5.html>> Acesso em 22 de janeiro de 2020.

YAN, S., LIANG, M., CHEN, R., HONG, X., ZHA, J. Reproductive toxicity and estrogen activity in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to environmentally relevant concentrations of octocrylene. **Environmental Pollution**. Vol. 261. 2020.

YANG et al. Chlorination and chloramination of benzophenone-3 and benzophenone-4 UV filters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. Vol. 163, p. 528-535. 2018.

APÊNDICE A – Resultados do teste do micronúcleo pisco

Grupo	Aquário (Tratamento)	Animal	Células Avaliadas	Células Normais	Células com Micronúcleo	Células com Alterações Morfológicas
GRUPO 1	1 (Controle)	1	X	X	X	X
	1 (Controle)	2	2000	1957	0	43
	1 (Controle)	3	2000	1973	0	27
	1 (Controle)	4	2000	1960	0	40
	1 (Controle)	5	2000	1965	0	35
	2 (Controle)	6	X	X	X	X
	2 (Controle)	7	X	X	X	X
	2 (Controle)	8	2000	1962	0	38
	2 (Controle)	9	2000	1965	0	35
GRUPO 2	3 (0,045% etanol)	10	2000	1970	0	30
	3 (0,045% etanol)	11	2000	1963	0	37
	3 (0,045% etanol)	12	2000	1962	0	38
	3 (0,045% etanol)	13	2000	1976	0	24
	4 (0,045% etanol)	14	X	X	X	X
	4 (0,045% etanol)	15	X	X	x	X
	4 (0,045% etanol)	16	2000	1963	0	37
	4 (0,045% etanol)	17	2000	1950	0	50
	4 (0,045% etanol)	18	2000	1976	0	24
GRUPO 3	5 (0,001 mg·L ⁻¹)	19	2000	1966	0	34
	5 (0,001 mg·L ⁻¹)	20	X	X	X	X
	5 (0,001 mg·L ⁻¹)	21	2000	1960	0	40
	5 (0,001 mg·L ⁻¹)	22	2000	1965	0	35
	5 (0,001 mg·L ⁻¹)	23	2000	1963	0	37
	6 (0,001 mg·L ⁻¹)	24	2000	1973	0	27
	6 (0,001 mg·L ⁻¹)	25	2000	1954	0	46
	6 (0,001 mg·L ⁻¹)	26	2000	1966	0	34
	6 (0,001 mg·L ⁻¹)	27	2000	1966	0	34
GRUPO 4	7 (0,5 mg·L ⁻¹)	28	X	X	X	X
	7 (0,5 mg·L ⁻¹)	29	X	X	X	X
	8 (0,5 mg·L ⁻¹)	30	X	X	X	X
	8 (0,5 mg·L ⁻¹)	31	X	X	X	X
	8 (0,5 mg·L ⁻¹)	32	X	X	X	X
	8 (0,5 mg·L ⁻¹)	33	X	X	X	X
	8 (0,5 mg·L ⁻¹)	34	X	X	X	X
	8 (0,5 mg·L ⁻¹)	34	X	X	X	X

Nota: A letra X indica que o dado não foi obtido para esse indivíduo.

Fonte: Autoria própria (2022)

APÊNDICE B - Resultados do ensaio cometa alcalino

Grupo	Aquário (Tratamento)	Animal	Score Obtido
GRUPO 1	1 (Controle)	1	54
	1 (Controle)	2	56
	1 (Controle)	3	49
	1 (Controle)	4	41
	1 (Controle)	5	29
	2 (Controle)	6	X
	2 (Controle)	7	29
	2 (Controle)	8	32
	2 (Controle)	9	16
GRUPO 2	3 (0,045% etanol)	10	31
	3 (0,045% etanol)	11	X
	3 (0,045% etanol)	12	49
	3 (0,045% etanol)	13	39
	4 (0,045% etanol)	14	X
	4 (0,045% etanol)	15	X
	4 (0,045% etanol)	16	46
	4 (0,045% etanol)	17	62
GRUPO 3	4 (0,045% etanol)	18	50
	5 (0,001 mg·L ⁻¹)	19	43
	5 (0,001 mg·L ⁻¹)	20	X
	5 (0,001 mg·L ⁻¹)	21	72
	5 (0,001 mg·L ⁻¹)	22	38
	5 (0,001 mg·L ⁻¹)	23	34
	6 (0,001 mg·L ⁻¹)	24	22
	6 (0,001 mg·L ⁻¹)	25	39
GRUPO 4	6 (0,001 mg·L ⁻¹)	26	21
	6 (0,001 mg·L ⁻¹)	27	33
	7 (0,5 mg·L ⁻¹)	28	X
	7 (0,5 mg·L ⁻¹)	29	X
	8 (0,5 mg·L ⁻¹)	30	X
	8 (0,5 mg·L ⁻¹)	31	X
	8 (0,5 mg·L ⁻¹)	32	X
	8 (0,5 mg·L ⁻¹)	33	53
	8 (0,5 mg·L ⁻¹)	34	83

Nota: A letra X indica que o dado não foi obtido para esse indivíduo.

Fonte: Autoria própria (2022)

ANEXO

Processo 23064.037216/2018-19:

21/11/2018

SEI/UTFPR - 0563373 - Parecer



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS



PARECER: 2018-037 (APROVADO)/2018 - CEUA
 PROCESSO Nº: 23064.037216/2018-19
 INTERESSADO: WANESSA ALGARTE RAMSDORF NAGATA

DADOS DO PROJETO / AULA PRÁTICA	Protocolo nº 2018-37
Título: Desenvolvimento e validação do método cromatográfico para determinação de octilmetoxicinamato (OMC) e biomarcadores de peixe	
Pesquisador / Professor: Prof. Wanessa Algarte Ramsdorf Nagata	
Área temática: Toxicologia	
Instituição: UTFPR/ Curitiba	
Financiamento: Não	
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEUA	Protocolo nº 2018-37
<p>Apresentação do Projeto:</p> <p>Essa pesquisa visa investigar o potencial acumulador do componente octilmetoxicinamato (OMC) em tecidos de tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>) e seus efeitos ecotoxicológicos. O OMC é comum em cosméticos e protetores solares, e facilmente incorporado ao esgoto doméstico. Tratamentos convencionais de esgoto são ineficientes para a remoção dessas substância, que pode se acumular em compartimentos abióticos e bióticos. Quando acumulado em tecidos, o OMC age como disruptor endócrino, e pelo processo de bioacumulação pode atingir humanos.</p> <p>A metodologia proposta é controlar a contaminação de tilápias juvenis em laboratório para em seguida utilizar solventes diversos para extrair OMC de tecidos musculares e hepáticos. Os peixes serão mantidos em condições laboratoriais com controle de variáveis abióticas e alimentação diária até a saciação por um período de 60 dias, sendo 30 de aclimação e 30 de experimento. Vinte peixes do total serão destinados para a validação do método cromatográfico. Após validação do método, os 60 peixes restantes serão distribuídos em dois tratamentos com concentrações diferentes OMC e um grupo controle. Durante a fase de experimento os peixes serão periodicamente expostos ao OMC, sob frequências que serão definidas de acordo com testes prévios de degradação do composto na água. Ao final do experimento espera-se que os peixes tenham atingido massa corpórea suficiente para avaliação da presença do OMC nos tecidos sanguíneo, muscular e hepático. Antes da remoção dos tecidos, os peixes serão anestesiados por imersão em solução de benzocaína, onde serão mantidos até a eutanásia.</p>	

<p>Objetivos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Desenvolver e validar um método bioanalítico utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a um detector por arranjo de diodos (DAD) para determinação do octilmetoxicinamato (OMC) em tecidos de peixe <i>Oreochromis niloticus</i> e análise de biomarcadores. - Otimizar um método de extração do OMC por Soxhlet da matriz biológica fortificada - Desenvolver e validar um método de separação, identificação e quantificação do OMC por CLAE-DAD -Aplicar o método na determinação dos analitos de interesse em animais expostos a condições laboratoriais - Avaliar danos decorrentes em biomarcadores genéticos e bioquímicos após exposição subcrônica dos peixes ao OMC
<p>Avaliação dos Riscos e Benefícios:</p> <p>A autora lista possíveis reações adversas e imprevistas dos organismos quando exposto ao composto OMC como risco. Os benefícios associados estão ligados ao estabelecimento de nova metodologia para identificar os efeitos do contaminante OMC em biomarcadores.</p>
<p>Comentários e Considerações sobre a Pesquisa / Aula prática:</p> <p>- O projeto apresenta clareza nos dados e nos objetivos e adota condutas pertinentes tanto de manutenção dos organismos em cativeiro quanto de eutanásia.</p>
<p>Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:</p> <p>Foram apresentados os seguintes termos e documentos:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Requerimento preenchido completamente e assinado pelo pesquisador responsável pelo projeto; 2) formulário unificado de encaminhamento do CEUA/UTFPR/DV; 3) projeto de pesquisa completo no modelo da PROPPG-CEUA; 4) declaração de não início do projeto (com assinatura e data); 5) registro de projeto junto a Diretoria responsável (anuência da DIRPPG).
<p>Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:</p> <p>Não há</p>
<p>Situação do Parecer:</p> <p>APROVADO</p>
<p>Considerações Finais a Critério da CEUA: Todos os procedimentos devem seguir a lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008.</p>

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Desenvolvimento e validação do método cromatográfico para determinação de octilmetoxicinamato (OMC) e biomarcadores de peixe**", protocolo nº 2018/37 sob a responsabilidade de **Wanessa Algarte Ramsdorf Nagata** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UTFPR) da UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ, em reunião de 13/11/2018.

CERTIFICATION

The Ethics Commission on Animal Use (CEUA) of Federal University of Technology – Paraná (UTFPR), CERTIFIES that the request herein identified by the protocol number 2018/ 37, coordinated and under the

21/11/2018

SEI/UTFPR - 0563373 - Parecer

responsibility of **Wanessa Algarte Ramsdorf Nagata**, which involves the production, maintenance and / or use of animals belonging to the phylum Chordata, sub-phylum Vertebrata (except human species), for the purposes of scientific research (or teaching), is in accordance with provisions of the Brazilian Law no. 11794 (October 8th, 2008), the Decree nº 6.899 (July 15th, 2009) and with further regulations published by the Brazilian National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA).

Vigência do projeto:	01/ janeiro /2018 - 30/dezembro/2020
Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Espécie/linhagem:	<i>Oreochromis niloticus</i>
Número de animais:	80
Peso/Idade:	4g/juvenis
Sexo:	machos e fêmeas
Origem:	Piscicultura (aquisição comercial de produtor regularizado na cidade)

Dois Vizinhos, 19 de novembro de 2018.

Assinado por:

Nédia de Castilhos Ghisi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná



Documento assinado eletronicamente por **NEDIA DE CASTILHOS GHISI, PRESIDENTE DA COMISSÃO**, em 19/11/2018, às 14:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.utfpr.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0563373** e o código CRC **0981109A**.

Referência: Processo nº 23064.037216/2018-19

SEI nº 0563373