

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

VINÍCIUS DE CARVALHO SOARES DE PAULA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE FOTOPROTETORES EM ORGANISMOS
AQUÁTICOS**

DISSERTAÇÃO

**CURITIBA
2019**

VINÍCIUS DE CARVALHO SOARES DE PAULA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE FOTOPROTETORES EM ORGANISMOS
AQUÁTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Orientadora: Profa. Dra. Adriane Martins de Freitas

Coorientadoras: Profa. Dra. Lucia Regina Rocha Martins

Profa. Dra. Flávia Yoshie Yamamoto

CURITIBA
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Paula, Vinícius de Carvalho Soares de
Avaliação dos efeitos de fotoprotetores em organismos aquáticos
[recurso eletrônico] / Vinícius de Carvalho Soares de Paula.-- 2019.
1 arquivo texto (94 f.): PDF; 3,05 MB.

Modo de acesso: World Wide Web
Título extraído da tela de título (visualizado em 15 abr. 2019)
Texto em português com resumo em inglês
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do
Paraná. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia
Ambiental, Curitiba, 2019
Bibliografia: f. 78-86

1. Tecnologia ambiental - Dissertações. 2. Radiação ultravioleta -
Impactos. 3. Radiação ultravioleta - Proteção - Impactos. 4. Organismos
aquáticos - Efeito das inovações tecnológicas. 5. Organismos aquáticos -
Efeito da radiação. 6. Organismos aquáticos - Morfologia. 7. Morfologia. I.
Freitas, Adriane Martins de. II. Martins, Lúcia Regina Rocha. III.
Yamamoto, Flávia Yoshie. IV. Universidade Tecnológica Federal do
Paraná - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia
Ambiental. V. Título.

CDD: Ed. 23 – 363.7

Biblioteca Central da UTFPR, Câmpus Curitiba
Bibliotecário: Adriano Lopes CRB-9/1429

TERMO DE APROVAÇÃO DE DISSERTAÇÃO Nº 116

A Dissertação de Mestrado intitulada: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE FOTOPROTETORES EM ORGANISMOS AQUÁTICOS, defendida em sessão pública pelo(a) candidato(a) **Vinicius de Carvalho Soares de Paula**, no dia 25 de fevereiro de 2019, foi julgada para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental, área de concentração Tecnologias e Processos Ambientais, e aprovada em sua forma final, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Adriane Martins de Freitas – Presidente – UTFPR
Prof. Dr. Daniel Bussolaro – IFPR
Prof. Dr. William Gerson Matias – UFSC

A via original deste documento encontra-se arquivada na Secretaria do Programa, contendo a assinatura da Coordenação após a entrega da versão corrigida do trabalho.

Curitiba, 25 de fevereiro de 2019.

Dedico este trabalho a memória de meu avô do coração, João, que me acompanhou desde meus primeiros passos e muito me ensinou sobre a vida, sempre será meu exemplo de caráter e dedicação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado sabedoria, paciência e determinação para enfrentar as dificuldades que encontrei pelo caminho.

A minha família e à Sa, pelo apoio incondicional, carinho, amor, compreensão e dedicação.

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná, por me proporcionar uma formação gratuita e de qualidade.

A Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação (PROPPG - UTFPR) pela concessão da bolsa de mestrado.

A Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná pelo financiamento desta pesquisa através do edital 09/2016.

Às minhas orientadoras, Adriane Freitas, Flávia Yamamoto e Lucia Martins por abraçarem este trabalho, compartilharem seus conhecimentos e experiências. Obrigado por todos os ensinamentos, paciência, dedicação e confiança depositada em mim. Vocês são exemplos de profissionalismo e amor à pesquisa.

À professora Wanessa Ramsdorf, pelos ensinamentos e orientações em laboratório, além de todas as contribuições na banca de qualificação.

Ao professor Marcus Liz pelas contribuições na banca de qualificação.

À Monike, minha irmã científica, por todos os momentos em que passamos trabalhando juntos. Foram muitos dias de bioquímicos, ensaios crônicos, reuniões, “hamburgões” no RU, risos e muitas histórias para contar. Deixo aqui registrada a minha gratidão pela parceria, compreensão e acima de tudo, cumplicidade em nossa amizade. Sem sua ajuda esse trabalho não seria possível.

Aos queridos amigos e colegas do Laboratório de Ecotoxicologia da UTFPR, Eli, Yorrannys, Renan, Fer, Duda e Paloma pelo apoio, companheirismo, convivência, bons momentos e por formarem uma equipe de trabalho maravilhosa.

Aos queridos amigos que fiz na UTFPR e me acompanharam nessa trajetória, Michelle, Vivi, Ju Maestrelli, Ju Moreira, Rhael, Mazepa, Fred, Cami, Raquel, Emeline, Bárbara, Rafa, Regi, Rhai, Luís e Roberson.

Por fim, a todos que de alguma forma contribuíram para minha formação e realização desse trabalho.

RESUMO

PAULA, Vinícius de Carvalho Soares de. **Avaliação dos Efeitos de Fotoprotetores em Organismos Aquáticos**. 94f. Dissertação. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2019.

Filtros ultravioleta (UV) são moléculas utilizadas para proteção contra radiação UVA (320-400 nm) e UVB (280-320 nm) e estão presentes em produtos de higiene pessoal como cremes, loções corporais e fotoprotetores. Devido à baixa eficiência dos sistemas de coleta e tratamento de esgotos, os ecossistemas aquáticos são os principais destinos dessas moléculas, sendo encontradas em ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$. A presença dessas substâncias no ambiente é preocupante devido ao potencial para causar efeitos deletérios em organismos aquáticos. Este trabalho teve como principal objetivo avaliar os efeitos de 2-etilhexil, 4-metoxicinamato (EHMC), avobenzona (AVO), benzofenona-3 (BF-3) e octocrileno (OC), através de exposições agudas e crônicas, em organismos aquáticos de diferentes níveis tróficos. Considerando esses fatores, inicialmente foi avaliada a toxicidade aguda (*Artemia salina*; *Daphnia magna*) e crônica (*Desmodesmus subspicatus*; *Daphnia magna*) para determinação de CE_{50} , CENO e quociente de risco ecológico. Em seguida foram realizados ensaios de toxicidade considerando concentrações de relevância ambiental, expondo embriões de *Rhamdia quelen*, duas gerações consecutivas de *Daphnia magna* e posterior avaliação de múltiplos biomarcadores bioquímicos (acetilcolinesterase - AChE; catalase - CAT; glutationa-S-trasferase - GST; superóxido dismutase - SOD; carbonilação de proteínas - PCO). Nas análises iniciais, EHMC se mostrou o mais tóxico para todos os organismos testados (*Desmodesmus subspicatus*: $\text{CE}_{50} = 0,37 \text{ mg L}^{-1}$, CENO = $0,05 \text{ mg L}^{-1}$; *Artemia salina* $\text{CE}_{50} = 0,37 \text{ mg L}^{-1}$; *Daphnia magna* $\text{CE}_{50} = 0,50 \text{ mg L}^{-1}$, CENO = $0,009 \text{ mg L}^{-1}$) e embora tenha apresentado alta toxicidade, foi considerado sem risco ecológico, conforme aplicação de estimativa matemática pelo método do quociente de risco. Contudo, nos ensaios multigeracionais com *Daphnia magna* foram observados atrasos reprodutivos na segunda geração exposta, em AVO 4450 ng L^{-1} , BF-3 175 ng L^{-1} e MIX (mistura das quatro moléculas), como também, diminuição das taxas de reprodução em AVO, BF-3, EHMC 224 ng L^{-1} e MIX, além de aumento da atividade de CAT, evidenciando indução do sistema antioxidante causado por AVO e BF-3. Os embriões de *Rhamdia quelen* apresentaram aumento da atividade de CAT, induzida pelos quatro fotoprotetores e sua mistura, também foram observados índices significativos de malformações causadas pela exposição a AVO, EHMC, OC e MIX. A concentração de proteínas carboniladas também foi aumentada em EHMC, o que sugere dano oxidativo. Concluiu-se que a exposição de organismos aquáticos a filtros solares, mesmo em concentrações ambientais, é nociva e pode ser prejudicial ao ciclo de vida das espécies, afetando o desenvolvimento embrionário e reprodutivo.

Palavras-chave: Filtros UV. *Daphnia magna*. Multigeracional. *Rhamdia quelen*. Anomalias morfológicas.

ABSTRACT

PAULA, Vinícius de Carvalho Soares de. **Evaluation of Effects of Photoprotectors on Aquatics Organisms**. 94f. Master's thesis. Graduate Program in Environmental Science and Technology. Federal Technological University of Paraná. Curitiba, 2019.

Ultraviolet (UV) filters are molecules used to protect against UVA (320-400 nm) and UVB (280-320 nm) radiation and are present in personal care products such as creams, body lotions and photoprotectors. Due to the low efficiency of sewage collection and treatment systems, aquatic ecosystems are the main destinations of these molecules, being found in ng L^{-1} to $\mu\text{g L}^{-1}$. The presence of these substances in the environment is of concern because of the potential to cause deleterious effects on aquatic organisms. The aim of this study was to evaluate the effects of 2-ethylhexyl, 4-methoxycinnamate (EHMC), avobenzone (AVO), benzophenone-3 (BF-3) and octocrylene (OC) on aquatic organisms of different trophic levels through acute and chronic exposures. Considering these factors, it was initially evaluated the acute (*Artemia salina*; *Daphnia magna*) and chronic (*Desmodesmus subspicatus*; *Daphnia magna*) toxicity for determination of EC_{50} , CENO and ecological risk quotient. Afterwards, toxicity tests were performed considering concentrations of environmental relevance, exposing embryos of *Rhamdia quelen*, two consecutive generations of *Daphnia magna* and subsequent evaluation of multiple biochemical biomarkers (acetylcholinesterase - AChE, catalase - CAT, glutathione-S-transferase - GST, superoxide dismutase - SOD, protein carbonylation - PCO). In the initial analyzes, EHMC showed to be the most toxic for all the organisms tested (*Desmodesmus subspicatus*: $\text{EC}_{50} = 0.37 \text{ mg L}^{-1}$, CENO = 0.05 mg L^{-1} , *Artemia salina* $\text{EC}_{50} = 0.37 \text{ mg L}^{-1}$; *Daphnia magna* $\text{EC}_{50} = 0.50 \text{ mg L}^{-1}$, CENO = 0.009 mg L^{-1}) and although it presented high toxicity, it was considered without ecological risk, according to the application of mathematical estimation by the risk quotient method. However, in the multigenerational studies with *Daphnia magna*, reproductive delays were observed in the second generation exposed with AVO 4450 ng L^{-1} , BF-3 175 ng L^{-1} and MIX (mixture of the four molecules), as well as decrease in reproduction rates with AVO, BF-3, EHMC 224 ng L^{-1} and MIX, besides induction of CAT activity, evidencing an antioxidant system response caused by AVO and BF-3. The embryos of *Rhamdia quelen* showed increased CAT activity induced by the four photoprotectors and their mixture, also significant index of malformations caused by exposure to AVO, EHMC, OC and MIX were observed. The concentration of carbonylated proteins was also increased in EHMC, suggesting oxidative damage. It was concluded that the exposure of aquatic organisms to UV filters, even at environmental concentrations, is harmful and can be detrimental to the life cycle of the species, affecting the embryonic and reproductive development.

KEYWORDS: UV Filters. *Daphnia magna*. Multigenerational. *Rhamdia quelen*. Morphological anomalies.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de ação dos filtros UV.	15
Figura 2. Aporte dos filtros UV ao ambiente. Legenda: PHPs: Produtos de higiene pessoal; ETE: Estação de tratamento de esgoto. Fonte: adaptado de Pestotnik, Kosjek e Heath; p. 460, 2014.	16
Figura 3. Estrutura química de 2-etilhexil-4-metoxicinamato, avobenzona, benzofenona-3 e octocrileno.....	17
Figura 4. Curvas dose-resposta obtidas para determinação da $CE_{50(72h)}$ em <i>Desmodesmus subspicatus</i>	31
Figura 5. Curvas dose-resposta obtidas para determinação da $CE_{50(48h)}$ em <i>Artemia salina</i>	33
Figura 6. Curvas dose-resposta obtidas para determinação da $CE_{50(48h)}$ em <i>Daphnia magna</i>	35
Figura 7. Taxas de reprodução dos grupos controle e amostras para 21 dias de exposição.....	37
Figura 8. Tempo necessário para primeira reprodução nas gerações F0 e F1..	50
Figura 9. Taxas de reprodução observadas em F0 e F1.	51
Figura 10. Atividade das enzimas catalase e glutationala-S-transferase medidas em F0 e F1.....	53
Figura 11. Atividade da enzima superóxido dismutase em F1 e F0.....	55
Figura 12. Índices de deformidades em 24, 72 e 96 horas.....	70
Figura 13. Atividade dos biomarcadores bioquímicos acetilcolinesterase, catalase, glutationala-S-transferase e superóxido dismutase em embriões de <i>Rhamdia quelen</i>	73
Figura 14. Concentração e carbonilas em embriões de <i>Rhamdia quelen</i>	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações de fotoprotetores utilizadas para avaliação de toxicidade crônica em <i>Desmodesmus subspicatus</i>	25
Tabela 2. Concentrações de fotoprotetores utilizadas para avaliação de toxicidade aguda em <i>Artemia salina</i>	27
Tabela 3. Concentrações de fotoprotetores utilizadas para avaliação de toxicidade aguda em <i>Daphnia magna</i>	28
Tabela 4. Concentrações de fotoprotetores utilizadas para avaliação de toxicidade crônica em <i>Daphnia magna</i>	29
Tabela 5. Índices de classificação de risco ecológico.	30
Tabela 6. Valores de CE _{50(48h)} e CENO obtidos em comparação com valores encontrados na literatura científica.	32
Tabela 7. Valores de CE _{50(48h)} resultantes em comparação com dados da literatura científica.	36
Tabela 8. Valores de CENO obtidos em comparação com valores de CE _{50(48h)} . ..	37
Tabela 9. Valores de CE _{50(48h)} , CENO obtidos e utilizados para o cálculo do quociente de risco.	38
Tabela 10. Amostras e concentrações de fotoprotetores em exposição multigeracional com <i>Daphnia magna</i>	42
Tabela 11. Percentual de longevidade obtido para cada amostra testada em ensaio multigeracional com <i>Daphnia magna</i>	49
Tabela 12. Amostras para exposição de embriões de <i>Rhamdia quelen</i>	60
Tabela 13. Escore associado às categorias e tipos de anomalia morfológica observadas em <i>Rhamdia quelen</i>	61
Tabela 14. Percentuais de mortalidade observados em embriões de <i>Rhamdia quelen</i>	69
Tabela 15. Percentuais de anomalias morfológicas em embriões de <i>Rhamdia quelen</i> por categoria.	71

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo Geral	13
2.2 Objetivos específicos	13
3 REFERENCIAL TEÓRICO	14
3.1 Filtros Ultravioleta	14
3.1.1 Filtro solar orgânico e sua ação.....	16
3.2 Monitoramento Ecotoxicológico	18
3.2.1 <i>Desmodesmus subspicatus</i>	19
3.2.2 <i>Daphnia magna</i>	20
3.2.3 <i>Artemia salina</i>	21
3.2.4 <i>Rhamdia quelen</i>	21
3.2.5 Biomarcadores bioquímicos.....	22
CAPÍTULO I – Avaliação da toxicidade de filtros UV utilizando diferentes organismos indicadores	24
1 INTRODUÇÃO	24
2 MATERIAL E MÉTODOS	25
2.1 Reagentes	25
2.2 Avaliação da toxicidade crônica de AVO, BF-3, EHMC e OC em <i>Desmodesmus subspicatus</i>	25
2.3 Avaliação da toxicidade aguda de AVO, BF-3, EHMC e OC em <i>Artemia salina</i>	26
2.4 Avaliação da toxicidade aguda de AVO, BF-3, EHMC e OC em <i>Daphnia magna</i>	27
2.5 Avaliação da toxicidade crônica de AVO, BF-3, EHMC e OC em <i>Daphnia magna</i>	28
2.6 Determinação do quociente de risco ecológico	30
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
3.1 Toxicidade crônica de AVO, BF-3, EHMC e OC em <i>Desmodesmus subspicatus</i>	31
3.2 Toxicidade aguda de AVO, BF-3, EHMC e OC em <i>Artemia salina</i>	32
3.3 Toxicidade aguda de AVO, BF-3, EHMC e OC em <i>Daphnia magna</i>	34
3.4 Toxicidade crônica de AVO, BF-3, EHMC e OC em <i>Daphnia magna</i>	36

3.5 Caracterização do risco ecológico.....	38
4 CONCLUSÃO.....	40
CAPÍTULO II – Efeitos multigeracionais de concentrações ambientais de filtros UV em <i>Daphnia magna</i>.....	41
1 INTRODUÇÃO.....	41
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
2.1 Reagentes.....	42
2.2 Toxicidade crônica multigeracional em <i>Daphnia magna</i>.....	42
2.3 Biomarcadores bioquímicos.....	44
2.3.1 Determinação de proteínas totais.....	44
2.3.2 Atividade da enzima catalase (CAT).....	45
2.3.3 Atividade da enzima glutathiona-S-transferase (GST).....	46
2.3.4 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD).....	47
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
3.1 Toxicidade crônica multigeracional em <i>Daphnia magna</i>.....	49
3.2 Biomarcadores bioquímicos.....	53
4 CONCLUSÃO.....	57
CAPÍTULO III – Efeitos de concentrações ambientais de filtros UV em embriões de <i>Rhamdia quelen</i>.....	58
1 INTRODUÇÃO.....	58
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	59
2.1 Reagentes.....	59
2.2 Exposição e avaliação de anomalias morfológicas.....	59
2.3 Biomarcadores bioquímicos.....	61
2.3.1 Determinação e normalização da concentração de proteínas totais.....	62
2.3.2 Carbonilação de proteínas (PCO).....	63
2.3.3 Atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE).....	64
2.3.4 Atividade da enzima catalase (CAT).....	65
2.3.5 Atividade da enzima glutathiona-S-transferase (GST).....	66
2.3.6 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD).....	67
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
3.1 Avaliação de mortalidade e anomalias morfológicas.....	69
3.2 Biomarcadores bioquímicos.....	72
4 CONCLUSÃO.....	76

5 CONCLUSÃO GERAL.....	77
REFERÊNCIAS.....	78
APÊNDICE A – Carta Controle de sensibilidade de <i>Daphnia magna</i> ao sulfato de zinco.....	87
APÊNDICE B – Parecer emitido pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UTFPR) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.....	88
ANEXO A – Meio para pré-cultura de <i>Desmodesmus subspicatus</i>.....	90
ANEXO B - Meio nutriente DIN para testes de toxicidade com <i>Desmodesmus subspicatus</i>.....	91
ANEXO C – Meio Básico para teste de toxicidade aguda com <i>Daphnia magna</i>.....	92
ANEXO D – Meio de cultivo M4 para <i>Daphnia magna</i>.....	93
ANEXO E – Água reconstituída para ensaio de toxicidade aguda com <i>Rhamdia quelen</i>.....	94

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os resíduos de produtos de higiene pessoal (PHPs) são reconhecidos como contaminantes emergentes além de possuir presença global e um extenso mercado de consumo envolvendo fragrâncias, cosméticos e filtros solares (JJEMBA, 2008; BAKI; ALEXANDER, 2015).

Dentre os PHPs, os fotoprotetores ou filtros ultravioleta constituem uma importante categoria presente em produtos que oferecem proteção contra a radiação solar. São classificados como inorgânicos (refletem a radiação UV, exemplos: ZnO e TiO₂) e orgânicos, a partir da absorção dos raios e transformação em calor. Estão presentes na formulação de inúmeros produtos de higiene pessoal (PHPs), por exemplo: cremes, loções corporais, shampoos e protetores solares (AVENEL-AUNDRAN et al., 2010; PESTOTNIK; KOSJEK; HEATH, 2014; MANOVÁ; GOETZ; HUNGERBUEHLER, 2015; BAKI; ALEXANDER, 2015).

Esses contaminantes podem chegar aos ambientes aquáticos de forma direta, através de efluentes industriais, esgotos não tratados e remoção de frações aplicadas na pele em atividades recreativas; ou indireta, pela lixiviação de resíduos de embalagens em aterros e esgotos tratados com baixa eficiência. A presença dessas substâncias no ambiente é preocupante devido ao potencial para causar bioacumulação e efeitos deletérios nas populações e comunidades expostas (PESTOTNIK; KOSJEK; HEATH, 2014; SILVA, 2014; DÍAZ-CRUZ; BARCELÓ, 2015).

Devido ao consenso sobre os danos causados pela exposição excessiva a radiação solar, o consumo de fotoprotetores é crescente no mundo todo, com produção global de aproximadamente 10^6 ton ano⁻¹ (LI et al., 2007; CHAMPAGNE, 2009). Em um estudo realizado na Dinamarca por Wulf et al. (1997), foi demonstrado que 65% dos banhistas usavam um ou mais fotoprotetores e 46% deles aplicavam no corpo todo. Na Austrália, segundo Neale et al. (2002), 56% da população utilizava produtos contendo filtros UV, no mínimo, cinco dias por semana.

Durante o verão há um aumento nas atividades recreativas em praias, lagos, rios e piscinas, com isso, quantidades significativas de filtros UV são aportadas ao ambiente. Considerando que protetores solares são aplicados em aproximadamente 80% do corpo dos banhistas, sendo o peso médio de uma mulher adulta 65 kg e de um homem 78 kg, são aplicados aproximadamente 2,5 e 3 g dia⁻¹

de 2-etilhexil-4-metoxicinamato (EHMC), respectivamente (SHARIFAN; KLEIN; MORSE, 2016b).

Sharifan, Klein e Morse (2016a) estimaram o potencial de contaminação por filtros UV utilizados por banhistas em praias da costa do Texas, no Golfo do México. Dentre as substâncias analisadas, EHMC e octocrileno (OC) apresentaram os potenciais mais altos, 477 kg ano^{-1} e 318 kg ano^{-1} , respectivamente.

Devido à baixa eficiência dos sistemas de coleta e tratamento de esgotos, os ecossistemas aquáticos são os principais destinos dos fotoprotetores no ambiente (PESTOTNIK; KOSJEK; HEATH, 2014; SILVA, 2014). Esses compostos já foram encontrados em corpos hídricos (ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$), organismos aquáticos (ng g^{-1} peso seco) e até em água para consumo humano (ng L^{-1}) (DÍAZ-CRUZ, 2011; MAGI et al., 2012; GAGO-FERRERO; DÍAZ-CRUZ; BARCELÓ, 2013).

Existem poucos dados sobre a toxicidade de filtros UV orgânicos em ambientes aquáticos e ainda não são suficientes para uma avaliação de risco adequada (FENT et al., 2010; KAISER et al., 2012). As faixas de concentração efetiva (CE_{50}) para *Daphnia magna* foram observadas em mg L^{-1} , muito acima das concentrações encontradas nos ambientes aquáticos (FENT et al., 2010; PARK et al., 2017). Entretanto não há dados na literatura científica sobre avaliações da ecotoxicidade crônica relacionada a esses compostos (PESTOTNIK; KOSJEK; HEATH, 2014).

Bioensaios de toxicidade aguda, crônica e avaliação de biomarcadores bioquímicos são ferramentas importantes para verificar possíveis riscos que organismos e populações estão expostos em águas contaminadas com filtros UV. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os possíveis efeitos causados pela exposição de microalgas fitoplanctônicas, microcrustáceos dulcícolas e marinhos e embriões de peixe a quatro fotoprotetores orgânicos (2-etilhexil, 4-metoxicinamato, avobenzona, benzofenona-3 e octocrileno).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a toxicidade aguda e crônica de 2-etilhexil, 4-metoxicinamato (EHMC), avobenzona (AVO), benzofenona-3 (BF-3) e octocrileno (OC) em organismos aquáticos de diferentes níveis tróficos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a toxicidade crônica ($CE_{50(72h)}$, $CENO_{(72h)}$) de AVO, BF-3, EHMC, OC em *Desmodesmus subspicatus*;
- Avaliar a toxicidade aguda ($CE_{50(48h)}$) de AVO, BF-3, EHMC e OC em *Artemia salina*;
- Avaliar a toxicidade aguda e crônica ($CE_{50(48h)}$, $CENO_{(21d)}$) de AVO, BF-3, EHMC e OC em *Daphnia magna*;
- Calcular o quociente de risco ecológico utilizando dados de CE_{50} e CENO, obtidos experimentalmente, com *Desmodesmus subspicatus*, *Artemia salina*, *Daphnia magna* expostas a AVO, BF-3, EHMC e OC.
- Avaliar os efeitos multigeracionais de concentrações ambientais de AVO, BF-3, EHMC e OC e da mistura das quatro moléculas em *Daphnia magna*.
- Avaliar os biomarcadores bioquímicos: catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) e superóxido dismutase (SOD) após exposição multigeracional de *Daphnia magna*.
- Avaliar os efeitos de concentrações ambientais de AVO, BF-3, EHMC e OC e da mistura das quatro moléculas no desenvolvimento embrionário de *Rhamdia quelen* (jundiá);
- Avaliar os biomarcadores bioquímicos: acetilcolinesterase (AChE), CAT, GST, SOD e carbonilação de proteínas (PCO) após exposição de embriões de *Rhamdia quelen*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Filtros Ultravioleta

Devido às atividades industriais, agrícolas e urbanas adotadas pela sociedade atual, o meio ambiente é diariamente contaminado por inúmeros micropoluentes orgânicos (PESTOTNIK; KOSJEK; HEATH, 2014). Os produtos de higiene pessoal (PHPs) são reconhecidos como contaminantes emergentes no ambiente, sendo um grupo caracterizado por diversas substâncias químicas presentes em cosméticos, fragrâncias, sabonetes, repelentes e filtros solares (JJEMBA, 2008). Os PHPs apresentam potencial de persistência no ambiente e são encontrados em formas disponíveis para assimilação e acumulação biológica (NAMIESNIK et al., 2014).

Os filtros ultravioleta (UV) formam uma importante classe dos PHPs e são produzidos para gerar fotoproteção contra a radiação situada entre 320 nm e 400 nm, conhecida como ultravioleta A (UVA), que atinge a camada mais profunda da pele, causando escurecimento e fotoenvelhecimento. Também, oferecem proteção contra raios ultravioleta B (UVB: 280-320 nm), que penetram na epiderme e podem causar queimaduras. Os fotoprotetores são divididos a partir de seu mecanismo de ação em: filtros orgânicos e inorgânicos (PESTOTNIK; KOSJEK; HEATH, 2014; BAKI; ALEXANDER, 2015).

Filtros inorgânicos, também chamados de filtros físicos, funcionam a partir da reflexão e dispersão da radiação UV por óxidos metálicos, a exemplo do óxido de zinco (ZnO) e dióxido de titânio (TiO₂). Já os filtros orgânicos, ou químicos, possuem anéis aromáticos em sua estrutura que são responsáveis pela absorção dos raios UV. Estes compostos convertem a energia absorvida em calor, a partir da transição eletrônica para estados elevados de excitação molecular e retorno aos estados fundamentais de energia (BAKI; ALEXANDER, 2015). A figura 1 ilustra o princípio dos mecanismos de ação dos dois tipos de filtros UV.

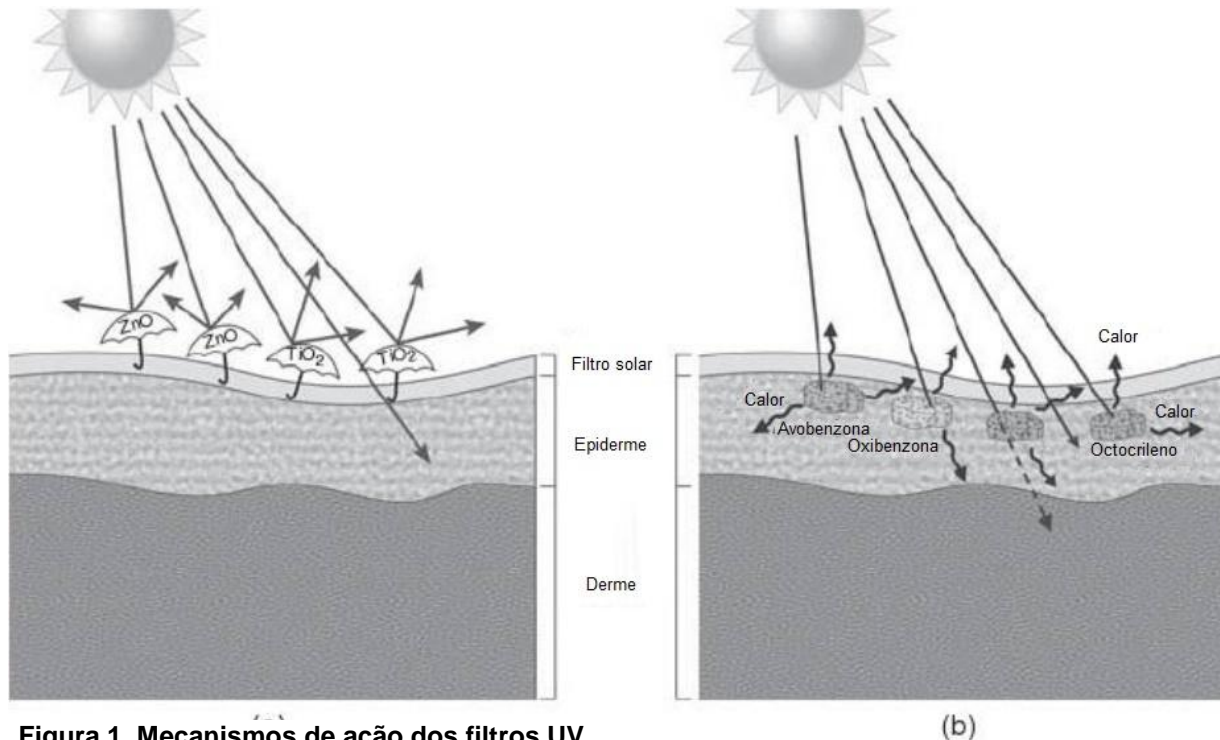


Figura 1. Mecanismos de ação dos filtros UV.
Legenda: (a) Filtro inorgânicos; (b) Filtro orgânicos.
Fonte: Adaptado de Baki e Alexander, p. 286, 2015.

Para garantir maiores espectros de proteção contra raios UV, filtros orgânicos são combinados em muitas formulações (FENT; KUNZAC; GOMEZD, 2008). Usualmente são misturados entre três e oito bloqueadores UV em uma formulação de fotoprotetor orgânico, representando até 15% do peso do produto final (FENT; ZENKER; RAPP, 2010). Cabe ressaltar que os filtros UV são aplicados em outros PHPs, como cremes, loções e batons, como também, em produtos têxteis, plásticos e tintas para evitar fotodegradação de pigmentos e polímeros. Com isso, uma quantidade expressiva desses compostos é disponibilizada no ambiente por meio de águas residuais do processo de fabricação, esgoto doméstico e descarte inadequado de embalagens (PESTOTNIK; KOSJEK; HEATH, 2014; DÍAZ-CRUZ; BARCELÓ, 2015; RAMOS et al., 2016).

No Brasil, a incorporação dessas substâncias em ambientes aquáticos é possivelmente alta, pois devido às características climáticas o consumo de produtos contendo filtros UV é elevado (MIZUKAWA et al., 2017). Além disso, o sistema de coleta e tratamento de efluentes domésticos possui baixa eficácia, sendo assim, a contaminação constante leva ao acúmulo e assimilação pelos ecossistemas (SILVA, 2014; GAGAO-FERRERO; DÍAZ-CRUZ; BACELÓ, 2015; MIZUKAWA et al., 2017). A figura 2 exemplifica as vias de contaminação por filtros UV em água.

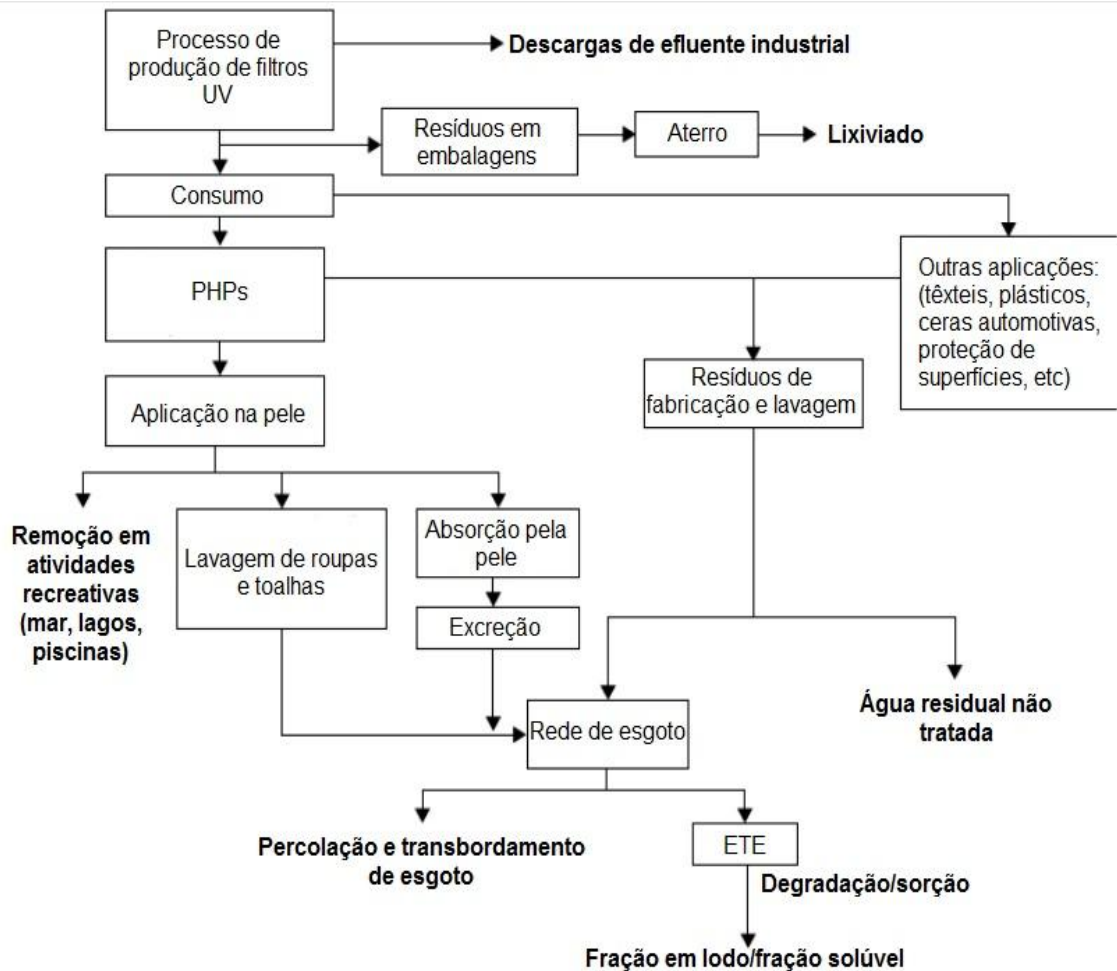


Figura 2. Aporte dos filtros UV ao ambiente.

Legenda: PHPs: Produtos de higiene pessoal; ETE: Estação de tratamento de esgoto.

Fonte: adaptado de Pestotnik, Kosjek e Heath; p. 460, 2014.

3.1.1 Filtro solar orgânico e sua ação

São exemplos de filtros orgânicos: 2-etilhexil-4-metoxicinamato (EHMC), avobenzona (AVO), benzofenona-3 (BF-3) e octocrileno (OC) (Figura 3) (BLÜTHGEN et al., 2014; PARK et al., 2017). Essas substâncias apresentam alto volume de produção e são algumas das mais utilizadas na indústria de PHPs (AVENEL-AUNDRAN et al., 2010; MANOVÁ; GOETZ; HUNGERBUEHLER, 2015). São moléculas de baixa solubilidade em água e alta lipofilicidade, o EHMC possui solubilidade de $0,156 \text{ mg L}^{-1}$ e $\log K_{ow} = 5,80$, BF-3 com $68,6 \text{ mg L}^{-1}$ e $\log K_{ow} = 3,79$, OC com $0,004 \text{ mg L}^{-1}$ e $\log K_{ow} = 6,88$ e AVO com $\log K_{ow} = 6,88$ (RODIL; SCHRADER; MOEDER, 2009; MOEDER et al., 2010; KAISER et al., 2012).

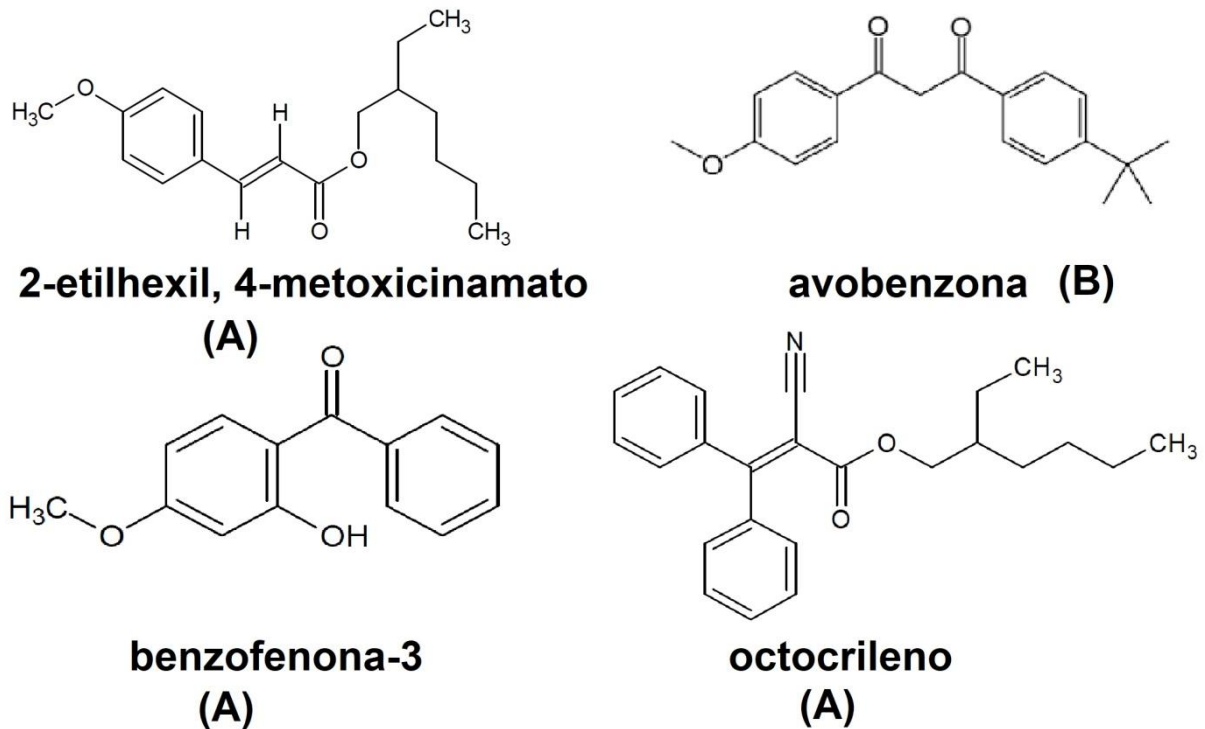


Figura 3. Estrutura química de e 2-etilhexil-4-metoxicinamato, avobenzona, benzofenona-3 e octocrileno.

Fonte: Adaptado de (A) Silva, p. 26, 2014; (B) Kaiser et al., p. 85, 2012.

Os corpos hídricos são o principal destino dos filtros UV. Desta maneira os organismos aquáticos são susceptíveis a possíveis efeitos adversos devido ao potencial de bioacumulação desses compostos, pois possuem baixa biodegradabilidade e tendem a se acumular em tecidos constituídos por lipídeos. (BLÜTHGEN et al., 2014; MANOVÁ; GOETZ; HUNGERBUEHLER, 2015; NECASOVÁ et al., 2016).

Considerando os potenciais riscos associados à presença de fotoprotetores em ecossistemas aquáticos, o monitoramento ambiental tem ganhado enfoque nos últimos anos (MANOVÁ; GOETZ; HUNGERBUEHLER, 2015; SHARIFAN; KLEIN; MORSE, 2016b; PARK et al., 2017). Foi relatada bioacumulação de EHMC e OC em peixes na Espanha, com valores de 240 ng g⁻¹ e 30 ng g⁻¹ de peso seco, respectivamente (GAGO-FERRERO; DÍAZ-CRUZ; BARCELÓ, 2013). No mesmo país, essas moléculas também foram encontradas em água tratada, nas concentrações de 170 ng L⁻¹ de OC e 260 ng L⁻¹ de EHMC (DÍAZ-CRUZ, 2012).

Nguyen et al. (2011) identificaram BF-3 (33 a 118 ng L⁻¹) e EHMC (25 a 83 ng L⁻¹) em água do mar, Magi et al. (2012) quantificaram 32 ng L⁻¹ de OC em água do mar e 112 ng L⁻¹ em água de rio, além de 10 ng L⁻¹ de EHMC em água de

rio na Itália. Na Colômbia, foi verificada a concentração de EHMC de 47,1 ng g⁻¹ de peso seco de sedimento (BARÓN et al., 2013). No Brasil, foram observadas concentrações de OC no fígado de mamíferos marinhos entre 89 e 782 ng g⁻¹ de peso seco (GAGO-FERRERO et al., 2013).

3.2 Monitoramento Ecotoxicológico

A partir da pressão feita pela opinião pública sobre governos e indústrias, durante as décadas de 1960 e 1970, surgiu a necessidade de avaliar efeitos causados por acidentes com produtos químicos, uso excessivo de agrotóxicos, contaminação por metais pesados e outros acontecimentos que causaram danos à saúde pública e ao meio ambiente. Desta maneira, iniciou-se o monitoramento ambiental como forma de verificar os níveis de contaminação nos ecossistemas (MORIARTY, 1999; WRIGHT; WELBOURN, 2002; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Os ensaios ecotoxicológicos surgiram como métodos de avaliação, fundamentados em conceitos da Toxicologia, para observar os efeitos causados por substâncias em organismos, e da Ecologia, no que tange a representatividade e relevância ambiental das espécies utilizadas como bioindicadores (WRIGHT; WELBOURN, 2002; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). São os ensaios ecotoxicológicos que demonstram os efeitos agudos ou crônicos causados em organismos ou populações. A partir disto, pode-se quantificar e qualificar o grau de perturbação causado pelos poluentes, contaminantes e substâncias químicas nos seres vivos (KNIE; LOPES, 2004).

Em ensaios ecotoxicológicos, deve-se estabelecer uma relação quantitativa entre a exposição dos organismos-teste à amostra e os efeitos causados, em relação a organismos não expostos (controles), por exemplo: análise estatística do crescimento, imobilidade, reprodução ou outros fatores relacionados à biologia de cada espécie (WRIGHT; WELBOURN, 2002; CONNELL et al., 2009).

Os ensaios agudos demonstram efeitos tóxicos em um curto período de tempo de exposição a concentrações mais altas, geralmente esses efeitos são irreversíveis, expressos em mortalidade e imobilidade (WRIGHT; WELBOURN, 2002; KNIE; LOPES, 2004; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). É o bioensaio mais

utilizado devido ao baixo custo, reprodutibilidade e rapidez (WRIGHT; WELBOURN, 2002; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Os bioensaios crônicos consistem na exposição dos organismos a concentrações subletais, sem haver mortalidade, podendo mostrar seus efeitos à longo prazo, considerando o ciclo de vida ou até mesmo através de gerações de uma espécie (KNIE; LOPES, 2004; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). Este tipo de teste apresenta respostas mais próximas da realidade e mais sensíveis aos agentes químicos testados, pois demonstra os efeitos causados por baixas concentrações, como, por exemplo, aumento ou inibição reprodutiva (WRIGHT; WELBOURN, 2002; KNIE; LOPES, 2004; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Considerando a contaminação de filtros UV em ambientes aquáticos pesquisas têm sido conduzidas para avaliar os efeitos causados por essas substâncias: No estudo de Kaiser et al. (2012), foi verificado efeito tóxico causado por EHMC na reprodução de caracóis das espécies *Potamopyrgus antipodarum* (0,4 mg Kg⁻¹) e *Melanoides tuberculata* (10 mg Kg⁻¹). Também foram observadas alterações morfológicas em *Danio rerio* em concentrações acima de 100 mg Kg⁻¹ de EHMC, enquanto AVO e OC não causaram efeitos significativos.

Liu et al. (2015), relataram danos hepáticos em peixes da espécie *Carassius auratus* causados por BF-3. Em embriões de *Chironomus riparius*, OC e EHMC causaram estresse oxidativo e distúrbios na regulação endócrina (OZÁEZ; MORCILLO; MARTÍNEZ-GUITARTE, 2016). Segundo a pesquisa de Park et al. (2017), a combinação de EHMC, AVO e OC resultou na redução dos efeitos tóxicos em *Daphnia magna*, quando comparados aos efeitos causados individualmente por esses compostos. A concentração efetiva (CE₅₀) de EHMC foi de 2,73 mg L⁻¹, AVO 1,95 e OC 3,18 mg L⁻¹ e, para a mistura de EHMC + AVO + OC 10,40 mg L⁻¹, caracterizando efeito antagonista entre a mistura das três moléculas.

3.2.1 *Desmodesmus subspicatus*

É uma microalga fitoplanctônica unicelular, possui vida livre e forma agrupamentos de celulares, chamados cenóbios, dispostos linearmente por 2-16 células (AN; FRIEDL; HEGEWALD, 1999).

Este microrganismo ocorre comumente em águas continentais, ricas em nutrientes. Tem papel importante na manutenção do equilíbrio dos ecossistemas,

pois são produtores primários e servem de alimento para organismos integrantes do zooplâncton (HENTSCHEKE; TORGAN, 2011; KNIE; LOPES, 2004).

As microalgas participam ativamente dos ciclos biogeoquímicos na ciclagem de nutrientes e devido a sua importância ecológica, altas taxas de reprodução e ciclo de vida conhecido são utilizadas como indicadores em testes de toxicidade (KNIE; LOPES, 2004; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Além disso, apresentam facilidade de cultivo e são sensíveis a variações no ambiente, tanto químicas, quanto físicas. Com isso, vários protocolos de avaliação de toxicidade foram descritos, a exemplo da normativa ABNT NBR 12648:2018, em que são padronizados ensaios de ecotoxicidade crônica utilizando esses organismos (ABNT, 2018; HENTSCHEKE; TORGAN, 2011; KNIE; LOPES, 2004).

3.2.2 *Daphnia magna*

Pertence ao subfilo Crustacea, ordem Cladocera. Vive em ambientes dulcícolas, alimenta-se por filtração, consumindo células de algas e matéria orgânica particulada. Quando presente em condições ambientais favoráveis apresenta reprodução assexuada, por partenogênese, originando fêmeas e é vulgarmente conhecida como pulga d'água (KNIE; LOPES, 2004). Ocupa importante posição na cadeia alimentar, é considerada consumidora primária e apresenta alta relevância ecológica (ESTEVES, 1998; ORTIZ-RODRIGUÉZ et al., 2012).

É uma espécie internacionalmente reconhecida e estudada como organismo-teste para ensaios ecotoxicológicos, apresenta características favoráveis a este tipo de pesquisa, como: uniformidade genética, resposta sensível a várias substâncias químicas, fácil cultivo e manejo em laboratório, adequada para ensaios estáticos, semiestáticos ou fluxo contínuo, ciclo de vida curto que facilita ensaios agudos e crônicos (KNIE; LOPES, 2004).

Devido às facilidades de cultivo e uniformidade genética, essa espécie é uma das mais utilizadas em ecotoxicologia aquática. Os ensaios de reprodução, a exemplo do protocolo padronizado pela OECD, são importantes para pesquisas de relevância ambiental em que os efeitos sobre o ciclo de vida dos organismos são avaliados (BARATA et al., 2017; CASTRO et al., 2018; OECD, 2012).

Nos ensaios de reprodução com *Daphnia magna*, múltiplos parâmetros reprodutivos podem ser avaliados, desde os primeiros momentos de vida até a fase adulta. Entretanto, normalmente, nesses ensaios padronizados não são considerados efeitos multigeracionais. Pesquisas recentes demonstram a viabilidade da extensão da metodologia OECD para mais de uma geração de organismos expostos aos xenobióticos de interesse, visto que podem trazer resultados mais próximos da realidade a nível populacional (CAMPOS et al., 2016; BARATA et al., 2017; CASTRO et al., 2018).

3.2.3 *Artemia salina*

Pertence ao subfilo Crustacea, ordem Anostraca, vive em ambientes marinhos, lagoas salinas e costeiras, apresenta alta adaptabilidade à salinidade (5 - 250 g L⁻¹) e temperatura (6 - 35 °C), desempenha importante função no fluxo energético da cadeia alimentar (NUNES et al., 2006; KANWAR, 2007).

O uso dessa espécie em estudos ecotoxicológicos é comum, pois este organismo apresenta boa sensibilidade a uma vasta gama de contaminantes, tem importância ecológica, alta reprodutividade, baixo custo de cultivo e são filtradores não seletivos, ou seja, ingerem as substâncias presentes na água, sendo facilmente expostos a contaminantes (NUNES et al., 2006; ARULVASU et al., 2014).

A facilidade no manuseio e estabilidade genética também são pontos positivos. Devido a essas características, a espécie é considerada adequada para uso em Ecotoxicologia. Além disso, os ensaios laboratoriais são simples e exigem poucos materiais, esses ensaios permitem a utilização de volumes pequenos de amostra e conseqüentemente a geração de resíduos tóxicos é minimizada (NUNES et al., 2006).

3.2.4 *Rhamdia quelen*

É um bagre neotropical encontrado em grande parte do território da América do Sul. Possui alta relevância ambiental, pois ocupa ambientes bentônicos e demersais e por isso desempenha função importante ao servir de alimento para organismos de topo de cadeia (ASSIS et al., 2018; BARRERA, 2013; MELA et al., 2013). Esta espécie tem hábitos noturnos, se refugia embaixo de pedras, troncos e

vegetações. Habita águas calmas, preferindo os ambientes mais profundos (GOMES et al., 2000).

Além da relevância ambiental esta espécie apresenta importância comercial devido a qualidade da sua carne e por ser abundante no sul do Brasil, principalmente no estado do Rio Grande do Sul. Este peixe tem capacidade de se adaptar bem ao frio e cresce rapidamente nos meses mais quentes, por isso é tão utilizado na aquicultura, devido a facilidade de cultivo e reprodução (ASSIS et al., 2018; PAMPLONA et al., 2011).

O uso desta espécie como modelo experimental em vários ensaios ecotoxicológicos se justifica pela quantidade de informações disponíveis na literatura, facilidade de aquisição, reprodução, baixo custo, relevância ecológica e por ser uma espécie nativa (ASSIS et al., 2018; BARRERA, 2013; MELA et al., 2013; PAMPLONA et al., 2011).

3.2.5 Biomarcadores bioquímicos

O termo biomarcador refere-se ao uso de alterações fisiológicas, bioquímicas e histológicas como indicadores de efeitos de xenobióticos. As técnicas de análise baseadas em biomarcadores são utilizadas para avaliar mudanças induzidas por substâncias tóxicas em subníveis individuais, como os níveis celulares e moleculares, por exemplo (ADAMS; ROWLAND, 2003).

Após a exposição e absorção, os xenobióticos podem sofrer excreção ou permanecer no organismo. Quando o composto é hidrofílico a excreção ocorre facilmente, entretanto quanto mais hidrofóbico, mais difícil de ser eliminado. Os seres vivos possuem duas formas de metabolizar os xenobióticos mais hidrofóbicos, a primeira é a inativação e armazenamento em compartimentos lipofílicos do organismo (gorduras). A outra forma é transformação do contaminante em espécies mais hidrofílicas, através de vias bioquímicas (BOLSTERLI, 2003).

A biotransformação pode seguir duas vias distintas, a primeira, chamada de metabolismo de fase 1, em que enzimas realizam reações de oxidação ou quebra do contaminante, com o objetivo de torná-lo mais hidrofílico. Na segunda via, chamada de metabolismo de fase 2, ocorre a conjugação do xenobiótico com um grupo funcional, também aumentando sua hidrossolubilidade. Esse processo pode ser catalisado por enzimas, como a glutathione-S-transferase (GST) em um

mecanismo de conjugação com o tripeptídeo glutationa reduzida (GSH), que visa inativar moléculas potencialmente tóxicas e facilitar sua excreção (BOLSTERLI, 2003; OOST, 2003).

Xenobióticos podem causar estresse oxidativo, que é definido como um quadro de desequilíbrio no sistema oxiredutor das células. Alguns contaminantes podem induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por interagirem com organelas e interferirem na cadeia transportadora de elétrons. O ânion superóxido é um exemplo de ERO, onde a enzima superóxido dismutase (SOD) converte essa espécie em peróxido de hidrogênio, outra ERO (BOLSTERLI, 2003; JONES, 2006; VALKO et al., 2007). Este peróxido de hidrogênio pode ser degradado pela catalase (CAT) em oxigênio e água, nos peroxissomos. No citosol a reação é catalisada pela glutationa peroxidase. As EROs não degradadas por via enzimática podem sofrer transformação química, catalisada por metais presentes no conteúdo intracelular, especialmente ferro, ocasionando reações Fenton, que geram o radical hidroxila como subproduto. As hidroxilas são altamente reativas, tem alta capacidade de oxidação e podem atacar lipídeos e proteínas presentes nas células, nesse caso, levando à carbonilação proteica (PCO) (BOELSTERLI, 2003; JONES, 2006; VALKO et al., 2007).

Além dos biomarcadores de estresse oxidativo, também pode ser avaliada a enzima acetilcolinesterase (AChE) que apresenta atividade regulatória de neurotransmissão (SANTOS, 2009). A AChE possibilita a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) em colina e ácido acético durante a transmissão dos impulsos nervosos (JAMEC et al., 2007; OLIVEIRA, 2014). Porém, esta enzima pode ter ação inibida, por exemplo, pela exposição de determinado organismo a compostos tóxicos, que podem resultar em acúmulo de acetilcolina nos tecidos musculares (JAMEC et al., 2007). Dessa maneira, podem ocorrer espasmos, hiperatividade, paralisia e até morte do organismo (YAWETZ; MANELIS; GASITH, 1993).

CAPÍTULO I – Avaliação da toxicidade de filtros UV utilizando diferentes organismos indicadores

1 INTRODUÇÃO

Fotoprotetores são utilizados em produtos de higiene pessoal com a função de proteção contra radiação ultravioleta. Durante os períodos mais quentes do ano as atividades recreativas em praias, lagos, rios e piscinas ocorrem com maior frequência, com isso, quantidades significativas de filtros UV são aportadas ao ambiente. Esses compostos já foram encontrados em ambientes dulcícolas e marinhos em concentrações na faixa de ng a $\mu\text{g L}^{-1}$ (BRAUSCH; RAND 2011; MAGI et al., 2012; GAGO-FERRERO; DÍAZ-CRUZ; BARCELÓ, 2013; SHARIFAN; KLEIN; MORSE, 2016b).

Existem poucos dados que relatam sobre os efeitos dos filtros UV em microalgas, invertebrados marinhos e dulcícolas. Nesse sentido, ressalta-se a importância da avaliação ecotoxicológica destes compostos em organismos modelos padronizados internacionalmente (FENT et al., 2010; LAYTON, 2015; SIERATOWICZ et al., 2011; KAISER et al., 2012).

As consequências da presença de fotoprotetores nos ambientes aquáticos são incertas, uma vez que as espécies expostas podem sofrer diferentes efeitos em seu ciclo de vida. Poucas pesquisas tratam sobre os temas de avaliação de risco ambiental e estudos preliminares se fazem necessários (LAYTON, 2015; PARK et al., 2017).

Considerando esses fatores, foram realizados ensaios agudos com *Daphnia magna* e *Artemia salina*. A toxicidade crônica também foi avaliada com a microalga *Desmodesmus subspicatus* e ensaio de reprodução com *Daphnia magna*. A partir dessas análises os valores de concentração efetiva (CE_{50}) e de efeito não observado (CENO) foram determinados para cada amostra com os respectivos organismos.

Os resultados obtidos nesses testes foram utilizados para realizar uma avaliação de risco ecológico preliminar, por meio do quociente de risco, determinado com base no “Guidelines for Ecological Risk Assessment” da United States Environmental Protection Agency (USEPA, 1998) para 2-etilhexil-4-metoxicinamato, avobenzona, benzofenona-3 e octocrileno.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes

Foram utilizados padrões farmacêuticos secundários de 2-etilhexil-4-metoxicinamato (EHMC) (Galena, 98,7%), Avobenzona (AVO) (Galena, 98%), Benzofenona-3 (BF-3) (Galena 99,9%) e Octocrileno (OC) (Galena, 99,2%). A dissolução das substâncias foi feita em dimetilsulfóxido (DMSO) (99,9%, Neon).

2.2 Avaliação da toxicidade crônica de AVO, BF-3, EHMC e OC em *Desmodesmus subspicatus*

Para esta avaliação, foi seguido método descrito na NBR 12648:2018 (ABNT, 2018). Este ensaio consistiu na exposição da microalga *Desmodesmus subspicatus* por 72 horas a cinco concentrações de cada fotoprotetor para determinação da $CE_{50(72h)}$ e CENO (Tabela 1).

Tabela 1. Concentrações de fotoprotetores utilizadas para avaliação de toxicidade crônica em *Desmodesmus subspicatus*.

EHMC (mg L ⁻¹)	AVO(mg L ⁻¹)	BF-3 (mg L ⁻¹)	Octocrileno (mg L ⁻¹)
0,006	0,120	0,093	0,031
0,012	0,250	0,187	0,062
0,025	0,500	0,375	0,125
0,050	-	0,500	0,250

Legenda: (EHMC) 2-etilhexil-4-metoxicinamato; (AVO) Avobenzona; (BF-3) Benzofenona-3; (OC) Octocrileno.

Três dias antes do início do ensaio foi feito inóculo da microalga em meio líquido para pré-cultura (ANEXO A). Após esse período, a densidade celular foi medida em leitora Fluostar Omega, através do método espectrofotométrico, em microplacas de 96 poços, considerando 250 µL de amostra em cada poço (quatro poços por amostra), com comprimento de onda fixo em 750 nm.

Em seguida foi inoculado o volume correspondente a 10⁵ células mL⁻¹ em erlenmeyers de 125 mL contendo meio nutriente DIN (ANEXO B), água de osmose reversa e a solução-teste dos fotoprotetores (AVO; BF-3; EHMC; OC; DMSO 0,03% e controle com água de osmose). O volume final dos frascos foi de 50 mL (ABNT, 2018).

Todos os frascos e meios nutrientes foram previamente autoclavados e os procedimentos foram feitos em câmara de fluxo laminar. O ensaio ocorreu em sala climatizada (23-25°C), onde os frascos com as soluções-teste e controles foram colocados em agitação constante (mesa de agitação orbital tipo shaker, Tecnal, modelo TE-1400) a 145 rpm e luminosidade de aproximadamente 7000 lux, medida através de luxímetro (Homis). Todas amostras e controles foram feitos em triplicata (ABNT, 2018).

Após 72 horas, a densidade celular foi medida em leitora de microplacas Fluostar Omega, através do método espectrofotométrico, em 750 nm, conforme descrito anteriormente. A partir dos dados obtidos foram verificadas as porcentagens de inibição de cada concentração em relação aos controles.

Para determinação da $CE_{50(72h)}$, os resultados de percentual de inibição de crescimento para cada concentração testada foram usados. Os cálculos foram realizados no software GraphPad Prism 5.0 e os resultados foram expressos em função da concentração efetiva a 50% dos organismos (CE_{50}) (ABNT, 2018).

Em seguida, foram determinadas as concentrações de efeito não observado (CENO), a partir de valores de EC_{10} , ou seja, concentrações que causaram 10% de inibição de crescimento em relação ao controle. Esses valores foram calculados a partir da relação linear entre o percentual de inibição de crescimento e as concentrações utilizadas na exposição, no software GraphPad Prism 5.0, com 95% de confiança.

2.3 Avaliação da toxicidade aguda de AVO, BF-3, EHMC e OC em *Artemia salina*

Os ensaios seguiram a metodologia descrita na NBR 16530 (ABNT, 2016b). Os cistos que deram origem aos náuplios utilizados nestes ensaios foram adquiridos comercialmente de um produtor local. Em um funil de separação, de 1 L, foram adicionados 200 mg L⁻¹ de cistos em 500mL de água do mar reconstituída, previamente aerada. Os mesmos foram incubados durante 24 horas, a 24 °C e no escuro (ABNT, 2016b).

Após a eclosão uma fonte de luz foi direcionada para a parte superior do funil de separação e os organismos saudáveis se concentraram no ponto luminoso, desta maneira as cascas e cistos não eclodidos foram descartados a partir

da abertura da torneira presente no fundo do funil. Os organismos viáveis foram distribuídos individualmente em placas de 96 poços, um neonato por poço, com 10 poços para cada concentração amostral, controle e DMSO 0,03%, todos em triplicata de placas (Tabela 2).

Tabela 2. Concentrações de fotoprotetores utilizadas para avaliação de toxicidade aguda em *Artemia salina*.

AVO (mg L ⁻¹)	BF-3 (mg L ⁻¹)	EHMC (mg L ⁻¹)	OC (mg L ⁻¹)
1,00	0,25	0,10	0,75
1,25	0,50	0,20	1,00
1,50	1,00	0,30	1,25
1,75	1,25	0,40	1,75
2,00	1,50	0,50	2,00
2,25	1,75	0,60	2,50
2,50	2,00	0,70	3,50
3,00	2,25	0,80	5,00
-	2,50	-	-
-	3,00	-	-

Legenda: (EHMC) 2-etilhexil-4-metoxicinamato; (AVO) Avobenzona; (BF-3) Benzofenona-3; (OC) Octocrileno.

Após 48 horas os organismos considerados imóveis foram contabilizados e se estabeleceu o percentual de imobilidade. (ABNT, 2016b). Os resultados foram expressos em função da concentração efetiva a 50% dos organismos (CE₅₀). Os cálculos foram realizados no software GraphPad Prism 5.0, em que foi determinada a CE₅₀, com 95% de confiança (KNIE; LOPES, 2004; ABNT, 2016b).

2.4 Avaliação da toxicidade aguda de AVO, BF-3, EHMC e OC em *Daphnia magna*

Os organismos utilizados nestes ensaios foram obtidos através de matrizes de *Daphnia magna* cultivadas em laboratório com controle de alimentação, fotoperíodo, temperatura, pH e dureza da água. Estes fatores foram comprovados através de uma carta controle de sensibilidade ao sulfato de zinco (APÊNDICE A). (KNIE; LOPES, 2004; ABNT, 2016a).

Os ensaios foram realizados de acordo com a metodologia descrita na NBR 12713:2016 (ABNT, 2016a). Dez neonatos (6-24h) foram distribuídos em

béqueres contendo 25 mL de amostra-teste e incubados a 20 ± 2 °C, no escuro, durante 48 horas. Para a diluição das amostras (Tabela 3), controle negativo e controle solvente (DMSO 0,03%) foi utilizado meio básico (ANEXO C), composto por quatro soluções nutrientes para *Daphnia magna*. Após 48 horas os organismos considerados imóveis foram contabilizados e se estabeleceu o percentual de imobilidade. Todos os ensaios foram realizados em triplicata (ABNT, 2016a).

Tabela 3. Concentrações de fotoprotetores utilizadas para avaliação de toxicidade aguda em *Daphnia magna*.

AVO (mg L ⁻¹)	BF-3 (mg L ⁻¹)	EHMC (mg L ⁻¹)	OC (mg L ⁻¹)
1,00	0,75	0,10	0,50
1,50	1,00	0,20	0,75
2,00	1,25	0,30	1,00
2,25	1,50	0,40	1,25
2,50	1,75	0,50	1,75
3,00	2,00	0,60	2,00
3,50	2,50	0,70	2,50
-	-	0,80	3,50
-	-	0,90	5,00
-	-	1,00	7,00

Legenda: (EHMC) 2-etilhexil-4-metoxicinamato; (AVO) Avobenzona; (BF-3) Benzofenona-3; (OC) Octocrileno.

Os resultados foram expressos em função da concentração efetiva a 50% dos organismos (CE₅₀). Os cálculos foram realizados no software GraphPad Prism 5.0, onde foi determinada a concentração efetiva a 50% dos organismos (CE₅₀), considerando 95% de confiança (KNIE; LOPES, 2004; ABNT, 2016a).

2.5 Avaliação da toxicidade crônica de AVO, BF-3, EHMC e OC em *Daphnia magna*

De acordo com o protocolo OECD 211 (OECD,2012), neonatos com idade inferior à 24h foram selecionados no início do ensaio e expostos individualmente, em decuplicata, utilizando béqueres contendo 25 mL de meio M4 (ANEXO D) com diferentes concentrações de OC, EHMC, AVO e BF-3 (Tabela 4). Nas mesmas condições foram preparados os controles: negativo e com solvente DMSO 0,03% (utilizado para solubilizar as moléculas).

Tabela 4. Concentrações de fotoprotetores utilizadas para avaliação de toxicidade crônica em *Daphnia magna*.

EHMC (mg L⁻¹)	AVO(mg L⁻¹)	BF-3 (mg L⁻¹)	OC (mg L⁻¹)
0,006	0,120	0,093	0,031
0,012	0,250	0,187	0,062
0,025	0,500	0,375	0,125
0,050	-	0,500	0,250

Legenda: (EHMC) 2-etilhexil-4-metoxicinamato; (AVO) Avobenzona; (BF-3) Benzofenona-3; (OC) Octocrileno.

Os recipientes-teste foram mantidos em incubadora a 20±2°C, com fotoperíodo de 16h luz/8h escuro, durante 21 dias. A cada 48h as soluções foram renovadas completamente e foi realizada alimentação com a microalga *Desmodesmus subspicatus* (10⁶ células mL⁻¹ por réplica). Após a primeira reprodução, além da renovação das soluções, as proles de cada réplica foram contabilizadas e descartadas (OECD, 2012).

Ao final da exposição, o número total de neonatos produzidos por réplica viva até o 21º dia de ensaio foi utilizado para calcular as taxas de reprodução de cada grupo exposto e controles (Equação 1) (OECD, 2012).

$$TR = (R1 + R2 + R3 + \dots + Rn) / n \quad \text{(Equação 1)}$$

Em que: TR é a taxa de reprodução; R o total de neonatos produzidos durante 21 dias por réplica; n o número de réplicas vivas ao final do ensaio.

As taxas de reprodução de todos os grupos foram comparadas estatisticamente no software GraphPad Prism 5.0, inicialmente por análise de normalidade, pelo teste de Kolmogorov Smirnov. Em seguida, as distribuições foram consideradas normais e foi feita análise através de ANOVA (um critério) seguido de teste de Dunnet (p<0,05).

Também foram determinadas as concentrações de efeito não observado (CENO), a partir de valores de EC₁₀, ou seja, concentrações que causaram 10% de inibição reprodutiva em relação ao controle. Esses valores foram calculados a partir da relação linear entre o percentual de inibição reprodutiva e as concentrações utilizadas na exposição, no software GraphPad Prism 5.0, com 95% de confiança (OECD, 2012).

2.6 Determinação do quociente de risco ecológico

A determinação do quociente de risco ecológico seguiu as diretrizes do “Guidelines for Ecological Risk Assessment” da United States Environmental Protection Agency (USEPA, 1998). Essa metodologia consiste no cálculo de um quociente de risco (QR), em que uma concentração do contaminantes de interesse detectada no ambiente é comparada com valores de CE_{50} (toxicidade aguda) ou valores de CENO (toxicidade crônica) (Equação 2) (USEPA, 1998; USEPA, 2015).

$$QR = CA/ECotoxicidade \quad (\text{Equação 2})$$

Em que: QR é o Quociente de Risco; CA a concentração no ambiente estimada ou medida; Toxicidade representa a CE_{50} ou CENO de organismos não alvo que foram mais sensíveis ao contaminante de interesse.

Após os cálculos, os Quocientes de Risco resultantes foram comparados com os valores de classificação para alto risco agudo, risco agudo e risco crônico (Tabela 5) (USEPA, 2015).

Tabela 5. Índices de classificação de risco ecológico.

Cálculo	QR	Classificação
CA/ CE_{50}	>0,5	Alto risco agudo
CA/ CE_{50}	>0,1	Risco agudo
CA/CENO	>1,0	Risco crônico

Legenda: (QR): Quociente de Risco; (CA) Concentração no Ambiente; (CE_{50}) Concentração Efetiva a 50% de uma população; CENO: Concentração de Efeito Não Observado.

Fonte: United States Environmental Protection Agency.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Toxicidade crônica de AVO, BF-3, EHMC e OC em *Desmodesmus subspicatus*

Ao final da exposição, foi realizada a leitura das amostras e as concentrações efetivas a 50% da população (CE50) foram calculadas.

Não foram observadas diferenças significativas (ANOVA+Dunnett, $p < 0,05$) entre os grupos controle e controle DMSO 0,03%. Para todos os ensaios foram observados coeficientes de determinação (r^2) acima de 0,93. Os valores de $CE_{50(72h)}$ encontrados foram: EHMC = $0,37 \text{ mg L}^{-1}$, AVO = $1,07 \text{ mg L}^{-1}$, BF-3 = $0,82 \text{ mg L}^{-1}$ e OC = $1,54 \text{ mg L}^{-1}$ (Figura 4).

Com a análise dos resultados, foi possível verificar o potencial tóxico

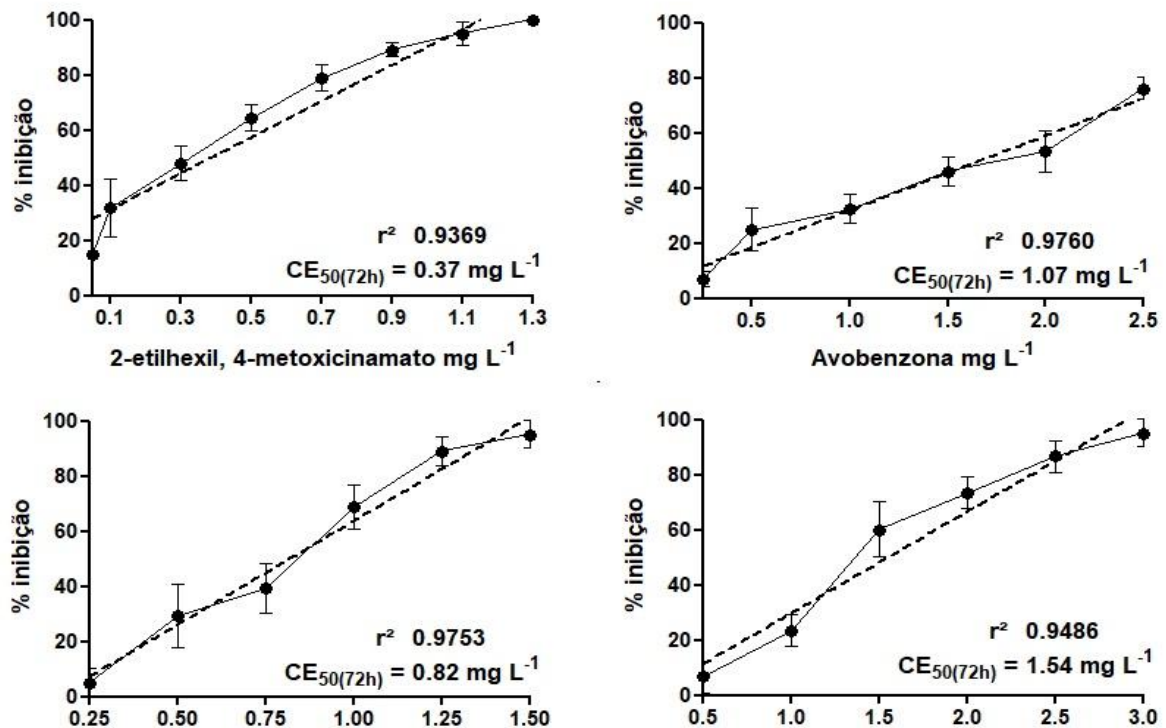


Figura 4. Curvas dose-resposta obtidas para determinação da $CE_{50(72h)}$ em *Desmodesmus subspicatus*.

dos fotoprotetores analisados, uma vez que AVO, BF-3 e EHMC causaram inibições estatisticamente significativas da multiplicação celular de *Desmodesmus subspicatus* em concentrações abaixo de 1 mg L^{-1} , fato que possivelmente está associado a biodisponibilidade e ao tempo de exposição. Devido à alta lipossolubilidade, essas moléculas tendem a se bioacumular e aumentar a intensidade dos efeitos ao longo

do tempo (BLÜTHGEN et al., 2014; MANOVÁ; GOETZ; HUNGERBUEHLER, 2015; NECASOVÁ et al., 2016).

Sieratowicz et al. (2011) determinaram a $CE_{50(72h)}$ para BF-3 utilizando *Desmodesmus subspicatus* e obtiveram 0,96 mg L⁻¹. Também calcularam o valor de 0,61 mg L⁻¹ como concentração inibitória a 10% da população de microalgas.

Os resultados obtidos para BF-3 no presente estudo são próximos aos reportados por Sieratowicz et al. (2011). Entretanto, para as demais moléculas de interesse, não foram encontrados outros estudos, apenas com outras espécies de microalgas e em condições diferentes de exposição. Rodil et al. (2009), encontraram $CE_{50(24h)}$ de 0,19 e 0,36 mg L⁻¹ para EHMC e BF-3, utilizando *Desmodesmus vacuolatus* (Tabela 6).

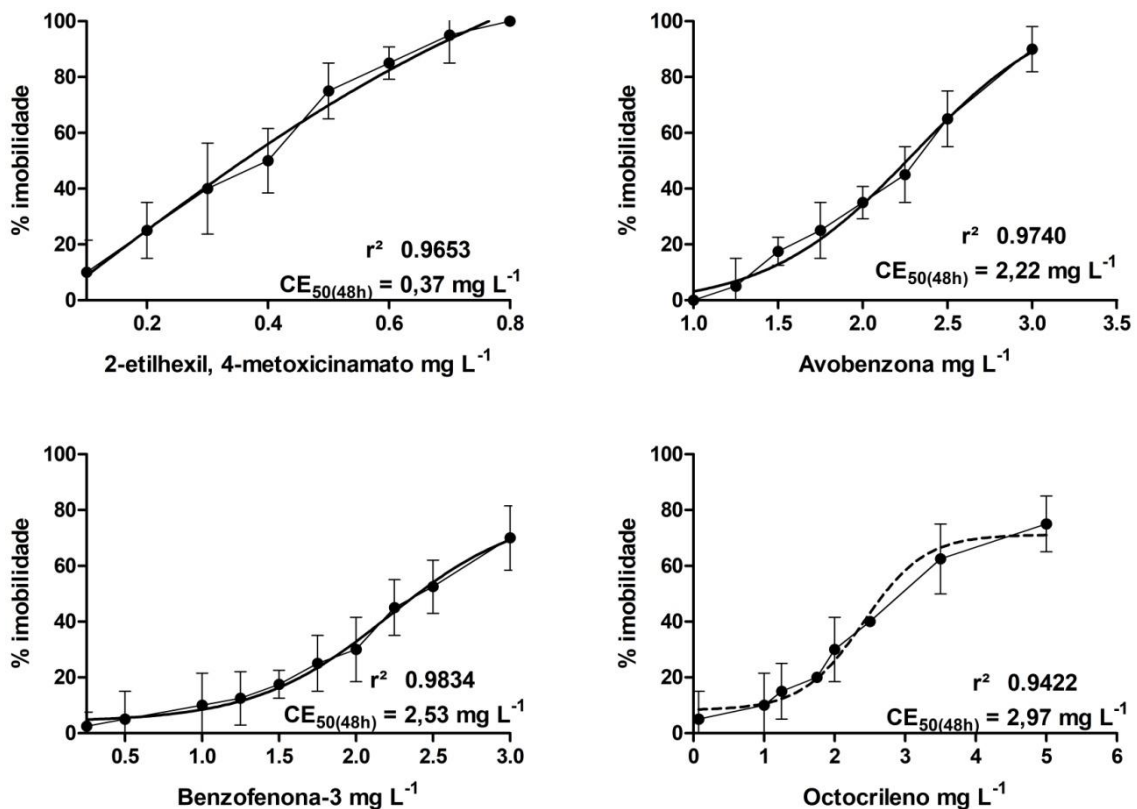
Tabela 6. Valores de $CE_{50(48h)}$ e CENO obtidos em comparação com valores encontrados na literatura científica.

Substância	$CE_{50(72h)}$ (mg L ⁻¹)	CENO _(72h) (mg L ⁻¹)	Literatura (mg L ⁻¹)	Referência
2-etilhexil-4-metoxicinamato	0,37	0,02	<i>D. subspicatus</i> : $CE_{10(72h)} = 0,07$ <i>D. vacuolatus</i> : $CE_{50(24h)} = 0,19$	(A) (B)
Avobenzona	1,07	0,18	-	-
Benzofenona-3	0,82	0,28	<i>D. subspicatus</i> : $CE_{50(72h)} = 0,96$ <i>D. vacuolatus</i> : $CE_{50(24h)} = 0,36$	(A) (B)
Octocrileno	1,54	0,46	Estimativa por modelagem matemática: <i>D. vacuolatus</i> : $CE_{50(24h)} = 0,05$	(B)

Legenda: (A) Sieratowicz et al., 2011; (B) Rodil et al., 2009.

3.2 Toxicidade aguda de AVO, BF-3, EHMC e OC em *Artemia salina*

Após 48 horas de exposição foi feita a contabilização dos organismos imóveis e as concentrações efetivas a 50% de cada população foram calculadas, considerando intervalo de confiança de 95%. Os grupos controle e DMSO 0,003% não causaram imobilidade nos organismos. As amostras de AVO, EHMC, BF-3 e OC apresentaram coeficientes de determinação (r^2) acima de 0,94, na relação entre as concentrações testadas e os percentuais de imobilidades resultantes. Os valores de



$CE_{50(48h)}$ encontrados foram: AVO = 2,22, BF-3 = 2,53, EHMC = 0,37 e OC = 2,97 mg L⁻¹ (Figura 5).

Os valores de $CE_{50(48h)}$ determinados para AVO, BF-3 e OC foram similares, entretanto observou-se maior toxicidade para *Artemia salina* quando exposta ao EHMC, com $CE_{50(48h)}$ de 0,37 mg L⁻¹.

A espécie *Artemia salina* é reconhecida pelo papel importante na cadeia alimentar marinha. Com isso, fatores relacionados a bioacumulação e biomagnificação podem ser observados quando ocorre exposição a filtros UV

Figura 5. Curvas dose-resposta obtidas para determinação da $CE_{50(48h)}$ em *Artemia salina*.

(ARULVASU et al., 2014; MANOVÁ; GOETZ; HUNGERBUEHLER, 2015; NECASOVÁ et al., 2016).

A capacidade de bioacumulação e biomagnificação dos filtros UV em *Artêmia salina* pode ser demonstrada no trabalho de Li et al. (2018), onde embriões de *Danio rerio* da segunda geração apresentaram efeitos tóxicos após exposição via trófica da primeira geração com alimentação de náuplios contaminados com BF-3, EHMC e OC.

Fotoprotetores apresentam alta capacidade de contaminação de ambientes marinhos, principalmente durante o verão, em que há um aumento expressivo nas atividades de recreação nos litorais (SHARIFAN; KLEIN; MORSE, 2016a). Contudo, cabe ressaltar que não foram encontrados relatos científicos da concentração efetiva de AVO, BF-3, EHMC e OC em *Artemia salina*, dificultando uma correlação entre biodisponibilidade e seus efeitos. Desta forma, dados de concentrações efetivas dos filtros UV para organismos presentes nos ambientes marinhos são de suma importância para o entendimento dos efeitos tóxicos causados por esses contaminantes.

3.3 Toxicidade aguda de AVO, BF-3, EHMC e OC em *Daphnia magna*

Os neonatos foram expostos a diferentes concentrações dos filtros UV, EHMC, AVO, BF-3 e OC. Após 48 h fez-se a contabilização dos organismos imóveis. Com isso, a concentração efetiva a 50% da população foi calculada, considerando intervalo de confiança de 95%. Para todos os ensaios foram observadas relações lineares com coeficientes de determinação (r^2) acima de 0,95. Os valores de $CE_{50(48h)}$ encontrados foram: EHMC = 0,50, AVO = 1,89, BF-3 = 1,72 e OC = 2,57 mg L⁻¹ (Figura 6).

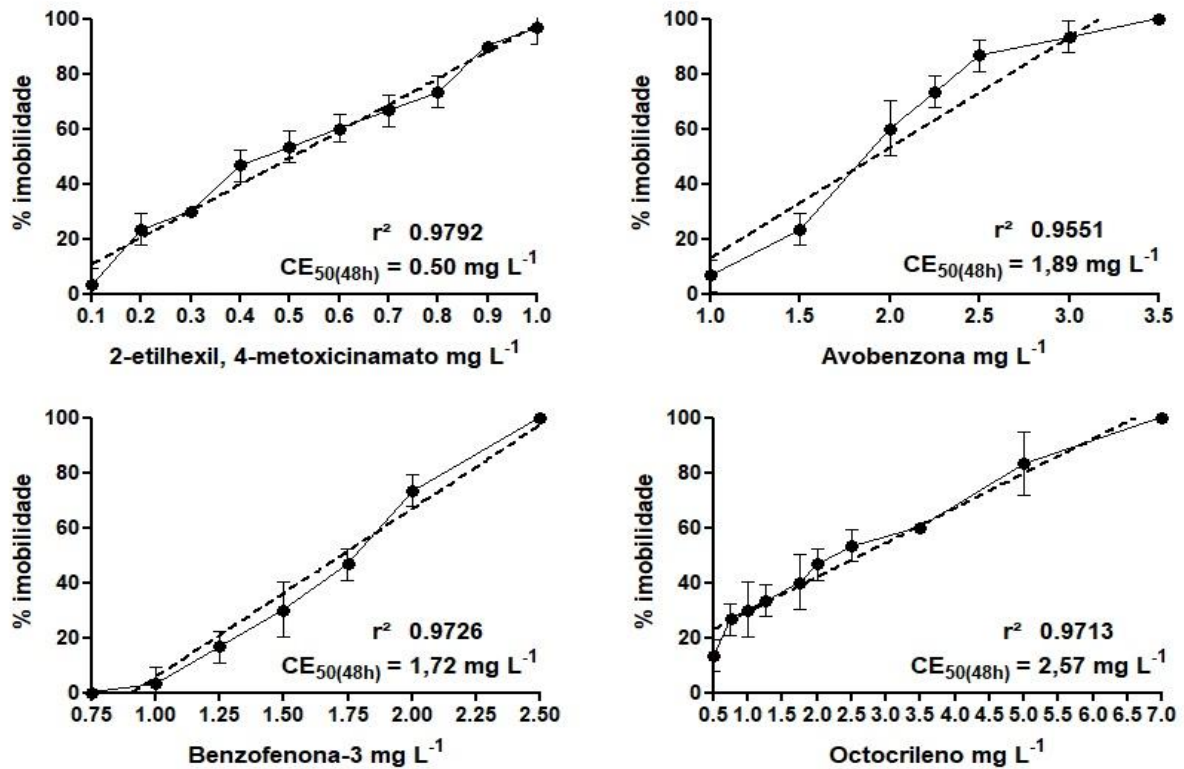


Figura 6. Curvas dose-resposta obtidas para determinação da $CE_{50(48h)}$ em *Daphnia magna*.

Os compostos analisados apresentaram valores de $CE_{50(48h)}$ próximos, o que sugere efeitos de toxicidade similares. Isso pode ser evidenciado pela lipossolubilidade que as quatro moléculas apresentam. Esta característica facilita a capacidade de penetração em membranas celulares e bioacumulação nos tecidos (FENT et al., 2010; PESTOTNIK; KOSJEK; HEATH, 2014; PARK et al., 2017).

Fent et al. (2010), analisaram benzofenona-3, benzofenona-4, 4-metil-benzilideno cânfora e 2-etilhexil, 4-metoxicinamato em *Daphnia magna*. Os autores relataram aumento da toxicidade conforme maior hidrofobicidade do composto. Esta resposta não foi observada no presente estudo, visto que OC apresentou menor toxicidade ($CE_{50(48h)} = 2,57 \text{ mg L}^{-1}$) e dentre as moléculas estudadas é a que apresenta maior lipossolubilidade ($\log K_{ow} = 6,88$), enquanto que para EHMC ($\log K_{ow} = 5,80$) foi verificado maior grau de toxicidade ($CE_{50(48h)} = 0,50 \text{ mg L}^{-1}$).

Observando os resultados de Kaiser et al. (2012), pode-se verificar que moléculas mais lipofílicas não necessariamente apresentam maior toxicidade. Entre os três fotoprotetores analisados (EHMC, AVO e OC), apenas EHMC provocou efeitos significativos em organismos de sedimento. Segundo os autores, isso pode ter sido provocado pela menor biodisponibilidade de AVO e OC, uma vez que podem

interagir com maior facilidade com sedimentos, material particulado e apresentam baixa capacidade de absorção quando ingeridos.

Os resultados obtidos puderam ser comparados com outras pesquisas envolvendo a determinação da CE_{50} em *Daphnia magna* e de maneira geral, corroboram com as descrições da literatura científica (Tabela 7).

Tabela 7. Valores de $CE_{50(48h)}$ resultantes em comparação com dados da literatura científica.

Substância	$CE_{50(48h)}$ (mg L ⁻¹)	$CE_{50(48h)}$ literatura (mg L ⁻¹)	LogK _{ow}
Avobenzona	1,84	1,95 (A)	6,1 (D)
Benzofenona-3	1,72	1,90/1,67 (B/C)	3,79 (E)
2-etilhexil-4-metoxicinamato	0,50	0,29/0,57/2,73 (B/C/A)	5,80 (E)
Octocrileno	2,57	3,18 (A)	6,88 (E)

Legenda: (A) Park et al., 2017; (B) Fent et al., 2010; (C) Sieratowicz et al., 2011; (D) Kaiser et al., 2012; (E) Rodil et al., 2009.

3.4 Toxicidade crônica de AVO, BF-3, EHMC e OC em *Daphnia magna*

O ensaio crônico foi considerado válido, conforme OECD 211/2008, com mortalidade inferior a 10% nos grupos controle negativo e controle DMSO 0,03%. Nas amostras de EHMC, AVO, BF-3 e OC os índices de mortalidade também ficaram abaixo de 10%. Desta maneira, não houve alteração na longevidade dos organismos nessas condições de exposição.

Apenas nas amostras de OC 250 µg L⁻¹ e EHMC 50 µg L⁻¹ houve interferência no desenvolvimento dos indivíduos. Observou-se 100% de mortalidade entre o quinto e sexto dia de exposição, mesmo em concentrações aproximadamente 10 vezes menores do que a CE_{50} (OC: 2570 µg L⁻¹ e EHMC: 500 µg L⁻¹) e duas vezes menores do que as concentrações de efeito não observado em 48 horas, previamente testadas e calculadas.

As taxas de reprodução (média total de neonatos por organismo) observadas após 21 dias foram calculadas e analisadas estatisticamente (ANOVA+Dunnett, p<0,05). Verificou-se que não houve diferença significativa entre o grupo controle e controle DMSO 0,03%, descartando-se a possibilidade de efeito do solvente. Para as amostras de fotoprotetores foi possível observar inibição reprodutiva nas concentrações mais altas de cada composto (Figura 7).

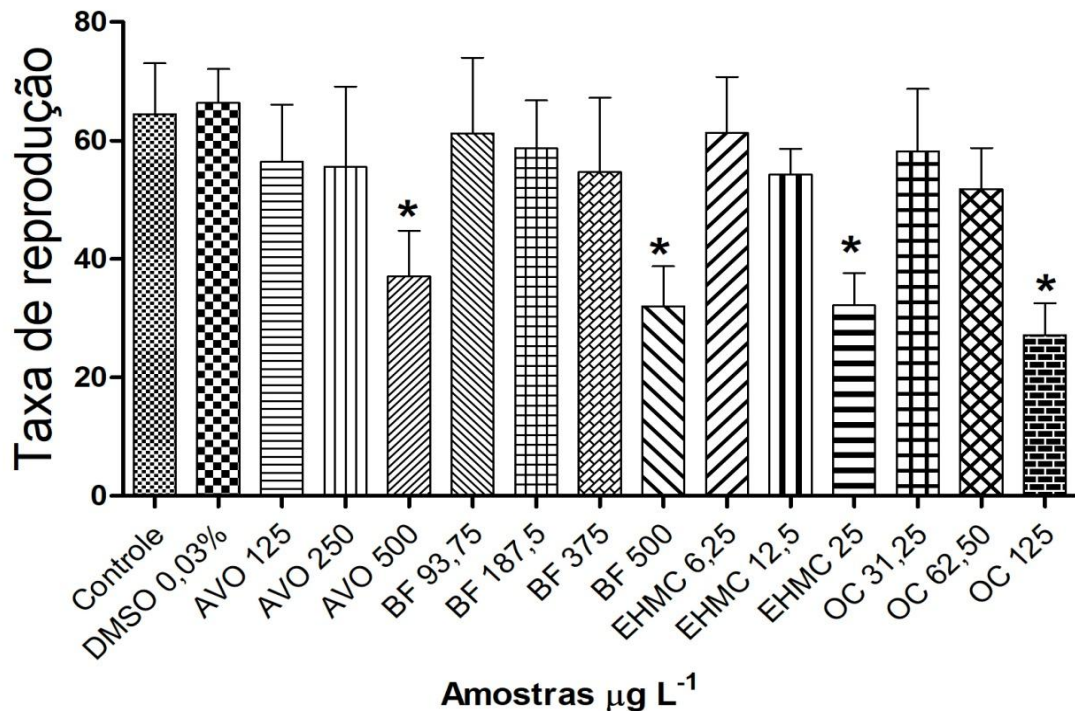


Figura 7. Taxas de reprodução dos grupos controle e amostras para 21 dias de exposição. Legenda: (*) $p < 0,05$ em ANOVA + teste de Dunnett.

A exposição crônica ocorre durante etapas importantes do desenvolvimento inicial do organismo até a vida adulta, fator que contribui para a identificação de efeitos causados pelos contaminantes testados, interferindo significativamente nas taxas de reprodução (KNIE; LOPES, 2004; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

A partir das taxas de reprodução, foi possível determinar a concentração efeito não observado (CENO) para cada filtro UV analisado (Tabela 8).

Tabela 8. Valores de CENO obtidos em comparação com valores de $CE_{50(48h)}$.

Substância	CENO _(21dias) (mg L ⁻¹)	CE _{50(48h)} (mg L ⁻¹)
2-etilhexil-4-metoxicinamato	0,009	0,50
Avobenzona	0,121	1,84
Benzofenona-3	0,188	1,72
Octocrileno	0,033	2,57

Legenda: CENO: Concentração de efeito não observado; CE_{50(48h)} Concentração efetiva a 50% da população.

Sieratowicz et al. (2011), analisaram EHMC e BF-3 em ensaio de reprodução com *Daphnia magna*. Obtiveram CENO de 0,040 mg L⁻¹ para EHMC e

nas condições e concentrações testadas, não encontraram efeitos significativos com BF-3, mesmo utilizando 0,5 mg L⁻¹ como concentração mais alta. No estudo de Layton (2015), foram verificados efeitos reprodutivos em *Daphnia magna* causados por AVO 0,22 mg L⁻¹ e BF-3 em 0,7 mg L⁻¹

Os efeitos resultantes da exposição crônica demonstraram a capacidade dos filtros UV em interferir nas funções reprodutivas, sendo dependente da concentração e período de exposição do contaminante (SIERATOWICZ et al., 2011; BLÜTHGEN et al., 2014; MANOVÁ; GOETZ; HUNGERBUEHLER, 2015).

3.5 Caracterização do risco ecológico

Com os dados provenientes dos ensaios de determinação de CE₅₀ e CENO em *Desmodesmus subspicatus*, *Artemia salina* e *Daphnia magna*, foi possível calcular o Quociente de Risco (QR) e comparar com as classificações de risco (Tabela 9) (USEPA, 2015).

Tabela 9. Valores de CE_{50(48h)}, CENO obtidos e utilizados para o cálculo do quociente de risco.

Substância	<i>A. salina</i>	<i>D. magna</i>	<i>D. subspicatus</i>	CA* (mg L ⁻¹)	QR	Classificação do risco (Agudo)
	CE _{50(48h)} (mg L ⁻¹)	CE _{50(48h)} (mg L ⁻¹)	CE _{50(72h)} (mg L ⁻¹)			
EHMC	0,37	0,50	0,37	2,24.10 ⁻⁴	0,006	SR
AVO	2,22	1,84	1,07	4,45.10 ⁻³	0,004	SR
BF-3	2,53	1,72	0,82	1,75.10 ⁻⁴	0,0002	SR
OC	2,97	2,57	1,54	4,45.10 ⁻³	0,002	SR
Substância	-	<i>D. magna</i>	<i>D. subspicatus</i>	CA* (mg L ⁻¹)	QR	Classificação do risco (Crônico)
		CENO _{21dias} (mg L ⁻¹)	CENO _{72h} (mg L ⁻¹)			
EHMC	-	0,009	0,02	2,24.10 ⁻⁴	0,0250	SR
AVO	-	0,121	0,18	4,45.10 ⁻³	0,0370	SR
BF-3	-	0,188	0,28	1,75.10 ⁻⁴	0,0009	SR
OC	-	0,033	0,46	4,45.10 ⁻³	0,1350	SR

Legenda: (CA) Concentração Ambiental; (QR) Quociente de Risco; (SR) Sem Risco; (*) Concentrações ambientais publicadas por Brausch; Rand, 2011.

Com a análise dos QRs não foram caracterizados riscos ambientais pela exposição aguda e crônica aos filtros UV, considerando os organismos e condições testadas.

Contudo, esses resultados são preliminares e podem ser diferentes para as mesmas moléculas, visto que a concentração ambiental é um valor variável e podem ser utilizados valores estimados ou reais. Quanto mais próxima a concentração ambiental estiver das concentrações de efeito agudo ou crônico, maior é a possibilidade de encontrar risco ecológico (USEPA, 1998).

Além disso, os dados que compõe o cálculo do QR podem ser combinados com outros fatores físicos e ambientais para auxiliar na avaliação completa dos riscos dos fotoprotetores. Outro fator que merece atenção é a metodologia aplicada, uma vez que os resultados podem sofrer alterações devido ao tipo de cálculo usado (LAYTON, 2015).

Fent et al. (2010) caracterizaram o risco para EHMC, BF-3 e outros dois fotoprotetores. Ao analisar os dados, concluíram que para EHMC havia risco ambiental, entretanto na metodologia empregada os valores foram multiplicados por fatores de segurança de 1000 para dados agudos e 100 para crônicos.

Sieratowicz et al. (2011) também realizaram uma caracterização de risco e não obtiveram resultados que demonstrassem risco ambiental associado a exposição a filtros UV. O mesmo ocorreu na avaliação feita por Layton (2015), em que AVO e BF-3 não ofereceram risco ecológico.

Dessa maneira, infere-se que os métodos de avaliação de risco ecológico devem ter seus resultados analisados com cautela, uma vez que as variações metodológicas interferem na determinação dos riscos e podem não se aproximar fielmente das situações ambientais reais.

4 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos foi possível concluir que os filtros solares apresentaram capacidade para interferir na reprodução de *Daphnia magna* e *Desmodesmus subspicatus*, com efeitos crônicos, causados por baixas concentrações, a exemplo de EHMC em *Daphnia magna* e BF-3 em *Desmodesmus subspicatus*.

Além disso, foi observada toxicidade aguda para *Artemia salina*, com destaque para EHMC, com $CE_{50(48h)}$ de $0,37 \text{ mg L}^{-1}$, fato que demonstra o potencial tóxico para organismos marinhos. Cabe ressaltar a importância desses dados, uma vez que até o momento não existiam publicações avaliando a toxicidade de fotoprotetores em *Artemia salina*, mesmo com a existência de outros estudos demonstrando a presença desses contaminantes em água do mar.

A toxicidade aguda em *Daphnia magna* foi comparada com os relatos da literatura científica e foi considerada coerente. Nessa avaliação a molécula de EHMC também se mostrou mais efetiva em relação as outras testadas. Apresentou $CE_{50(48h)}$ de $0,50 \text{ mg L}^{-1}$, valor similar ao observado para *Desmodesmus subspicatus* e *Artemia salina*.

Com a análise dos quocientes de risco, foi possível verificar que os filtros UV não apresentaram risco ecológico nas condições testadas. Contudo, a análise de risco ambiental pode gerar resultados diferentes dependendo das metodologias aplicadas e os resultados devem ser analisados com cautela, considerando a possibilidade de não serem definitivos ou não se aproximarem da realidade, visto que o quociente de risco é uma estimativa matemática.

CAPÍTULO II – Efeitos multigeracionais de concentrações ambientais de filtros UV em *Daphnia magna*

1 INTRODUÇÃO

O consumo de filtros UV resulta em grandes quantidades desses produtos em corpos hídricos. Esses contaminantes possuem baixa biodegradabilidade e possuem potencial para bioacumulação (BLÜTHGEN et al., 2014; MANOVÁ; GOETZ; HUNGERBUEHLER, 2015; NECASOVÁ et al., 2016).

Considerando os potenciais riscos associados à exposição de fotoprotetores em ecossistemas aquáticos, o monitoramento das concentrações presentes no ambiente tem ganhado enfoque nos últimos anos (BRAUSCH; RAND 2011; MAGI et al., 2012; GAGO-FERRERO; DÍAZ-CRUZ; BARCELÓ, 2013; SHARIFAN; KLEIN; MORSE, 2016b). Contudo, os efeitos ecotoxicológicos causados por concentrações de relevância ambiental são pouco conhecidos, sendo necessária a avaliação de toxicidade em baixas concentrações de filtros UV (BLÜGTHGEN; ZUCCHI; FENT, 2012; LI et al., 2018).

Os ensaios de reprodução com *Daphnia magna* são empregados em ecotoxicologia aquática. São vantajosos por apresentarem baixo custo e permitem avaliação ecotoxicológica de inúmeras substâncias (BARATA et al., 2016; CAMPOS et al., 2016).

Na maioria dos estudos esses ensaios são realizados com apenas uma geração de organismos, desconsiderando efeitos multigeracionais, uma vez que o potencial tóxico dos contaminantes pode aumentar, diminuir ou permanecer o mesmo através de gerações. Com isso, os ensaios multigeracionais possibilitam uma extrapolação mais real dos efeitos dos contaminantes em níveis populacionais (BARATA et al., 2016; CAMPOS et al., 2016; CASTRO et al., 2018).

A partir disso, foram realizados ensaios com duas gerações de *Daphnia magna* expostas a concentrações ambientais de 2-etilhexil-4-metoxicinamato, avobenzona, benzofenona-3, octocrileno e a mistura dos quatro fotoprotetores. Foram avaliados: longevidade, tempo para primeira prole, taxa de reprodução e atividade das enzimas catalase, glutathiona-S-transferase e superóxido dismutase.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes

Foram utilizadas soluções estoque de 2-etilhexil-4-metoxicinamato (EHMC) 2 g L⁻¹ (Galena, 98,7%), Avobenzona (AVO) 2 g L⁻¹ (Galena, 98%), Benzofenona-3 (BF-3) 2 g L⁻¹ (Galena 99,9%) e Octocrileno (OC) 2 g L⁻¹ (Galena, 99,2%) em dimetilsulfóxido (DMSO) (99,9%, Neon). A partir dessas soluções, foram preparadas soluções mãe de 1 mg L⁻¹ de cada composto e diluídas para as respectivas concentrações utilizadas no ensaio.

2.2 Toxicidade crônica multigeracional em *Daphnia magna*

Experimentos de toxicidade crônica foram realizados de acordo com a OECD 211 (OECD, 2012). As concentrações de AVO, BF-3, EHMC e OC foram escolhidas com base nas concentrações máximas contidas na publicação de Brausch e Rand (2011), que apresenta um compilado de análises de águas continentais, contendo média, mediana e valores máximos de cada fotoprotetor analisado. Além disso, foram feitos grupos de controle, negativo e de solvente DMSO a 0,003%, definido a partir da maior concentração de solvente presente nos grupos amostrais. A mistura (MIX) dos quatro fotoprotetores também foi estudada, com as mesmas concentrações de exposição de cada molécula (Tabela 10).

Tabela 10. Amostras e concentrações de fotoprotetores em exposição multigeracional com *Daphnia magna*.

Amostra	Concentração (ng L ⁻¹)
Controle	-
DMSO	0,003%
AVO	*4450
BF-3	175
EHMC	224
OC	4450
MIX	AVO 4450 + BF-3 175 + EHMC 224 + OC 4450

Legenda: (*) Valor definido com base na maior concentração encontrada para as outras substâncias testadas (OC: 4450 ng L⁻¹), devido à falta de informações na literatura científica.

Foram avaliadas duas gerações de organismos em exposições de 21 dias: a primeira, nomeada F0 (geração parental) e a segunda chamada de F1, originada pelas proles de F0 que nasceram no 21º dia de ensaio. Os procedimentos de exposição e avaliação de dados foram iguais para F0 e F1.

Neonatos com idade inferior a 24h, provenientes de cultivos de *Daphnia magna* em condições padrão (ABNT, 2016), foram expostos individualmente, em doze replicatas, utilizando béqueres contendo 30 mL de meio M4 (ANEXO D) e as amostras de AVO 4450 ng L⁻¹, EHMC 224 ng L⁻¹, BF-3 175 ng L⁻¹, OC 4450 ng L⁻¹ e MIX. Também foram feitos grupos de controle, denominados Controle (meio M4) e Controle Solvente (DMSO 0,003%).

Os ensaios foram mantidos em incubadora em condições de cultivo, com temperatura a 20±2°C e fotoperíodo de 16h. A cada 48h as soluções foram renovadas, foi realizada alimentação com a microalga *Desmodesmus subspicatus* (10⁶ células mL⁻¹ por réplica) e as proles foram contabilizadas e descartadas. O manejo dos testes foi feito em ambiente climatizado e iluminado, a fim de evitar variações bruscas de temperatura e luminosidade (OECD, 2012).

Após 21 dias de exposição, os organismos de cada amostra e controles foram coletados em microtubos para medição de biomarcadores bioquímicos. Além disso, parâmetros do ciclo de vida foram avaliados: longevidade (percentual médio de organismos vivos até o final do ensaio), tempo médio para primeira reprodução e taxa de reprodução (OECD, 2012).

Para o cálculo da taxa de reprodução (Equação 3) de cada grupo exposto e controles foram consideradas apenas réplicas vivas até o final do experimento (OECD, 2012).

$$TR = (R1 + R2 + R3 + \dots + Rn) / n \quad \text{(Equação 3)}$$

Em que: TR é a taxa de reprodução; R o total de neonatos produzidos durante 21 dias por réplica; n o número de réplicas vivas ao final do ensaio.

Os dados dos parâmetros avaliados foram analisados estatisticamente, inicialmente por análise de normalidade, pelo teste de Kolmogorov Smirnov. Em seguida, as distribuições foram consideradas normais e foi feita análise via ANOVA (um critério) seguido de teste de Dunnett, com nível de confiança de 95% (p<0,05), no software GraphPad Prism 5.0 (OECD, 2012).

2.3 Biomarcadores bioquímicos

A análise de biomarcadores bioquímicos foi realizada com as duas gerações, F0 e F1, após 21 dias de exposição. Cada amostra e controles (dodeplicata) foi dividida em três grupos (triplicatas) contendo quatro indivíduos vivos que foram colocados em microtubos de 2 mL com 250 µL de tampão fosfato (0,1 M, pH 7,2). Em amostras contendo 11 organismos vivos, foram preparados dois tubos com quatro indivíduos e um com três.

Em seguida, as triplicatas (três a quatro indivíduos por réplica) foram imediatamente levadas ao homogeneizador rotativo a 14.000 rpm e tiveram seus tecidos desagregados mecanicamente pelo equipamento. Após a homogeneização, foram centrifugadas a 8.000 G, durante 10 min, a 4 °C, em centrifuga Hitachi.

O material líquido sobrenadante foi utilizado no mesmo dia para determinação de proteínas totais e atividade das enzimas catalase (CAT), glutationa-S-transferase (GST) e superóxido-dismutase (SOD).

2.3.1 Determinação de proteínas totais

O procedimento de determinação de proteínas totais seguiu a metodologia de Bradford (1976), adaptado para microplaca de 96 poços. Este método teve como princípio a leitura de absorvância da forma aniônica do corante reativo de Bradford (BG-250), em 595 nm, causada pelo deslocamento de equilíbrio da reação com proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas (BRADFORD, 1976).

Antes da leitura das amostras, foi preparada uma curva de calibração utilizando albumina de soro bovina (BSA) como padrão de proteínas totais, nas concentrações de 0,000, 0,250, 0,500, 0,750 e 1 mg mL⁻¹. Em cada poço de uma placa de 96 poços, foram adicionados 10 µL de BSA, nas respectivas concentrações da curva analítica, e 250 µL de reagente de Bradford (Sigma-Aldrich), procedimento realizado em quadruplicata, com leitura de absorvância em 595 nm, em leitora de microplacas Fluostar Omega.

Após o preparo da curva analítica foi verificado o coeficiente de correlação linear (R^2) e a equação da reta foi obtida através do software Omega. Foram aceitos valores de R^2 acima de 0,99.

Em seguida, o líquido sobrenadante de cada tubo tipo “eppendorf” proveniente dos ensaios crônicos com *Daphnia magna*, foi analisado em triplicata. Em microplacas de 96 orifícios, foram colocados, em cada poço, 10 μL de amostra, 250 μL de reagente de Bradford (Sigma-Aldrich) e a absorbância medida em 595 nm. Também foi realizada a leitura de uma amostra denominada Branco, composta por água de osmose.

Os resultados obtidos foram transformados em médias para cada amostra e subtraiu-se o valor do Branco (tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2). Os valores corrigidos foram substituídos na equação da reta da curva analítica e foi possível determinar o valor em mg mL^{-1} de proteínas de cada amostra.

2.3.2 Atividade da enzima catalase (CAT)

A quantificação da atividade de catalase seguiu o método de AEBI (1984), que teve como princípio a análise cinética do decréscimo de absorbância, em 240 nm, pela degradação de peróxido de hidrogênio causada pela enzima catalase (AEBI, 1984).

A análise da atividade enzimática foi realizada em duplicata para cada tubo tipo “eppendorf” contendo material líquido sobrenadante das amostras e controles. Em microplacas de 96 poços de poliestireno, especiais para leituras em espectro ultravioleta, foram adicionados, em cada poço, 30 μL de amostra, 70 μL de tampão Tris-HCl (20 mM, EDTA 1,0 mM, pH 7,6) e 150 μL de meio reacional (Tampão Tris-HCl 1,0 M, EDTA 5,0 mM, pH 8,0; água de osmose; H_2O_2 30 mM). A placa foi levada imediatamente para leitora de microplacas Fluostar Omega para análise da cinética de reação, com comprimento de onda fixo em 240 nm, os ciclos de leitura ocorreram a cada 20 segundos, durante 2 minutos.

Os valores obtidos foram descontados das leituras do Branco (30 μL de tampão fosfato 0,1 M, 70 μL de tampão Tris-HCl e 150 μL de meio reacional). Para cada amostra foi observado um intervalo com decaimento de absorbância linear ($R^2 = 0,99$) e com esses valores foi calculada a diferença entre o maior e menor valor medido, denominada ΔABS . Com isso, foi possível calcular a atividade da enzima

catalase expressada em mmoles de H₂O₂ degradado x min⁻¹ x mg de proteína⁻¹. (equação 4).

$$CAT = \left[\frac{(\Delta ABS / min \times 100)}{40} \right] / PROT \quad (\text{Equação 4})$$

Em que: CAT é a atividade de catalase; $\Delta ABS/min$ é a diferença entre a maior e menor absorvância medida em um decaimento linear, dividida pelo tempo de análise; PROT é concentração em mg de proteína⁻¹ mL⁻¹ da amostra analisada.

As atividades de catalase calculadas foram submetidas à análise estatística de normalidade, pelo teste de Kolmogorov Smirnov. Em seguida, as distribuições foram consideradas normais e foi feita análise ANOVA (um critério), seguida de teste de Dunnett, com nível de confiança de 95% (p<0,05), no software GraphPad Prism 5.0.

2.3.3 Atividade da enzima glutationa-S-transferase (GST)

A determinação da atividade de glutationa-S-transferase (GST) foi feita com base na metodologia descrita por Habig et al. (1974). O método teve como princípio a quantificação do aumento de absorvância, em 340 nm, causado pela formação de tioéter devido à reação de conjugação entre 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com a enzima glutationa- S-transferase (GST) (HABIG, et al., 1974).

A análise foi realizada em triplicata utilizando o conteúdo sobrenadante de cada tubo tipo “ependorf” obtido após o término das exposições de F0 e F1. Em microplacas de 96, foram pipetados, em cada poço, 20 μ L de amostra e 180 μ L de meio reacional (GSH 1,5 mM; CDNB 2 mM; tampão fosfato de potássio 1M). Imediatamente após a adição do meio de reação, foi realizada a leitura de absorvância em leitora de microplacas Fluostar Omega, com comprimento de onda fixo em 340 nm, em ciclos de 20 segundos, durante 6 minutos.

Os valores obtidos foram descontados das leituras do Branco (20 μ L de tampão fosfato 0,1 M e 180 μ L de meio reacional). Para cada amostra foi observado um intervalo com decaimento de absorvância linear ($R^2 = 0,99$) e com esses valores foi calculada a diferença entre o maior e menor valor medido, denominada ΔABS .

Com isso, foi possível calcular a atividade da enzima GST expressada em μmoles de tioéter formado $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg}$ de proteína $^{-1}$. (equação 5).

$$GST = \left[\frac{(\frac{\Delta ABS}{min} \times 10)}{5,76} \right] / PROT \quad (\text{Equação 5})$$

Em que: GST é a atividade de glutathiona-S-transferase; $\Delta\text{ABS}/\text{min}$ é a diferença entre a maior e menor absorvância medida em um decaimento linear, dividida pelo tempo de análise; PROT é concentração em mg de proteína $^{-1} \text{mL}^{-1}$ da amostra analisada.

As atividades de GST passaram por análise estatística, inicialmente de normalidade, pelo teste de Kolmogorov Smirnov. Em seguida, as distribuições foram consideradas normais e foi feita análise via ANOVA (um critério), seguida de teste de Dunnett, com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$), no software GraphPad Prism 5.0.

2.3.4 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

O método para avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi realizado com base nos trabalhos de Marklund e Marklund (1974) e Maciel et al. (2013), com adaptações para microplacas de 96 poços. A metodologia analítica teve como princípio a análise do decaimento de absorvância, em 320 nm, causado pelo consumo do radical superóxido na presença de SOD. O radical superóxido foi gerado na auto-oxidação de pirogalol em pH básico.

A análise foi realizada em triplicata utilizando o conteúdo sobrenadante de cada tubo tipo “ependorf” obtido após o término das exposições crônicas. Foram transferidos 50 μL de sobrenante para microtubos contendo 1,4 mL de tampão Tris-HCl (50 mM, EDTA 1 mM, pH 9) e foram incubados durante 25 minutos, a 25 °C, em banho-maria. Em seguida, foram transferidos 200 μL do conteúdo incubado para microplaca de 96 poços e 34 μL de pirogalol (1mM, HCl 1 mM) foram adicionados. Imediatamente após esse procedimento, a leitura de absorvância foi realizada em leitora de microplacas Fluostar Omega, em 320 nm, durante 5 minutos, com ciclos a cada 20 segundos. O mesmo procedimento foi realizado para a amostra

denominada auto-oxidação de pirogalol (AOP), contendo água de osmose no lugar de amostra sobrenadante (MACIEL et al., 2013).

Com os resultados das leituras de absorvância, a atividade de SOD foi calculada utilizando valores de porcentagem de inibição em relação a AOP (auto-oxidação de pirogalol), sendo que 1 unidade (1U) corresponde a 50% de inibição. A partir dessa conversão, a atividade de SOD foi expressa em U x mg de proteína⁻¹ (MACIEL et al., 2013)..

As atividades de SOD foram analisadas estatisticamente pelo teste de Kolmogorov Smirnov. Em seguida, as distribuições foram consideradas normais e foi feita análise por ANOVA (um critério), seguida de teste de Dunnett, com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$), no software GraphPad Prism 5.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Toxicidade crônica multigeracional em *Daphnia magna*

Os parâmetros avaliados durante o ensaio crônico foram: longevidade, tempo para primeira reprodução e taxa de reprodução. A longevidade não foi afetada, uma vez que os índices de mortalidade foram baixos, com percentuais abaixo de 10% para todas amostras e controles, em F0 e F1. Não foram verificadas diferenças significativas após ANOVA (um critério) seguida por teste de Dunnett, considerando 95% de confiança (Tabela 11).

Tabela 11. Percentual de longevidade obtido para cada amostra testada em ensaio multigeracional com *Daphnia magna*.

Substância	Longevidade F0 (%)	Longevidade F1 (%)	Conclusão
Controle	91,66	100	NS
DMSO	100	100	NS
AVO	91,66	100	NS
BF-3	91,66	100	NS
EHMC	100	100	NS
OC	100	91,66	NS
MIX	100	91,66	NS

Legenda: (NS) Não significativo em ANOVA + Dunnett com $p < 0,05$.

A inexistência de efeitos dessa ordem se caracteriza pela faixa de concentração dos fotoprotetores, a qual é muito inferior à concentração capaz de causar mortalidade, mesmo em ensaios de longa exposição. Conforme observado na discussão da seção 3.2, do Capítulo 1, do presente trabalho, EHMC 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ e OC 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ afetaram a longevidade de *Daphnia magna* em concentrações muito acima das testadas em F0 e F1 (EHMC 224 ng L^{-1} ; OC 4450 ng L^{-1}), sendo aproximadamente 56 vezes maior para OC e 220 vezes para EHMC. Entretanto, cabe ressaltar que até o momento, não havia registros de avaliação de longevidade em mais de uma geração de *Daphnia magna* exposta a concentrações ambientais de filtros UV.

O tempo necessário para a primeira reprodução também foi avaliado e não foi observado efeito significativo em F0, nenhuma das amostras diferiu em relação ao controle, todas as médias foram próximas. Já em F1 foi verificado atraso

na primeira reprodução dos grupos AVO (10,33 dias), BF-3 (10,08 dias) e MIX (10,09 dias) em relação ao Controle F1 (8,2 dias) (Figura 8).

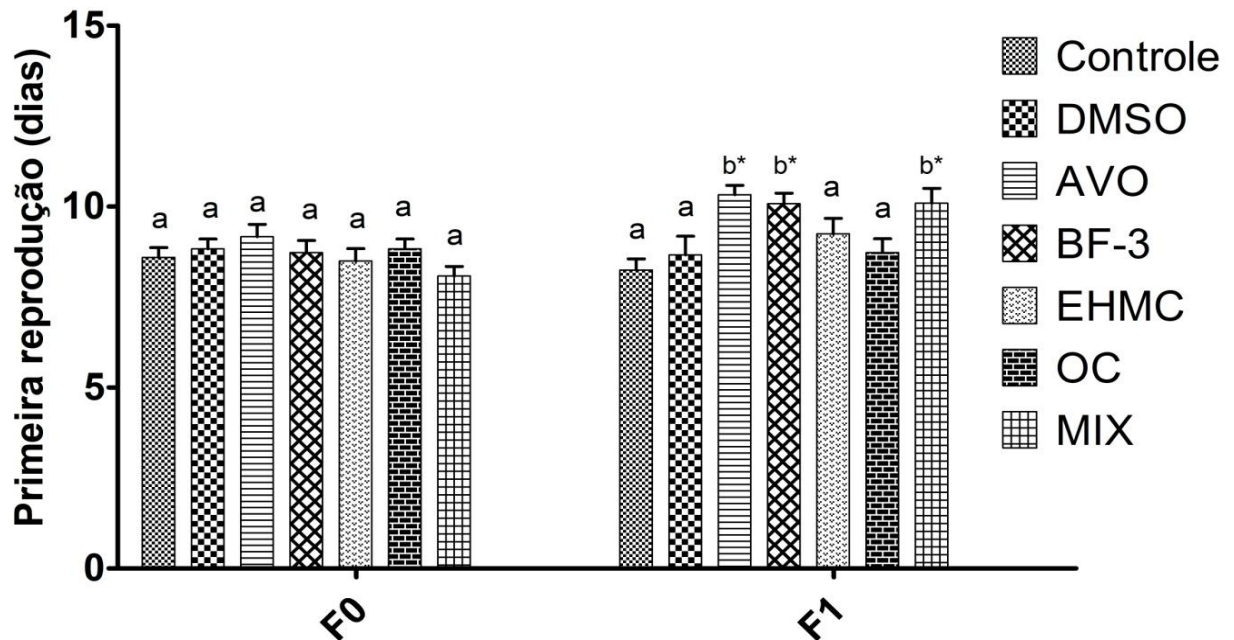


Figura 8. Tempo necessário para primeira reprodução nas gerações F0 e F1. Legenda: (a) Sem diferença significativa; (b*) $p < 0,05$ em ANOVA + teste de Dunnett.

Além da comparação das amostras com controle, em F0 e F1, os grupos controle (F0 = 8,6 dias; F1 = 8,2 dias) e DMSO (F0 = 8,83 dias; F1 = 8,66) foram comparados entre si, via ANOVA (um critério), seguido por teste de Tuckey, com 95% de confiança. Foi verificado que o tempo necessário para primeira reprodução não foi afetado entre as gerações desses grupos, bem como, não houve efeito do solvente (DMSO 0,003%) no parâmetro avaliado.

As taxas de reprodução também foram analisadas e não foram observados efeitos reprodutivos em F0. Contudo, na geração F1 foi verificado efeito inibitório nas amostras de AVO (34,50 neonatos x réplica⁻¹ x 21 dias⁻¹), BF-3 (31,92 neonatos x réplica⁻¹ x 21 dias⁻¹), EHMC (35,17 neonatos x réplica⁻¹ x 21 dias⁻¹) e MIX (35,18 neonatos x réplica⁻¹ x 21 dias⁻¹) em relação ao controle F0 (47,20 neonatos x réplica⁻¹ x 21 dias⁻¹) e F1 (46,00 neonatos x réplica⁻¹ x 21 dias⁻¹) (Figura 9).

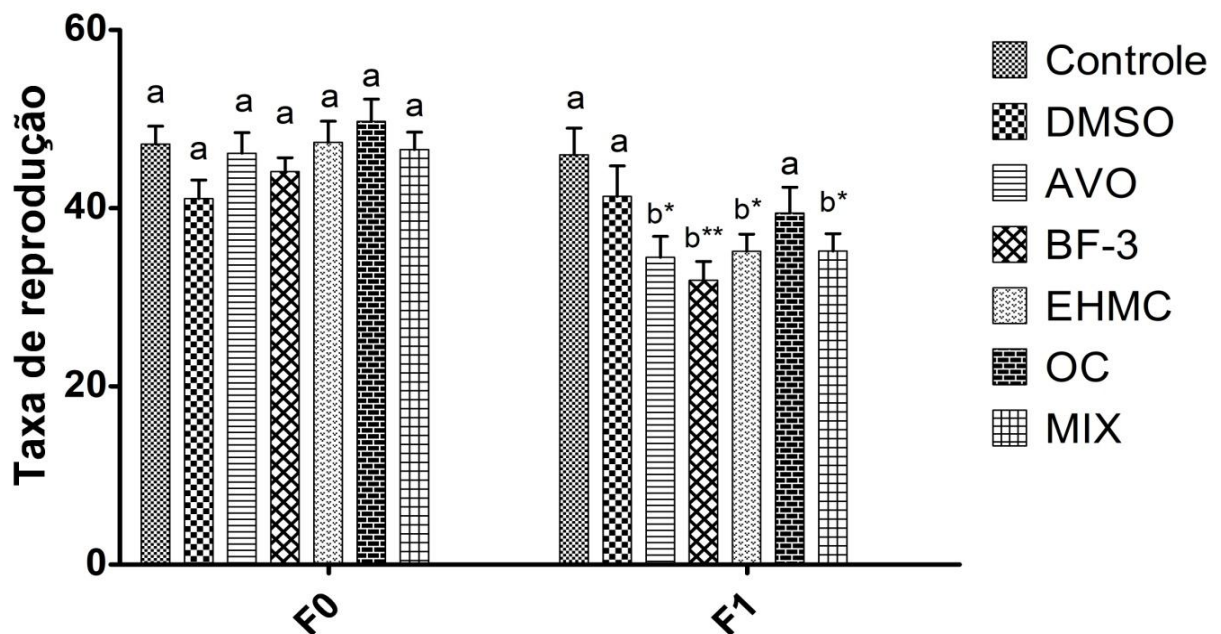


Figura 9. Taxas de reprodução observadas em F0 e F1.

Legenda: (a) Sem diferença significativa; (b*) $p < 0,05$ em ANOVA + teste de Dunnett; (b**) $p < 0,01$ em ANOVA + teste de Dunnett

Os grupos Controle F0 ($47,20$ neonatos \times réplica⁻¹ \times 21 dias⁻¹) e F1 ($46,00$ neonatos \times réplica⁻¹ \times 21 dias⁻¹) também foram comparados estatisticamente por ANOVA + Tuckey ($p < 0,05$), com o grupo DMSO F0 ($41,08$ neonatos \times réplica⁻¹ \times 21 dias⁻¹) e F1 ($41,33$ neonatos \times réplica⁻¹ \times 21 dias⁻¹). Não foram registradas diferenças significativas entre os grupos analisados, demonstrando ausência de efeitos reprodutivos entre as gerações de Controle e controle de solvente DMSO 0,003%. Os organismos expostos às amostras de AVO, BF-3, EHMC e MIX apresentaram alterações no sistema reprodutivo em F1, evidenciando o efeito multigeracional da exposição aos fotoprotetores.

No estudo de Layton (2015) foram verificados atrasos significativos na produção da primeira prole de *Daphnia magna* causados por AVO ($0,22$ mg L⁻¹), BF-3 (10 mg L⁻¹) e EHMC ($0,03$ mg L⁻¹) em ensaio crônico tradicional de 21 dias. Mesmo sendo concentrações com baixa relevância ambiental, os dados de Layton (2015), corroboram com os resultados observados na geração F1 de AVO e BF-3, pois essas duas moléculas apresentam potencial para interferência endócrina, assim como EHMC (MOROHOSHI et al., 2005; OZÁEZ et al., 2016; WANG et al., 2016).

O grupo das benzofenonas é constantemente relacionado a múltiplas alterações estrogênicas e androgênicas em peixes, ratos e seres humanos. Os efeitos mais comuns são: inibição de estradiol, ativação de receptores estrogênicos, indução da produção de vitelogenina em peixes e inibição da ação da testosterona em ratos. Além disso, a biotransformação desses compostos pode potencializar os efeitos disruptores, uma vez que múltiplos metabólitos podem ser gerados (MOROHOSHI et al., 2005; MOLINA-MOLINA et al., 2008; WATANABE et al., 2015).

A regulação endócrina está diretamente ligada ao funcionamento normal de um organismo, caso seja afetada, pode desencadear disfunções, por exemplo, de atrasos no desenvolvimento reprodutivo, diminuição ou completa inibição das taxas reprodutivas (MOROHOSHI et al., 2005; CAMPOS et al., 2016; OZÁEZ; MORCILLO; MARTÍNEZ-GUITARTE, 2016; WANG et al., 2016). A relação entre o possível efeito de desregulação endócrina e os resultados observados de atraso e inibição reprodutiva na geração F1 ficou evidente. Contudo, os impactos causados por disruptores endócrinos em invertebrados de água doce são pouco conhecidos (OZÁEZ; MORCILLO; MARTÍNEZ-GUITARTE, 2016).

Possíveis efeitos de bioacumulação também podem ser inferidos, pois exposições ao longo de gerações podem causar altos índices de bioacumulação nos tecidos dos organismos, principalmente das gerações seguintes a parental, uma vez que são expostas aos contaminantes da fase embrionária até a vida adulta. Além disso, quando uma substância não é metabolizada e excretada na mesma taxa em que é absorvida, pode ocorrer bioacumulação, dependendo do nível trófico e forma de exposição. A bioacumulação pode comprometer funções do metabolismo celular, além de gerar estresse oxidativo, causar danos a membranas lipídicas, interferir na permeabilidade celular e dificultar o transporte de nutrientes (FENT et al., 2010; PESTOTNIK; KOSJEK; HEATH, 2014; GAGO-FERRERO; DÍAZ-CRUZ; BARCELLÓ, 2015).

Quanto aos resultados obtidos na geração F1 da amostra MIX (AVO 4450 ng L⁻¹; BF-3 175 ng L⁻¹; EHMC 224 ng L⁻¹ e OC 4450 ng L⁻¹), verificou-se atraso na produção de primeira prole e inibição reprodutiva em níveis próximos aos observados para as amostras isoladas. Segundo Park et al. (2017), a interação entre AVO, EHMC e OC é antagônica, ou seja, a mistura das três moléculas é menos tóxica do que quando isoladas, entretanto esse efeito não foi verificado nos resultados de MIX. Devido à presença de BF-3 na mistura, não foi possível afirmar

qual tipo de interação ocorreu, uma vez que a coexistência de diferentes contaminantes pode influenciar na interação, absorção e toxicidade da mistura (PABLOS; GARCIA-HORTIGÜELA; FERNÁNDEZ, 2015).

Em comparação a exposição crônica tradicional de 21 dias, em que apenas uma geração foi avaliada, em concentrações na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$, apresentada no Capítulo 1, seção 3.4, do presente trabalho, verificou-se que nos ensaios multigeracionais os organismos foram mais sensíveis à ação dos contaminantes, devido à exposição por duas gerações. Estudos multigeracionais apresentam respostas ecologicamente mais relevantes, pois possibilitam a avaliação da toxicidade de substâncias em concentrações encontradas no ambiente, que se aproximam de uma extrapolação mais realista dos efeitos em nível populacional (CASTRO et al., 2018).

3.2 Biomarcadores bioquímicos

A atividade dos biomarcadores bioquímicos catalase (CAT) e glutiona-S-transferase (GST) foi analisada após a exposição das gerações F0 e F1 (Figura 10).

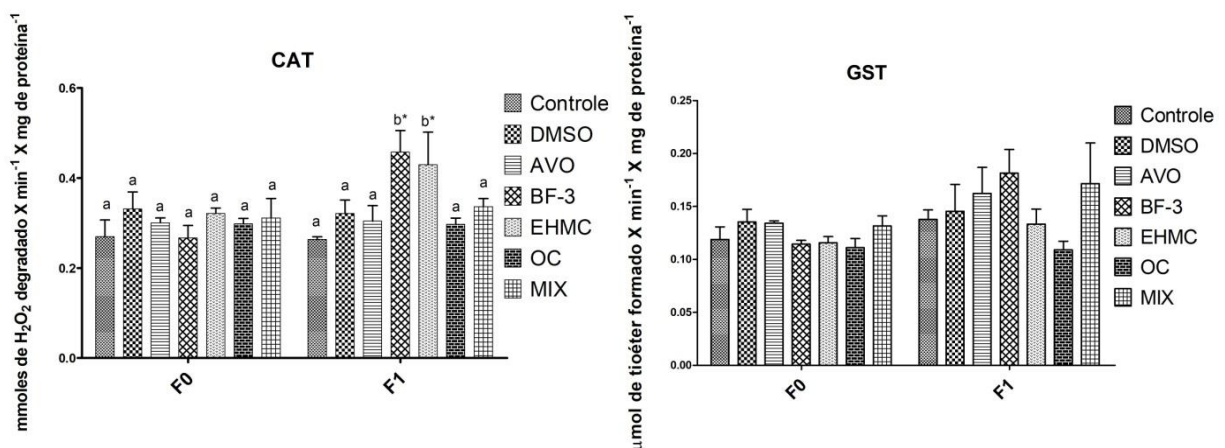


Figura 10. Atividade das enzimas catalase e glutiona-S-transferase medidas em F0 e F1. Legenda: (a) Sem diferença significativa (b*) $p < 0,05$ em ANOVA + teste de Dunnett.

Com os resultados obtidos para CAT não foram verificadas diferenças significativas nos grupos expostos na primeira geração (F0), entretanto os organismos de F1 expostos a BF-3 e EHMC tiveram a atividade aumentada

significativamente, em relação ao Controle F1, considerando 95% de confiança em ANOVA+Dunnett.

A atividade de GST não sofreu alterações significativas nos grupos de exposição em comparação ao grupo Controle, em F0 e F1. Contudo, mesmo sem significância estatística, observou-se, em F1, tendência de aumento da atividade enzimática nas amostras de BF-3, EHMC e MIX.

O sistema antioxidante presente nas células eucarióticas permite a proteção contra espécies reativas de oxigênio (EROs) que são geradas na detoxificação de xenobióticos. As enzimas CAT, GST e SOD exercem funções importantes na degradação de EROs. Nos peroxissomos, os xenobióticos sofrem oxidação e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é gerado como subproduto e em seguida degradado pela CAT. Dessa maneira, considerou-se que o aumento da atividade de CAT, em F1, foi induzido por conta da exposição à BF-3 e EHMC (BOELSTERLI, 2003; OOST et al., 2003).

Na pesquisa de Li et al. (2015) foi relatado estresse oxidativo em peixes da espécie *Carassius auratus*, causado por $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BF-3. Os autores avaliaram SOD, GST e CAT e concluíram que a exposição a BF-3 aumenta a produção de EROs e desencadeia estresse oxidativo no fígado de *Carassius auratus*.

O aumento da atividade de CAT causado por BF-3 também foi observado no estudo de Gao et al. (2013), em que organismos da espécie *Tetrahymena thermophyla* foram expostos a $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de BF-3 e apresentaram alterações significativas na atividade de CAT.

O gene hsp70 é ativado em resposta a estresses causados por xenobióticos em níveis celulares. Esse gene é considerado um biomarcador sensível para medir efeitos proteotóxicos, caracterizados pelo aumento da concentração de EROs. Em larvas de *Chironomus riparius* expostas a EHMC foi verificada a indução de hsp70, o que indica possível efeito de estresse oxidativo causado pelo contaminante (OZÁEZ; MORCILLO; MARTÍNEZ-GUITARTE, 2016).

Moléculas orgânicas que apresentam anéis aromáticos e hidroxilas em sua composição, como no caso de BF-3 e EHMC, podem sofrer biotransformação durante o metabolismo celular e gerar intermediários reativos que podem aumentar a produção de EROs e conseqüentemente a atividade de enzimas detoxificantes, como o caso de CAT, GST e SOD (BOELSTERLI, 2003; WATANABE et al., 2015).

As análises de SOD também foram realizadas ao final das exposições e F0 e F1. Verificou-se que na geração F0 os níveis de SOD, em grupos controle e amostrais, foram baixos. Em alguns casos não foi detectada, com valores negativos de U x mg de proteína⁻¹ (DMSO, AVO, OC e MIX), e em outros (Controle, BF-3 e EHMC), em baixas concentrações. Esses resultados foram considerados coerentes para F0, uma vez que em outros parâmetros avaliados também não foram registrados aumento de atividade enzimática ou inibição reprodutiva nessa geração (Figura 11).

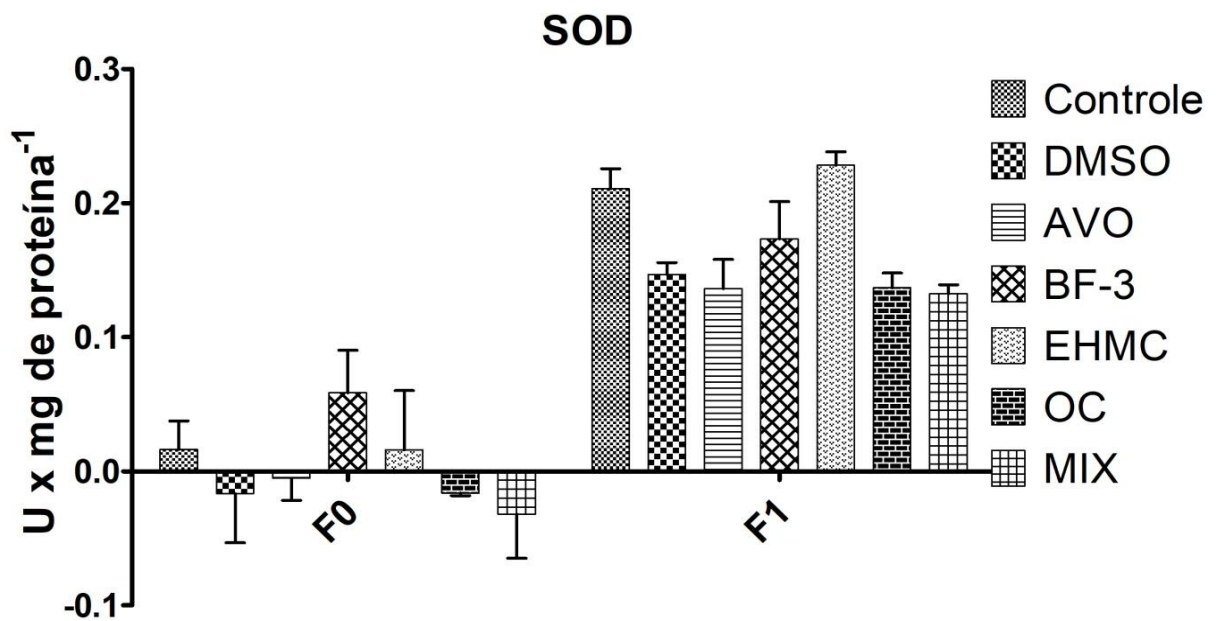


Figura 11. Atividade da enzima superóxido dismutase em F1 e F0.

Ao analisar a geração F1, foi observado aumento significativo da concentração de SOD em relação a F0, para todas as amostras (ANOVA+Dunnet). Esse comportamento não era esperado para os grupos Controle e DMSO, uma vez que não deveriam sofrer qualquer tipo de estresse. Considerando esses fatores, não é possível afirmar o que pode ter causado esse aumento na concentração, visto que todos os procedimentos foram realizados de acordo com as metodologias seguidas.

A enzima SOD catalisa a conversão do ânion superóxido em H₂O₂, que posteriormente é degradado pela CAT em oxigênio e água (BOELSTERLI, 2003). Logo, o aumento significativo registrado na geração F1 deveria gerar tendência de aumento na atividade de CAT, fato que não foi observado para Controle F1 quando comparado ao Controle F0 via ANOVA + Dunnet, uma vez que as médias de atividade de CAT entre os controles das duas gerações ficaram muito próximas.

Com isso, não foi possível confirmar efeitos causados pelas amostras na concentração de SOD devido ao aumento da concentração em Controle F1, visto que não foram observadas diferenças significativas em ensaio ANOVA, seguido de teste de Dunnett, com $p < 0,05$.

4 CONCLUSÃO

Com os resultados apresentados neste capítulo foi possível concluir que os filtros solares apresentaram capacidade para interferir no ciclo de vida de *Daphnia magna*, em exposição crônica multigeracional.

Os filtros UV analisados não causaram mortalidade significativa em nenhuma geração exposta, entretanto na segunda geração foi observado atraso reprodutivo dos organismos dos grupos AVO, BF-3 e MIX (AVO, BF-3, EHMC e OC). Além do atraso na reprodução, também foi verificada diminuição nas taxas de reprodução em AVO, BF-3, EHMC e MIX. Fatores que foram afetados possivelmente por mecanismos de interferência endócrina dos contaminantes, também por bioacumulação ao longo do ciclo de vida e ocorrida entre as gerações.

Além das alterações de ordem reprodutiva, foi observado aumento significativo na atividade da enzima CAT, em BF-3 e EHMC, indicando mecanismo de indução do sistema antioxidante para degradação de EROs geradas pela exposição aos filtros UV.

Dessa maneira concluiu-se que a exposição a filtros solares em concentrações ambientais pode causar alterações de caráter reprodutivo, com potencial para interferência endócrina, ao longo de gerações, causando impactos no ciclo de vida dos organismos e no sistema de defesa antioxidante.

CAPÍTULO III – Efeitos de concentrações ambientais de filtros UV em embriões de *Rhamdia quelen*

1 INTRODUÇÃO

Os ambientes aquáticos são os principais destinos dos resíduos de produtos de higiene pessoal, dentre eles os filtros solares, visto que a eficiência dos sistemas de coleta e tratamento de esgotos é baixa (PESTOTNIK; KOSJEK; HEATH, 2014; SILVA, 2014). Esses contaminantes são encontrados em corpos hídricos na faixa de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$ (BRAUSCH; RAND 2011; MAGI et al., 2012; GAGO-FERRERO; DÍAZ-CRUZ; BARCELÓ, 2013; SHARIFAN; KLEIN; MORSE, 2016b).

Existem poucos dados sobre a ecotoxicidade dos filtros UV em concentrações ambientais. Nesse sentido, ressalta-se a importância da avaliação dos possíveis efeitos relacionados a exposições em baixas concentrações desses contaminantes (BLÜGTHGEN; ZUCCHI; LI et al., 2018).

Uma opção para avaliação de toxicidade dos filtros UV são os ensaios com embriões de peixe, uma vez que esses organismos apresentam maior sensibilidade nos estágios iniciais de desenvolvimento (BLÜGTHGEN et al., 2014; LI et al., 2018).

A espécie *Danio rerio* é amplamente utilizada para esse tipo de estudo, entretanto espécies nativas, as quais apresentam maior representatividade ecológica, ainda são pouco adotadas como modelos de estudo para avaliação da toxicidade (BARRERA, 2013).

A partir disso, foram realizados ensaios utilizando embriões de *Rhamdia quelen*, em exposição de 96h a concentrações ambientais de 2-etilhexil-4-metoxicinamato, avobenzona, benzofenona-3, octocrileno e a mistura dos quatro fotoprotetores. Foram avaliados: mortalidade, presença de anomalias morfológicas e biomarcadores bioquímicos acetilcolinesterase, catalase, glutathione-S-transferase, superóxido dismutase e carbonilação de proteínas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes

Foram utilizadas soluções estoque de 2-etilhexil-4-metoxicinamato (EHMC) 2 g L⁻¹ (Galena, 98,7%), Avobenzona (AVO) 2 g L⁻¹ (Galena, 98%), Benzofenona-3 (BF-3) 2 g L⁻¹ (Galena 99,9%) e Octocrileno (OC) 2 g L⁻¹ (Galena, 99,2%) em DMSO (98,9%, Neon). A partir dessas soluções, foram preparadas soluções mãe de 1 e 0,1 mg L⁻¹ de cada composto e diluídas para as respectivas concentrações utilizadas no ensaio.

2.2 Exposição e avaliação de anomalias morfológicas

Este ensaio passou por aprovação prévia do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (CEUA-UTFPR), conforme processo nº 23064.024487/2018-12, aprovado em 13 de setembro de 2018, pelo parecer SEI nº 0432708 (APÊNDICE B). Os procedimentos foram realizados de acordo com as normas e legislações vigentes de ética em pesquisa com animais.

O ensaio seguiu a metodologia descrita pelo protocolo 236 (OECD, 2013) e o trabalho de Barrera (2013).

Os óvulos fertilizados de *Rhamdia quelen* foram adquiridos da piscicultura Panamá, localizada na cidade de Paulo Lopes - SC. Doze horas após a fertilização, os organismos viáveis foram selecionados e distribuídos individualmente em placas de 96 poços, quatro placas para cada amostra. Foram 88 organismos expostos às amostras e 8 apenas em água reconstituída, chamados de controles de Placa, para monitorar o ambiente de exposição (OECD, 2013).

Os embriões foram expostos a concentrações ambientais de filtros UV (BRAUSCH; RAND 2011) (Tabela 12), as quais foram obtidas a partir da diluição das soluções estoque em água reconstituída (ANEXO E).

Tabela 12. Amostras para exposição de embriões de *Rhamdia quelen*.

Amostra	Concentração 1 (ng L⁻¹)	Concentração 2 (ng L⁻¹)
Controle negativo	-	-
Controle DMSO	0,03%	-
Avobenzona*	20,5	4450
Benzofenona-3	20,5	175
2-etilhexil-4-metoxicinamato	6,1	224
Octocrileno	1,90	4450
Mistura	Concentração 2 das quatro substâncias	-

Legenda: (*) Devido à falta de informações sobre concentrações ambientais dessa molécula, as concentrações usadas nesse ensaio foram definidas com base nos valores mais altos de Concentração 1 e 2 das outras moléculas testadas.

O ensaio teve duração de 96 horas e as placas foram mantidas em incubadora com temperatura a $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12h (BARRERA, 2013; OECD, 2013). A renovação de soluções e observação dos embriões ocorreu em ambiente climatizado e iluminado, para evitar variações bruscas de temperatura e luminosidade. As soluções tiveram renovação de 125 μL (volume total: 250 μL) a cada 24 horas, contadas a partir do início da exposição. Durante a renovação das soluções cada organismo teve parâmetros morfológicos avaliados individualmente em estereomicroscópio.

Os danos morfológicos foram categorizados pela região em que ocorreram e pelo tipo de anomalia observada. Foram atribuídos valores de 1 a 4, denominados escores, sendo 4 para danos mais severos e 1 mais brandos (Tabela 13).

Tabela 13. Escore associado às categorias e tipos de anomalia morfológica observadas em *Rhamdia quelen*.

Categoria do dano	Anomalia morfológica	Escore
Axial	Lordose ou cifose	4
	Esqueleto atrofiado	4
	Enrolamento caudal	4
Cefálico	Ausência de olhos	4
	Deformidade bucal	4
	Deformidade facial	3
Nadadeiras	Edema ocular	4
	Atrofia/deformidade	2
	Lesão	1
Torácico/Abdominal	Atrofia corporal	2
	Distensão corporal	2
	Edema cardíaco	4

Ao final do ensaio foi feita uma média de escore por amostra, bem como, percentual de mortalidade. Esses dados passaram por análise de normalidade, pelo teste de Kolmogorov Smirnov. Em seguida, as distribuições foram consideradas normais e foi feita análise por ANOVA (um critério), seguida de teste de Dunnett, com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$), no software GraphPad Prism 5.0.

Após a exposição os organismos foram distribuídos em tubos tipo Eppendorf e sacrificados por congelamento instantâneo, em ultrafreezer, a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para análise de biomarcadores bioquímicos.

2.3 Biomarcadores bioquímicos

A análise de biomarcadores bioquímicos foi realizada após 96 horas de exposição. Cada amostra foi dividida em quatro grupos (quadruplicata) contendo 85 a 88 indivíduos vivos que foram colocados em microtubos de 2,0 mL com 500 μL de Tampão Tris-HCl (20 mM, EDTA 1,0 mM, pH 7,6). A variação na quantidade de indivíduos por microtubo ocorreu devido à mortalidade durante o período de exposição.

Os microtubos com os organismos foram levados ao ultrafreezer, para sacrifício, a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, por congelamento instantâneo. Posteriormente, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente e levadas ao homegeneizador

rotativo a 14.000 rpm e tiveram seus tecidos desagregados mecanicamente pelo equipamento. Após a homogeneização, foram centrifugadas a 10.000 G, durante 10 min, a 4 °C, em centrífuga Hitachi.

O material líquido sobrenadante foi utilizado para determinação de proteínas totais e normalização da concentração proteica. Após a normalização, foram feitas análises de carbonilação proteica (PCO) e foram medidas as atividades das enzimas acetil colinesterase (AChE), catalase (CAT), glutationa-S-transferase (GST) e superóxidodismutase (SOD).

2.3.1 Determinação e normalização da concentração de proteínas totais

O procedimento de determinação de proteínas totais seguiu a metodologia de Bradford (1976), adaptado para microplaca de 96 poços. Este método teve como princípio a leitura de absorvância da forma aniônica do corante reativo de Bradford (BG-250), em 595 nm, causada pelo deslocamento de equilíbrio da reação com proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas (BRADFORD, 1976).

Antes da leitura das amostras, foi preparada uma curva de calibração utilizando albumina de soro bovina (BSA) como padrão de proteínas totais, nas concentrações de 0,000, 0,250, 0,500, 0,750 e 1 mg mL⁻¹. Em cada poço de uma placa de 96 poços, foram adicionados 10 µL de BSA, nas respectivas concentrações da curva analítica, e 250 µL de reagente de Bradford (Sigma-Aldrich), procedimento realizado em quadruplicata, com leitura de absorvância em 595 nm, em leitora de microplacas Fluostar Omega.

Após o preparo da curva analítica foi verificado o coeficiente de correlação linear (R^2) e a equação da reta foi obtida através do software Omega. Foram aceitos valores de R^2 acima de 0,99.

Em seguida, o líquido sobrenadante de cada microtubo de amostra foi analisado em triplicata. Em microplacas de 96 orifícios, foram colocados, em cada poço, 10 µL de amostra, 250 µL de reagente de Bradford (Sigma-Aldrich) e a absorvância medida em 595 nm. Também foi realizada a leitura de uma amostra denominada Branco, composta por água de osmose.

Os resultados obtidos foram transformados em médias para cada amostra e subtraiu-se o valor do Branco. Os valores corrigidos foram substituídos na

equação da reta da curva analítica e foi possível determinar o valor em mg mL^{-1} de proteínas de cada amostra.

Os valores de concentração proteica das amostras foram usados para calcular a diluição de normalização para 1 mg mL^{-1} , concentração necessária para análise de AChE, CAT, GST, e SOD. Como também, para 2 mg mL^{-1} , para análise de PCO. O conteúdo de todas as amostras foi diluído em Tampão Tris-HCl (20 mM, EDTA 1,0 mM, pH 7,6) com o volume necessário para atingir as respectivas concentrações. As alíquotas necessárias para cada biomarcador bioquímico foram separadas em microtubos e em seguida as metodologias analíticas foram aplicadas.

2.3.2 Carbonilação de proteínas (PCO)

Para analisar a carbonilação de proteínas foi utilizado o método descrito por Levine et al. (1994), em que foram detectadas dinitrofenil hidrazonas, a 370 nm. As moléculas detectadas foram formadas a partir da reação de proteínas carboniladas presentes na amostra e 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) (LEVINE et al., 1994).

A análise foi realizada em triplicata utilizando as amostras homogeneizadas e normalizadas para 2 mg mL^{-1} de proteínas totais. O procedimento analítico ocorreu com um branco por amostra, 200 μL foram adicionados em cada microtubo de 2 mL (um para a reação das proteínas com DNPH e outro para o branco). Aos brancos foram adicionados 500 μL de HCl (2 M) e os tubos de reação 500 μL meio reacional (2,4-dinitrofenil-hidrazina 10 mM), todos foram incubados durante 90 min, a 37 °C. Em seguida 700 μL de ácido tricloroacético (28%) foram adicionados e misturados em *vortex*.

O material foi levado a centrifugação (Hitachi MODELO) a 4.000 G, por 10 min, a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. Ao corpo de fundo, formado pela centrifugação, foi misturado 1 mL de uma solução etanol-acetato de etila (1:1) e novamente centrifugado. Este procedimento foi repetido três vezes, até quando o sobrenadante não apresentou mais coloração. O corpo de fundo resultante das centrifugações foi misturado em 500 μL de hidrocloreto de guanidina (6 M) e centrifugado a 9.000 G, durante 3 minutos, a 4 °C.

Em seguida, o conteúdo dos tubos de reação e brancos foi analisado em triplicata. Em microplacas de 96 poços, foram adicionados 200 μL de cada

amostra e brancos. Imediatamente, a leitura de absorvância foi feita em leitora de microplacas Fluostar Omega, em 370 nm.

Os resultados da leitura de absorvância das amostras de reação foram descontados dos valores medidos para seus brancos correspondentes. Com isso, a concentração de carbonilas foi calculada e expressa em μmoles de carbonilas x mg de proteína⁻¹ (Equação 6).

$$PCO = (ABS_{\text{rea}} - ABS_{\text{bra}}) \times 0,0992 \quad (\text{Equação 6})$$

Em que: PCO é a concentração de carbonilas; ABS_{rea} é a absorvância medida da amostra que reagiu com DNPH; ABS_{bra} é a absorvância medida do branco da amostra.

Os valores de PCO resultantes passaram por análise estatística, inicialmente de normalidade, pelo teste de Kolmogorov Smirnov. Em seguida, as distribuições foram consideradas normais e foi feita análise ANOVA (um critério), seguida de teste de Dunnett, com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$), no software GraphPad Prism 5.0.

2.3.3 Atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE)

Para detecção da atividade de acetilcolinesterase foi empregado o método descrito por Ellman et al. (1961), com adaptações para microplaca por Guilhermino et al (1996). O método foi baseado na reação de hidrólise ocorrida entre AChE presente na amostra e acetilticolina, a partir dessa reação, o subproduto tiocolina interagiu com ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) e possibilitou a detecção de seus produtos 2-nitrobenzoato-5-mercaptotiocolina e 5-tio-2-nitrobenzoato em 405 nm (ELLMAN et al., 1961).

A análise foi realizada em triplicata utilizando as amostras homegeneizadas e normalizadas para 1 mg mL⁻¹ de proteínas totais. Em microplacas de 96 poços, foram pipetados, em cada poço, 20 μL de amostra, 130 μL de DTNB (0,75 mM) e 50 μL de iodeto de acetilcolina (9mM). Imediatamente após a adição dos reagentes, foi realizada a leitura de absorvância em leitora de microplacas Fluostar Omega, com comprimento de onda fixo em 405 nm, em ciclos de 40 segundos, durante 5 minutos.

Os valores obtidos foram descontados das leituras do Branco (20 µL de tampão Tris-HCl 20 mM, EDTA 1,0 mM; 130 µL de DTNB (0,75 mM) e 50 µL de iodeto de acetilcolina 9 mM). Para cada amostra foi observado um intervalo com decaimento de absorvância linear ($R^2 = 0,99$) e com esses valores foi calculada a diferença entre o maior e menor valor medido, denominada ΔABS . Com isso, foi possível calcular a atividade da enzima AChE, expressada em µmoles de acetilcolina hidrolisada $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg de proteína}^{-1}$ (equação 7).

$$AChE = \frac{\Delta ABS}{min} \times 1,22549 \quad (\text{Equação 7})$$

Em que: AChE é a atividade de acetilcolinesterase; $\Delta ABS/min$ é a diferença entre a maior e menor absorvância medida em um aumento linear, dividida pelo tempo de análise.

As atividades de AChE foram analisadas estatisticamente, inicialmente por normalidade, pelo teste de Kolmogorov Smirnov. Em seguida, as distribuições foram consideradas normais e foi feita análise ANOVA (um critério), seguida de teste de Dunnett, com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$), no software GraphPad Prism 5.0.

2.3.4 Atividade da enzima catalase (CAT)

A quantificação da atividade de catalase seguiu o método de AEBI (1984), que teve como princípio a análise cinética do decréscimo de absorvância, em 240 nm, pela degradação de peróxido de hidrogênio causada pela enzima catalase (AEBI, 1984).

A análise da atividade enzimática foi realizada em duplicata com as amostras homogeneizadas e normalizadas para 1 mg mL^{-1} de proteínas totais. Em microplacas de 96 poços de poliestireno, especiais para leituras em espectro ultravioleta, foram adicionados, em cada poço, 30 µL de amostra, 70 µL de tampão Tris-HCl (20 mM, EDTA 1,0 mM, pH 7,6) e 150 µL de meio reacional (Tampão Tris-HCl 1,0 M, EDTA 5,0 mM, pH 8,0; água de osmose; H_2O_2 30 mM). A placa foi levada imediatamente para leitora de microplacas Fluostar Omega para análise da cinética

de reação, com comprimento de onda fixo em 240 nm, os ciclos de leitura ocorreram a cada 20 segundos, durante 2 minutos.

Os valores obtidos foram descontados das leituras do Branco (30 µL de tampão Tris-HCl 20 mM, EDTA 1,0 mM; 70 µL de tampão Tris-HCl e 150 µL de meio reacional). Para cada amostra foi observado um intervalo com decaimento de absorvância linear ($R^2 = 0,99$) e com esses valores foi calculada a diferença entre o maior e menor valor medido, denominada ΔABS . Com isso, foi possível calcular a atividade da enzima catalase, expressada em mmoles de H_2O_2 degradado $\times min^{-1} \times mg$ de proteína⁻¹. (equação 8).

$$CAT = \left[\frac{(\frac{\Delta ABS}{min} \times 100)}{40} \right] \quad (\text{Equação 8})$$

Em que: CAT é a atividade de catalase; $\Delta ABS/min$ é a diferença entre a maior e menor absorvância medida em um decaimento linear, dividida pelo tempo de análise.

As atividades de catalase calculadas foram submetidas à análise estatística de normalidade, pelo teste de Kolmogorov Smirnov. Em seguida, as distribuições foram consideradas normais e foi feita análise ANOVA (um critério), seguida de teste de Dunnett, com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$), no software GraphPad Prism 5.0.

2.3.5 Atividade da enzima glutathiona-S-transferase (GST)

A determinação da atividade de glutathiona-S-transferase (GST) foi feita com base na metodologia descrita por Habig et al. (1974). O método teve como princípio a quantificação do aumento de absorvância, em 340 nm, causado pela formação de tioéter devido à reação de conjugação entre 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com a enzima glutathiona-S-transferase (GST).

A análise foi realizada em triplicata utilizando as amostras homegeneizadas e normalizadas para 1 mg mL⁻¹ de proteínas totais. Em microplacas de 96, foram pipetados, em cada poço, 20 µL de amostra e 180 µL de meio reacional (GSH 1,5 mM; CDNB 2 mM; tampão fosfato de potássio 1M). Imediatamente após a adição do meio de reação, foi realizada a leitura de absorvância em leitora de

microplacas Fluostar Omega, com comprimento de onda fixo em 340 nm, em ciclos de 20 segundos, durante 6 minutos.

Os valores obtidos foram descontados das leituras do Branco (20 µL de tampão Tris-HCl 20 mM, EDTA 1,0 mM; de osmose e 180 µL de meio reacional). Para cada amostra foi observado um intervalo com aumento de absorvância linear ($R^2 = 0,99$) e com esses valores foi calculada a diferença entre o maior e menor valor medido, denominada ΔABS . Com isso, foi possível calcular a atividade da enzima GST expressada em $\mu\text{moles de tioéter formado} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg de proteína}^{-1}$. (equação 9).

$$GST = \left[\frac{(\frac{\Delta ABS}{\text{min}} \times 10)}{5,76} \right] \quad (\text{Equação 9})$$

Em que: GST é a atividade de glutathione-S-transferase; $\Delta ABS/\text{min}$ é a diferença entre a maior e menor absorvância medida em um aumento linear, dividida pelo tempo de análise.

As atividades de GST passaram por análise estatística, inicialmente de normalidade, pelo teste de Kolmogorov Smirnov. Em seguida, as distribuições foram consideradas normais e foi feita análise via ANOVA (um critério), seguida de teste de Dunnett, com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$), no software GraphPad Prism 5.0.

2.3.6 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

O método para avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi realizado com base nos trabalhos de Marklund e Marklund (1974) e Maciel et al. (2013), com adaptações para microplacas de 96 poços. A metodologia analítica teve como princípio a análise do decaimento de absorvância, em 320 nm, causado pelo consumo do radical superóxido na presença de SOD. O radical superóxido foi gerado na auto-oxidação de pirogalol em pH básico.

A análise foi realizada em triplicata usando as amostras homogeneizadas e normalizadas para 1 mg mL^{-1} de proteínas totais. Foram transferidos 50 µL de sobrenante para microtubos contendo 1,4 mL de tampão Tris-HCl (50 mM, EDTA 1 mM, pH 9) e foram incubados durante 25 minutos, a 25 °C, em

banho-maria. Em seguida, foram transferidos 200 μ L do conteúdo incubado para microplaca de 96 poços e 34 μ L de pirogalol (1mM, HCl 1 mM) foram adicionados. Imediatamente após esse procedimento, a leitura de absorvância foi realizada em leitora de microplacas Fluostar Omega, em 320 nm, durante 5 minutos, com ciclos a cada 20 segundos. O mesmo procedimento foi realizado para a amostra denominada auto-oxidação de pirogalol (AOP), contendo água de osmose no lugar de amostra sobrenadante (MACIEL et al., 2013).

Com os resultados das leituras de absorvância, a atividade de SOD foi calculada utilizando valores de porcentagem de inibição em relação a AOP (auto-oxidação de pirogalol), sendo que 1 unidade (1U) corresponde a 50% de inibição. A partir dessa conversão, a atividade de SOD foi expressa em U x mg de proteína⁻¹ (MACIEL et al., 2013)..

As atividades de SOD foram analisadas estatisticamente pelo teste de Kolmogorov Smirnov. Em seguida, as distribuições foram consideradas normais e foi feita análise por ANOVA (um critério), seguida de teste de Dunnett, com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$), no software GraphPad Prism 5.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação de mortalidade e anomalias morfológicas

Nas primeiras 48h a coagulação dos embriões foi considerada como parâmetro de mortalidade e em 72 e 96h o critério foi ausência de batimentos cardíacos. Verificou-se que não houve diferenças estatisticamente significativas (ANOVA+Tukey, $p < 0,05$) entre os percentuais de mortalidade dos grupos controle e tratamentos (Tabela 14).

Tabela 14. Percentuais de mortalidade observados em embriões de *Rhamdia quelen*.

Substância	24 h	48 h	72 h	96 h	Mortalidade total (%)	Conclusão
Controle	1,98	1,44	2,64	2,11	7,38	NS
DMSO	2,55	1,45	2,07	2,11	7,95	NS
AVO 20,5	0,85	1,14	0,87	0,87	3,69	NS
AVO 4450	1,42	0,28	1,15	1,75	4,56	NS
BF 20,5	2,84	0,87	0,59	0,89	5,11	NS
BF 175	1,13	1,43	1,66	0,59	4,26	NS
EHMC 6,1	0,56	0,85	1,81	1,53	4,54	NS
EHMC 224	0,28	1,99	0,87	1,17	4,26	NS
OC 1,9	1,42	0,57	0,29	0,58	2,84	NS
OC 4450	2,55	0,58	0,88	0,88	4,82	NS
MIX	1,70	2,02	2,65	0,00	6,25	NS

Os índices de mortalidade nos Grupos Controle e DMSO (Controle solvente) ficaram abaixo de 10%, com isso, o ensaio foi considerado válido e os resultados aceitos (OECD, 2013).

As moléculas utilizadas neste ensaio não apresentaram potencial para causar mortalidade nas concentrações utilizadas para exposição. Não foram encontrados relatos na literatura científica sobre valores de CE_{50} , CENO ou CEO de AVO, BF-3, EHMC e OC em larvas de *Rhamdia quelen*, entretanto, no estudo de Blüthgen et al (2014), embriões de *Danio rerio* foram expostos a 69, 293 e 925 $\mu\text{g L}^{-1}$ de OC e não foi relatada mortalidade significativa. Na exposição do peixe *Carassius auratus* a BF-3 em 0,5 e 5 mg L^{-1} , durante 7, 14 e 28 dias, também não houve mortalidade expressiva (LIU et al., 2015).

Na publicação de Li et al. (2018), a mistura das moléculas de BF-3, EHMC e OC foi estudada em embriões de *Danio rerio*, em concentrações ambientalmente relevantes. Nas exposições de maior concentração de cada filtro (BF-3 550; EHMC 400; OC 700 $\mu\text{g L}^{-1}$) os índices de mortalidade não foram significativos. Com isso, infere-se que, possivelmente, as doses de efeito letal dos fotoprotetores estão várias vezes acima das concentrações detectadas em ambientes aquáticos.

As análises de anomalias morfológicas foram registradas a cada 24 h, resultando em quatro índices de deformidades para cada amostra. Após análise por ANOVA, seguida de teste de Dunnett ($p < 0,05$), para cada tempo (24, 48, 72 e 96 horas), verificou-se que as amostras MIX, em 24h, EHMC 224 ng L^{-1} e OC 4450 ng L^{-1} , em 72h, AVO 4450 ng L^{-1} , EHMC 224 ng L^{-1} e OC 4450 ng L^{-1} , em 96h, apresentaram índices de deformidades significativos em relação ao grupo Controle (Figura 12).

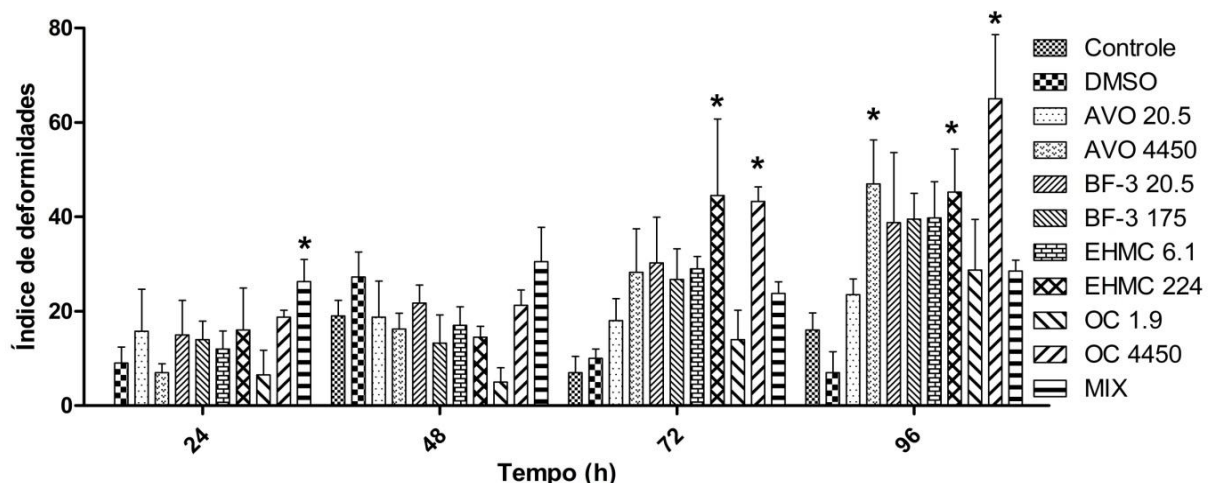


Figura 12. Índices de deformidades em 24, 72 e 96 horas.

Legenda: (*) $p < 0,05$ em ANOVA + teste de Dunnett.

As anomalias também foram distribuídas e analisadas pelas categorias de danos (axial, cefálico, nadadeiras, torácico/abdominal), a partir desses dados foi possível observar a prevalência dos danos em cada amostra.

A amostra de OC 4450 ng L^{-1} se destacou pela alta incidência de danos axiais (9,66%), nas nadadeiras (8,80%) e torácicos/abdominais (10,23%). Nas amostras de AVO 20,5 e 4450 ng L^{-1} , BF-3 20,5 ng L^{-1} e EHMC 6,1 e 224 ng L^{-1} , os danos não foram concentrados em nenhuma categoria específica. Entretanto em

BF-3 175 ng L⁻¹ os danos axiais (7,38%) tiveram destaque e em MIX, os danos torácicos/abdominais (6,25%) foram prevalentes (Tabela 15).

Tabela 15. Percentuais de anomalias morfológicas em embriões de *Rhamdia quelen* por categoria.

Amostra (ng L ⁻¹)	Axial (%)	Cefálico (%)	Nadadeiras (%)	Torácico/abdominal (%)
Controle	3,13	1,42	0,00	5,97
DMSO	4,26	0,85	0,00	3,98
AVO 20,5	3,80	1,12	0,00	4,32
AVO 4450	5,11	5,68	4,83	5,97
BF 20,5	5,68	4,26	4,26	5,97
BF 175	7,38	4,54	4,83	5,14
EHMC 6,1	5,39	4,83	3,97	5,96
EHMC 224	6,53	5,97	5,11	5,68
OC 1,9	3,40	2,55	2,84	4,54
OC 4450	9,66	4,83	8,80	10,23
MIX	5,40	4,83	3,69	6,25

Durante o desenvolvimento embrio-larval inúmeros processos fisiológicos ocorrem, como, multiplicação celular, formação de tecidos, órgãos e sistemas. A ocorrência de anomalias morfológicas pode indicar distúrbios nessas funções e serem causadas pela ação de contaminantes, como o caso dos filtros UV (BIÜTHGEN et al., 2014; LI et al., 2018).

A presença desses contaminantes nas células pode alterar a permeabilidade de membranas, trocas iônicas, produção energética, transporte de água e nutrientes (FENT et al., 2010; PESTOTNIK; KOSJEK; HEATH, 2014; GAGO-FERRERO; DÍAZ-CRUZ; BARCELLÓ, 2015; LI et al., 2018). As deformidades adquiridas no início do desenvolvimento embrionário podem comprometer as fases seguintes do ciclo de vida, afetando a locomoção, busca por alimentos e defesa contra predadores (BARRERA, 2013; LI et al., 2018).

Segundo Bülthgen et al. (2014), a exposição de embriões de *Danio rerio* a OC pode afetar a formação de vasos e células sanguíneas, bem como, o fluxo sanguíneo e impactar diretamente a formação dos órgãos, a exemplo do coração. A alta prevalência de edemas cardíacos (categoria: torácico/abdominal)

observada nos embriões expostos a OC 4450 ng L⁻¹, em 72 e 96h, pode estar ligada a má formação cardíaca e dificuldade de circulação.

De acordo com Li et al. (2018), a ocorrência de anomalias morfológicas pode estar ligada a efeitos cumulativos causados pela exposição a misturas de filtros UV ao longo de gerações, mesmo em concentrações ambientalmente relevantes. Contudo, na exposição realizada no presente trabalho, em apenas uma geração, foram verificadas anomalias em MIX nas primeiras 24h de exposição, após esse período os escores permaneceram similares ao grupo controle.

3.2 Biomarcadores bioquímicos

A atividade dos biomarcadores bioquímicos acetilcolinesterase (AChE), catalase (CAT), glutationa-S-transferase (GST) e superóxido dismutase (SOD) foi analisada após o período de exposição (Figura 13).

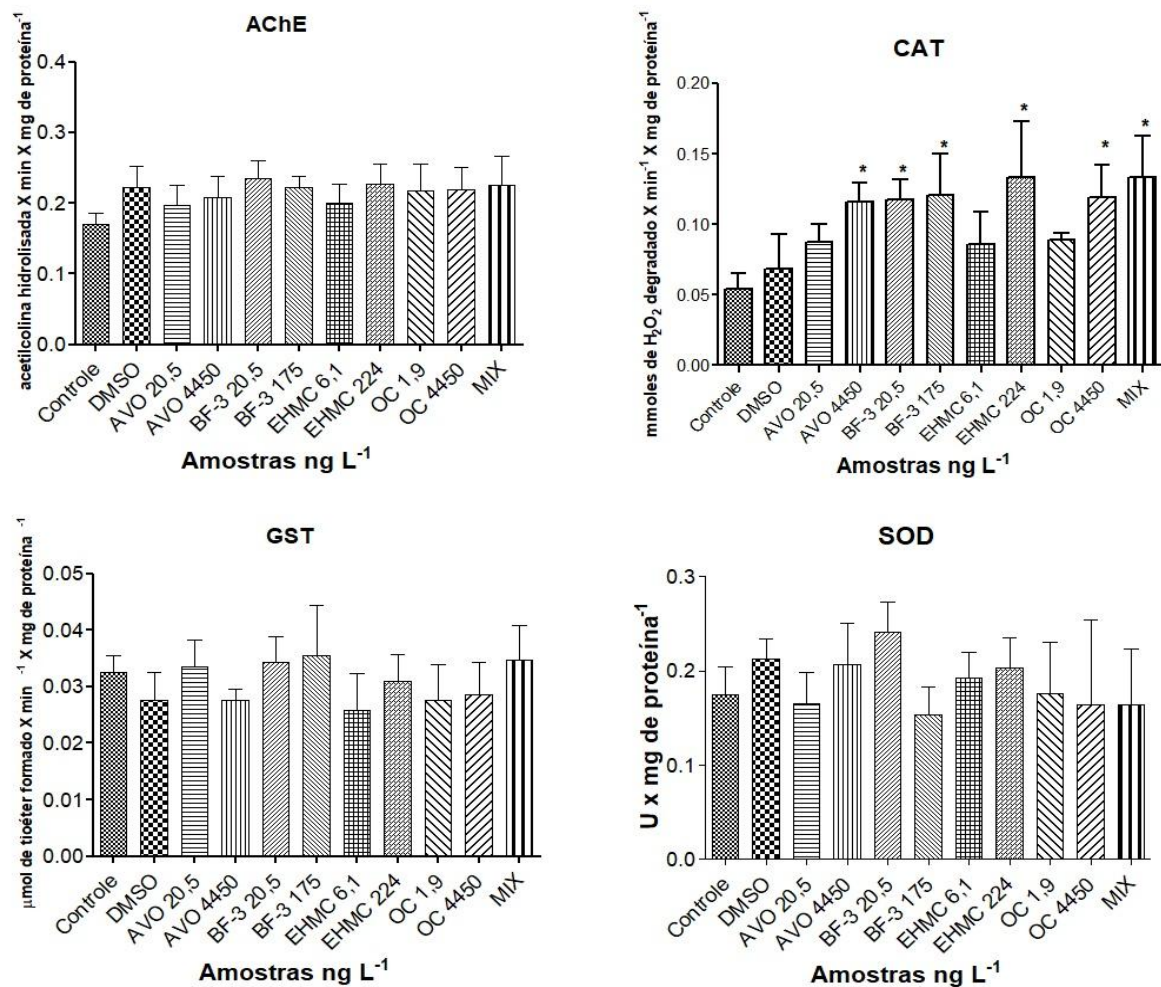


Figura 13. Atividade dos biomarcadores bioquímicos acetilcolinesterase, catalase, glutational-S-transferase e superóxido dismutase em embriões de *Rhamdia quelen*.

Legenda: (*) p<0,05 em ANOVA + teste de Dunnett.

As amostras de AVO 4450, BF-3 20,5, 175, EHMC 224, OC 4450 ng L⁻¹ e MIX tiveram aumento significativo na atividade de CAT, após ensaio ANOVA seguido de Dunnett, com 95% de confiança, em relação ao grupo Controle.

Nas análises de AChE, GST e SOD não foram observadas diferenças significativas de nenhum grupo amostral, sendo próximas às atividades ao Controle. Além disso, não foram verificadas alterações significativas nas atividades enzimáticas do grupo DMSO em relação ao Controle para AChE, CAT, GST e SOD.

A influência da exposição a filtros solares na atividade enzimática de apenas um biomarcador é limitada, com isso, a análise de múltiplos biomarcadores bioquímicos é importante para entender os mecanismos envolvidos na toxicidade desses contaminantes (RODRÍGUEZ-FUENTES et al., 2015; MA et al., 2017).

Na pesquisa de Ma et al. (2017), foi detectada inibição da atividade de AChE e indução da atividade de CAT e SOD em carpas, *Carassius auratus*, expostas durante 3 a 28 dias a AVO (3,88, 35,61, 181,85 e 337,15 $\mu\text{g/L}$). Liu et al. (2015) estudaram os efeitos de BF-3 também em *Carassius auratus* e indicaram estresse oxidativo em CAT, GST e SOD. Li et al. (2018) também observaram alterações na enzima CAT, causada pela mistura de BF-3 (0,55 $\mu\text{g L}^{-1}$), EHMC (0,4 $\mu\text{g L}^{-1}$) e OC (0,7 $\mu\text{g L}^{-1}$) em embriões de *Danio rerio*.

A atividade induzida de CAT, observada em AVO 4450, BF-3 20,5, 175, EHMC 224, OC 4450 ng L^{-1} e MIX, foi interpretada como uma resposta adaptativa para evitar possível desequilíbrio, que levaria as células ao estresse oxidativo. A biotransformação dessas moléculas pode induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e, conseqüentemente aumentar a atividade de CAT como mecanismo de defesa antioxidante para diminuir a concentração de EROs nas células (BOELSTERLI, 2003; WATANABE et al., 2015; LI et al., 2018).

Além das atividades enzimáticas a carbonilação de proteínas (PCO) também foi analisada. A concentração de carbonilas foi significativamente maior em EHMC 224 ng L^{-1} após comparação com o grupo Controle, em ANOVA e Dunnett, com $p < 0,05$. Não foram verificadas diferenças entre DMSO e Controle (Figura 14).

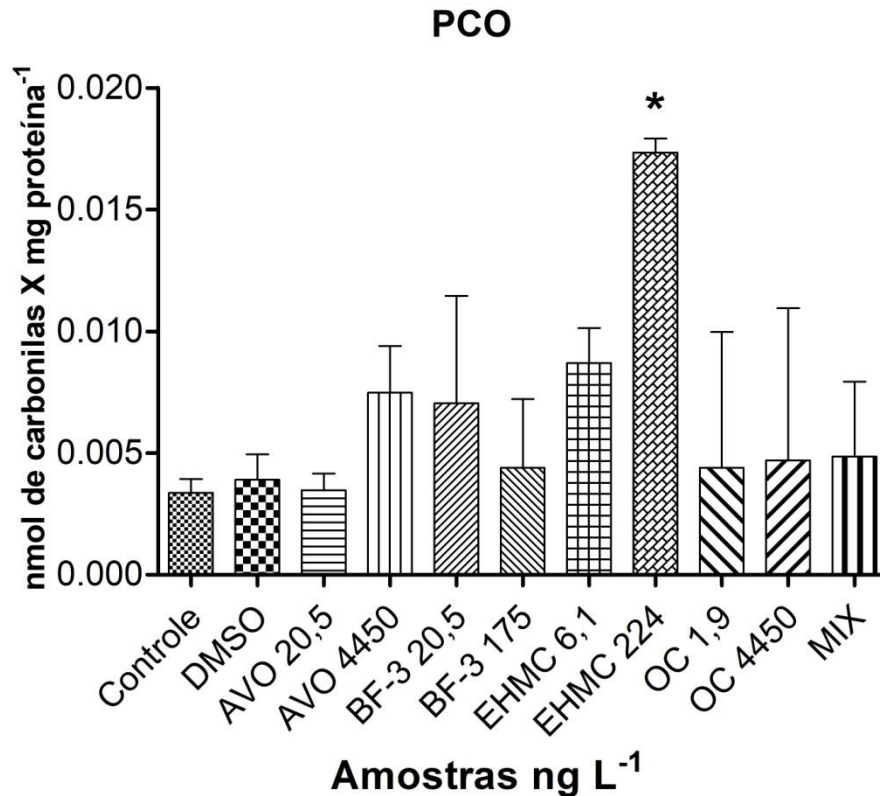


Figura 14. Concentração e carbonilas em embriões de *Rhamdia quelen*.
Legenda: (*) p<0,05 em ANOVA + teste de Dunnett.

Durante a biotransformação dos contaminantes EROs podem ser geradas e degradadas pela CAT, nos peroxissomos e no citosol pela Glutathione Peroxidase. As EROs não degradadas por via enzimática podem sofrer transformação química, catalisada por metais presentes no conteúdo intracelular, especialmente ferro, ocasionando em reações Fenton, gerando o radical hidroxila como subproduto. As hidroxilas são altamente reativas, tem alta capacidade de oxidação e podem atacar lipídeos e proteínas presentes nas células (BOELSTERLI, 2003).

Com isso, ficou evidente a reação dos mecanismos de defesa celular frente ao EHMC, que induziu respostas adaptativas para evitar desequilíbrios oxidativos, uma vez que causou aumento na atividade de catalase e aumento na concentração de proteínas carboniladas.

4 CONCLUSÃO

Com a análise dos resultados apresentados neste capítulo, foi possível concluir que os filtros solares apresentaram toxicidade em concentrações de relevância ambiental para embriões de *Rhamdia quelen*, em exposição de 96h.

As moléculas analisadas não tiveram potencial para causar mortalidade nos embriões, entretanto foram observadas anomalias morfológicas de ordem axial, cefálica, em nadadeiras e tórax/abdômem quando os organismos foram expostos as maiores concentrações de AVO, EHMC e OC, bem como a mistura (MIX = AVO, BF-3, EHMC e OC) nas primeiras 24h de ensaio.

Além da interferência no desenvolvimento inicial dos organismos, também foi observado potencial para causar alterações em enzimas do sistema de defesa antioxidante. Em que foi registrado o aumento da atividade de CAT causado por AVO, BF-3, EHMC, OC e MIX. Com destaque para EHMC 224 ng L⁻¹, que também causou danos em proteínas.

A avaliação da toxicidade de contaminantes emergentes, especialmente produtos de higiene pessoal, em concentrações encontradas nos ambientes aquáticos faz-se necessária para a elucidação dos mecanismos de toxicidade de cada molécula, uma vez que mais estudos são necessários para determinar o real efeito desses contaminantes em populações e ecossistemas.

Concluiu-se que os efeitos causados pelos filtros solares em baixas concentrações são prejudiciais ao desenvolvimento embriolarval de *Rhamdia quelen*.

5 CONCLUSÃO GERAL

Dentre análises apresentadas no Capítulo 1, em que foram realizados ensaios ecotoxicológicos em faixas de concentrações de mg L^{-1} , para determinação de CE_{50} e CENO, observou-se maior toxicidade aguda e crônica relacionada ao EHMC, com valores de CE_{50} e CENO mais baixos para *Desmodesmus subspicatus*, *Artemia salina* e *Daphnia magna*, em comparação aos outros fotoprotetores analisados. Para AVO e BF-3 foi verificada toxicidade similar, com valores de CE_{50} e CENO próximos entre si. A molécula menos tóxica foi OC, causou efeitos em concentrações mais altas, com exceção aos ensaios de toxicidade crônica para *Daphnia magna*, em que foi mais tóxica que AVO e BF-3.

Quanto aos resultados obtidos nos Capítulos 2 e 3, em que foram realizados ensaios utilizando concentrações de relevância ambiental, foram verificadas alterações no sistema reprodutivo e antioxidante ao longo de gerações de *Daphnia magna*, causadas por AVO, BF-3 e EHMC, bem como pela mistura dos quatro fotoprotetores analisados. Além disso, foram observados índices significativos de malformações em embriões de *Rhamdia quelen* causados pela exposição a AVO, EHMC, OC e MIX, com comprometimento de estruturas vitais. Também foi verificada indução do sistema antioxidante (AVO, BF-3, EHMC, OC e MIX) e danos em proteínas (EHMC).

Cabe ressaltar o ineditismo e importância de alguns resultados perante a literatura científica atual, principalmente em relação às análises em concentrações de relevância ambiental, uma vez que oferecem maior proximidade com a realidade encontrada nos ambientes naturais, em comparação aos ensaios clássicos de ecotoxicidade apresentados no Capítulo 1.

A observação de efeitos precoces no desenvolvimento embrionário de *Rhamdia quelen*, assim como na segunda geração de *Daphnia magna*, demonstrou o potencial tóxico dos fotoprotetores e o risco ambiental envolvido à sua exposição contínua. Com isso, concluiu-se que a presença de filtros solares em ambientes, mesmo em baixas concentrações, pode ser nociva e prejudicial ao ciclo de vida de espécies aquáticas.

REFERÊNCIAS

ADAMS, W. J.; ROWLAND, C. Aquatic toxicology methods. In: HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON, G. A.; CAIRNS, J. C. (Ed.). **Handbook of ecotoxicology**. Lewis publishers, 2003.

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Method Enzymol.**, v. 105, n. 2, p. 121-126, 1984.

AN, S.S., FRIEDL, T; HEGEWALD, E. Phylogenetic relationships of Scenedesmus and Scenedesmus like coccoid green algae as referred from ITS-2 rDNA sequence comparisons. **Plant biology**. v.1,p. 418-428,1999.

ARULVASU et al. Toxicity effect of silver nanoparticles in Brine Shrimp *Artemia*. **The Scientific World Journal**. 2006.

ASSIS, H. C. S. et al. Cloning, partial sequencing and expression analysis of the neural form of P450 aromatase (*cyp19a1b*) in the South America catfish *Rhamdia quelen*. **Comparative biochemistry and physiology part B: Biochemistry and molecular biology**. v. 221-222, p. 11-17, 2018.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR 12684**. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (*Chlorophyceae*), 2018.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR 12713**. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp (*Cladocera*, *Crustacea*), 2016a.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR 16530**. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Artemia* spp (*Crustacea*, *Brachiopoda*), 2016b.

AVENEL-AUNDRAN, M. et al. Octocrylene, an emerging photoallergen. **Arch Dermatol**. v. 146 p. 753-757. 2010.

BAKI, G.; ALEXANDER, K. S. **Introduction to Cosmetic Formulation and Technology**. Somerset, US: Wiley, 2015.

BARRERA, E. A. L. Avaliação dos efeitos da exposição de nanopartículas de prata em larvas de *Rhamdia quelen* e da coexposição com Benzo(a)pireno em indivíduos adultos. Tese de Doutorado. **Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação**. Univerisdade Federal do Paraná. 160.p, 2013.

BARÓN, E. et al. Occurrence of hydrophobic organic pollutants (BFRs and UV-filters) in sediments from South America. **Chemosphere**, v. 92, p. 309-316, 2013.

BLÜTHGEN, N. et al. Accumulation and effects of the UV-filter octocrylene in adult and embryonic zebrafish (*Danio rerio*). **Science of The Total Environment**. v. 476-475 p. 207-217. 2014.

BLÜTHGEN, N.; ZUCCHI, S.; FENT, K. Effects of the UV filter benzophenone-3 (oxybenzone) at low concentrations in zebrafish (*Danio rerio*). **Toxicology and applied pharmacology**. v. 263, p. 184-194. 2012.

BOELSTERLI, A. Mechanistic Toxicology: The molecular basis of how chemicals disrupt biological target. **Taylor & Francis**. 2003.

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

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

CASTRO, B. B. et al. Transgeratioal effects of toxicants: An extension of the *Daphnia* 21-day chronic assay? **Archives of contamination and toxicology**. v. 74, p. 616-626. 2018.

CAMPOS, B. et al. ETwo-generational effects of contaminants in *Daphnia magna*: Effects of offspring quality. **Environmental toxicology and chemistry**. v. 35, p. 1470-1477. 2016.

CHAMPAGNE, P. Personal care products. In: **Contaminants of Emerging Environmental Concern** (eds Bhandari, A. et al.), American Society of Civil Engineers, Reston, Virginia, p. 86–140. 2009.

CONNELL, D. et al. **Introduction to Ecotoxicology**. Blackwell Science, 2009.

DÍAZ-CRUZ, M. S.; BARCELÓ, D. Personal care products in the aquatic environment. **The handbook of environmental chemistry**. v. 36. New York: Springer, 2015.

DÍAZ-CRUZ, M. S. et al. Analysis of UV filters in tap water and other clean waters in Spain. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, p. 2325-2333, 2012.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88–95, 1961.

ESTEVEES, F., A. **Fundamentos de Limnologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência, FINEP, 1998.

FENT, K., et al. A tentative environmental risk assessment of the UV-filters 3-(4-methylbenzylidene-camphor), 2-ethyl-hexyl-4-trimethoxycinnamate, benzophenone-3, benzophenone-4 and 3-benzylidene camphor. **Marine Environmental Research**, v. 69, 2010.

FENT, K.; KUNZAC, P.Y.; GOMEZD, E. UV filters in the aquatic environment induce hormonal effects and affect fertility and reproduction in fish. **Chimia**, v. 62, p. 368-375, 2008.

FENT, K.; ZENKER, A.; RAPP, M. Widespread occurrence of estrogenic UV filters in aquatic ecosystems in Switzerland. **Environmental Pollution**, v. 158, p. 1817-1824, 2010.

GAGO-FERRERO, P.; DÍAZ-CRUZ, M. S.; BARCELÓ, D. Multi-residue method for trace level determination of UV filters in fish based on pressurized liquid extraction and liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1286, n. 19, p. 93-101, 2013.

GAGO-FERRERO, P. et al. Fully automated determination of nine ultraviolet filters and transformation products in natural waters and wastewaters by on-line solid phase extraction–liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1294, p. 106-116, 2013.

GAO, L. et al. Effects of four commonly used UV filters on the growth, cell viability and oxidative stress responses of the *Tetrahymena thermophila*. **Chemosphere**. v. 93, p. 2507-2513. 2013.

HABIG, W. H; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of biological chemistry**, v. 249, n. 8, p. 7130–7139, 1974.

HENTSCHKE, G.; TORGAN, L. C. *Desmodesmus* e *Scenedesmus* (Scenedesmaceae, Sphaeropleales, Chlorophyceae) em ambientes aquáticos na Planície Costeira do Rio Grande do Sul, Brasil. **Rodriguésia**. v. 61, p. 585-601, 2010.

JAMEC, A et al. The applicability of acetylcholinesterase and glutathione S-transferase in *Daphnia magna* toxicity test. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 144, p. 303-309, 2007.

JJEMBA, P. K. **Pharma-Ecology : The Occurrence and Fate of Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment**. Hoboken, US: Wiley, 2008.

JONES, D. Redefining oxidative stress. **Antioxidants and redox signaling**. v. 8, 2006

KAISER, D. et al. Ecotoxicological effect characterisation of widely used organic UV filters. **Environmental Pollution**. v. 163 p. 84-90. 2012.

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

KANWAR, A. Brine shrimp (*Artemia salina*) a marine animal for simple and rapid biological assays. **Journal of Chinese Clinical Medicine**, vol. 2, pp. 236-240, 2007.

LAYTON, S.M. **UV filters as common organic water contaminants: A toxicological study of selected UV filters on *Daphnia magna*, a monitoring study of selected Oklahoma lakes, and the development of an undergraduate endocrine disruption**. 2015. Tese (Doutorado). Oklahoma State University.

LEVINE, R.L.; WILLIAMS, J.A.; STADTMAN, E.P., SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**. V.233, p.346–357. 1994

LI, A. J. et al. Joint effects of multiple UV filters on Zebrafish embryo development. **Environmental science and technology**. v. 52, p. 9460-9467. 2018.

LI, W. et al. Occurrence and behavior of four of the most used sunscreen UV filters in a wastewater reclamation plant. **Water Research**. v. 41, p. 3506–3512. 2007.

LIU, H. et al. Hepatic oxidative stress biomarker responses in freshwater fish *Carassius auratus* exposed to four benzophenone UV filters. **Ecotoxicology and environmental safety**. v. 119, p. 116-122. 2015.

MA, B. et al. Bioconcentration and multi-biomarkers of organic UV filters (BM-DBM and OD-PABA) in crucian carp. **Ecotoxicology and environmental safety**. v. 141, p. 116-122. 2017.

MACIEL, G. M. et al. Response of *Ganoderma lucidum* and *Trametes* sp. To the herbicide picloram: Tolerance, antioxidants and production of ligninolytic enzymes. **Pesticide biochemistry and physiology**. v. 105, p. 84-92. 2013.

MAGI, E. et al. Stir bar sorptive extraction and LC MS/MS for trace analysis of UV filters in different water matrices. **Chromatographia**, v. 75, n. 17/18, p. 973-982, 2012.

MANOVÁ, E.; GOETZ, N. V.; HUNGERBUEHLER, K. Aggregate consumer exposure to UV filter ethylhexyl methoxycinnamate via personal care products. **Environment International**. v. 74 p. 249-257. 2015.

MARKLUND, S., MARKLUND, G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. **European Journal of Biochemistry**, 47(3), 469–474, 1974

MELA, M. et al. Effects of the herbicide atrazine in neotropical catfish *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicology and environmental safety**. v. 93, p. 13-21, 2013.

MIZUKAWA, A. et al. Sediments as a sink for UV filters and benzotriazoles: the case study of Upper Iguaçú watershed, Curitiba (Brazil). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 22, p. 18284-18294, 2017.

MOEDER, M. et al. At-line microextraction by packed sorbent-gas chromatography-mass spectrometry for the determination of UV filter and polycyclic musk compounds in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 17, p. 2925-2932, 2010.

MOLINA-MOLINA, J. et al. Profiling of benzophenone derivatives using fish and human strogen receptor-specific in vitro bioassays. **Toxicology and applied pharmacology**. v. 232, p. 384-395. 2008.

MORIARTY, F. **Ecotoxicology – The study of pollutants in ecosystems**. San Diego, California: Academic Press, 1999.

MOROHOSHI, K.; et al. Estrogenic activity of 37 components of commercial sunscreen lotions evaluated by in vitro assays. **Toxicology in Vitro**. v. 19, p. 457-469. 2005.

NAMIESNIK et al. Classifying the Transformation Products (TPs) of Emerging Contaminants (ECs) for Prioritizing Research into their Impact on the Environment and Human Health. In: LAMBROPOULOU, D. A.; NOLLET, L. M. L., (Ed.). **Transformation Products of Emerging Contaminants in the Environment : Analysis, Processes, Occurrence, Effects and Risks**. Somerset, GB: John Wiley & Sons, 2014.

NEALE, R. et al. Application patterns among participants randomized to daily sunscreen use in a skin cancer prevention trial. **Arch.Dermatol**. v. 138, p. 1319–1325. 2002.

NECASOVÁ, A. et al. New probabilistic risk assessment of ethylhexyl methoxycinnamate: comparing the genotoxic effects of trans and cis EHMC. **Environment toxicology**. 2016.

NGUYEN, K. T. N. et al. Rapid and selective determination of UV filters in seawater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry combined with stir bar sorptive extraction. **Talanta**, v. 85, n. 5, p. 2375-2384, 2011.

NUNES, B. S. et al. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. **Environmental Pollution**, vol. 144, no. 2, pp. 453–462, 2006.

OLIVEIRA, L. L. D. **Biomarcadores enzimáticos e testes ecotoxicológicos da toxicidade de fármacos em invertebrados aquáticos**. 2014, 279 f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

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

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD/OCD). **Test-211** - Guidelines for the testing of chemicals - *Daphnia magna* Reproduction, 2012.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD/OCD). **Test-236** – Fish embryo acute toxicity (FET) test, 2013.

ORTIZ-RODRIGUÉZ, R. O. et al. Transgenerational effects of microcystin-LR on *Daphnia magna*. **Journal of experimental biology**. v. 215 p. 2795-2805. 2012.

OZÁEZ, I.; MORCILLO, G.; MARTÍNEZ-GUITARTE, J. L. Ultraviolet filters differentially impact the expression of key endocrine and stress genes in embryos and larvae of *Chironomus riparius*. **Science of The Total Environment**. v. 557-558, p. 240-247. 2016.

PABLOS, M. V; GARCÍA-HORTIGÜELA, P.; FERNÁNDEZ, C. Acute and chronic toxicity of emerging contaminants, alone or in combination, in *Chlorella vulgaris* and *Daphnia magna*. **Environmental science and pollution research**. v. 22, p. 5417-5424. 2015.

PAMPLONA, J. H. et al. Subchronic effects of dipyrone on the fish species *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicology and environmental safety**. v. 74, p. 342-349, 2011.

PARK, C. B. et al. Single and mixture toxicity of three organic UV-filters, ethylhexyl methoxycinnamate, octocrylene, and avobenzone on *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 137 p. 57-63. 2017.

PESTOTNIK, K.; KOSJEK, T.; HEATH, E. Transformation Products of Personal Care Products: UV Filters Case Studies. In: LAMBROPOULOU, D. A.; NOLLET, L. M. L., (Ed.). **Transformation Products of Emerging Contaminants in the Environment : Analysis, Processes, Occurrence, Effects and Risks**. Somerset, GB: John Wiley & Sons, 2014.

RAMOS, S. et al. A review of organic UV-filters in wastewater treatment plants. **Environment International**. v. 86, p. 24-44, 2016.

RODIL, R. et al. Photostability and phytotoxicity of selected sunscreen agents and their degradation mixtures in water. **Analytical and bioanalytical chemistry biochemistry**. v. 395, p. 1513-1524, 2009.

RODRÍGUEZ-FUENTES, G. et al. Evaluation of the estrogenic and oxidative stress effects of the UV filter 2-benzophenone in zebrafish (*Danio rerio*) eleuthero-embryos. **Ecotoxicology and environmental safety**. v. 115, p. 14-18. 2015.

SANTOS, P. I. M. **Avaliação da toxicidade aguda do inseticida metomil e seu efeito sobre a atividade da acetilcolinesterase do peixe *Danio rerio***. 2009. 64 f. Dissertação (Mestrado em Bioecologia Aquática) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2009.

SHARIFAN, H; KLEIN, D.; MORSE, A. N. UV filters are an environmental threat in the Gulf of Mexico: a case study of Texas coastal zones. **Oceanologia**. v. 58, p. 327-335. 2016a.

SHARIFAN, H; KLEIN, D.; MORSE, A. N. UV filters interaction in the chlorinated swimming pool, a new challenge for urbanization, a need for community scale investigations. **Environmental Research**. v. 148, p. 273-276. 2016b.

SIERATOWICZ, A. et al. Acute and chronic toxicity of four frequently used UV filter substances for *Desmodesmus subspicatus* and *Daphnia magna*. **Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**. v. 46, p. 1311-1319. 2011.

SILVA, C. P. **Filtros UV na água de abastecimento público na região da Bacia Hidrográfica Tietê-Jacaré: desenvolvimento de método, estudo de ocorrência e concentrações ambientais**. 2014, Tese (Doutorado). Instituto de Química - Universidade Estadual Paulista.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **Guidelines for ecological risk assessment** – 630/R-95/002F, Washington, DC. 1998.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **Ecological risk assessment for pesticides: Technical Overview**. Washington, DC. 2015.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international of biochemistry and cell biology**. v. 39, p. 44-84, 2007.

WANG, J. et al. Recent advances on endocrine disrupting effects of UV filters. **International journal of environmental research and public health**. v. 13. 2016.

WATANABE, Y. et al. Metabolism of UV-filter benzophenone-3 by rat and human liver microsomes and its effect on endocrine-disrupting activity. **Toxicology and applied pharmacology**. v. 282, p. 119-128. 2015.

WRIGHT, D. A.; WELBOURN, P.(Ed.) **Environmental Toxicology**. Cambridge University Press, 2002.

WULF, H.C. et al. Sunscreens used at the beach do not protect against erythema: a new definition of SPF is proposed. **Photodermatol, Photoimmunol, Photomed**. v.13, p. 129–132. 1997.

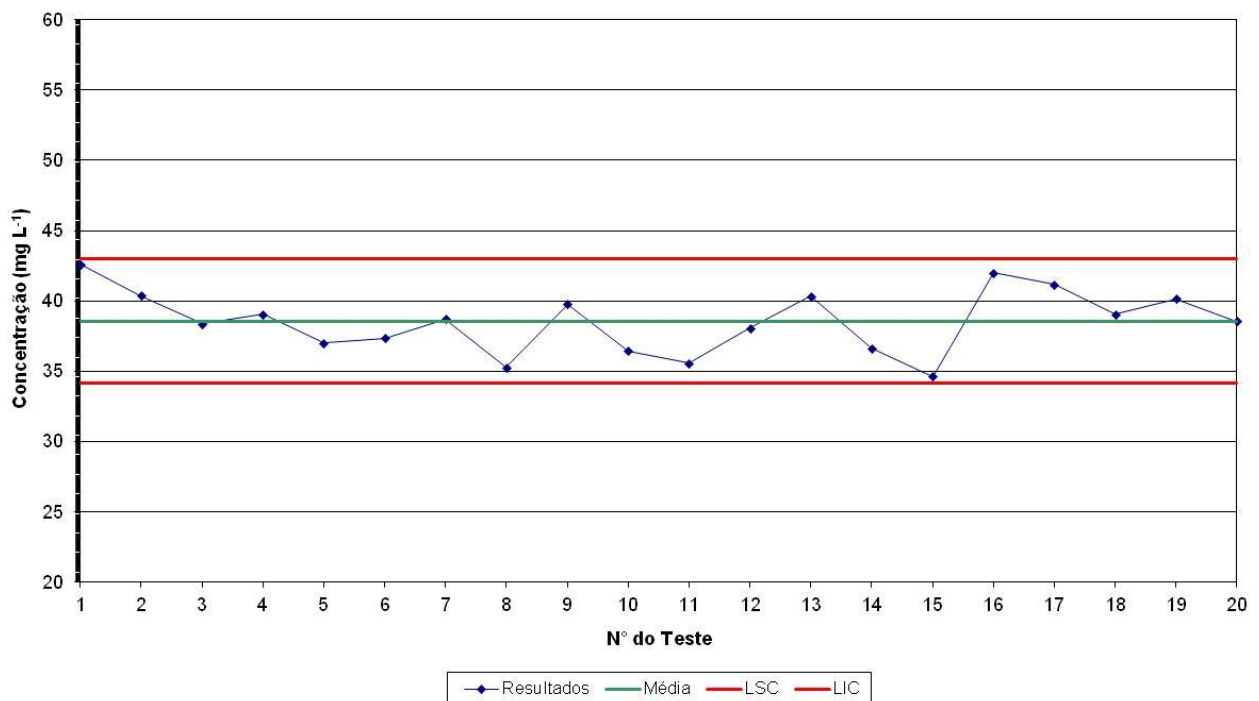
YAWETZ, A.; MANELIS, R; GASITH, A. Cholinesterase enzymatic profiles and the exposure of fish to organophosphorous and carbamate pesticides in Israel. **Wat. Sci. Tech**, V.27, p. 465-472, 1993.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações**. 2ª ed. São Carlos: Rima, 2008.

APÊNDICE A – Carta Controle de sensibilidade de *Daphnia magna* ao sulfato de zinco

Número teste	Data	CE _{50(24h)} ZnSO ₄ (mg L ⁻¹)
1	02/08/2017	42,59
2	09/08/2017	40,38
3	10/08/2017	38,38
4	11/08/2017	39,04
5	11/08/2017	37,01
6	17/08/2017	37,35
7	01/09/2017	38,72
8	05/09/2017	35,25
9	10/10/2017	39,75
10	10/11/2017	36,42
11	07/12/2017	35,58
12	16/02/2018	38,06
13	09/05/2018	40,32
14	24/05/2018	36,61
15	08/08/2018	34,63
16	19/08/2018	42,00
17	15/08/2018	41,17
18	16/08/2018	39,04
19	29/08/2018	40,16
20	25/10/2018	38,55

Carta Controle de Sensibilidade de *Daphnia magna* (ZnSO₄)



APÊNDICE B – Parecer emitido pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UTFPR) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná

13/09/2018

SEI/UTFPR - 0432708 - Parecer



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



PARECER: 2018-28 (APROVADO)/2018 - CEUA
PROCESSO Nº: 23064.024487/2018-12
INTERESSADO: ADRIANE MARTINS DE FREITAS

PROJETO DE PESQUISA / AULA PRÁTICA

Título:	"Avaliação da ecotoxicidade de filtros UV em embriões de <i>Rhamdia quelen</i> "
Área Temática:	2.10.07.00-4 – Toxicologia
Pesquisador / Professor:	ADRIANE MARTINS DE FREITAS
Instituição:	UTFPR/ (Câmpus): Curitiba
Financiamento:	UTFPR (bolsa mestrado) – Fundação Araucária (projeto aprovado Chamada 09/2016)
Versão:	02

PARECER CONSUBSTANCIADO DA CEUA	Protocolo nº 2018-028
<p>Apresentação do Projeto:</p> <p>Os resíduos de produtos de higiene pessoal (PHPs) são reconhecidos como contaminantes emergentes, possuem presença global e um extenso mercado de consumo envolvendo fragrâncias, cosméticos e filtros solares, por exemplo. Dentre os PHPs, os bloqueadores ultravioleta (UV) constituem uma importante categoria e são largamente utilizados em batons, produtos têxteis, ceras automotivas e cremes para proteção contra radiação solar. A partir do descarte inadequado de embalagens desses produtos, águas residuárias, esgotos não tratados ou com baixa eficiência de tratamento, esses contaminantes podem chegar aos ambientes aquáticos, com potencial para causar efeitos deletérios e bioacumulação nas populações e comunidades dos ecossistemas. Desta forma, conhecer os efeitos causados por filtros ultravioletas a organismos representantes dos ecossistemas aquáticos é de fundamental importância para quantificar e qualificar os efeitos ocorridos nos seres que estão expostos em corpos hídricos. Com os ensaios de ecotoxicidade utilizando embriões de <i>Rhamdia quelen</i> espera-se obter respostas satisfatórias que demonstrem as formas de manifestação desses efeitos e o quanto esses organismos são afetados.</p> <p><u>Descrição detalhada dos grupos experimentais:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Controle Negativo (peixes expostos a água reconstituída de acordo com o protocolo da OECD 236) • Exposição ao controle de solvente de DMSO 0,03% • Exposição ao composto 2,etilhexil-4,metoxicinamato (6,1 ng/L e 224 ng/L) • Exposição ao composto Benzofenona-3 (20,5 ng/L e 175 ng/L) • Exposição ao composto Octocrileno (1,9 ng/L e 4450 ng/L) • Exposição ao composto Avobenzona (20,5 ng/L e 4450 ng/L) • Exposição a mistura de 2,etilhexil-4,metoxicinamato (224 ng/L), Benzofenona-3 (175 ng/L), Octocrileno (4450 µg/L) e Avobenzona (4450 ng/L). 	
<p>Objetivo:</p> <p><u>Objetivo Geral:</u> Avaliar a ecotoxicidade de concentrações ambientais de octocrileno, 2-etilhexil, 4-metoxicinamato, avobenzona e benzofenona-3 (separados e em mistura) em embriões de <i>Rhamdia quelen</i> com exposição de 96 h.</p> <p><u>Objetivos Específicos:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Avaliar taxa de mortalidade e anomalias morfológicas a cada 24 h; • Avaliar, ao final da exposição, a atividade das enzimas: acetilcolinesterase, glutatona-S-transferase e catalase; • Quantificar, ao final da exposição, a concentração de proteínas carboniladas (carbonilação proteica – CPO) e de hidroperóxidos (lipoperoxidação – LPO) para avaliar possíveis danos em proteínas e membranas lipídicas causados pela exposição aos fotoprotetores de interesse; • Verificar a existência de efeitos combinados pela mistura de octocrileno, 2-etilhexil, 4-metoxicinamato, avobenzona e benzofenona-3. 	
<p>Avaliação dos Riscos e Benefícios:</p> <p><u>Benefícios:</u> Os benefícios associados a este projeto podem ser explicitados pela quantidade de respostas que serão obtidas com os ensaios propostos, uma vez que não há relatos na literatura científica sobre a toxicidade dos fotoprotetores de interesse em <i>Rhamdia quelen</i>. Espera-se contribuir com a implementação e otimização de novos bioensaios ecotoxicológicos no Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A implementação e consolidação dos métodos apresentados neste projeto poderá trazer benefícios à universidade, pois outros projetos poderão ser desenvolvidos no Grupo de Pesquisas em Ecotoxicologia utilizando esses ensaios.</p> <p><u>Riscos:</u> Os organismos utilizados nos ensaios previstos no presente projeto serão cuidadosamente manuseados e transportados, as trocas e observação de anomalias serão feitas em ambiente climatizado para evitar variações de temperatura e exposição. Durante o ensaio haverá monitoramento da temperatura e intensidade luminosa a fim de controlar variações que possam causar estresse aos organismos. Para evitar casos em que ocorra morte ou dano nos animais causado pela sucção durante a troca das soluções de exposição, será utilizada uma micropipeta com capacidade para 100 µL com ponteira cortada, desta forma, será diminuída a pressão de sucção que pode causar choques mecânicos nos organismos.</p>	
<p>Comentários e Considerações sobre a Pesquisa / Aula Prática:</p> <p>Segundo o proponente: Os organismos serão coletados em tubos do tipo "ependorf" e em seguida levados a ultrafreezer a -80°C para congelamento rápido</p> <p>De acordo com a RN. 37 -Baixa a Diretriz da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - Conceia: (Anexo 1 - 8.14.13.2). A imersão em nitrogênio líquido pode ser aceita com restrição em fetos e neonatos de pequenos roedores e lagomorfos e em peixes de pequeno porte que não ultrapassem 200 mg (0,2 g) de peso. Desta forma, a eutanásia encontra-se adequada a legislação.</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/aula prática; ok 2) formulário unificado de encaminhamento do CEUA/UTFPR/DV; ok. 3) projeto de pesquisa completo no modelo da PROPPG-CEUA; ok 	

13/09/2018

SEI/UTFPR - 0432708 - Parecer

- 4) declaração de não início do projeto (com assinatura e data).
 5) registro de projeto junto a Diretoria responsável (anuência da DIRPPG) ok
 6) Declaração de RT do Médico Veterinário - ok.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há

Situação do Parecer:

APROVADO

Considerações Finais a Critério da CEUA:

Todos os procedimentos devem seguir a lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008.

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da ecotoxicidade de filtros UV em embriões de *Rhamdia quelen*", protocolo nº 2018/028, sob a responsabilidade de **ADRIANE MARTINS DE FREITAS** - 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 10/09/2018.

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/ 028, coordinated and under the responsibility of **ADRIANE MARTINS DE FREITAS**, which involves the production, maintenance and / or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum 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:	20/09/2018 - 01/02/2019
Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Espécie/linhagem:	<i>Rhamdia quelen</i> (jundiá)
Número de animais:	3000
Peso/Idade:	>0,1g/ embriões/larvas
Sexo:	N/A
Origem:	Aquisição comercial

Dois Vizinhos, 13 de setembro 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 13/09/2018, às 19:16, 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_documento=0, informando o código verificador 0432708 e o código CRC 82851F5F.

ANEXO A – Meio para pré-cultura de *Desmodemus subspicatus*

Solução Estoque	Composição da Solução Estoque	Concentração (g L ⁻¹)	Volume a adicionar para 1 L de meio (mL)
1	NH ₄ Cl	1,5	10
	MgCl ₂ .6H ₂ O	1,2	
	CaCl ₂ .2H ₂ O	1,8	
	MgSO ₄ .7H ₂ O	1,5	
	KH ₂ PO ₄	0,16	
2	FeCl ₃ .6H ₂ O	0,080	1
	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ .2H ₂ O	0,10	
3	H ₃ BO ₃	0,185	1
	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,415	
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,007	
	ZnCl ₂	0,030	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,015	
	CuCl ₂ .2H ₂ O	0,010	

Fonte: Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2018.

ANEXO B - Meio nutriente DIN para testes de toxicidade com *Desmodesmus subspicatus*

Solução Estoque	Composição da Solução Estoque	Concentração (g L ⁻¹)	Volume a adicionar para 1 L de meio (mL)
1	NH ₄ Cl	1,5	100
	MgCl ₂ .6H ₂ O	1,2	
	CaCl ₂ .2H ₂ O	1,8	
	MgSO ₄ .7H ₂ O	1,5	
	KH ₂ PO ₄	0,16	
2	FeCl ₃ .6H ₂ O	0,080	10
	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ .2H ₂ O	0,10	
3	H ₃ BO ₃	0,185	10
	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,415	
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,007	
	ZnCl ₂	0,030	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,015	
	CuCl ₂ .2H ₂ O	0,010	

Fonte: Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2018.

ANEXO C – Meio Básico para teste de toxicidade aguda com *Daphnia magna*

Solução Estoque	Composição da Solução Estoque	Concentração (g L ⁻¹)	Volume a adicionar para 1 L de meio (mL)
1	CaCl ₂ .2H ₂ O	8	20
2	MgSO ₄ .7H ₂ O	8,7	5
3	KCl	28,4	0,1
4	NaHCO ₃	18,6	0,4

Fonte: Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2016.

ANEXO D – Meio de cultivo M4 para *Daphnia magna*

Solução Estoque	Composição da Solução Estoque	Concentração (g L ⁻¹)	Volume a adicionar para 1 L de meio (mL)
1	CaCl ₂ .2H ₂ O	73,5	3,2
2	MgSO ₄ .7H ₂ O	123,3	0,8
3	KCl	5,8	0,8
4	NaHCO ₃	64,8	0,8
5	MnCl ₂ .4H ₂ O	7,21	0,1
	LiCl	6,12	
	RbCl	1,42	
	SrCl ₂ .6H ₂ O	3,04	
	CuCl ₂ .2H ₂ O	0,335	
	ZnCl ₂	0,260	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,200	
	NaNO ₃	0,548	
	H ₃ BO ₃	5,719	
	NaBr	0,032	
6	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,126	0,5
	NH ₄ VO ₃	0,00115	
	KI	0,0065	
	Na ₂ SeO ₃	0,00438	
7	NaSiO ₃	21,465	0,2
8	Na ₂ EDTA.7H ₂ O	0,500	5,0
	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,199	
9	KH ₂ PO ₄	0,286	0,5
	K ₂ HPO ₄	0,368	
10	Hidrocloreto de tiamina	0,750	0,1
	Cianocobalamina (vitamina B12)	0,010	
	D (+) Biotina	0,0075	

Fonte: Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2016.

ANEXO E – Água reconstituída para ensaio de toxicidade aguda com *Rhamdia quelen*

Solução Estoque	Composição da Solução Estoque	Concentração (g L⁻¹)
1	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,0065
2	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1335
3	KCl	0,0004
4	NaHCO ₃	0,0105

Fonte: Organisation for Economic Co-operation and Development, 2012.