

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA E BIOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA TECNOLÓGICA COM ÊNFASE
EM QUÍMICA AMBIENTAL**

**DIOGO ALBUQUERQUE DE ALMEIDA
MARJORIE EMANOELI LOPES VIEIRA**

**AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA GENOTOXICIDADE DE FILTRO
SOLAR COMERCIAL EM *Astyanax sp***

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**CURITIBA
2013**

DIOGO ALBUQUERQUE DE ALMEIDA
MARJORIE EMANOELI LOPES VIEIRA

**AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA GENOTOXICIDADE DE FILTRO
SOLAR COMERCIAL EM *Astyanax sp***

Trabalho de conclusão de curso do Curso Bacharelado em Química Tecnológica com Ênfase em Química Ambiental, do Departamento Acadêmico de Química e Biologia – DAQBI – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel.

Orientadora: Profa. Dra. Wanessa Algarte Ramsdorf.

Co-orientadora: Profa. Dra. Lucia Regina Rocha Martins

CURITIBA
2013

TERMO DE APROVAÇÃO

**DIOGO ALBUQUERQUE DE ALMEIDA
MARJORIE EMANOELI LOPES VIEIRA**

AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA GENOTOXICIDADE DE FILTRO SOLAR COMERCIAL EM *Astyanax sp*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do grau de BACHAREL EM QUÍMICA do Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBI) do Câmpus Curitiba da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR e **APROVADO** pela seguinte banca:

Membro 1 – Me. Laércio Dante Stein Piancini
Departamento de Genética (UFPR)

Membro 2 – Me. Jeferson Keiti Nagata
Departamento de Genética (UFPR)

Orientadora – Prof^a. Dr^a. Wanessa A. Ramsdorf
Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

Co-Orientadora – Prof^a. Dr^a. Lucia Regina Rocha Martins
Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

Coordenadora de Curso – Prof^a. Dr^a. Danielle Caroline Schnitzler (UTFPR)

Curitiba, 4 de outubro de 2013.

“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso”



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 696

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno da CEUA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "*Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)*".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "*Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)*".

PROCESSO: 23075.016581/2013-56

APROVADO: 20/06/2013 – R.O. 05/2013

TÍTULO: Avaliação de genotoxicidade de substâncias químicas e de efluentes tratados em peixes

AUTORES: Wanessa Algarte Ramsdorf, Lucia Regina Rocha Martins, Diogo Albuquerque de Almeida, Marjorie E. Lopes Vieira, Thomaz Aurélio Pagioro

DEPARTAMENTO: Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio
Coordenador da CEUA

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Professora Wanessa Ramsdorf pela orientação nesse trabalho, por toda a ajuda, dedicação, paciência e todo o conhecimento transmitido.

À professora Lucia Rocha Martins pela idéia, pelo protetor solar e sua formulação, pelos conselhos e conhecimento.

Ao professor Thomaz Pagioro por ceder o laboratório e nos ajudar na instalação das caixas da água e filtros.

Ao Jeferson Nagata pela ajuda no momento crítico de aclimatação, especialmente quando os peixinhos teimavam em morrer.

Ao Wagner Massami Noda e à Farmácia Pura Essência e pelo protetor e ajuda.

Aos inúmeros servidores da UTFPR pela ajuda com todo material pesado e serviços necessários.

Ao Rodrigo do Vale, Cláudia e Jessé Almeida por sempre acreditar em nós e, principalmente, por entender que estamos longe, mas eles estão sempre em nossos corações.

À Joelma Bonatto por ceder o Dia das Mães e entender que precisávamos trabalhar em pleno domingo, além de todos os lanchinhos deliciosos.

Aos nossos pais, por todo apoio, confiança e encorajamento.

À Geni por compartilhar o sofrimento quando tudo dá errado.

E a todos os professores do Departamento de Química e Biologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná que de alguma forma ajudaram nesse projeto e na nossa formação.

RESUMO

DE ALMEIDA, Diogo Albuquerque. VIEIRA, Marjorie Emanoeli Lopes. Avaliação preliminar da genotoxicidade de filtro solar comercial em *Astyanax sp.* Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química Tecnológica com Ênfase em Ambiental). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

O aumento na produção e consumo, nas últimas décadas, de produtos contendo compostos responsáveis por absorver e/ou refletir a radiação UV, tem levantado dúvidas quanto aos impactos desses compostos no ambiente, de modo especial o ambiente aquático. Sendo assim, é de fundamental importância a realização de estudos que caracterizem os efeitos dos filtros solares nesse ambiente, permitindo que medidas sejam tomadas para a manutenção da qualidade dos recursos hídricos e sua biodiversidade. Estudos anteriores visaram a quantificação dos filtros solares em corpos d'água, bem como seus efeitos tóxicos em organismos aquáticos, porém seus efeitos genotóxicos ainda são pouco conhecidos. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo principal avaliar o potencial genotóxico de um protetor solar comercial, contendo os filtros solares benzofenona-3 e *p*-metoxicinamato de octila, utilizando peixes da espécie *Astyanax sp* como organismos-teste. A genotoxicidade foi avaliada pelo ensaio cometa, o qual detecta danos no DNA de organismos expostos a poluentes, que podem, em longo prazo, constituir mutagenicidade, carcinogenicidade ou letalidade. Foram realizados dois bioensaios, um agudo e um subcrônico com duração de 4 e 21 dias, respectivamente. Para isso, os exemplares de peixes foram divididos em cinco aquários diferentes e expostos ao protetor solar através da sua dissolução na água. Cada aquário recebeu uma concentração diferente do protetor solar, sendo elas: 10, 100 e 1000 µg/L de *p*-metoxicinamato de octila e 23, 233 e 2333 µg/L de benzofenona-3 (Aquário 1, 2 e 3, respectivamente). Dois aquários foram utilizados para os grupos controle, um contendo somente água filtrada e outro contendo a base do protetor solar dissolvida em água, sem a presença dos filtros solares. Após o tempo de exposição os peixes foram anestesiados e sacrificados e realizou-se o ensaio cometa com seus eritrócitos. Através da análise estatística dos escores pelo teste de Kruskal-Wallis, no bioensaio agudo foram observadas diferenças significativas entre o grupo controle água e os Aquários 1, 2 e 3. No bioensaio subcrônico foi verificada a mortalidade de 11 indivíduos no decorrer dos vinte e um dias de exposição, ocorrida no grupo exposto à maior concentração, Aquário 1. A análise estatística dos escores no bioensaio subcrônico mostrou diferença significativa entre os grupos controle água e os Aquários 1, 2 e 3, assim como entre o controle gel e as diferentes concentrações. Esses resultados sugerem que o protetor solar pode causar danos ao DNA de *Astyanax sp*, tanto na exposição aguda, quanto na subcrônica.

Palavras-chave: Filtro solar. Benzofenona-3. *p*-metoxicinamato de octila. Ensaio cometa. Genotoxicidade. *Astyanax sp*.

ABSTRACT

DE ALMEIDA, Diogo Albuquerque. VIEIRA, Marjorie Emanoeli Lopes. Preliminary evaluation of genotoxicity of comercial sunscreens in *Astyanax sp.* Senior Research Project (Bachelor of Chemistry). Federal University of Technology – Parana, Curitiba, 2013.

The increase in production and consumption, in the last decades, of products containing compounds responsible for absorbing and/or reflecting UV radiation, has raised concerns about the impacts of these compounds in the environment, especially the aquatic environment. Therefore, it is of fundamental importance to study the effects of sunscreens in this environment, allowing measures to be taken to maintain the quality and biodiversity of water resources. Previous studies aimed at the quantification of sunscreens in water bodies, and their toxic effects on aquatic organisms, but their genotoxic effects are still poorly understood. For this reason, this study aimed to evaluate the genotoxic potential of a commercial sunscreen containing sunscreens benzophenone -3 and ethylhexyl methoxycinnamate, using fishes *Astyanax sp* as test organisms. The genotoxicity was assessed by comet assay, which detects DNA damage in organisms exposed to pollutants which, in long term, may cause mutagenicity, carcinogenicity or lead to lethality. There were two bioassays, an acute and subchronic, lasting 4 and 21 days, respectively. Then, the fish specimens were divided into five tanks and exposed to sunscreen by dissolving it in water. Each tank received a different concentration of sunscreen, as follows: 10, 100 and 1000µg/L of ethylhexyl methoxycinnamate and 23, 233 and 2333 µg/L of benzophenone-3 (Tank 1, 2 and 3). Two tanks were used for control, one of it containing filter water and another containing only the base of the sunscreen dissolved in water, without the UV-filters. After the exposure time, the fishes were anesthetized and sacrificed and the comet assay was held with their erythrocytes. Through statistical analysis by Kruskal-Wallis test, the acute bioassay showed significant differences between the control group and the Tanks 1, 2 e 3. In subchronic bioassay was observed mortality of 11 individuals during the twenty-one days of exposure, which occurred in the group exposed to the highest concentration, Tank 3. Statistical analysis of the subchronic bioassay showed significant difference between the control groups and Tanks 1, 2 e 3, as well as between the control and the different gel concentrations. These results suggest that sunscreen may cause DNA damage in *Astyanax sp*, both in acute exposure, as in the subchronic.

Keywords: Sunscreen. Benzophenone-3. Ethylhexyl methoxycinnamate. Single cell gel electrophoresis assay. Comet assay. Genotoxicity. *Astyanax sp*.

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BZ-3	Benzofenona-3
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
Fig.	Figura
MCO	<i>p</i> -metoxicinamato de octila
q.s.p	Quantidade suficiente para
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

A	Ampére
°C	Graus Celcius
μ	Micro (10^{-6})
%	Percentual
cm	Centímetro
g	Gramma
h	Horas
M	Molaridade
mL	Mililitro
m ³	Metro cúbico
nm	Nanômetro

LISTA DE FIGURAS

EQUAÇÃO 1 - Índice de dano.....	34
FIGURA 1 - Espectro de UV de soluções etanólicas de benzofenona-3 6 mg.ml ⁻¹ (---) e <i>p</i> -Metoxicinamato de octila 6 mg.ml ⁻¹ (—).....	21
FIGURA 2 - Benzofenona-3	21
FIGURA 3 - <i>p</i> -metoxicinamato de octila	22
FIGURA 4 - Exemplar de <i>Astyanax sp</i>	28
FIGURA 5 - Tanque de aclimatação dos peixes	30
FIGURA 6 - Aquários durante os bioensaios.....	31
FIGURA 7 - Classificação dos danos	34
FIGURA 8 - Escores obtidos no ensaio cometa (agudo) com eritrócitos de <i>Astyanax sp</i> nos diferentes grupos, controle água, controle gel e expostos às concentrações de filtro solar - Aquários 1, 2 e 3	37
FIGURA 9 - Escores obtidos no ensaio cometa (subcrônico) com eritrócitos de <i>Astyanax sp</i> nos diferentes grupos, controle água, controle gel e expostos às concentrações de filtro solar - Aquários 1, 2 e 3	39
QUADRO 1 - Filtros UV orgânicos e suas bandas de absorção	20
TABELA 1 - Níveis de <i>p</i> -metoxicinamato de octila em ambientes aquáticos	23
TABELA 2 - Escores resultantes do bioensaio agudo	36
TABELA 3 - Escores resultantes do bioensaio subcrônico.....	39

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	JUSTIFICATIVA	14
3	OBJETIVOS	15
3.1	OBJETIVO GERAL	15
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
4.1	BIOENSAIO, BIOTRANSFORMAÇÃO, BIOACUMULAÇÃO, BIOINDICADOR E BIOMONITOR	16
4.2	FILTROS SOLARES.....	18
4.2.1	Benzofenona-3	21
4.2.2	<i>p</i> -metoxicinamato de octila	22
4.3	ENSAIO COMETA.....	24
4.4	PEIXES COMO ORGANISMOS-TESTE	26
4.5	<i>Astyanax sp</i>	27
5	METODOLOGIA	29
5.1	MATERIAS E REAGENTES	29
5.2	BIOENSAIO	29
5.3	ENSAIO COMETA.....	31
5.3.1	Preparo das Lâminas.....	32
5.3.2	Ensaio Cometa	32
5.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
6.1	BIOENSAIO AGUDO	36
6.2	BIOENSAIO SUBCRÔNICO	38
7	CONCLUSÃO	42
	REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas têm ocorrido um aumento da conscientização dos riscos decorrentes da exposição da pele à radiação ultravioleta, conseqüentemente, houve um aumento da utilização de produtos de proteção solar, bem como da preferência de produtos com fatores de proteção solar mais elevados.

Apenas no ano de 2010 as pessoas ao redor do mundo gastaram cerca de 8,2 bilhões de dólares em produtos de proteção solar, enquanto no Brasil foram gastos 1,1 bilhões de dólares. Tendo em vista que o consumo *per capita* desses produtos em 2009 dobrou em relação ao ano de 2004 (ABIHPEC, 2010) e as recorrentes recomendações das autoridades de saúde sobre a prevenção do câncer de pele através da utilização de compostos de proteção solar, é seguro afirmar que as quantidades produzidas e consumidas tendem a aumentar cada vez mais.

Esse aumento da utilização de protetores solares leva a uma maior produção e consumo de compostos responsáveis por absorver e/ou refletir a radiação UV (como a benzofenona-3 e o *p*-metoxicinamato de octila), levantando questões sobre o impacto desses compostos no ambiente.

Tais compostos podem ser introduzidos no ambiente através do efluente de atividades industriais nas quais estão presente, da liberação da pele durante o banho e natação, e de resíduos em embalagens destinadas incorretamente, mesmo após a passagem por estações de tratamento (POIGER *et al.*, 2004).

Além disso, essas substâncias não são exclusivas da formulação de protetores solares. Podem ser encontradas em outros cosméticos e produtos de higiene pessoal, embalagens de alimentos, medicamentos, plásticos, produtos têxteis e produtos de manutenção de veículos que têm como objetivos evitar a fotodegradação de polímeros e pigmentos (GAGO-FERRERO *et al.*, 2012).

Vários estudos têm demonstrado a ocorrência de filtros solares em matrizes ambientais. Devido às suas propriedades físico-químicas, é esperado que se acumulem nos sedimentos, o que é considerado como a principal via de exposição aos organismos bentônicos. No entanto, maior atenção é dada para

amostras de água, nas quais foram encontradas concentrações máximas de até 4 mg/L. Os filtros UV são encontrados não só em água doce, mas também em ecossistemas marinhos (KAISER *et al.*, 2012).

É importante ressaltar que além de confirmar a presença e até mesmo quantificar essas substâncias, a avaliação dos efeitos e impactos nos organismos que foram expostos aos filtros solares é fundamental. Nesse sentido, um parâmetro importante que deve ser estudado é o genético. A exposição ao xenobiótico pode causar alterações na estrutura e disposição dos cromossomos ou das bases do DNA (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

Um dos ensaios que pode ser utilizado para avaliar parâmetros de genotoxicidade é o ensaio cometa, que é uma técnica rápida, sensível e visual para analisar rupturas no DNA. É particularmente útil na medida em que permite a detecção de danos no DNA entre diferentes células, em virtualmente qualquer população de célula eucarionte, exige amostras de células extremamente pequenas e os resultados podem ser obtidos num único dia (MCKELVEY-MARTIN *et al.*, 1993).

Biomarcadores são considerados fluídos corpóreos, células ou tecidos que indicam (em termos bioquímicos, celulares ou moleculares) a presença de contaminantes, bem como, respostas fisiológicas, comportamentais ou energéticas dos organismos expostos ao contaminante (LIVINGSTONE, 1993). Nesse sentido, o ensaio cometa é um importante biomarcador genético, pois aponta possíveis quebras na dupla-fita de DNA.

O uso de peixes em ensaios ecotoxicológicos é bastante difundido devido à maneira similar que os peixes respondem aos contaminantes quando comparado a outros vertebrados. Além disso, podem indicar o potencial de exposição ou atuarem como meio de transferência dos contaminantes a outras populações, como por exemplo, a população humana (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

Com relação aos filtros solares, inúmeros trabalhos vêm quantificando esses compostos em diferentes matrizes: águas superficiais, águas recreacionais, água do mar, sedimentos e água em estações de tratamento de esgoto (BALMER *et al.*, 2005; RODIL *et al.*, 2009; KAMEDA *et al.*, 2011; PLAGELLAT *et al.*, 2006; GIOKAS *et al.*, 2005). No entanto, as consequências para o meio aquático permanecem incertas, devido à falta de estudos *in vivo*

com espécies adequadas. Considerando as concentrações notáveis no ambiente, há apenas um conhecimento limitado sobre os efeitos ecotoxicológicos e toxicológicos desses filtros UV (KAISER *et al.*, 2012).

Assim, apesar de amplamente utilizados, há escassez de dados e compreensão extremamente limitada sobre o destino, distribuição e efeitos dos filtros UV e muitos de seus metabólitos e produtos de transformação. De modo especial, os dados ecotoxicológicos, que são fragmentários e não permitem avaliar o risco potencial representado por essas substâncias para os ecossistemas aquáticos (KAISER *et al.*, 2012), tendo em vista que inúmeros estudos demonstram que filtros UV estão presentes em peixes e corpos de águas superficiais (POIGER *et al.*, 2004).

À luz do aumento das preocupações com o que alguns filtros UV podem causar e, devido às quantidades significativas desses produtos químicos que são utilizados hoje em dia, existe uma necessidade de um melhor conhecimento dos seus efeitos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a existência de danos genotóxicos em peixes quando expostos a diferentes concentrações de protetor solar.

2 JUSTIFICATIVA

Diante da grande quantidade de protetores solares utilizados e da detecção desses compostos em corpos de águas superficiais, aliados à escassez de informações de efeitos dos filtros UV e muitos de seus metabólitos e produtos de transformação, realizaram-se bioensaios para avaliação preliminar da genotoxicidade de filtro UV comercial em peixes *Astyanax sp.*

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a genotoxicidade preliminar do filtro UV comercial em peixes de água doce (*Astyanax sp*).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a genotoxicidade aguda do filtro UV benzofenona-3 e *p*-metoxicinamato em peixes *Astyanax sp*, utilizando o ensaio cometa com eritrócitos;
- Avaliar a genotoxicidade subcrônica do filtro UV a genotoxicidade aguda do filtro UV em peixes *Astyanax sp*, utilizando o ensaio cometa com eritrócitos.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 BIOENSAIO, BIOTRANSFORMAÇÃO, BIOACUMULAÇÃO, BIOINDICADOR E BIOMONITOR

O crescimento urbano e o desenvolvimento tecnológico geram dúvidas sobre as consequências dos impactos causados pela ação antrópica nos ecossistemas, aumentando o interesse da comunidade científica e das agências reguladoras (BICKHAM *et al.*, 2000). Diversos estudos relatam a presença de substâncias tóxicas em rios, principalmente naqueles onde há descarte de efluentes domésticos e industriais. Substâncias tóxicas podem contaminar os organismos aquáticos individualmente, ou ainda o ecossistema inteiro podendo atingir os seres humanos através da ingestão desses organismos durante a alimentação (VON BURG e LIU, 1993).

Bioensaios são ensaios laboratoriais, sob condições controladas, que utilizam organismos vivos ou partes deles para avaliar a toxicidade de efluentes ou substâncias químicas. Podem ser observados efeitos letais, inibidores de crescimento ou da reprodução, modificação de comportamento, entre outros. Os bioensaios ajudam a prever e/ou avaliar os efeitos de um xenobiótico, em uma determinada concentração ou dosagem, em determinada espécie (KNIE; LOPES, 2004).

Em bioensaios utilizando peixes, os métodos de exposição podem ser por imersão (o agente tóxico encontra-se dissolvido na água), injeção intraperitoneal ou via trófica, na qual os animais recebem o contaminante através da alimentação. Na contaminação por imersão, os modos de exposição podem ser: estático, semi-estático e dinâmico (KNIE e LOPES, 2004).

O método mais utilizado é o estático, no qual a amostra não é trocada e os organismos-teste permanecem expostos à mesma solução-teste durante todo o período do ensaio. Podem ocorrer mudanças químicas dependendo da composição da amostra e da duração do teste (KNIE e LOPES, 2004). No método semi-estático a solução-teste é substituída, em intervalos de tempo definidos, por outra solução com as mesmas características. Este método

encontra maior aplicação em testes com amostras ambientais pouco estáveis, que contém substâncias voláteis ou de baixa solubilidade. O método dinâmico consiste em expor os organismos a um fluxo contínuo da amostra, sendo mais adequado na medição de meios instáveis (substâncias voláteis), de amostras com substâncias de baixa solubilidade e para questões de bioacumulação e biotransformação. Uma desvantagem deste método é o elevado custo para sua realização (KNIE e LOPES, 2004).

Os ensaios de toxicidade são classificados pelo tempo de exposição, concentração utilizada e efeito observado. Consideram-se ensaios de toxicidade aguda aqueles que avaliam doses elevadas de contaminantes por um curto período de exposição, variando entre 24 a 96 horas. Os testes agudos detectam os efeitos imediatos, geralmente irreparáveis (KNIE e LOPES, 2004).

Devido ao intervalo de tempo que as caracteriza, as definições de toxicidade subaguda e subcrônica são controversas. Em geral, estudam os efeitos adversos decorrentes da exposição à dose/concentrações múltiplas do agente tóxico por um período que não exceda 10% da vida do animal (AZEVEDO e CHASIN, 2004).

Os ensaios de avaliação de toxicidade crônica avaliam os efeitos de concentrações inferiores de xenobiotícos por um período de exposição prolongado, abrangendo parte significativa do ciclo de vida do organismo. Observam-se mudanças na taxa de crescimento e reprodução, e danos que se mostram após um tempo maior, em alguns casos, após várias gerações (KNIE e LOPES, 2004).

Assim como no meio ambiente, em condições laboratoriais as substâncias podem sofrer biotransformações após serem absorvidas. Biotransformação pode ser definida como a conversão de um composto xenobiótico catalisada por enzimas que o tornam mais solúvel em água, podendo desta forma ser excretado pela célula ou organismo mais facilmente que o composto original. Essa conversão leva à diminuição da meia-vida biológica, diminuição do armazenamento da substância no organismo, além da modificação na atividade biológica. Em alguns casos, porém, a biotransformação pode produzir compostos de maior toxicidade (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006).

O fenômeno no qual certos isótopos, elementos ou ligas metálicas estão presentes ou são ingeridos pelos organismos em concentrações mais altas que num determinado compartimento do ambiente, é conhecido como bioacumulação. A bioacumulação pode ser entendida como um termo superior, que engloba a bioconcentração (absorção direta pela pele, guelra ou pulmão) e a biomagnificação (absorção por meio de ingestão de água ou alimentos) (KNIE e LOPES, 2004). Devido a esse fenômeno, as concentrações de xenobióticos presentes nos organismos vivos podem exceder as concentrações encontradas no meio abiótico (D'AMATO, 2002).

Bioindicadores ou indicadores biológicos são organismos utilizados em bioensaios, visando determinar o efeito biológico de alguma substância, fator ou condição. A presença ou ausência de uma espécie em um habitat ou região em particular também pode funcionar como um bioindicador das condições ambientais destes meios. No entanto, a composição das espécies ou a abundância relativa de seus componentes individuais da população ou comunidade são consideradas em índice mais confiável da qualidade da água (KNIE e LOPES, 2004).

Biomonitores são os seres vivos expostos à contaminação no ambiente natural, normalmente, e a sua análise periódica caracteriza um biomonitoramento. Os principais organismos utilizados como biomonitores são espécies de moluscos, peixes, anfíbios, mamíferos e algas (RAMSDORF, 2011). Peixes são amplamente utilizados devido à sua resposta similar aos grandes vertebrados quando expostos a tóxicos, servindo também para indicar o potencial de exposição de populações humanas a tóxicos químicos, já que são os principais vetores em ambiente aquático de transferência de contaminantes para humanos (AL-SABTI e METCALFE, 1995).

4.2 FILTROS SOLARES

Filtros solares são, por definição, eficazes na proteção contra queimaduras solares e bronzeamento, além disso, proporcionam proteção contra danos no DNA induzidos pela ação da radiação UV (ROSEN, 2003).

A primeira publicação que especificamente recomendava o uso de protetor solar químico foi feita em 1891. Nessa publicação, Hammer argumenta sobre alguns efeitos da luz na pele, evidenciando que as queimaduras solares são efeito da radiação UV: “Materiais que previnem a radiação UV de atingir a pele e causar eritema solar” (URBACH, 2001). Algum tempo depois, em 1928, nos Estados Unidos, ocorreu a primeira utilização comercial de protetor solar, que consistia em uma emulsão de salicilato de benzila e cinamato de benzila (SANTOS, 2007).

Atualmente, a composição dos filtros solares é regulamentada por diferentes órgãos ao redor do mundo. No Brasil, a regulamentação é feita pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), através da Resolução - RDC Nº 47, de 16 de março de 2006, que apresenta os filtros ultravioletas permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes, bem como suas concentrações máximas permitidas.

Os filtros solares podem ser divididos em dois grupos, filtros químicos e físicos. Os filtros físicos são compostos inorgânicos, sendo os principais o dióxido de titânio e o óxido de zinco, que atuam refletindo ou absorvendo a radiação UV. Já os filtros químicos absorvem a radiação UV e a liberam novamente na região do infravermelho, a maioria são compostos aromáticos dissubstituídos: um grupo carbonila, cetona ou éster e, na posição orto ou para, um grupo amina ou metoxila, que possuem caráter doador de elétrons devido ao par de elétrons livres (SANTOS, 2007). O Quadro 1 relaciona os principais filtros UV orgânicos e suas bandas de absorção.

De modo geral, de três a oito diferentes filtros UV orgânicos são encontrados em protetores solares e, juntos, podem apresentar mais de 10% da massa total do produto (BRAUSCH e RAND, 2011).

Filtro UV	Banda Absorvida
Derivados do PABA Octil dimetil PABA	UVB
Cinamatos p-MEtoxicinamato de octila Octocrileno	UVB UVA/UVB
Salicilatos Salicilato de octila	UVB
Antranilatos Antranilato de Metila	UVA
Benzofenonas Benzofenona-3	UVA/UVB
Dibenzoilmetanos Avobenzona	UVA
Derivados de Benzilideno cânfora Ácido tereftalideno dicânfora sulfônico Trisiloxano de drometrizol	UVA UVA/UVB
Outros Metileno-bis-benzotriazolil tetrametilbutilfenol Bis-etilhexilofenol metoxifenil	UVA/UVB UVA/UVB

Quadro 1 – Filtros UV orgânicos e suas bandas de absorção
Fonte: Rosen, 2003.

O *p*-Metoxicinamato de octila e a benzofenona-3 são filtros UV geralmente combinados em formulações de protetor solar, pois seus espectros UV têm bandas de sobreposição (Fig. 1) e a mistura permite um bom fator de proteção solar (FPS) em toda a gama de radiações UVB e UVA (CHISVERT *et al.*, 2001).

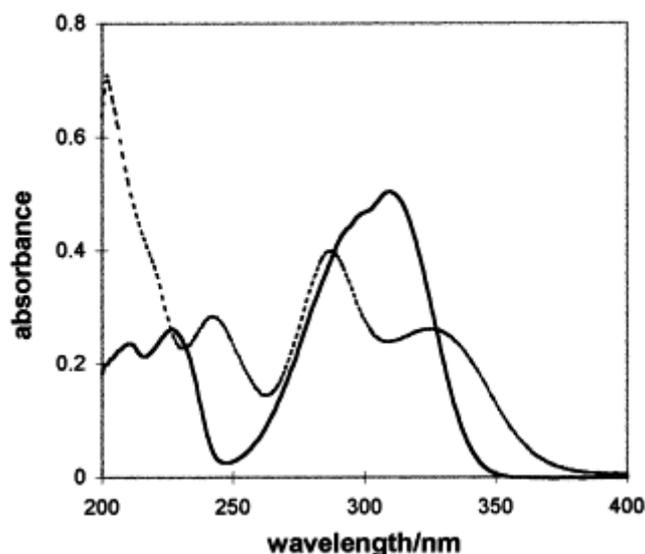


Figura 1 - Espectro de UV de soluções etanólicas de benzofenona-3 6 mg.ml^{-1} (---) e *p*-Metoxicinamato de octila 6 mg.ml^{-1} (—). Fonte: CHISVERT *et al.*, 2001.

4.2.1 Benzofenona-3

Um dos compostos amplamente utilizado como filtro solar é a benzofenona-3 (BZ-3) (Fig. 2), sendo primeiramente encontrada na formulação de protetores solares na década de 50 (GAGO-FERRERO *et al.*, 2012). A benzofenona-3 (2-hidroxi-4-metoxi-5 ácido benzofenona) é uma substância lipofílica, que absorve radiação UVA e UVB, sendo que seu pico de absorção é em 290 nm, apresenta uma solubilidade de $0,1 \text{ g.L}^{-1}$, é sintetizada a partir da reação entre o cloreto de benzoíla e o 2-hidroxianisol (ROSEN, 2003; SANTOS, 2007).

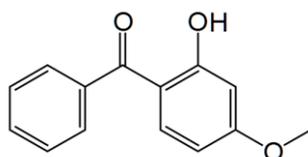


Figura 2 - Benzofenona-3. Fonte: GAGO-FERRERO *et al.*, 2012.

Apesar de ser comumente empregada na formulação de produtos cosméticos, especialmente em protetores solares, a BZ-3 é capaz de induzir

reações fotoalérgicas e está incluída no kit de teste padrão para alergias. Dentre os absorvedores de UV utilizados comercialmente, esse composto é descrito como o fotoalergênico mais comum (ROSEN, 2003). Além desse potencial alergênico, não têm sido atribuídos outros efeitos adversos para a saúde humana.

Mesmo assim, a grande utilização desse composto reflete numa crescente preocupação sobre seus efeitos na saúde humana e no meio ambiente. Um estudo realizado nos Estados Unidos mostrou que em 96,8% de 2517 amostras de urina de pessoas de diferentes regiões, sexo e idade, foi possível detectar a presença de benzofenona-3 (CALAFAT *et al.*, 2008).

Experimentos realizados em ratos e camundongos mostraram alterações no fígado, rins e órgãos reprodutivos, a partir de administração dérmica e oral desse composto (CALAFAT *et al.*, 2008).

4.2.2 *p*-metoxicinamato de octila

O *p*-metoxicinamato de octila (MCO) (Fig. 3), também conhecido como 2-etilhexil(2E)-3-(4-metoxifenil)prop-2-enoato, octinoxato e *p*-metoxicinamato de etilhexila, é o filtro mais amplamente utilizado em produtos cosméticos que contam com proteção solar. É eficaz na absorção de UVB entre 280-320 nm, apresenta pico de absorção em 311nm, é lipofílico, tem um bom histórico de segurança e é relativamente barato. O MCO é derivado do ácido cinamato, um ácido graxo insaturado (CHENG *et al.*, 1997).

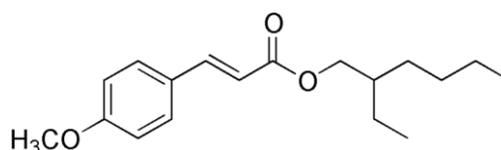


Figura 3 - *p*-metoxicinamato de octila. Fonte: GAGO-FERRERO *et al.*, 2012.

É o filtro solar mais utilizado, sendo responsável por 81% do mercado de formulações de protetor solar em 2001 – porém informações mais recentes

sobre o consumo global destas substâncias são muito escassas (AMINE *et al.*, 2012).

Sendo o filtro UV mais utilizado, inúmeros trabalhos são feitos para quantificar o MCO no ambiente, em diferentes locais ao redor do mundo e diferentes matrizes, a Tabela 1 mostra alguns desses resultados. É interessante ressaltar que essas quantidades no ambiente, variam muito conforme a localização e, numa mesma localização, podem variar durante período do ano.

Tabela 1 - Níveis de *p*-metoxicinamato de octila em ambientes aquáticos.

Matriz		Localização	MCO	Referência
Planta de tratamento de esgoto	Afluente	Suíça	0,5-19	Balmer <i>et al.</i> 2005
		Alemanha	1,732	Rodil <i>et al.</i> 2009
	Efluente	Suíça	<0,010-0,1	Balmer <i>et al.</i> 2005
		Alemanha	Nd	Rodil <i>et al.</i> 2009
	Lodo de Esgoto	Japão	0,012	Kameda <i>et al.</i> 2011
		Suíça	0,010-0,390	Plagellat <i>et al.</i> 2006
Águas superficiais	Riacho	Japão	0,021-0,260	Kameda <i>et al.</i> 2011
	Lago	Japão	0,018	Kameda <i>et al.</i> 2011
	Rio (altamente poluído)	Japão	0,125-1,040	Kameda <i>et al.</i> 2011
	Rio (moderadamente poluído)	Japão	0,012-0,91	Kameda <i>et al.</i> 2011
Águas recreacionais	Piscinas	Grécia	0,0045	Giokas <i>et al.</i> 2004
		Grécia	0,0038-0,0044	Lambropoulou <i>et al.</i> 2002
	Lagos	Suíça	0,002-0,026	Poiger <i>et al.</i> 2004
		Alemanha	3,009	Rodil <i>et al.</i> 2009
Água do Mar	Oceano Pacífico (microcamada)	Polinésia	0,013-0,092	Goksoyr <i>et al.</i> 2009
Sedimentos	Rio (altamente poluído)	Japão	0,0022-0,0096	Kameda <i>et al.</i> 2011
	Rio (moderadamente poluído)	Japão	0,0038-0,030	Kameda <i>et al.</i> 2011

Amostras aquosas e sólidas estão expressas em $\mu\text{g.L}^{-1}$ e $\mu\text{g.g}^{-1}$ em peso seco, respectivamente.

Além de ser quantificado em matrizes ambientais, o MCO é quantificado em organismos, podendo alcançar níveis de até 337mg/kg de lipídios em macroinvertebrados e peixes (*Dreissena polymorpha*, *Salmo trutta*) e até 701mg/kg de lipídio em biguá, uma ave marinha (*Phalacrocorax sp.*) (KAISER *et al.*, 2012).

Diferente da BZ-33, o MCO é descrito como um filtro solar bastante seguro e com baixo potencial alergênico, mesmo assim, estudos mostram que quando no meio ambiente o MCO pode trazer efeitos nocivos. Por exemplo, causando atividades hormonais, que tem sido documentado *in vitro*, bem como *in vivo*. Um estudo realizado em 2010 mostrou que o MCO induziu uma diminuição de espermatócitos nos testículos e ovócitos nos ovários de peixe-zebra (ZUCCHI *et al.*, 2010). Outras observações sobre essas substâncias mostraram que MCO e BZ-3 estavam envolvidos no branqueamento de corais, promovendo infecções virais (DANOVARO *et al.*, 2008).

4.3 ENSAIO COMETA

Os agentes genotóxicos são capazes de interagir quimicamente com o material genético, provocando adutos, alterações oxidativas ou mesmo quebras na molécula de DNA (MÍDIO e MARTINS, 2000). Normalmente as células podem reparar lesões no DNA através de diferentes processos ou estas podem ser eliminadas. O DNA danificado e não reparado pode dar origem a defeitos na transcrição e replicação da molécula, provocando mutações (KORNHAUSER *et al.*, 1991). Efeitos genotóxicos podem se manifestar mesmo em concentrações muito baixas de substâncias, podendo refletir na reprodução, vida embrionária, desenvolvimento, crescimento e sobrevivência de organismos. Podem ter ainda relação com carcinogênese, defeitos hereditários por mutações, teratogênese e patologias de fundo genético (DI PAOLO, 2006).

Assim, diferentes testes citogenéticos têm sido utilizados para avaliar o potencial genotóxico e mutagênico de substâncias presentes nos ecossistemas aquáticos. Dentre as metodologias utilizadas para avaliar danos no DNA o

ensaio cometa tem recebido grande destaque devido sua capacidade de detectar lesões pré-mutagênicas sendo extensamente utilizado para detecção de genotoxicidade (KAMMANN *et al.*, 2001).

O ensaio cometa (*Single-Cell Gel Eletrophoresis* – SCGE, eletroforese em gel de células individuais) é utilizado para verificar lesões genômicas que, caso não sejam reparadas, podem ser processadas dando origem a mutações (GONTIJO e TICE, 2003). Este método tem sido amplamente utilizado como ensaio de toxicidade de produtos industriais, farmacêuticos e agroquímicos e outras substâncias, para detectar danos e reparos do DNA em células individuais.

A maior vantagem do ensaio cometa é sua alta sensibilidade a vários tipos de danos no DNA (BÜCKER *et al.*, 2006). É um método rápido, de baixo custo, seguro e de execução relativamente simples. Outras vantagens incluem: a detecção de danos em células individuais; o baixo número de células necessário para a realização do ensaio; pode ser realizado com qualquer tipo de célula eucariótica nucleada (LEE e STEINERT, 2003).

O princípio básico do ensaio cometa é a migração eletroforética do DNA em matriz de agarose, após ter sido liberado através da lise de membranas celulares e proteínas nucleares, provocada por uma solução detergente. O DNA, maior e mais pesado que o restante dos componentes celulares, permanece retido numa estrutura residual semelhante a um núcleo, chamada de nucleóide. Em caso de quebras na molécula de DNA a estrutura do nucleóide é alterada devido à migração crescente dos fragmentos de DNA em direção ao ânodo, resultando em uma estrutura semelhante à cauda de um cometa. Caso o dano de DNA seja pouco ou inexistente a célula não apresentará cauda (VILCHES, 2009).

Os cometas resultantes necessitam passar por uma coloração, que pode ser feita por técnicas de fluorescência, em que são utilizados brometo de etídio, iodeto de propídio ou *syber green*, ou por histotécnica convencional com sal de prata. Ambos os métodos possuem vantagens e limitações. As limitações do método por fluorescência incluem a necessidade de um microscópio para análise de material fluorescente e a dificuldade de armazenamento das lâminas para observação posterior, já que a coloração perde sua fluorescência em um dia. Outra desvantagem é a toxicidade de alguns reagentes, como o brometo

de etídio, que é mutagênico e pode ser cancerígeno sob exposição crônica. A análise com coloração com sal de prata pode ser feita com microscópio óptico convencional e as lâminas podem ser armazenadas, porém, formam resíduos escuros depositados sobre a lâmina que dificultam a leitura dos nucleóides (BRIANEZI *et al.*, 2009).

Existem duas versões do ensaio cometa: uma neutra, menos sensível, porque detecta apenas lesões de fita dupla de DNA, e a alcalina desenvolvida por SINGH *et al.* em 1988, de maior utilização por detectar os diversos tipos de lesões de DNA, como quebras de fita simples, quebras de fita dupla, sítios álcali-lábeis, sítios abásicos, excisão de sítios incompletos de reparo e ligações cruzadas (BRIANEZI *et al.*, 2009).

O grau de dano no DNA pode ser analisado de várias maneiras, como a quantidade de DNA na cauda, o comprimento da cauda e a porcentagem de células com diferentes classes de danos (TICE, 1995).

4.4 PEIXES COMO ORGANISMOS-TESTE

Peixes são organismos que apresentam vantagens para estudos de citogenotoxicidade: possuem eritrócitos nucleados, o que possibilita a realização de diversas técnicas com amostras sanguíneas, sem que seja preciso macerar ou separar enzimaticamente células de tecidos sólidos; são bioconcentradores, apresentando resposta mesmo a baixas concentrações de poluentes ambientais; respondem a agentes tóxicos de maneira similar a vertebrados superiores; podem ser mantidos facilmente em laboratório e expostos a substâncias químicas; são parte importante do fluxo de energia dos ecossistemas costeiros e constituem um recurso alimentar humano de alto valor protéico (VIGNARDI, 2012). Portanto, informações sobre a genotoxicidade de xenobióticos nestes animais são importantes tanto para a conservação do ecossistema como para a saúde humana.

O uso de peixes como bioindicadores é de extrema importância, pois permite detectar precocemente problemas nos ecossistemas aquáticos (VAN DER OOST *et al.*, 2003). Além disso, informações sobre a mutagenicidade

causada por um xenobiótico em espécies nativas de peixes, pode ajudar a preservar tais espécies (AL-SABTI e METCALFE, 1995).

O ensaio cometa tem sido aplicado em vários estudos utilizando eritrócitos de várias espécies de peixes, devido à sensibilidade das células sanguíneas destes animais aos efeitos genotóxicos. Esta técnica também foi aplicada em outros tipos de células píceas, como hepatócitos, células branquiais, renais e intestinais (SOUZA e FONTANETTI, 2007).

4.5 *Astyanax* sp

Peixes do gênero *Astyanax* são conhecidos popularmente pelos nomes de lambaris, piabas, lambari-guaçu, mojarra, crioula, tabuão, piaba da lagoa entre outros. São peixes de pequeno porte, de até 20cm de comprimento total e chegam a pesar 40g (Fig. 4). Possuem ampla distribuição geográfica, desde o sudoeste dos Estados Unidos até a bacia do rio da Prata. São encontrados em cabeceiras de riachos, rios e lagos, vivem em cardumes e realizam migrações curtas na época das cheias para sua reprodução (MARCON, 2008).

Inicialmente o gênero *Astyanax* foi proposto por BAIRD e GIRARD (1854) e uma revisão mais completa do gênero foi realizada por EIGENMANN (1921) e EIGENMANN (1927), validando 74 espécies e subespécies. GÈRY (1977) enumerou uma lista de 62 espécies e subespécies em água doce do Brasil. Na revisão mais recente, realizada por LIMA *et al.* (2003), 86 espécies foram citadas e as poucas subespécies existentes foram elevadas a espécies.

A espécie *Astyanax* sp, descrita por GARUTTI e BRITSKI (2000), pertence à seguinte divisão taxonômica: Superclasse Osteichthyes, Classe Actinopterygii, Infraclasse Teleostei, Superordem Osthariophysi, Subsérie Characiphysi, Ordem Characiformes, Família Characidae. Muitas espécies do gênero *Astyanax* são morfologicamente parecidas tornando a sua separação taxonômica complexa (FERNANDES e MARTINS-SANTOS, 2004).

Esses lambaris são utilizados para consumo humano, porém não possuem grande valor comercial devido ao seu pequeno tamanho. Apesar disso, possuem alto valor ecológico como espécie forrageira (GODOY, 1975) e

são considerados transformadores de partículas orgânicas em proteína, que deverá alimentar aves e peixes de níveis tróficos superiores (RAMSDORF, 2011).

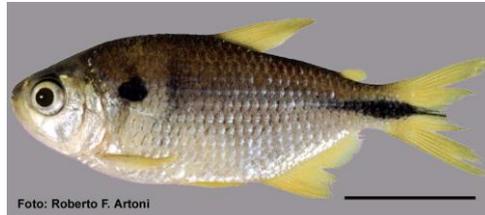


Figura 4 - Exemplar de *Astyanax sp.* Barra = 3cm.

Fonte: RAMSDORF, 2007.

5 METODOLOGIA

5.1 MATERIAS E REAGENTES

O protetor solar foi adquirido em farmácia de manipulação local. Os peixes foram adquiridos de piscicultura local. Os reagentes padrão analítico e materiais foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Limnologia e Ecotoxicologia da UTFPR.

O protetor solar foi manipulado para que a composição e suas quantidades pudessem ser completamente conhecidas. O protetor foi preparado com MCO e BZ-3, com concentrações de 3% e 7% em massa, respectivamente, em uma base de copolímero acrilato de sódio e lecitina 2% e água q.s.p. (nome comercial LecigelTM), uma base gel-creme não oleosa.

Considerando a escassez de estudos anteriores que avaliam a genotoxicidade de filtros solares em peixes, as concentrações dos contaminantes foram determinadas a fim de variá-las amplamente visando determinar parâmetros para trabalhos futuros.

As concentrações utilizadas foram: 10 µg/L (Áquario 1), 100 µg/L (Áquario 2) e 1000 µg/L (Áquario 3), calculadas a partir do percentual de MCO presente na composição do filtro solar, conseqüentemente as concentrações de BZ-3 aos que os organismos foram expostos foram de 23 µg/L (Áquario 1), 233 µg/L (Áquario 2) e 2333 µg/L (Áquario 3), respectivamente. A massa de base LecigelTM, utilizada no grupo controle contendo somente a base do filtro, foi igual à massa de protetor solar utilizada no bioensaio de maior concentração, 1000 µg/L.

5.2 BIOENSAIO

Os peixes, do gênero *Astyanax sp* (lambari), adquiridos comercialmente de Piscicultura, foram transportados para o Laboratório de Limnologia e

Ecotoxicologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, onde foram aclimatados à temperatura ambiente durante um mês em tanques de 250 L (Fig. 5), contendo água filtrada e aeração constante. O laboratório possui iluminação natural satisfatória, sendo assim, a aclimação e também os bioensaios contaram com fotoperíodo natural.



Figura 5 - Tanque de aclimação dos peixes.

Terminado o período de aclimação os peixes foram transferidos para cinco aquários de 20 L de volume útil, nos quais os bioensaios foram realizados. Foram utilizados três aquários de vidro contendo diferentes concentrações de filtro solar adquirido comercialmente, de formulação manipulada e fator de proteção 15, que foi solubilizado em água; um aquário para o grupo controle, contendo somente água da rede filtrada; e mais um aquário para um segundo grupo controle contendo somente a base do protetor solar – sem os princípios ativos do protetor solar (Fig. 6).



Figura 6 – Aquários durante os bioensaios.

Em cada aquário foram colocados 15 exemplares de peixe, que foram mantidos por diferentes tempos de exposição no bioensaio agudo e subcrônico, antes da coleta de sangue e realização do ensaio cometa:

- Teste Agudo: o período de exposição de 96 horas (4 dias);
- Teste Subcrônico: o período de exposição de 21 dias.

No teste subcrônico utilizou-se um método semi-estático, com renovação parcial da substância-teste. Ou seja, os peixes passaram por sete ciclos de manutenção de três dias cada um: no dia 1 os peixes eram alimentados; no dia 2, 30% da água dos aquários era renovada, juntamente com uma nova concentração proporcional do contaminante (protetor solar ou base); e no dia 3 nenhuma ação era realizada.

Após o período de exposição os peixes foram retirados dos aquários e colocados, um a um, em uma solução contendo 10% do anestésico p-aminobenzoato de etila (benzocaína), que é um anestésico sem ação mutagênica (GONTIJO *et al.*, 2003). Quando totalmente anestesiados, os peixes tiveram o peso, o comprimento e o sexo de cada exemplar anotado.

Em seguida foram coletados 10 μ L de sangue de cada animal, que foram transferidos para eppendorfs contendo 1mL de tampão fosfato salino (PBS). O material coletado foi armazenado em caixa térmica com gelo, para evitar que as amostras fossem danificadas pela ação de radiação de ondas de comprimento ultravioleta, provenientes tanto da incidência de luz natural, quanto de lâmpadas.

5.3 ENSAIO COMETA

O ensaio cometa foi realizado baseado na metodologia descrita por SINGH *et al.* (1988) com algumas modificações.

5.3.1 Preparo das Lâminas

Foram dissolvidos 1,5g de agarose normal em 100mL de tampão fosfato salino (PBS, pH 7.4) em um Erlenmeyer, sob agitação por duas horas. A mistura foi levada ao forno microondas até que estivesse completamente dissolvida.

Após a sua solidificação em temperatura ambiente, a agarose foi picada e levada novamente ao forno microondas. Este procedimento foi repetido mais uma vez. A agarose resultante foi, então, mantida em banho-maria a 70°C, para evitar sua solidificação, a 37°C.

Lâminas, previamente limpas com álcool etílico e secas com panos absorventes, foram mergulhadas na agarose aquecida, a fim de que a superfície com ponta esmerilhada, na qual estava a identificação de cada uma das lâminas, ficasse completamente coberta com uma camada fina de agarose. As lâminas ficaram por 24h sobre uma superfície plana e horizontal em temperatura ambiente para que a cobertura de agarose solidificasse.

Essa primeira camada é feita com o intuito de melhorar a adesão da segunda camada nas lâminas, que conterà o material celular (VIGNARDI, 2012).

Para preparar a solução da segunda camada, de agarose de baixo ponto de fusão (LMP), 100mg de agarose normal foram dissolvidos em 20mL de PBS e levados ao forno microondas para fervura e dissolução. A solução foi armazenada na geladeira até o momento do uso, quando foi aquecida em banho-maria e mantida em temperatura acima de 37°C, temperatura que mantém o gel líquido.

5.3.2 Ensaio Cometa

Em um ambiente protegido da luz, foram preparadas as lâminas do ensaio cometa. Para isso, da solução contendo sangue animal e PBS foram coletados 10µL e misturados com 120µL de agarose LMP liquefeita. Esta

suspensão celular foi depositada sobre uma das lâminas preparadas com cobertura de agarose e então coberta com uma lamínula de vidro. As lâminas com essa segunda camada eram dispostas horizontalmente em uma bandeja e levadas a geladeira por 15 minutos para a solidificação do gel. As lamínulas foram, então, delicadamente retiradas.

As lâminas foram imersas em uma cubeta de vidro contendo uma solução de lise gelada de alta concentração de sais e detergente (NaCl 2,5M, Na₂EDTA 100mM, Tris 10mM, pH 10; Triton X-100 e DMSO 10%, adicionados logo antes do uso). O período de imersão foi de 24h. Este procedimento visa romper as membranas das células sanguíneas, do núcleo e organelas, retirando e dissolvendo componentes citoplasmáticos e proteínas nucleares.

Após as 24 horas, as lâminas foram dispostas na cuba eletroforética e, quando necessário, lâminas limpas preencheram os espaços existentes. A cuba foi mantida refrigerada e ao abrigo da luz.

Na cuba de eletroforese adicionou-se delicadamente a solução de eletroforese pH>13 (NaOH 10M, EDTA 200mM), cobrindo as lâminas por 30 minutos para que ocorresse o desenrolamento ou relaxamento do DNA.

Iniciou-se, então, a corrida de eletroforese a 25V e 300mA por 25 minutos. Terminada a eletroforese, as lâminas eram retiradas da cuba e dispostas inclinadas em uma bandeja por um minuto para escorrer.

A neutralização das lâminas foi feita através de sua imersão em solução tampão neutro gelado (Tris 0,4M; pH 7,5), por 15 minutos, divididos em 3 seções de 5 minutos cada.

As lâminas foram secas em temperatura ambiente e então fixadas em etanol 96% por 5 minutos. Após a fixação as lâminas foram armazenadas para coloração e visualização.

Para a coloração foram adicionados 25µL de brometo de etídeo (0,02g/L) em cada lâmina. As lâminas eram então cobertas com uma lamínula cada e levadas ao microscópio de epifluorescência (Leica DMLS) com aumento de 400x. Para cada lâmina foram analisados 100 nucleóides.

Para a análise dos danos causados ao DNA, os cometas foram classificados de acordo com o dano, conforme o comprimento da cauda formada após a corrida eletroforética, segundo Gomes *et al.* (2012).

Nesta classificação a classe 0 corresponde a nucleóides considerados intactos, sem danos aparentes, sem cauda; a classe 1 corresponde a danos pequenos, os nucleóides apresentam um tamanho de cauda inferior ao diâmetro da cabeça; a classe 2 aos danos médios, os nucleóides apresentam caudas com tamanhos equivalentes a uma vez o tamanho do diâmetro da cabeça; a classe 3 aos danos mais severos, os nucleóides apresentam caudas com tamanho equivalente a duas vezes o diâmetro da cabeça; e a classe 4 aos danos máximos, os nucleóides apresentam caudas com tamanho superior a duas vezes o diâmetro da cabeça (Fig 7).

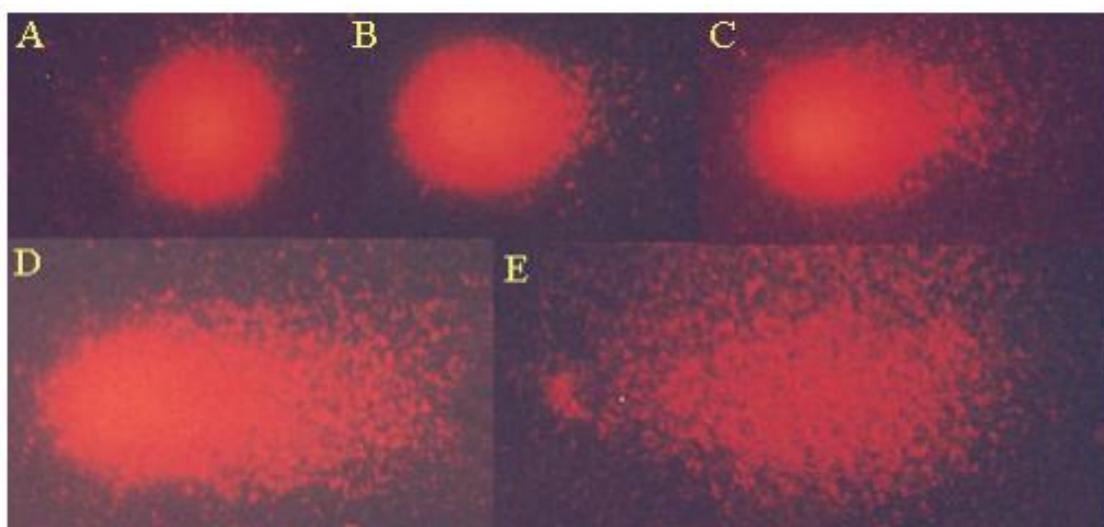


Figura 7 – Classificação dos danos. Fonte: SALDANHA, 2007.

A: Classe 0, B: Classe 1, C: Classe 2, D: Classe 3, E: Classe 4.

O Índice de Dano (ID) foi calculado pela somatória dos produtos da multiplicação entre o número de nucleóides de cada classe (n) para cada peixe e o dígito denominador da classe (0, 1, 2, 3, 4).

$$(ID) = 0(n \text{ Classe } 0) + 1(n \text{ Classe } 1) + 2(n \text{ Classe } 2) + 3(n \text{ Classe } 3) + 4(n \text{ Classe } 4)$$

Equação 1: Índice de dano

Assim, o valor do ID varia de 0, para peixes com todos os cometas apresentando DNA intactos, a 400 para peixes com todos os cometas com DNA danificados ao máximo.

5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística utilizou-se o teste Kruskal-Wallis através do programa BioEstat 2.0. O nível de significância considerado nas análises foi de 0,05. O programa Excell para Windows foi utilizado para o cálculo das medianas. A elaboração dos gráficos foi através do programa GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 BIOENSAIO AGUDO

Não foi observada mortalidade de nenhum indivíduo no decorrer dos quatro dias de exposição.

Os exemplares de *Astyanax sp.*, ao final do bioensaio, apresentavam-se dentro da normalidade quanto às massas corpóreas e comprimento total: $1,62 \pm 0,80$ g e $4,77 \pm 0,67$ cm. Nesse bioensaio, 60% dos peixes utilizados era fêmeas e 40% eram machos.

Os escores foram calculados conforme a equação 1, esses resultados, bem como suas medianas estão compilados na Tabela 2.

Tabela 2 - Escores resultantes do bioensaio agudo.

Organismo	Controle H ₂ O	Controle gel	Aquário 1	Aquário 2	Aquário 3
1	168	137	218	136	231
2	115	154	176	195	196
3	97	127	297	146	166
4	175	240	217	239	215
5	179	78	231	146	261
6	183	101	259	164	166
7	89	151	238	228	194
8	172	236	221	273	135
9	129	142	199	225	201
10	125	241	135	255	274
11	113	249	205	176	236
12	245	206	165	215	218
13	161	120	166	205	198
14	66	124	208	239	205
15	181	160	111	153	205
Mediana	161	151	208	205	205

As medianas dos escores nos grupos controle água, controle gel e Aquários 1,2 e 3 foram, respectivamente, 161, 151, 208, 205 e 205 (Fig. 8).

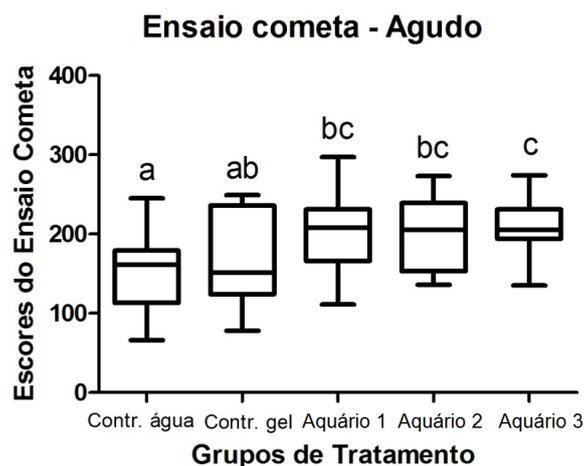


Figura 8 - Escores obtidos no ensaio cometa (agudo) com eritrócitos de *Astyanax sp*; nos diferentes grupos, controle água, controle gel e expostos às concentrações de filtro solar – Aquários 1,2 e 3. Letras iguais indicam falta de diferença estatística significativa e letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

A partir da análise estatística dos dados do ensaio cometa não foi observada diferença significativa nos escores de danos entre os grupos controle água e controle gel ($p = 0,37$). Foram observadas diferenças significativas entre o grupo controle água e os Aquários 1, 2 e 3 ($p=0$ em todas as comparações). Não houve diferença significativa entre o grupo controle gel e os Aquários 1 e 2 ($p=0,05$ e $p=0,08$ respectivamente), porém foram observadas diferenças significativas entre o grupo controle gel e o Aquário 3 ($p=0,035$). Não foram observadas diferenças significativas entre os Aquários 1 e 2 ($p=0,86$), 1 e 3 ($p=0,85$) e 2 e 3 ($p=0,72$).

Alguns desses resultados são particularmente importantes, pois podem representar que em certas condições o protetor pode levar a danos ao material genético dos peixes.

Quando se analisa o ensaio cometa agudo com eritrócitos de peixes, é possível verificar que não houve diferença significativa entre os escores dos grupos controle água e controle gel, o que sugere que, nessas condições, a base do protetor solar não provoca danos ao DNA.

Por outro lado, quando se compara o controle água com os Aquários 1, 2 e 3, se observam diferenças significativas em todos os casos, sendo assim, pode-se propor que numa exposição aguda o protetor solar pode causar danos ao DNA.

Por fim, a comparação entre as variadas concentrações não indicou diferenças significativas, sugerindo que em apenas 96h a concentração do contaminante não é fator determinante na extensão dos danos ao DNA.

6.2 BIOENSAIO SUBCRÔNICO

Foi observada mortalidade de 11 indivíduos no decorrer dos vinte e um dias de exposição, ocorrida no grupo exposto à maior concentração, Aquário 3, isso representou 73,3% dos peixes desse grupo.

Os exemplares de *Astyanax sp*, ao final do bioensaio, apresentavam-se dentro da normalidade quanto às massas corpóreas e comprimento total: $1,54 \pm 0,67$ g e $4,90 \pm 0,59$ cm. Nesse bioensaio, 55% dos peixes utilizados era fêmeas e 45% eram machos.

Bem como no teste agudo, os escores foram calculados utilizando a equação 1, esses resultados, bem como suas medianas estão compilados na Tabela 3.

Tabela 3 - Escores resultantes do bioensaio subcrônico.

Organismo	Controle H ₂ O	Controle gel	Aquário 1	Aquário 2	Aquário 3
1	151	157	332	233	301
2	140	113	339	272	261
3	216	93	254	238	295
4	174	153	269	266	273
5	175	190	294	164	
6	189	148	220	222	
7	165	97	184	338	
8	169	156	260	267	
9	188	181	255	234	
10	96	153	228	299	
11	116	163	192	217	
12	143	175	175	238	
13	131	206	184	205	
14	181	212	132	225	
15	177	203	190	210	
Mediana	169	157	228	234	284

As medianas dos escores nos grupos controle água, controle gel e Aquários 1,2 e 3 foram, respectivamente 169, 157, 228, 234 e 284 (Fig. 9).

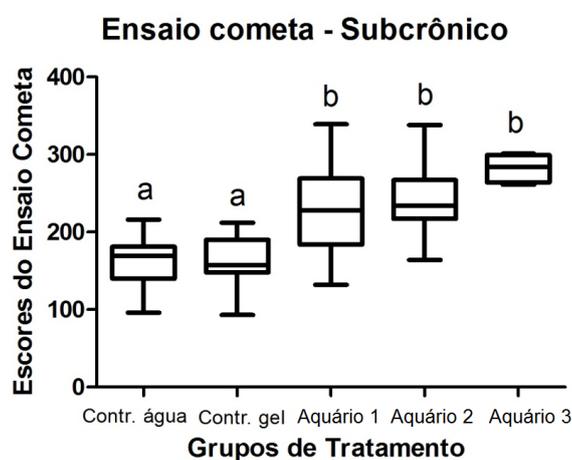


Figura 9 - Escores obtidos no ensaio cometa (subcrônico) com eritrócitos de *Astyanax sp*; nos diferentes grupos, controle água, controle gel às concentrações de filtro solar – Aquários 1,2 e 3. Letras iguais indicam falta de diferença estatística significativa e letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

A partir da análise estatística dos dados do ensaio cometa não foi observada diferença significativa nos escores de danos entre os grupos controle água e controle gel ($p = 0,94$). Foram observadas diferenças significativas entre o grupo controle água e os Aquários 1, 2 e 3 ($p=0$ em todas as comparações), assim como entre o grupo controle gel e os Aquários 1, 2 e 3 ($p=0$ em todas as comparações). Porém não foram observadas diferenças significativas entre os Aquários 1 e 2 ($p=0,53$), 1 e 3 ($p=0,13$) e 2 e 3 ($p=0,27$).

As informações obtidas a partir desses resultados são relevantes, pois podem sugerir que em certas condições o protetor pode acarretar em danos ao material genético dos peixes.

Quando se analisa o ensaio cometa subcrônico com eritrócitos de peixes, semelhante ao que foi verificado no teste agudo, percebe-se que não houve diferença significativa entre os escores dos grupos controle água e controle gel, o que sugere que, nessas condições, a base do protetor solar não provoca danos ao DNA.

Novamente, quando se compara o controle água com os Aquários 1, 2 e 3, se observam diferenças significativas em todos os casos, sendo assim,

pode-se propor que numa exposição subcrônica o protetor solar pode causar danos ao DNA.

Da mesma forma, a comparação entre as medianas dos escores do controle gel e as diferentes concentrações de protetores solar resulta em diferença significativa em todos os casos, esse resultado reforça a sugestão de que apenas a base Lecigel™ do protetor solar não oferece risco de danos ao material genético do peixe.

Por fim, concordando com os resultados do teste agudo, as comparações entre as variadas concentrações não indicaram diferenças significativas entre si, sugerindo que nessas condições a concentração do contaminante não é fator determinante na produção de danos no material genético do peixe.

Kunz *et al.* determinou *in vitro* a atividade estrogênica de 23 filtros UV empregando uma levedura recombinante com o receptor de estrogênio de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Os filtros benzofenona-1, benzofenona-2, 4,4-dihidroxi-benzofenona, 4-hidroxibenzofenona, 2,4,4-trihidroxi-benzofenona e fenil salicilato mostraram curvas dose-resposta com respostas máximas de 81-115%, enquanto 3-benzilideno cânfora, octil salicilato, benzil salicilato, benzofenona-3, e benzofenona-4 mostraram máximas de 15-74%. No mesmo trabalho, Kunz *et al.* analisou a estroginicidade *in vivo* de oito filtros UV em peixes “fathead minnows” (*Pimephales promelas*) pela indução potencial de vitelogenina depois de 14 dias de exposição aquática. Três filtros demonstraram potencial *in vivo*, dentre eles a benzofenona-3, que induziu a produção de vitelogenina em concentrações mais baixas (435µg/L) do que a benzofenona-1 (4919µg/L) e a benzofenona-2 (8783µg/L).

Em outro trabalho, Kunz *et al.* analisou os efeitos do filtro UV 3-benzilideno cânfora na reprodução de peixes *Pimephales promelas*. Depois de uma exposição de 21 dias, 3-benzilideno cânfora afetou a reprodução de forma dose-dependente com pequenos efeitos na fecundidade em 3µg/L, diminuição significativa em 74µg/L, e interrupção da reprodução em 285µg/L. Ocorreram também, de forma dose-dependente, desmasculinização em características sexuais secundárias de machos e efeitos na indução de vitelogenina plasmática, sendo significativa a partir de 74µg/L. O 3-benzilideno cânfora também demonstrou um profundo efeito dose-dependente na histologia das

gônadas de machos e fêmeas a partir de $3\mu\text{g/L}$. Em $74\mu\text{g/L}$ e $285\mu\text{g/L}$, o desenvolvimento de ovócitos e espermatócitos foram inibidos nas gônadas de fêmeas e machos.

7 CONCLUSÃO

Neste estudo, foram avaliados os efeitos do protetor solar comercial de composição *p*-metoxicinamato de octila 3% e benzofenona-3 7% através do ensaio cometo com eritrócito de peixe *Astyanax sp*, em duas baterias de testes: ensaio agudo (96 horas) e ensaio subcrônico (21 dias).

A partir desse trabalho pode-se notar que nas condições dos testes, em ambos os casos, o controle composto apenas por água quando comparado ao controle gel, não apresentou diferença significativa. Por outro lado, quando comparados o controle água e os grupos contaminados com protetor solar, resulta em diferença significativa. Além disso, no teste subcrônico, houve também diferença significativa entre os grupos contaminados com a formulação completa e o grupo contaminado apenas com a base gel-creme.

Esses resultados podem sugerir que os filtros-UV utilizados podem causar danos ao material genético dos peixes, e esses danos podem ser atribuídos ao MCO e ao BZ-3, considerando que em ambos os testes os controle água e gel não resultaram em diferenças significativas entre si.

No entanto, esses dados ainda são muito escassos para afirmar que os filtros utilizados possam a vir causar efeito danoso ao peixe estudado e ao meio ambiente. Para tanto, são necessárias avaliações complementares, como testes de micronúcleo písceo, testes de exposição crônica, novas avaliações com outros gêneros e espécies de peixes, outros organismos, menores e maiores concentrações de contaminantes, bem como investigar suas fontes, o destino e outras implicações ecotoxicológicas que o protetor solar possa causar.

As concentrações utilizadas foram escolhidas arbitrariamente, a fim de realizar um ensaio preliminar, devido à falta de estudos e descrições sobre esses compostos em testes de genotoxicidade. Mas os resultados encontrados se mostraram satisfatórios e podem ser usados em próximos ensaios. Com exceção da maior concentração utilizada, Aquário 3, que provocou a morte de alguns organismos no ensaio subcrônico. Como isso não é desejado nesse tipo de bioensaio, as concentrações em testes futuros devem ficar abaixo desse valor em ensaio subcrônicos para essa espécie.

REFERÊNCIAS

ABIHPEC. Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. **Abihpec – Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos**. 2010. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/f569ef804822feed95bed754098589a5/2_Palestra.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: março de 2013.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in Water. **Mutation Research**, v. 343, p.121-35, 1995.

AMINE, H.; GOMEZ, E.; HALWANI, J.; CASELLAS, C.; FENET, H. UV filters, ethylhexyl methoxycinnamate, octocrylene and ethylhexyl dimethyl PABA from untreated wastewater in sediment from eastern Mediterranean river transition and coastal zones. **Marine Pollution Bulletin**. v. 64, p. 2435–2442, 2012.

ANVISA. Resolução-RDC nº 47, de 16 de março de 2006. **Lista de filtros ultravioletas permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/14c345804ee4083b759bfa337abae9d/Resolu%C3%A7%C3%A3o+RDC+n%C2%BA+47%2C+de+16+de+mar%C3%A7o+de+2006.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: março de 2013.

AZEVEDO, F. A; CHASIN, A. M. **As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia**. São Paulo: Editora Rima (interfox), 340p, 2004.

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

BICHKHAM, J.W.; SANDHU, S.; HEBERT, P.D.N.; CHIKHI, L.; ATWHWAL, R. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. **Mutation Research**, v. 463, 2000.

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

BRIANEZI, G.; DE CAMARGO, J.L.V.; MIOT, H.A. Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 4, p. 325-334, 2009.

BÜCKER, A.; CARVALHO, W., ALVES-GOMES, J.A. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. **Acta Amazonica**. v. 36, n. 3, 2006.

CALAFAT, A.; NEEDHAM, L.; REIDY, J.; WONG, L.; XIAOYUN, Y. Concentrations of the sunscreen agent benzophenone-3 in residents of the United States: National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2004. **Environmental Health Perspectives**, v. 116.7, p. 893, 2008.

CHENG, J.; LI, Y.; ROBERTS, R.L.; WALKER, G. Analysis of 2-ethylhexyl-*p*-methoxycinnamate in sunscreen products by HPLC and Raman spectroscopy. **Talanta**. v. 44, p. 1807–1813, 1997.

CHISVERT, A.; SALVADOR, A.; PASCUAL-MART, M.C. Simultaneous determination of oxybenzone and 2-ethylhexyl-4-methoxycinnamate in sunscreen formulations by flow injection-isodifferential derivative ultraviolet spectrometry. **Analytica Chimica Acta**. v. 428, p. 183–190, 2001.

D'AMATO, C.; TORRES, J. P. M.; MALM, O. DDT (dicloro difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental - uma revisão. **Química Nova**. v. 25, n. 6a, 2002. .

DANOVARO, R.; BONGIORNI, L.; CORINALDESI, C.; GIOVANNELLI, D.; DAMIANI, E.; ASTOLFI, P.; GRECI, L.; PUSCEDDU, A. Sunscreens cause coral bleaching by promoting viral infections. **Environmental Health Perspectives**. v. 116, p. 441–447, 2008.

DI PAOLO, C. **Aplicação do ensaio cometa a estudo de danos ao DNA de robalos, *Centropomus parallelus* (Poey, 1860), expostos à β -naftoflavona**. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica) – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

EIGENMANN, C.H. The American Characidae. *Memoirs of the Museum of Comparative Zoology (Harvard College)*, v. 43, n. 3, p. 209-310, 1921. In: AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C. **Reservatório de Segredo: bases ecológicas para o manejo**. Maringá: EDUEM, 1997.

EIGENMANN, C.H. The American Characidae. *Memoirs of the Museum of Comparative Zoology (Harvard College)*, v. 43, n. 4, p. 311-428, 1927. In: AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C. **Reservatório de Segredo: bases ecológicas para o manejo**. Maringá: EDUEM, 1997.

FERNANDES, C. A.; MARTINS-SANTOS, I. C. Cytogenetic studies in two populations of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). **Hereditas**, v. 141, p. 1-5, 2004.

GÈRY, J. **Characoids of the world**. Neptune City: T.F.H. Publ., 1977.

FINK, S.V.; FINK, W.L. Interrelationships of the Ostariophysan fishes (Teleostei). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 72, n. 4, 1981.

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

GARUTTI, V.; BRITSKI, H.A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia**, PUCRS, série Zoologia, v. 13, p. 65-88, 2000.

GIOKAS, D.L.; SAKKAS, V.A.; ALBANIS, T.A. Determination of residues of UV filters in natural waters by solid-phase extraction coupled to liquid chromatography–photodiode array detection and gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v. 1026, p. 289–293, 2004.

GODOY, M. P. **Peixes do Brasil: subordem Characoidei; bacia do rio Mogi Guassu**. São Paulo, Franciscana. p. 857, 1975.

GOKSOYR, A.; TOLLEFSEN, K.E.; GRUNG, M.; LOKEN, K.; LIE, E.; ZENKER, A.; FENT, K.; SCHLABACH, M.; HUBER, S. Balsa raft crossing the Pacific finds low contaminant levels. **Environmental Science and Technology**. v. 43, p. 4783–4790, 2009.

GOMES, V.; PASSOS, M. J. A. C. R.; SANTOS, T. C. A.; CAMPOS D. Y. F.; USSAMI, K. A.; HASUE, F. M.; PHAN, V. N. 2012. DNA strand breaks in caged Antarctic coastal fish (*Trematomus newnesi*), following exposure to the waters in front of the Brazilian Antarctic Research Station “Comandante Ferraz”. **Pesquisa Antártida Brasileira**, v. 5, p. 61-70, 2012.

GONTIJO, A. M. M. C.; BARRETO, R. E.; SPEIT, G.; REYES, V. A. V.; VOLPATO, G. L.; SALVADORI, D. M. F. Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. **Mutation Research**, v. 534, n. 1, p. 165-172, 2003.

GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003.

KAISER, D; SIERATOWICZ, A; ZIELKE, H; OETKEN, M.; HOLLERT H; OEHLMANN, J. Ecotoxicological effect characterisation of widely used organic UV filters. **Environmental Pollution**, v 163, p. 84-90, 2012.

KAMEDA, Y.; KIMURA, K.; MIYAZAKI, M. Occurrence and profiles of organic sunblocking agents in surface waters and sediments in Japanese rivers and lakes. **Environmental Pollution**. v. 159, p. 1570–1576, 2011.

KAMMANN, U.; BUNKE, M.; STEINHART, H.; THEOBALD, N. A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. **Mutation Research**. v. 98, 2001.

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

KORNHAUSER, A.; WAMER, W. G.; LAMBERT, L. L. 1991. Light-induced dermal toxicity: Effects on the cellular and the molecular level. In: MARZULLI, F. N.; MAIBACH, H. I. (Eds). *Dermal-toxicology*. 4th edition. New York: Hemisphere, p. 527-569.

KUNZ, P.; GRIES, T.; FENT, K. Comparison of In Vitro and In Vivo Estrogenic Activity of UV Filters in Fish. **Toxicological Sciences**. v. 90, pág. 349–361, 2006.

KUNZ, P.; GRIES, T.; FENT, K. The Ultraviolet Filter 3-Benzylidene Camphor Adversely Affects Reproduction in Fathead Minnow (*Pimephales promelas*). **Toxicological Sciences**. v.93, pág. 311–321, 2006.

LAMBROPOULOU, D.A.; GIOKAS, D.L.; SAKKAS, V.A.; ALBANIS, T.A.; KARAYANNIS, M.I. Gas chromatographic determination of 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone and octyldimethyl-p-aminobenzoic acid sunscreen agents in swimming pool and bathing waters by solid-phase microextraction. **Journal of Chromatography A**. v. 967-2, p. 243–253, 2002.

LEE, R. F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutation Research**, v 544, p. 43-64, 2003.

LIMA, F.C.T.; MALABARBA, L.R.; BUCKUP, P.A.; SILVA, J.F.P.; VARI, R.P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAWA, O.T.; PAVANELLI, C.S.; MENEZES, N.A.; LUCENA, C.A.S.; MALABARBA, M.C.S.L.; LUCENA, Z.M.S.; REIS, R.E.; LANGEANI, F.; CASATTI, L.; BERTACO, V.A.; MOREIRA, C.; LUCINDA, P.H.F. Characidae. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS JR, C.J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003.

LIVINGSTONE, D. R. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarker in the aquatic environment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v. 57, p. 195-211, 1993.

MARCON, L. **Morfologia ovariana no lambari *Astyanax bimaculatus* sob efeito do hormônio de crescimento**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Viçosa; 2008.

MCKELVEY-MARTIN, V.J.; GREEN, M.H.L; SCHMEZER, P; POOL-ZOBEL B.L, DE MÉO, M.P; COLLINS, A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. **Mutation Research**, v. 288, p. 47-63, 1993.

METCALFE, J. L. Biological water quality assessment of running waters based on macroinvertebrates communities: history and present status in Europe. **Environmental Pollution**, Barking, v. 60, 1989.

MÍDIO, A.; MARTINS, D. I. **Toxicologia de alimentos**. São Paulo: Varela, 2000.

PLAGELLAT, C.; KUPPER, T.; FURRER, R.; DE ALENCASTRO, L.F.; GRANDJEAN, D.; TARRADELLAS, J. Concentrations and specific loads of UV filters in sewage sludge originating from a monitoring network in Switzerland. **Chemosphere**. v. 62, p. 915-925, 2006.

POIGER, T; BUSER, H; BALMER, M; BERGQVIST, P; M€ULLER, M. Occurrence of UV filter compounds from sunscreens in surface waters: regional mass balance in two Swiss lakes. **Chemosphere**, v 55, p. 951–963, 2004.

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

RAMSDORF, W. **Utilização de duas espécies de *Astyanax* (*Astyanax sp B* e *A. Altiparanae*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (Fazenda Cangüiri – UFPR)**. Dissertação (Mestrado em Genética). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

RODIL, R.; SCHRADERB, S.; MOEDER, M. Non-porous membrane-assisted liquid liquid extraction of UV filter compounds from water samples. **Journal of Chromatography A**. v. 1216, p. 4887–4894, 2009.

ROSEN, C. F.; Topical and systemic photoprotection. **Dermatology and Therapy**. v. 16, p. 8-15, 2003.

SALDANHA, C. **Avaliação *in vitro* da citotoxicidade e genotoxicidade dos polímeros de albumina magnéticos**. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

SANTOS, V. **Preparação de filtros solares em nanosistema visando à maior ação protetora**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

SINGH, N. P.; McCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p 184-191, 1988.

SOUZA, T. S., FONTANETTI, C. S. **Ensaio do Cometa para Avaliação da Qualidade das Águas do Rio Paraíba do Sul, numa área sob influência de uma Refinaria de Petróleo**. 4ª DPETRO. Campinas, 2007.

TICE, R. The Single Cell/ Comet Assay: A Microgel Eletroforetic Technique for the Detection of DNA Damage and Repair in Individual Cell. In: PHILLIPS, D. H.; VENNIT, S. (Eds.). **Environmental Mutagenesis**. Bios Scientific Publishers Ltd. Oxford, UK; 1995.

URBACH, F. The historical aspects of sunscreens. **The Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 64, p. 99-104, 2001.

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

VIGNARDI, C. P. **Avaliação da genotoxicidade da nanopartícula de dióxido de titânio em juvenis de pampas, *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766), através de métodos.** Dissertação (Mestrado em Ciências; Oceanografia Biológica). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

VILCHES, M. **Análise genotóxica do rio Cadeia/RS através do ensaio cometa e teste de micronúcleo e anormalidades nucleares utilizando peixes como bioindicadores.** Dissertação (Mestrado em Qualidade Ambiental). Feevale, Novo Hamburgo-RS, 2009.

VON BURG, R.; LIU, D. Chromium and hexavalent chromium. **Journal of Applied Toxicology**. 13, p. 225-230, 1993.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações.** 1ª ed., 2006.

ZUCCHI, S.; IERONIMO, A.; FENT, K.. Alteration of gene expression by UV-filters ethyl-hexyl-4-trimethoxycinnamate (EHMC) and benzophenone-4 (BP4) in zebra fish (*Danio rerio*) determined by microarrays and qPCR. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v.157, p. 29–30, 2010.