UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental

MARIÂNGELA SPADOTO

**Avaliação dos efeitos dos parabenos sobre organismos
aquáticos e comparação de sensibilidade de espécies**

São Carlos

São Paulo

2017

MARIÂNGELA SPADOTO

**Avaliação dos efeitos dos parabenos sobre organismos
aquáticos e comparação de sensibilidade de espécies**

Tese apresentada à Escola de Engenharia de
São Carlos, da Universidade de São Paulo,
como parte dos pré-requisitos para obtenção
do título de Doutor em Ciências Engenharia
Ambiental.

**Orientadora: Profa. Dra. Eny Maria
Vieira**

São Carlos

São Paulo

2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

S732a Spadoto, Mariângela
Avaliação dos efeitos dos parabenos sobre
organismos aquáticos e comparação de sensibilidade de
espécies / Mariângela Spadoto; orientadora Eny Maria
Vieira. São Carlos, 2017.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação e Área
de Concentração em Ciências da Engenharia Ambiental --
Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de
São Paulo, 2017.

1. Toxicidade aguda. 2. Metilparabeno. 3.
Propilparabeno. 4. Fungicidas. 5. Comparação de
sensibilidade de espécies. 6. Testes de curta duração.
I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Licenciada e Bacharel **MARIÂNGELA SPADOTO**.

Título da tese: "Avaliação de risco de parabenos para organismos aquáticos através da comparação de sensibilidade de espécies tropicais e temperadas".

Data da defesa: 05/06/2017.

Comissão Julgadora:

Resultado:

Profa. Dra. **Eny Maria Vieira**
(Orientadora)
(Instituto de Química de São Carlos/IQSC)

Aprovado

Prof. Dr. **Luiz Antonio Daniel**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

APROVADO

Profa. Dra. **Odete Rocha**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

Aprovado

Profa. Associada **Regina Teresa Rosim Monteiro**
(Centro de Energia Nuclear na Agricultura/CENA-USP)

Aprovado

Profa. Dra. **Gisela de Aragão Umbuzeiro**
(Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP)

Aprovado

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental:

Prof. Associado **Frederico Fabio Mauad**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Associado **Luís Fernando Costa Alberto**

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos à Profa. Dra. Eny Maria Vieira por me orientar, apoiar, acreditar e incentivar a realizar este trabalho. Obrigada por todos os ensinamentos durante esses seis anos em que trabalhamos juntas.

Durante a minha vida acadêmica pude conhecer e trabalhar com pesquisadores fundamentais para o desenvolvimento dessa pesquisa, bem como para o meu crescimento pessoal: à Profa. Dra. Odete Rocha (UFSCar) agradeço pelo acolhimento em seu laboratório desde a minha graduação e depois em muitos outros momentos na pós-graduação, pelas suas valorosas contribuições, pela parceria e pela inspiração; à Dra. Clarice Maria Rispoli Botta (CRHEA-USP), agradeço pelos inúmeros conselhos, pela ajuda com os ensaios ecotoxicológicos e pelas análises de resultados; ao Prof. Dr. Evaldo Luís Gaeta Espíndola (CRHEA-USP), agradeço pelos conselhos, por viabilizar os ensaios ecotoxicológicos e por contribuir no estabelecimento da parceria Brasil-Portugal, fundamental para a realização desse trabalho; ao Dr. Carlos Alexandre Galinaro, agradeço pelas contribuições com preparo de amostras, pelo desenvolvimento das análises cromatográficas e por todas as contribuições durante o desenvolvimento do projeto; à Dra. Ana Paula Erbetta Sueitt, sou grata pela ajuda com o planejamento experimental, pelas infinitas contribuições ao longo de diversas etapas da pesquisa e pela amizade ao longo de todos esses anos.

Uma vez que a parte central dos testes ecotoxicológicos desse doutoramento foram desenvolvidos na Universidade de Coimbra em Portugal, não posso deixar de agradecer imensamente ao Prof. Dr. Rui Godinho Lobo Girão Ribeiro e à Dra. Matilde Moreira-Santos por me acolherem em seu laboratório, agradeço pela oportunidade, pelo aprendizado e pela experiência. Agradeço também, à Profa. Dra. Cristina Canhoto e à Dra. Ana Lucia Gonçalves, pela confiança, pela paciência e por viabilizarem os ensaios com os fungos.

Agradeço às professoras Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro (Unicamp), Dra. Regina Teresa Rosim Monteiro (CENA/USP), Dra. Odete Rocha (UFSCar) e ao professor Dr. Luis Antonio Daniel (EESC/USP) pela participação e pelas contribuições apresentadas durante a banca da presente tese.

Agradeço aos funcionários da EESC/USP, especialmente ao Amândio, José Luiz, Nélson, Cido, Carlos e Regina. Agradeço aos funcionários do ISQC/USP, Veroneide, Gislei e Cláudia. Por fim, agradeço aos funcionários do DEBE/UFSCar, Edna e Valdecir.

Agradeço a todos os pesquisadores do NEEA/CRHEA/USP por todos esses anos de trabalho em conjunto, agradeço também a todos os pesquisadores do LAQUAAE/IQSC/USP, assim como a todos os pesquisadores do DEBE/UFSCAR e laboratório de Ecotoxicologia aquática, muito obrigada por todos esses anos de convivência, aprendizado e respeito mútuo.

Agradeço em especial aos meus queridos amigos da USP que estiveram comigo ao longo de toda a caminhada desde o mestrado, obrigada pelos bons momentos que tivemos e pela força: Ana, Caroline, Chien, Juliana, Laira, Nathe, André, Raphael e Tiago.

Agradeço aos queridos pesquisadores do IMAR-UC-Portugal com os quais convivi quase que diariamente e tornaram meu período em Coimbra ainda mais feliz: Claudia, Cristiane, Melissa, Sonia, Raquel, Gabi, Rute, Filipa, Daniel, Lucas, Pieter, Sebastian e Yohan.

Aos amigos de longa data: Danieli, Márcia, Mariana, Sandra e Carlos.

Agradeço a todos os meus colegas professores, coordenadores, diretores e meus queridos ex-alunos, sempre me lembro de vocês.

À minha família por me apoiar durante a minha vida, me amando e me incentivando acima de tudo. Meus pais, Ângelo e Maria, minhas irmãs, Marcela e Mariane pela amizade e companheirismo de toda a vida e meus cunhados Marcos e Vínicius pela amizade e pelo apoio. Agradeço a dona Graça e ao seu Mauro, pelo carinho e apoio ao longo desses anos. Agradeço às todas às minhas tias, tios e primos, que estiveram verdadeiramente ao meu lado nesse processo e que sempre acreditaram em mim.

Ao meu querido André, por me acompanhar nessa jornada, por me apoiar e incentivar em todos os momentos.

Ao meu amado avô Justino "*in memoriam*" pelo exemplo de vida que me motiva todos os dias.

Agradeço ao CNPq (Bolsa de doutorado institucional, Processo: 142217/2013-1) e a Capes (Bolsa de doutorado sanduíche: 99999.007014/2015-05) pelos financiamentos concedidos durante esse doutoramento.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho, muito obrigada!

*“Segue o teu destino,
Rega as tuas plantas,
Ama as tuas rosas.
O resto é a sombra
De árvores alheias”.*

(Fernando Pessoa, Ricardo Reis- in Odes)

RESUMO

SPADOTO, M. **Avaliação dos efeitos dos parabenos sobre organismos aquáticos e comparação de sensibilidade de espécies**, 2017. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil.

Os parabenos são conservantes utilizados em alimentos, fármacos, cosméticos e produtos de cuidado pessoal. Pertencem à família de ésteres do ácido p-hidróxibenzoico, distinguindo-se entre si pelo comprimento e ramificação da cadeia lateral alquílica. Nesse contexto, o objetivo principal dessa tese foi avaliar os efeitos dos dois parabenos mais frequentemente utilizados (metilparabeno e propilparabeno) sobre diferentes espécies de ambientes aquáticos. Para isso, inicialmente, foram realizados testes de toxicidade de curta duração com cinco espécies de organismos de diferentes grupos taxonômicos e funcionais, sendo quatro delas de regiões tropicais (*Ceriodaphnia silvestrii*, *Chironomus xanthus*, *Macrothrix flabelligera* e *Hydra viridissima*) e uma pertencente às regiões temperadas (*Hydra attenuata*). Os resultados obtidos nesses testes foram comparados com os resultados de literatura aberta, mostraram que *Ceriodaphnia silvestrii* (MeP CE50=7,56 mgL e PrP, CE50=2,90 mgL) e *Macrothrix flabelligera* apresentaram-se mais sensíveis em comparação aos organismos padrão de clima temperado. Num segundo momento, foram realizados testes de toxicidade com sete espécies de fungos hifomicetos aquáticos (*Articulospora tetracladia* Ingold, *Flagellospora curta* Webster, *Heliscus lugdunensis* Sacc. & Thérre, *Lemonniera aquatica* Wildeman, *Lemonniera pseudofloccula* Dyko et al., *Tetracladium apienses* R.C. Sinclair & Eicker, *Tetracladium marchalianum* Wild.) expostas ao conservante propilparabeno, por possuir maior ação antifúngica. *Lemonniera aquatica* apresentou maior sensibilidade ao propilparabeno, sendo o mais sensível de todos os fungos testados, bem como dos demais organismos aquáticos reportados na literatura. Além de confirmarem que os parabenos representam risco ecológico potencial para os ambientes aquáticos, os resultados obtidos permitiram concluir que há diferenças de sensibilidade entre as espécies tropicais e temperadas e, por isso, as espécies nativas são mais indicadas para se avaliar os efeitos tóxicos dos parabenos nos ambientes. Dada a presença e persistência dos compostos estudados por entrada contínua no ambiente, a magnitude das concentrações determinadas (ng L^{-1} e $\mu\text{g L}^{-1}$), a carência de informações relativas à toxicidade e ao risco que representam para os ecossistemas tropicais, incluindo os do Brasil, sugere-se a implantação pelas agências reguladoras de medidas mais restritivas para o uso desses conservantes, visando uma melhor proteção da biota aquática.

Palavras-chave: Toxicidade aguda. Metilparabeno. Propilparabeno. Fungicidas. Comparação de sensibilidade de espécies.

ABSTRACT

SPADOTO, M. **Ecotoxicological effects of parabens on aquatic organisms and comparison of species sensitivity, 2017.** Thesis (Ph.D. degree) – School of Engineering of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, SP, Brazil.

Parabens are preservatives used in foods, pharmaceuticals, cosmetics and personal care products. They belong to the family of esters of p-hydroxybenzoic acid, distinguishing each other by the length and branching of the alkyl side chain. The main objective of this thesis was to evaluate the effects of the two most commonly used parabens, methylparaben and propylparaben, on aquatic species. For this purpose, short-term toxicity tests were initially carried out on five species of organisms from different taxonomic and functional groups: four of them from tropical regions, *Ceriodaphnia silvestrii*, *Macrothrix flabelligera*, *Chironomus xanthus* and *Hydra viridissima*, and one belonging to temperate regions, *Hydra attenuata*. The results obtained in these tests were compared with the results of the open literature, showing that *Ceriodaphnia silvestrii* (MeP, $EC_{50} = 7.56 \text{ mg L}^{-1}$ and PrP, $EC_{50} = 2.90 \text{ mg L}^{-1}$) and *Macrothrix flabelligera* (MeP, $EC_{50} = 8.04 \text{ mg L}^{-1}$ and PrP, $EC_{50} = 3.85 \text{ mg L}^{-1}$) were more sensitive compared to the standard organisms of temperate climate. Secondly, toxicity tests were performed with seven species of aquatic hyphomycetes fungi and only with the preservative propylparaben, because they have a higher antifungal action: *Articulospora tetracladia* Ingold, *Flagellospora curta* Webster, *Heliscus lugdunensis* Sacc. & Thérriy, *Lemonnieria aquatica* Wildeman, *Lemonnieria pseudofloscula* Dyko et al., *Tetracladium apienses* R.C. Sinclair & Eicker, *Tetracladium marchalianum* Wild. *Lemonnieria aquatica* showed greater sensitivity to propylparaben ($EC_{50} = 1.63 \text{ mg L}^{-1}$), being more sensitive than all fungi, as well as other aquatic organisms. Thus, the results obtained in the present thesis indicate that there is a difference in sensitivity between tropical and temperate species when exposed to parabens, with tropical native species being more sensitive to the effects of these compounds. Given the presence and persistence of the compounds studied by continuous entry into the environment, the magnitude of the concentrations determined (ng L^{-1} and $\mu\text{g L}^{-1}$), the lack of toxicity and risk information for tropical ecosystems, including Brazil, it is suggested that regulatory agencies implement more restrictive measures for the use of these preservatives, aiming at a better protection of the aquatic biota.

Key-words: Acute toxicity. Methylparaben. Propylparaben. Fungicides. Comparison of species sensitivity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasil
APHA	<i>American Public Health Association</i>
BuP	Butilparabeno
BzP	Benzilparabeno
DANISH	<i>Danish Environment Protection Agency.</i>
EC	<i>European Comission</i>
EC ₅₀	Concentração de efeito sobre 50% dos indivíduos.
EC ₂₀	Concentração de efeito sobre 20% dos indivíduos
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
ERA	<i>Environmental Risk Assessment</i>
EtP	Etilparabeno
EU	<i>European Union</i>
HC ₅	<i>Hazard Concentration 5%</i>
HC ₅₀	<i>Hazard Concentration 50%</i>
HPLC	<i>High-performancy liquid chromatography</i>
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Renováveis
i-BuP	Iso-Butilparabeno
i-PrP	Iso-Propilparabeno
LC ₅₀	<i>Median Lethal Concentration.</i>
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária
PB(s)	Parabeno(s)
PeP	Pentilparabeno
PHP	Produtos de Higiene Pessoal
PhP	Fenilparabeno
PPCPs	Pharmaceuticals and Personal Care Products
PrP	Propilparabeno
SSD	<i>Species Sensivity Distribution</i>
US	<i>United States (of America)</i>

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO DA TESE	1
Capítulo 1: Contextualização do problema e justificativa da pesquisa	3
Capítulo 2: Introdução geral	7
2.1. Parabenos: estrutura química e propriedades.....	7
2.2. Parabenos: definição de conservantes e legislação para uso em formulações.....	9
2.3. Parabenos: usos e concentrações ambientais	10
2.4. Parabenos: vias de exposição, modo de ação, efeitos e riscos.....	12
2.4.1 Citologia e toxicologia em estudos com vertebrados.....	16
2.4.2 Ecotoxicologia e estudo dos efeitos dos parabenos aos invertebrados aquáticos.....	17
2.4.3 Principais organismos-testes utilizados em ensaios ecotoxicológicos.....	19
2.5. Comparação de sensibilidade entre espécies: Distribuição de sensibilidade de espécies (SSD)	28
2.6. Referências Bibliográficas	29
Capítulo 3: Avaliação do risco ambiental para os conservantes metilparabeno e propilparabeno: uma comparação de sensibilidade para espécies tropicais e temperadas.	43
3.1. Introdução	44
3.2. Materiais e métodos	48
3.2.1. Substâncias testadas e concentrações	48
3.3. Cultivo e manutenção dos organismos teste	49
3.3.1. <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> e <i>Macrothrix flabelligera</i>	49
3.3.2. <i>Chironomus xanthus</i>	49
3.3.3. <i>Hydra attenuata</i> e <i>Hydra viridissima</i>	50
3.4. Testes de toxicidade.....	51
3.4.1. <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> e <i>Macrothrix flabelligera</i>	51
3.4.2. <i>Chironomus xanthus</i>	52

3.4.3. <i>Hydra viridissima</i> e <i>Hydra attenuata</i>	52
3.5. Análises estatísticas	53
3.6. Resultados	54
3.7. Discussão	57
3.8. Conclusões	60
3.9. Referências.....	61
Capítulo 4: Avaliação de toxicidade do propilparabeno em fungos hifomicetos aquáticos e análise de risco.....	69
4.1. Introdução	70
4.2. Materiais e métodos	75
4.2.1. Substância testada, concentrações e solução de nutrientes	75
4.2.2. Culturas de fungos.....	76
4.2.3. Análises estatísticas.....	78
4.3.1. Análises químicas.....	79
4.3.2. Ensaios de toxicidade	79
4.4. Discussão	82
4.5. Conclusões	84
4.6. Referências.....	84
Capítulo 5: Conclusões gerais	89
Capítulo 6: Considerações finais e recomendações para trabalhos futuros.....	91
Apêndices	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fluxograma mostrando as diferentes etapas desenvolvidas na presente tese.	2
Figura 2- Fórmulas estruturais dos principais parabenos. Os compostos metilparabeno e propilparabeno são os compostos estudados na presente tese. Fonte: autor.	7
Figura 3 - Vias de exposição dos organismos aos parabenos. A grande maioria das fontes de contaminação dos parabenos é devido ao uso de PPCPs. (Fonte: adaptado de BLEDZKA et al., 2014).	15
Figura 4 - Cládóceros nativos de regiões tropicais utilizados nos testes ecotoxicológicos: (a) <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> ; (b) <i>Macrothrix flabelligera</i> . Fonte: autor.....	22
Figura 5- Cinco estágios da morfologia de <i>Hydra attenuata</i> sob condições de estresse, categorizados em score (a até e, representando as alterações morfológicas de 1-5). Fonte: (https://www.ec.gc.ca/stl/default.asp?lang=En&n=91EAEB1F-1).	23
Figura 6- <i>Hydra attenuata</i> (a) e <i>Hydra viridissima</i> (b). Fonte: autor.....	24
Figura 7 - Larvas do díptero <i>Chironomus xanthus</i> . Fonte: autor.....	25
Figura 8 – Micélios de hifomicetos aquáticos postos a crescer em meio Agar sólido. (a) <i>Articulospora tetracladia</i> , (b) <i>Heliscus lugdunensis</i> . Fonte: Ana Lúcia Gonçalves (GONÇALVES et al., 2017).....	26
Figura 9- Ciclo de vida dos fungos hifomicetos aquáticos: fixação no substrato, esporulação na água e decomposição de matéria orgânica em decomposição (Fonte: modificado de Webster, 1959).....	27
Figura 10- Esporos (conídios) dos hifomicetos aquáticos: (A) <i>Heliscus lugdunensis</i> ; (B) <i>Tetracladium marchalianum</i> ; (C) <i>Lemmoniera aquatica</i> ; (D) <i>Articulospora tetracladia</i> . Onde: (A) e (D) foto autor, (B) e (C) (Fonte: modificado de DUARTE et al. 2016).....	28
Figura 11- Distribuição de Sensibilidade das Espécies (SSD) de organismos de diferentes grupos taxonômicos, com base nos valores de CE ₅₀ (mg L ⁻¹) para o conservante metilparabeno..	56
Figura 12- Distribuição de Sensibilidade das Espécies (SSD) de organismos de diferentes grupos taxonômicos, com base nos valores de CE ₅₀ (mg L ⁻¹) para o conservante propilparabeno.....	57
Figura 13 - Desenho experimental da exposição dos fungos hifomicetos ao propilparabeno. Na figura, tempo de exposição, medido em horas para as espécies expostas: * <i>Heliscus lugdunensis</i> e <i>Flagellospora curta</i> (144 h);** <i>Lemmoniera aquatica</i> (168 h); *** <i>Lemmoniera pseudofloscula</i> , <i>Tetracladium apienses</i> , <i>Tetracladium marchalianum</i> , <i>Articulospora tetracladia</i> (240 h).	77

Figura 14 - Exposição em longo prazo de sete hifomicetos aquáticos ao propilparabeno: taxa de esporulação em ensaios de toxicidade crônica. Foram feitas comparações entre as respostas de espécies do mesmo gênero e entre espécies de gênero diferente.....	80
Figura 15 - Distribuição de sensibilidade de espécies de hifomicetos e outras espécies aquáticas de diferentes grupos taxonômicos e regiões geográficas, com base nos valores de EC50 para o conservante antifúngico propilparabeno.	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características físicas e químicas do metilparabeno e do propilparabeno.	8
Tabela 2- Concentrações ambientais encontradas dos conservantes MeP e PrP em diversos corpos d'água.	11
Tabela 3 - Principais endpoints ecotoxicológicos para diferentes organismos aquáticos expostos ao MeP e PrP. Resultados em mg L^{-1}	19
Tabela 4 - Principais endpoints ecotoxicológicos (mg L^{-1}) presentes na literatura para os conservantes MeP e PrP obtidos em estudos de toxicidade com diferentes organismos aquáticos.	47
Tabela 5 - Resumo dos <i>endpoints</i> avaliados para os organismos expostos aos parabenos, CE_{50} com seus respectivos intervalos de confiança e 95% em mg L^{-1}	55
Tabela 6 - Principais endpoints ecotoxicológicos (mg L^{-1}) presentes na literatura para o conservante PrP obtidos em ensaios ecotoxicológicos com diferentes organismos aquáticos.	74
Tabela 7 - Concentrações efetivas (CE_{50} e CE_{20}) e concentração HC5 para os hifomicetos aquáticos com seus respectivos limites de confiança de 95% para os testes de toxicidade realizados com propilparabeno.	81

APRESENTAÇÃO DA TESE

A presente tese foi elaborada em capítulos, os quais foram escritos de modo a contemplar os seguintes itens: (1) Contextualização do problema e justificativa da pesquisa, (2) Introdução geral abordando o estado geral da arte da pesquisa ecotoxicológica sobre parabenos, (3) Avaliação do risco ambiental para os conservantes metilparabeno e propilparabeno: uma comparação de sensibilidade para espécies tropicais e temperadas, (4) Avaliação de toxicidade do propilparabeno em fungos hifomicetos aquáticos e análise de risco, (5) Conclusões gerais da tese, (6) Considerações finais e recomendações para trabalhos futuros, e (7) Apêndices.

Os Capítulos (3) e (4) foram elaborados sob a forma de manuscritos, de modo a facilitar a publicação dos resultados aqui apresentados. Ambos possuem as seguintes sub-seções: Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão e Referências Bibliográficas.

Vale salientar que os resultados apresentados nos Capítulos (3) e (4) foram obtidos em experimentos realizados tanto no Brasil quanto em Portugal. No Brasil, o estudo foi desenvolvido com a colaboração da Professora Dra. Odete Rocha no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática, da Universidade Federal de São Carlos e no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática do Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada, da Universidade de São Paulo. Em Portugal (período de doutoramento sanduíche), o estudo foi desenvolvido sob a supervisão do Professor Dr. Rui Godinho Lobo Girão Ribeiro e da Dra. Matilde Moreira-Santos, no Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade de Coimbra.

A Figura 1 resume esquematicamente as etapas do trabalho.

Figura 1- Fluxograma mostrando as diferentes etapas desenvolvidas na presente tese.

Capítulo 1: Contextualização do problema e justificativa da pesquisa

O aumento da população mundial e da expectativa de vida da população vem sendo acompanhados pelo surgimento de novas doenças e pela busca incessante por novos tratamentos médicos e medicamentos que melhorem e prolonguem a vida com qualidade, sendo esses os responsáveis diretos pelo incremento na produção e no consumo de fármacos e de produtos para cuidados pessoais (PPCPs) (WILKINSON et al., 2015).

Os PPCPs compreendem todos os fármacos disponíveis por prescrição médica, fármacos de venda livre e outros produtos de consumo humano e veterinário, tais como itens de perfumaria, sabonetes e itens de banho, shampoos e demais itens relacionados ao cabelo (sprays, tinturas, cremes), produtos de higiene oral, conservantes, desinfetantes, protetores solares e repelentes (DAUGHTON e TERNES, 1999; BOXALL et al., 2012).

Os PPCPs fazem parte da classe dos contaminantes emergentes (CE), os quais incluem além dos produtos farmacêuticos e dos PPCPs, os hormônios esteróides, os produtos químicos industriais, produtos de limpeza, os pesticidas, as drogas ilícitas (VERLICCHI et al., 2010; LUO et al., 2014) e muitos outros compostos usados em diversas atividades humanas diárias. Os CE vêm recebendo maior atenção nos últimos anos por apresentarem entrada contínua no ambiente (LI et al., 2016), serem persistentes, biologicamente ativos com atividade hormonal, cancerígena, estrogênica, entre outras (KASPRZYK-HORDERN et al., 2009; TERASAKI et al., 2012).

Como mencionado, os CE constituem uma vasta e crescente gama de compostos antropogênicos, bem como substâncias naturais presentes nas águas em concentrações de ng L^{-1} e $\mu\text{g L}^{-1}$, as quais são capazes de provocar efeitos no sistema endócrino, afetar a saúde, o crescimento e a reprodução dos organismos a elas expostas (BILA e DEZOTTI, 2007; LUO et al., 2014). Além disso, esses compostos não apresentam limite de restrição ambiental, por isso, não são monitorados rotineiramente pelos órgãos ambientais.

Isso explica porque muitas indústrias têm construído instalações de produção em países tropicais em desenvolvimento, aproveitando-se de leis e regulamentos mais brandos, além de facilidades em termos de logística com a produção deslocada para essas regiões. Dessa forma, o uso de substâncias tóxicas aumentou conjuntamente com o crescimento e o

desenvolvimento dos países menos desenvolvidos e, assim, os efeitos produzidos por esses compostos à saúde humana e à vida selvagem tornaram-se uma preocupação crescente (LACHER e GOLDSTEIN, 1998).

Desse modo, esses compostos são candidatos à futura regulamentação ambiental, dependendo do resultado obtido nos testes de toxicidade, dos efeitos adversos à biota e dos dados obtidos a partir do monitoramento ambiental (GAFFNEY et al., 2013).

Entre os micropoluentes inseridos no grupo dos CE, tem-se a classe dos parabenos (ésteres de alquilo de para-hidroxibenzóico), compostos largamente utilizados como conservantes em produtos de cuidados pessoais, medicamentos e alimentos, considerando que as formulações farmacêuticas e cosméticas representam um meio em potencial para proliferação de micro-organismos, tornando-se necessária a adição de conservativos com ação antifúngica e bactericida para realizar o controle microbiológico desses produtos (SONI et al., 2001; SONI et al., 2005).

Os parabenos estão entre os conservantes mais produzidos e consumidos em países de clima tropical. O Brasil, por exemplo, é o quarto maior consumidor de PPCPs, perfumaria e cosméticos. A indústria brasileira de produtos de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos é composta, segundo o último levantamento do setor, por 2613 empresas regulamentadas. De acordo com o levantamento, em 1996, o faturamento líquido era 4,9 bi enquanto em 2015 o faturamento foi de 42,6 bi (ABIHPEC, 2016).

Os parabenos que possuem uso mais frequente nas formulações, individualmente e em misturas, incluem: metilparabeno (MeP), etilparabeno (EtP), propilparabeno (PrP), e butilparabeno (BuP) (SONI et al., 2005; CABALEIRO et al., 2014). Tais compostos podem atuar como desreguladores do sistema endócrino (ROUTLEDGE et al., 1998; PEDERSEN et al., 2000; BOLONG et al., 2009) devido à similaridade de suas moléculas com o principal estrogênio natural, o 17 β -estradiol. Assim, de forma mimética, ocorre a ligação dos parabenos aos receptores de estrogênio (ER), estimulando células dependentes de ER a crescer, além de influenciar a expressão de genes estrogênio-dependentes, e de algumas atividades estrogênicas-dependentes (OKUBO et al., 2001).

Apesar dos parabenos serem utilizados pela indústria como conservantes há décadas e, conseqüentemente, serem encontrados nas matrizes ambientais, existem relativamente poucos dados disponíveis sobre seus efeitos toxicológicos para os organismos não-alvo no ambiente

aquático. Especialmente no que concerne a organismos nativos de ambiente tropical não há análises de risco realizadas compondo o banco de dados.

Sabe-se que o clima tropical propicia uma maior proliferação de bactérias e fungos, devido à maior temperatura e umidade, havendo assim um aporte maior de conservantes nos PPCPs e em alimentos. Além disso, há uma maior demanda individual pelo uso de produtos de higiene, o que explica uma tendência maior de uso desses produtos em regiões de clima tropical (OKEKE e LAMIKANRA, 2001).

Os estudos realizados com os parabenos até o presente momento focaram apenas em um reduzido número de espécies, sendo utilizadas as espécies padronizadas e as de ambiente morfoclimático temperado. Uma vez que os ambientes aquáticos tropicais são distintos ecologicamente dos habitats de clima temperado, tanto nos atributos físico-químicos e biológicos, bem como em relação à biodiversidade (substancialmente mais elevada nas regiões subtropicais e tropicais do que em zonas temperadas), espera-se que o número de espécies potencialmente afetadas pela exposição a um determinado poluente seja maior (KWOK et al., 2006).

A exposição aos PPCPs no ambiente, especialmente para os organismos aquáticos, pode diferir da de pesticidas e outros produtos industriais em um aspecto significativo – as exposições podem ser de uma natureza mais intensa porque PPCPs são infundidos constantemente no ambiente onde quer que os seres humanos habitem ou frequentem. Dessa forma, fazem-se necessários mais estudos a partir dos quais será possível construir avaliações de risco para os PPCPs (DAUGHTON e TERNES, 1999).

Assim, para se estabelecer uma análise de risco ambiental mais abrangente e representativa pode-se recorrer a curvas de distribuição de sensibilidade de espécies (SSDs) nas quais se incorporam um conjunto maior de dados de toxicidade do que apenas os valores obtidos à partir das espécies padrão (MALTBY et al, 2009), podendo-se comparar com a toxicidade de espécies não-padronizadas e nativas. Nesse contexto, as curvas de SSDs podem ser utilizadas para determinar as concentrações limiares (*hazard concentration* – HC), que agem como limites protetores das comunidades.

Diante do exposto, justifica-se o desenvolvimento de estudos com vistas à realização de testes ecotoxicológicos avaliando o efeito dos parabenos sobre as espécies aquáticas não-alvo. Dessa forma, a presente pesquisa se propôs a:

- (1) Avaliar os efeitos dos dois parabenos mais utilizados em formulações (metilparabeno e propilparabeno) sobre organismos de regiões tropicais (*Ceriodaphnia silvestrii*,

Macrothrix flabelligera, *Chironomus xanthus* e *Hydra viridissima*) e um representante de regiões temperadas (*Hydra attenuata*);

- (2) Avaliar os efeitos antifúngicos do propilparabeno sobre sete espécies de fungos hifomicetos aquáticos dulcícolas: *Articulospora tetracladia* Ingold, *Flagellospora curta* Webster, *Heliscus lugdunensis* Sacc. & Thérry, *Lemonniera aquatica* de Wildeman, *Lemonniera pseudofloscula* Dyko et al., *Tetracladium apienses* de R.C. Sinclair & Eicker, *Tetracladium marchalianum* de Wild, com a finalidade de propor uma padronização para a utilização em testes de toxicidade;
- (3) Comparar a sensibilidade dos organismos obtida no presente estudo com os dados de outras espécies (tropicais ou temperadas e padronizadas ou não), buscando assim estabelecer o risco ecológico relativo à exposição a cada um dos parabenos estudados, por meio da construção de curvas de sensibilidade de espécies.

Assim pode-se pela primeira vez avaliar a sensibilidade de organismos para os quais não há protocolos para testes de toxicidade: compostos conservantes (não pesticidas e não metais) e com relevância ecológica para as regiões tropicais. O estudo foi conduzido sob condições laboratoriais por meio de bioensaios ecotoxicológicos e a comparação entre a sensibilidade de diferentes espécies foi abordada com base na literatura científica aberta para consulta.

Capítulo 2: Introdução geral

2.1. Parabenos: estrutura química e propriedades

Parabenos são alquilesteres derivados do ácido 4-para-hidroxibenzoico, nos quais o grupo funcional éster está localizado no carbono 4 da molécula (**Figura 2**) (PETRUCI et al., 2011; Haman et al., 2015). A classificação dos parabenos pode ser feita de acordo com o tamanho da cadeia ligada ao grupo funcional éster, da seguinte forma: (a) cadeia curta- metilparabeno (MeP) e etilparabeno (EtP), (b) cadeia longa- propilparabeno (PrP), butilparabeno (BuP), isopropilparabeno (i-PrP), isobutilparabeno (i-BuP) e benzilparabeno (BzP) (SONI et al., 2005).

Figura 2- Fórmulas estruturais dos principais parabenos. Os compostos metilparabeno e propilparabeno são os compostos estudados na presente tese. Fonte: autor.

Os parabenos possuem uma série de características que são evidenciadas no uso em conjunto, possuem maior atividade em faixa de pH 4,5 - 7,5, elevada estabilidade quando colocados em contato com água, têm um largo espectro de atividade antimicrobiana e são eficazes contra fungos e bactérias (ELDER, 1984; WADE e WELLER, 1994; SONI et al., 2001). Com o aumento do comprimento da cadeia do grupo alquil da molécula dos parabenos, aumenta também sua atividade antimicrobiana; entretanto, sua solubilidade na água diminui (GIORDANO et al., 1999) e quanto maior a cadeia do éster, maior a lipossolubilidade (MOWAD, 2000). Assim, podemos resumir as principais características físicas e químicas do MeP e PrP conforme a Tabela 1.

Tabela 1 – Características físicas e químicas do metilparabeno e do propilparabeno.

	Metilparabeno	Propilparabeno
Número CAS	99-76-3	94-13-3
Abreviação	MeP	PrP
Massa molecular (g/mol)	152.15 ^a	180.21 ^a
Estrutura Química
Solubilidade em água (mg L ⁻¹) 25°C	2500 ^a	500 ^a
Coeficiente de partição octanol-água Log K _{ow}	1.96 ^b	3.04 ^b
Constante de dissociação ácida Log (pka)	8.17 ^b	8.35 ^b

^a Petersen et al., 2007; ^b Soni et al., 2005.

Assim, com base no fator estimado de bioconcentração e no Log Kow, o potencial de bioconcentração para organismos aquáticos são baixos para MeP e ácido p-hidroxibenzoico, moderado para PrP (MADSEN et al., 2001; PETERSEN et al., 2007; DANISH EPA, 2013). Se os parabenos forem liberados para a água, sua adsorção aos sólidos suspensos ou sedimentos depende fortemente da presença de conteúdo orgânico na matéria sólida e da hidrofobia dos parabenos (isto é, log Kow), sugerindo que as interações hidrofóbicas predominam quando comparadas com os outros tipos de interação (HAMAN et al., 2015)

2.2. Parabenos: definição de conservantes e legislação para uso em formulações

Conservantes são compostos químicos não estéreis, adicionados aos PPCPs, cosméticos, perfumes, alimentos e medicamentos, com a finalidade de prevenir ou reduzir o crescimento de microrganismos durante sua fabricação, estocagem e uso.

No Brasil, a Resolução RDC nº 29, de 1 de junho de 2012, determina quais são as substâncias permitidas bem como as concentrações de uso consideradas seguras para utilização nos PPCPs através da “Lista de Substâncias de Ação Conservante permitidas para Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes”. Temos atualmente no Brasil 60 substâncias conservantes permitidas e como poucos compostos apresentam ampla atividade antimicrobiana, é comum uso de associações entre elas (ANVISA, 2012a).

Os parabenos são os principais conservantes indicados na farmacopéia brasileira tanto para a composição de produtos magistrais e oficinais quanto para as bases utilizadas no preparo de outras formulações (ANVISA, 2012b). Os parabenos são utilizados de diversas maneiras nas formulações, podendo ser utilizados individualmente, combinados entre si ou em conjunto com outros conservantes (SONI et al., 2001; DANISH EPA, 2013).

No Brasil, o MAPA em conjunto com o IBAMA classificam os diferentes compostos com base na periculosidade ambiental: altamente perigosos (classe I); muito perigosos (classe II); perigosos (classe III) e pouco perigosos (classe IV). Esta classificação baseia-se em várias características dos produtos como, por exemplo, persistência no ambiente, características físicas e químicas, bioacumulação nos tecidos vivos, toxicidade a diferentes organismos e a capacidade de deslocamento do mesmo no ambiente (MAPA, 2013). Nesse quesito, a ANVISA, em determinação conjunta com o MAPA e IBAMA, classificou os conservantes metilparabeno (MeP) e propilparabeno (PrP) como compostos de Classe IV, ou seja, são considerados compostos de mínima preocupação para o risco ambiental (MAPA, 2013).

A agência de segurança alimentar e de medicamentos dos Estados Unidos (US FDA) considera o uso de parabenos como conservantes em cosméticos como seguro, porém, estabelece limite de 0,1% quando os parabenos são usados para a conservação de alimentos. Ainda segundo a US FDA, o limite de ingestão diária para os compostos é de 0-10mg / por kg de massa corporal/ por dia (HC, 2016; US FDA, 2016; MAPA, 2013; CIR, 2012). O Canadá e o Brasil seguem as mesmas determinações da US FDA.

A União Europeia, por outro lado, estabeleceu parâmetros de controle para o uso de conservantes e há limites de utilização dos parabenos também no que tange as formulações cosméticas, sendo o valor máximo para MeP e EtP de 0,4%, PrP e BuP de 0,14%, enquanto que para as misturas dos ésteres é de 0,8% (EU, 2014a; EU, 2014b). Além disso, ficou estabelecido que o PrP e BuP não podem ser utilizados em produtos infantis aplicados em áreas cobertas pelas fraldas (EU, 2014b). Essa resolução da União Europeia veio em resposta a uma normativa estabelecida pelo Ministério de Meio Ambiente do governo da Dinamarca, a qual proibiu o uso de PrP e BuP, suas isoformas e seus sais, nos produtos cosméticos destinados a crianças com idade inferior a três anos, com base na potencial atividade endócrina dos referidos compostos (DANISH EPA, 2013; EU, 2014b).

2.3. Parabenos: usos e concentrações ambientais

Em um estudo realizado nos EUA, foram listadas as marcas de produtos de consumo não alimentares e não farmacêuticos, sendo 14.835 produtos incluídos na classe de PPCPs. Desse total, 346 produtos continham um ou mais parabenos, podendo até ter uma combinação de seis diferentes parabenos. A maior parte desses produtos que possui parabenos como conservantes são tinturas, hidratantes, produtos para área dos olhos e lábios. Nos produtos de uso dérmico (cremes anti-idade, sabonete de limpeza facial, condicionador, shampoo, hidratante facial, brilho labial, removedor de maquiagem, máscara para cílios, protetor solar e óleo bronzeador) as porcentagens dos parabenos encontrados foram: MeP 40%, PrP 33%, 9% EtP, 10% BuP e 10% i-BuP (YE et al., 2007).

A realidade norte-americana, quanto ao uso e destinação dos parabenos, se repete em outros países e, por isso, a ocorrência de parabenos e as vias de transporte de seus compostos ativos em ambientes aquáticos vêm atraindo muita atenção científica (DAUGHTON e TERNES, 1999; BARCELÓ e PETROVIC, 2007) por serem compostos muito utilizados

(PEDERSEN et al., 2000; OISHI, 2002; DOBBINS et al., 2009; DANISH EPA, 2013; HAMAN et al., 2015), figurarem entre os contaminantes emergentes ou micropoluentes, serem introduzidos continuamente nos ecossistemas aquáticos (principalmente por estações de tratamento de efluentes) e terem sido encontrados em águas superficiais na faixa de ng L^{-1} até $\mu\text{g L}^{-1}$ (LEE et al, 2005; GREGORY e MARK, 2006; KASPRZYK-HORDERN et al., 2008).

A **Tabela 2** apresenta dados de concentração de MeP e PrP determinados em águas superficiais de diferentes ambientes aquáticos ao redor do mundo.

Tabela 2- Concentrações ambientais encontradas dos conservantes MeP e PrP em diversos corpos d'água.

País de coleta		MeP	PrP	Local de amostragem	Referências
Reino Unido, Londres		<0,3 – 150 (29) $\mu\text{g L}^{-1}$	<0,2 – 11 (4) $\mu\text{g L}^{-1}$	Rio Taff	KASPRZYK-HORDERN et al., 2008
Índia, Karnataka e Kerala	Tamil Nadu	ND – 22,8 ng L^{-1} ND – 14,8 ng L^{-1} and ND – 3,43 ng L^{-1}	ND – 57,0 ng L^{-1} ND ND – 38,6 ng L^{-1}	Rios Kaveri, Vellar e Tamiraparani	RAMASWAMY et al., 2011.
Japão, Osaka e Tokushima		25 – 199 ng L^{-1} 49 – 676 ng L^{-1}	<0,8 – 20 ng L^{-1} 7,5 – 207 ng L^{-1}	Rios (Imagire, Yoshino, Shinmachi, Daini-neya, Hirano, Sakuranomiya Ponte de Okawa, Neya, Kyobashi Ponte de Okawa); Corregos (Tamiya, Tsumeta, Utebi).	YAMAMOTTO et al., 2011
Espanha, Barcelona		<0,20 ng L^{-1}	22-38 (30) ng L^{-1}	Rios Jarama e Manzanares	ESTEBAN et al., 2014
Brasil, São Paulo		<ND – 27,5 (8,0) $\mu\text{g L}^{-1}$	<ND – 52,1 (13,1) $\mu\text{g L}^{-1}$	Rio Mogi-guaçu	GALINARO et al., 2015

2.4. Parabenos: vias de exposição, modo de ação, efeitos e riscos

As principais formas de exposição humana e dos demais seres vivos aos parabenos estão representadas na **Figura 3**.

Com relação aos humanos, a exposição aos produtos contendo parabenos pode ser ocasional e ou mesmo diária. Nesse último caso, o período de exposição é prolongado por um longo tempo (SONI et al., 2001). Dependendo do uso, o contato com os parabenos pode ocorrer por inalação, via epidérmica ou mesmo por ingestão e sabe-se que a metabolização pode ser diferente para cada indivíduo dependendo da via de exposição (SONI et al., 2005). Produtos contendo parabenos possuem aplicação tópica, entram em contato com a pele através do uso de PPCPs e então são absorvidos e posteriormente são metabolizados por esterases (CROVETTO et al., 2017).

Com relação ao modo de ação, os parabenos podem ser ou não metabolizados, podendo ser bioacumulados. Assim, são conhecidos múltiplos efeitos biológicos desses compostos:

- Os parabenos agem como desreguladores do sistema endócrino, mimetizando os hormônios que ocorrem naturalmente no corpo humano como o 17 β - estradiol ou mesmo substâncias exógenas (hormônios artificiais e fitoesteróis), se ligando assim aos receptores de estrogênio e estimulando os genes estrogênio – dependentes. Podem ser miméticos em relação à natureza da ligação do hormônio, mas também em relação à potência (magnitude) da resposta (GOLDEN et al., 2005). O MeP, EtP, PrP e BuP foram considerados compostos de ação estrogênica após realização de um exame de detecção de estrogênio à partir de leveduras geneticamente modificadas (*Yeast Estrogen Screen: YES*), sendo o PrP considerado equivalente ao nonilfenol, e o BuP foi considerado o parabeno mais potente, sendo 10.000 vezes menos potente do que o 17 β estradiol (ROUTLEDGE et al., 1998);
- O MeP pode ser considerado um importante indutor da formação de radicais livres atuando sobre as células da pele humana exposta à luz solar, desencadeando assim o fenômeno da apoptose nessas células (HANDA et al., 2006);
- Os principais efeitos da exposição aos parabenos são aqueles relacionados à inibição nos fenômenos de transporte através da membrana celular e em processos mitocondriais. Uma vez que a citotoxicidade induzida por parabeno está ligada à falência dos processos de transporte mitocondriais dependentes da indução de transição de permeabilidade da membrana (TPM)

mitocondrial acompanhada pela despolarização e depleção mitocondrial do ATP celular através do desacoplamento do processo de fosforilação oxidativa (NAKAGAWA e MOORE, 1999);

- O metabolismo energético é o processo fundamental que suporta todas as funções celulares e é crucialmente importante na motilidade dos espermatozóides, que são células motilizadas especializadas que têm que se mover rapidamente para encontrar e fertilizar o oócito. Devido a esse fato, os espermatozóides precisam excepcionalmente de mais ATP do que qualquer outra célula (TAVARES et al., 2009);

- Uma vez que diversos estudos abordam o potencial estrogênico dos parabenos, há também relatos de efeitos adversos reprodutivos e desenvolvimento compatível com estrogenicidade em estudos toxicológicos de parabenos (HARVEY e DARBRE, 2014). Os parabenos apresentam atividade estrogênica fraca, confirmada por ensaios uterotróficos positivos (HARVEY et al., 2003; KODA et al., 2005), esses resultados estão de acordo com estudos que indicaram que MeP e EtP têm menor atividade *in vitro* e atividade estrogênica *in vivo* do que o PrP e BuP, sendo esse último considerado o parabeno com maior atividade (ROUTLEDGE et al., 1998).

- Há uma crescente preocupação com os efeitos dos parabenos, com estudos indicando haver relação entre a presença dos parabenos e o aumento na incidência de câncer de mama (DARBRE et al., 2003; DARBRE e HARVEY, 2014). Além disso, uma série de experimentos foi realizada com a exposição de roedores a BuP e PrP por OISHI (2001, 2002, 2004) que observaram que os compostos afetaram adversamente a produção de testosterona e a função reprodutiva masculina;

De acordo com a ficha de segurança online do MeP e do PrP disponível no site da Sigma-Aldrich, ambos os parabenos são classificados como compostos irritantes, de potencial risco à saúde e que devem ser manuseados com o uso de equipamentos de segurança. Nesse sentido, diversos estudos vem contestando a real segurança dos parabenos devido ao modo de ação desses compostos, discutido anteriormente. Em um desses estudos, observou-se que esses compostos biocumulam em células cancerosas de tecido mamário (linhagem MCF7) como ésteres intactos, sendo absorvidos sem sofrer hidrólise (DARBE et al., 2004; DAGNER et al., 2012).

A toxicidade dos parabenos em células MCF7 está relacionada com a sua lipofilicidade e a ausência de metabolismo nas células MCF7 resulta numa maior estabilidade dos parabenos, contribuindo assim para a sua bioacumulação (DAGNER et al., 2012). Além disso, MeP, EtP, PrP e BuP mostraram-se capazes de induzir a proliferação de células da linhagem MCF7 (BYFORD et al., 2002).

Uma vez que os parabenos foram estudados numa série de estudos *in vitro* e *in vivo* para visualizar a atividade estrogênica destes compostos, tanto os dados *in vitro* como os *in vivo* são valiosos na discussão sobre o real risco dos compostos exógenos fracamente estrogênicos para os seres humanos. Os dados obtidos em experimentos *in vitro* proporcionam aproximações úteis de ordem de grandeza entre os compostos testados e o resultados do estrogénio, o que podem determinar a natureza e a extensão com que as substâncias interagem com um receptor hormonal. Por outro lado, apenas dados *in vivo* podem fornecer uma evidência de como as substâncias hormonalmente ativas são influenciadas pela absorção, distribuição, metabolismo e excreção num animal. Consequentemente, uma combinação *in vitro* / *in vivo* é justificada para se obter uma compreensão completa das atividades do composto em questão (GOLDEN et al., 2008).

Figura 3 - Vias de exposição dos organismos aos parabenos. A grande maioria das fontes de contaminação dos parabenos é devido ao uso de PPCPs. (Fonte: adaptado de BLEDZKA et al., 2014).

Em outro estudo, Calafat et al. (2010), ao analisarem amostras de urina de um grupo populacional nos EUA, constataram que 92% dos indivíduos avaliados apresentaram MeP e

PrP na urina, enquanto que 50% dos indivíduos tinham EtP e BuP. Resultados similares foram obtidos por Shirai et al. (2013) ao analisarem amostras de urina de mulheres grávidas no Japão. Nos dois estudos, as altas concentrações de MeP e PrP obtidas nas amostragens podem ser correlacionadas com o consumo de alimentos ou com a utilização diária de PPCPs contendo esses conservantes (SONI et al., 2005; CIR, 2012).

Watkins et al. (2015) ao estudarem os biomarcadores de estresse oxidativo e de indicação de processos inflamatórios em mulheres grávidas, indicaram que houve aumento na produção de um biomarcador de peroxidação lipídica, o isoprostano (é um biomarcador de estresse oxidativo, considerado um indicativo da presença de parabenos e bisfenol A na urina das gestantes).

2.4.1 Citologia e toxicologia em estudos com vertebrados

Ao considerar que os efeitos dos compostos químicos podem ocorrer em diversos níveis de organização biológica (desde o nível bioquímico ou intracelular, até a população e nível do ecossistema), se faz necessária uma seleção mais acurada dos parâmetros a ser monitorados, uma vez que as concentrações ambientais de poluentes são muitas vezes demasiado baixas para causar mortalidade. Assim, a busca por *endpoints* sub-letais, de análise bioquímica, são por vezes mais adequados, uma vez que eles são mais sensíveis e mais fáceis de mensurar antes que os efeitos sejam mais prejudiciais aos níveis mais elevados de organização biológica (HUGGETT et al., 1992; DOMINGUES et al., 2009).

Os parabenos promovem um aumento da adipogênese (ou diferenciação de adipócitos a partir de células tronco linhagem 3T3-L1 – murinas), como revelado pela morfologia dos adipócitos, acumulação lipídica e pela expressão de mRNA de marcadores específicos de adipócitos; o potencial adipogênico dos parabenos é aumentado com o aumento do comprimento da cadeia linear na seguinte ordem: metil <etil <propil <butil <benzilparabeno; sendo assim, os parabenos podem promover a diferenciação de células estromáticas multipotentes, no caso as da linhagem murina (células do tecido conjuntivo frouxo com potencial de se tornar qualquer tipo celular do tecido conjuntivo) em adipócitos (células derivadas). Dessa forma, esses resultados indicam que os parabenos podem contribuir para a epidemia de obesidade e reforçam que o papel dos parabenos na adipogênese *in vivo* necessita ser mais aprofundada (HU et al., 2013).

Já em estudos com fêmeas de ratos (21-40 dias) tratadas oralmente com doses de parabenos (62,5; 250 e 1000 mg / por kg de peso corporal / dia), utilizando-se etinilestradiol (1 mg / por kg de peso corporal / dia) como controle positivo e óleo de milho como veículo, altas dosagens de MeP e i-PrP (1000 mg / por kg / dia) resultaram em atraso significativo na data de abertura vaginal, em alterações no peso dos ovários, glândulas adrenais, glândulas tireóideas, fígado e rins. Em relação à estrogenicidade foram demonstrados anormalidades histopatológicas nos ovários, tais como a diminuição dos corpos lúteos, o aumento dos folículos e do epitélio. Foi observada uma diminuição significativa das concentrações séricas de estradiol e tiroxina (VO et al., 2010).

O efeito estrogênico do PrP foi estudado em trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) sendo a indução de vitelogenina medida antes e durante a exposição ao PrP, em tecidos do fígado e músculo por Bjerregaard et al. (2003). Nesse estudo demonstrou-se um aumento nos níveis de vitelogenina nos peixes expostos a 33mg de PrP, além disso, evidenciou-se que o PrP possui tendência de bioacumulação nos organismos, apresentando tempo de meia vida de 8,6 horas no fígado e 1,5 horas no músculo.

Pedersen et al. (2000) em estudo com trutas arco-íris, demonstraram que o EtP, PrP e BuP são estrogênicos *in vivo*, enquanto o metabólito ácido p-hidroxibenzoico não apresentou qualquer atividade durante o teste. A estrogenicidade e a toxicidade ocorreram num intervalo de dose entre 100 e 300 mg / kg, à partir desses resultados reforça-se a necessidade de incluir testes para efeito estrogênico entre a bateria de sistemas de teste antes de aceitar novos produtos químicos para uso industrial.

2.4.2 Ecotoxicologia e estudo dos efeitos dos parabenos aos invertebrados aquáticos

A Ecotoxicologia é uma importante ferramenta para avaliar as diferentes formas de exposição e contaminação dos componentes ambientais (recursos hídricos, sedimento, solo, ar) e de substâncias químicas padrão através de organismos-teste. Assim, ao utilizarmos os organismos-teste podemos identificar quais compostos afetam os sistemas biológicos, permitindo efetuar uma avaliação de risco ambiental dos referidos contaminantes (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006; COSTA et al., 2008).

Através da realização dos ensaios ecotoxicológicos promove-se o estabelecimento, a homologação, a alteração e o registro dos produtos químicos comerciais, além disso, pode ter como produto a determinação dos valores de referência para os compartimentos ambientais.

A diversidade de organismos existente nos ecossistemas dulcícolas é de vital importância para a manutenção do equilíbrio ambiental, pois esses organismos constituem a base da cadeia alimentar, como produtores e consumidores primários. A comunidade zooplancônica constitui importante elo da cadeia trófica, sendo formada por organismos protozoários até estágios larvais de vertebrados (ESTEVES, 1988). Além disso, para que a abordagem ecotoxicológica seja feita de forma mais ampla possível, há uma variedade de organismos a ser considerada para os testes, tais como: bactérias, fungos, algas, microcrustáceos, insetos, hidrozoários, plantas e peixes. Diversos fatores devem ser considerados no processo de escolha dos organismos, entre eles: o valor ecológico e econômico da espécie; se há sensibilidade aos fatores testados (composto químico, luz, temperatura, demanda de alimento, etc); se a espécie é abundante, qual a sua distribuição geográfica e como é o ciclo de vida (esses fatores interferem na maior ou menor disponibilidade de organismos para os testes) (APHA, 2005).

Numa tentativa de demonstrar como se dá contaminação com substâncias químicas, deverá ser levado em conta que a sensibilidade fisiológica de cada organismo é apenas um dos fatores que determina a sensibilidade a cada composto. Nesse sentido, em estudos de toxicidade aguda feitos com *Daphnia magna* os valores de CE_{50} obtidos para MeP e PrP foram, respectivamente, 62 (50-72) e 23 (20-27) $mg\ L^{-1}$ (TERASAKI et al., 2009) ou 24,6 $mg\ L^{-1}$ e 12,3 $mg\ L^{-1}$ (DOBBINS et al., 2009). Os resultados dos dois trabalhos diferem para o mesmo composto, apesar das condições de teste serem semelhantes, indicando que a sensibilidade individual pode ser um possível fator de diferença na resposta ao contaminante. Além disso, a temperatura, o pH e a solubilidade influenciam grandemente a sensibilidade. Assim, para uma abordagem com maior realismo ambiental é preciso levar em conta que os organismos não só têm que tolerar variáveis físicas, químicas e biológicas, mas também a exposição concomitante a diversos desses estressores (BOUCHNAK e STEINBERG, 2010).

Ainda é preciso considerar que um mesmo fator de estresse pode desencadear diferentes respostas em diferentes organismos (VAN DEN BRINK et al., 2000), portanto, é altamente recomendável que a avaliação dos efeitos dos compostos tóxicos seja feita em espécies diferentes (espécies de diferentes grupos taxonômicos, se possível) na busca de encontrar os organismos mais sensíveis para os contaminantes avaliados, e estimar o impacto por meio dos contaminantes no ambiente de uma forma mais segura (GHERARDI-GOLDSTEIN et al., 1990).

Em avaliações do risco ecológico, podem ser utilizados os testes de toxicidade aguda e crônica. Os testes agudos são utilizados, em geral, antes de se avaliar a toxicidade crônica e para determinar a toxicidade de um composto ou uma mistura, sendo o efeito observado a mortalidade ou sobrevivência. Já nos testes crônicos, busca-se avaliar os efeitos da exposição em longo prazo à substância, através de endpoints subletais (MITCHELL et al., 2002). Nesse contexto, os limitados estudos de ecotoxicidade aguda e crônica conduzidos com os parabenos até o presente momento estão apresentados na **Tabela 3**. De acordo com os dados, é possível sugerir que os parabenos podem causar potenciais efeitos aos organismos aquáticos, especialmente os de maior cadeia carbonica (BRAUSCH e RAND, 2011) e BzP, BuP e PrP podem provocar respostas estrogênicas em baixas doses (DOBBINS et al., 2009), similarmente ao que foi observado em mamíferos e em resultados de testes de estrogenicidade com leveduras, discutidos nos itens anteriores.

Tabela 3 - Principais endpoints ecotoxicológicos para diferentes organismos aquáticos expostos ao MeP e PrP. Resultados em mg L⁻¹.

Organismos	Metilparabeno	Propilparabeno	Referências
<i>V. fischeri</i>	CE ₅₀ : 5,9 (5,5-6,5)	CE ₅₀ : 0,26 (0,24-0,28)	Terasaki et al., 2008
<i>P. subcapitata</i>	CE ₅₀ : 91 (90-93)	CE ₅₀ : 15 (15-16)	Madsen et al., 2001
<i>P. subcapitata</i>	CE ₅₀ : 21	CE ₅₀ : 7,4	Yamamoto et al., 2011
<i>D. magna</i>	CE ₅₀ : 11,2 (5,7-22,0)	CE ₅₀ : 15,4 (8-32,3) ¹	Madsen et al., 2001
<i>D. magna</i>	CE ₅₀ : 62 (50-72)	CE ₅₀ : 23 (20-27)	Terasaki et al., 2008
<i>D. magna</i>	CE ₅₀ : 24,6 (8,3) LOEC: 6,0 (crescimento)	CE ₅₀ : 9,7 (0,6) LOEC: 12,3 (4,3) (crescimento)	Dobbins et al., 2009
<i>D. magna</i>	NOEC: 2,4 (21 dias)	CE ₅₀ : 7,4 NOEC: 1,2 (21 dias)	Yamamoto et al., 2011
<i>P. promelas</i>	CE ₅₀ : >160	CE ₅₀ : 12,3 (4,3) LOEC: 0,4 (crescimento)	Dobbins et al., 2009

Onde: *V. fischeri*: *Vibrio fischeri*; *P. subcapitata*: *Pseudokirchneriella subcapitata*; *D. magna*: *Daphnia magna*; *P. promelas*: *Pimephales promelas*.

2.4.3 Principais organismos-testes utilizados em ensaios ecotoxicológicos

Rand (1995) elencou os principais critérios que devem ser considerados na escolha dos organismos-teste para ensaios ecotoxicológicos:

- uso de espécies representativas com sensibilidades distintas (ampla faixa de sensibilidade) à substância teste;
- escolha de espécies viáveis e abundantes ao longo do ano;
- dar preferência para o uso de espécies nativas na área de estudos, para que assim sejam mais representativos;
- espécies que sejam de uso recreativo, comercial ou ecológico podem ser incluídas;
- as espécies devem ser facilmente adaptáveis às condições laboratoriais e de fácil cultivo, de modo a viabilizar a realização de testes agudos e crônicos;
- é preferível que a espécie a ser utilizada tenha um repertório de estudos de fisiologia, comportamento e genética já realizados, para facilitar a interpretação dos resultados obtidos.

Considerando os critérios apresentados, as espécies de cladóceros mais utilizadas como organismos-teste de água doce são *Daphnia magna* e *Ceriodaphnia dubia* (MITCHELL et al., 2002). Ambos são organismos da família Daphnidae, amplamente distribuídos nas regiões de clima temperado do hemisfério Norte (RAND, 1995).

No Brasil, esforços têm sido feitos por diversos grupos de pesquisa ao longo do tempo com o objetivo de ampliar o conhecimento acerca da biologia de espécies nativas que reúnam as características fundamentais de uma espécie-teste, descritas segundo Rand (1995) para uso em testes ecotoxicológicos, desenvolvendo e adaptando as metodologias de testes de toxicidade, tanto nos ambientes de água doce, marinha, estuarino, salobro, termal, sedimento e meio terrestre, bem como nos diferentes níveis da cadeia trófica, reunindo uma gama ampla de espécies que possam ser utilizadas como organismos-teste para a avaliação da toxicidade nos diferentes compartimentos ambientais.

Desse modo, os estudos ecotoxicológicos feitos com espécies nativas e representativas nos ecossistemas devem ser priorizados, devido à sua importância ecológica e dessa forma ser uma ferramenta mais realista na adoção de limites em relação ao lançamento de compostos químicos e efluentes (FONSECA, 1991). Usar organismos nativos nos testes ecotoxicológicos é importante para prevenção de introdução de espécies exóticas no ambiente, facilidade de obtenção dos organismos e de renovação das culturas, sendo mais factível uma extrapolação de dados laboratoriais para o campo (ALMEIDA, 2007) e por se tratar de organismos vivos no mesmo domínio morfoclimático no qual se está fazendo o estudo.

Em relação ao uso de espécies nativas em testes ecotoxicológicos há três pontos que carecem de maior atenção: estudos amplos sobre a biologia de espécies nativas que possam vir a ser utilizadas como organismos-teste (estudos de fisiologia, morfologia, ciclo de vida, reprodução), estudos de toxicidade quanto a compostos de referência, em manutenção em longo prazo de espécies endêmicas em ambiente laboratorial para realização de bioensaios.

Os itens subsequentes abordam a caracterização dos organismos-testes escolhidos para o presente estudo.

2.4.3.1 Cladóceros

O subfilo Crustacea apresenta cerca de 38.000 espécies conhecidas, distribuídas majoritariamente no ambiente marinho, muitos representantes de água doce, além de espécies terrestres (RUPPERT e BARNES, 1996).

Ceriodaphnia silvestrii, do subfilo Cladocera e da família Daphnidae, são organismos nativos e endêmicos da região Neotropical (COELHO e ROCHA, 2010). Os Cladocera são conhecidos como pulgas d'água, possuem segmentação reduzida do corpo com tórax e abdômen fundidos, possuem uma carapaça envolvendo o tronco, possuem espinho apical e antenas poderosas que auxiliam na natação, podem ser encontrados em rios, lagos e lagoas (RUPPERT e BARNES, 1996).

Macrothrix flabelligera, do subfilo Cladocera e da família Macrothricidae, é um organismo nativo da região neotropical, está presente na Austrália e América do sul (GUNTZEL et al., 2004). Os cladóceros apresentam dimorfismo sexual em forma e em tamanho, sendo que as principais diferenças são visíveis na antena, pós-abdômen, gancho e primeira porção da perna (GUNTZEL et al., 2004).

C. silvestrii e *M. flabelligera* foram as espécies de Cladocera utilizadas nos experimentos descritos no Capítulo 3. Os Cladocera utilizados nesses ensaios de toxicidade com parabenos encontram-se representados na **Figura 4**.

Figura 4 - Cládoceros nativos de regiões tropicais utilizados nos testes ecotoxicológicos: (a) *Ceriodaphnia silvestrii*; (b) *Macrothrix flabelligera*. Fonte: autor.

2.4.3.2 Hidrozoários

O filo *Cnidaria* consiste principalmente de animais marinhos, medusas, anêmonas, corais (mais de 7000 espécies) e os pólipos de água doce, as hidras (JANKOWSKI et al., 2008; DESERTI e ZAMPONI, 2011). Os hidrozoários são amplamente distribuídos, encontrados em todos os continentes, exceto na Antártida (CAMPBELL et al., 1987). A classe Hydrozoa possui cerca de 2700 espécies (RUPPERT e BARNES, 1996).

O pólipio tem o corpo composto por cavidade tubular e possui uma única abertura de entrada e de saída (boca), seu esqueleto é hidrostático, enchido com água a partir do ambiente circundante, incluindo um número variável de tentáculos (que pode ser diferente em aparência e espessura para cada espécie) (DESERTI, 2012). A formação de brotos ocorre na região da haste através de invaginações da parede corporal, dessa forma a extremidade do broto forma uma boca e um círculo de tentáculos, o broto se desprende formando novo indivíduo (RUPPERT e BARNES, 1996).

Uma das medidas mais comuns nos testes de toxicidade com *Hydra* sp é a avaliação de alterações morfológicas, que são indicativos de ambos os efeitos letais e subletais, e podem ser geralmente pontuadas de 1 a 5 de acordo com os 5 estágios morfológicos descritos

(**Figura 5**) (TROTIER et al., 1997; QUINN, 2007): fase 1, o hidrante é dito normal possui tentáculos estendidos, seu corpo é reativo; fase 2, nas pontas dos tentáculos formam-se pequenas bolas de cnidocistos, e corpo fica menos reativo, este é o primeiro sinal de toxicidade; fase 3, os tentáculos tornam-se muito curtos, o que está ligado à toxicidade mais grave, o corpo torna-se ainda menos reativo e mais encurtado; fase 4 é a fase de tulipa, o corpo é totalmente contraído, quase sem tentáculos; e na fase 5 o hidrante é totalmente degradado.

Figura 5- Cinco estágios da morfologia de *Hydra attenuata* sob condições de estresse, categorizados em score (a até e, representando as alterações morfológicas de 1-5). Fonte: (<https://www.ec.gc.ca/stl/default.asp?lang=En&n=91EAEB1F-1>).

Parte do sucesso da utilização de hidra em bioensaios para testes de toxicidade é devido à grande variedade de *endpoints* que podem ser utilizados em testes de toxicidade agudo e crônicos. Podemos verificar a letalidade através de alterações na morfologia a partir do enquadramento dos organismos nos *scoring* 4-5 anteriormente citados. Já em estudos subletais, a toxicidade dos compostos pode ser verificada nos indivíduos que apresentam *scoring* 1-3, através da realização de estudos de alimentação pós-exposição (TROTIER et al., 1997; QUINN et al., 2007; QUINN et al., 2012).

Hydra attenuata e *Hydra viridissima* (**Figura 6**) foram as espécies de hidrozoários utilizadas nos experimentos descritos no Capítulo 3.

Figura 6- *Hydra attenuata* (a) e *Hydra viridissima* (b). Fonte: autor.

2.4.3.3 Chironomídeos

A classe Insecta ou Hexapoda possui mais de 750.000 espécies descritas, sendo assim o maior grupo animal em número de espécies, sendo essencialmente animais terrestres. Algumas espécies podem ocupar ambientes aquáticos, distinguindo-se dos demais artrópodes unirremes por apresentarem o corpo dividido em: cabeça, tórax e abdômen (RUPPERT e BARNES, 1996). Entre as famílias da classe Insecta, a família Chironomidae é a mais abundante nos ambientes aquáticos (PINDER, 1986).

Chironomus tentans e *Chironomus riparius* vem sendo utilizados em testes de toxicidade com sedimento devido à sensibilidade a metais e agrotóxicos, fácil manutenção em laboratório e por serem representativos ecologicamente, tendo os procedimentos de teste padronizados internacionalmente OECD (2004). No Brasil, a viabilização e cultivo espécies de Chironomidae nativos para testes ecotoxicológicos começou com os estudos com *Chironomus xanthus* (**Figura 7**) (FONSECA, 1997; FONSECA e ROCHA, 2004). A espécie de *Chironomus xanthus* foi utilizada para os testes ecotoxicológicos que estão descritos no Capítulo 3.

Figura 7 - Larvas do díptero *Chironomus xanthus*. Fonte: autor.

2.4.3.4 Fungos hifomicetos aquáticos

Os hifomicetos aquáticos são um grupo polifilético de fungos de água doce que apresentam a capacidade de esporular em água corrente, esses fungos também são conhecidos como fungos Ingoldianos em homenagem ao Prof. Ingold o pioneiro do estudo de sua taxonomia (INGOLD, 1975; BARLOCHER, 1992; WEBSTER e WEBER, 2007). Os hifomicetos podem produzir esporos multirradiados ou sigmóides cujas pontas podem ser cobertas com mucilagem, o que facilita a fixação do esporo ao substrato (SUBERKROPP et al., 1998; WONG et al., 1998).

Os fungos aquáticos são importantes agentes no processo de decomposição da matéria orgânica foliar através de transformações bióticas e abióticas que resultam na formação de biomassa fúngica, dióxido de carbono, matéria orgânica dissolvida e matéria particulada fina (GESSNER et al., 2007). A atividade decompositora dos hifomicetos aquáticos está relacionada às características físicas e químicas da matéria orgânica (dureza, concentração de nutrientes e de materiais secundários) (KONIG et al., 2014), às características do meio (oxigênio, pH, temperatura) e à dependência das interações estabelecidas entre os fungos, bactérias e macroinvertebrados colonizadores do substrato (SUBERKROPP et al., 1998).

Uma vez que a decomposição foliar ocorre devido à ação conjunta dos fatores físicos (lixiviação de compostos solúveis e fragmentação física) e degradação biológica (mediada por organismos decompositores e detritívoros) (GRAÇA et al., 2002). Os hifomicetos atuam através de enzimas extracelulares que são capazes de degradar o tecido foliar (e.g., substâncias pécicas, hemicelulose, celulose, lenhina), convertendo os componentes da parede celular em substâncias mais simples e passíveis de ser digeridas e assimiladas pelos consumidores primários, pelos detritívoros trituradores (WIPFLI et al., 2007). Os organismos

trituradores apresentam uma elevada diversidade, tais como larvas de insetos e de crustáceos, os quais servirão de alimento a predadores (macroinvertebrados, peixes, anfíbios ou mesmo aves) (GONÇALVES et al., 2017).

A vida dos hifomicetos aquáticos inicia-se com os esporos (também conhecidos por conídios); estes são formados em estruturas presentes nas extremidades de hifas fúngicas, os conidióforos, e são os responsáveis pela reprodução assexuada destes fungos. O crescimento do micélio (**Figura 8**) das diferentes espécies de hifomicetos aquáticos que atingem a folha dá início a um processo conhecido por condicionamento foliar; este consiste essencialmente no aumento da palatabilidade e qualidade nutricional desse material foliar que ficará disponível para consumo pelos trituradores (GONÇALVES et al., 2017). Assim, o ciclo de vida dos fungos hifomicetos aquáticos pode ser resumido conforme **Figura 9**.

Figura 8 – Micélios de hifomicetos aquáticos postos a crescer em meio Agar sólido. (a) *Articulospora tetracladia*, (b) *Heliscus lugdunensis*. Fonte: Ana Lúcia Gonçalves (GONÇALVES et al., 2017)

Figura 9- Ciclo de vida dos fungos hifomicetos aquáticos: fixação no substrato, esporulação na água e decomposição de matéria orgânica em decomposição (Fonte: modificado de Webster, 1959).

Os fungos hifomicetos produzem esporos com múltiplos formatos (**Figura 10**), capacidade de aderir ao substrato, colonização e esporulação rápida quando há substrato disponível e condições adequadas, habilidade de esporular em ampla faixa de temperatura. Os formatos de esporos também influenciam na fixação: tetrarradiados, sigmóides, ramificados ou filiformes (INGOLD, 1942, 1968). Os hifomicetos aquáticos são identificados e classificados com base na morfologia e desenvolvimento dos seus esporos (GONÇALVES et al., 2017)

Figura 10- Esporos (conídios) dos hifomicetos aquáticos: (A) *Heliscus lugdunensis*; (B) *Tetraccladium marchalianum*; (C) *Lemonniera aquatica*; (D) *Articulospora tetraccladia*. Onde: (A) e (D) foto autor, (B) e (C) (Fonte: modificado de DUARTE et al. 2016).

As espécies *Articulospora tetraccladia* Ingold, *Flagellospora curta* Webster, *Heliscus lugdunensis* Sacc. & Thérry, *Lemonniera aquatica* de Wildeman, *Lemonniera pseudofloscula* Dyko et al., *Tetraccladium apienses* de R.C. Sinclair & Eicker, *Tetraccladium marchalianum* de Wild foram utilizadas para os testes ecotoxicológicos que estão descritos no Capítulo 4.

2.5. Comparação de sensibilidade entre espécies: Distribuição de sensibilidade de espécies (SSD)

Para avaliação do risco da exposição a substâncias tóxicas são utilizados diversos métodos, entre os quais, os métodos com fatores de extrapolação fixos, nos quais os efeitos ecológicos adversos são definidos como improváveis. Este limiar é referido com base na concentração de efeito não observado (PNEC) chegando até curvas de distribuição da

sensibilidade das espécies (SSDs) (FORBES e CALOW, 2002a, 2002b; CALOW e FORBES, 2003; POLLINO et al., 2008).

A curva de SSD estabelece uma função entre a concentração de um composto químico e os efeitos que causam aos organismos, tais como a letalidade, a imobilidade ou efeitos comportamentais. Geralmente, os valores de concentrações letais (CL₅₀) ou efetivas (CE₅₀) são expressos em relação a 50% dos organismos (ABNT, 2004), para relacionar como as espécies se distribuem de acordo com sua sensibilidade e ao composto. Assim, ao usar as curvas de SSD, pode-se estimar qual a concentração de determinado composto químico que excede a resposta crítica para percentagens específicas das espécies. Desse modo, as concentrações abaixo do valor crítico são chamadas de protetoras para aqueles ecossistemas em relação ao composto amostrado, representando um *endpoint* mais robusto para espécies mais sensíveis do que o valor do PNEC nas avaliações de risco (FORBES e CALLOW, 2002a, 2002b).

Quando se elabora uma SSD busca-se estabelecer qual é concentração do(s) composto(s) químico(s) em estudo que é protetora para a maioria das espécies no ambiente (WHEELER et al., 2002) e usualmente se estabelece a concentração de risco para 5% das espécies (HC₅), ou seja, o fator de proteção para 95% das espécies (VAN STRAALLEN e VAN RIJN, 1998).

Assim, o *ranking* de sensibilidade dos organismos a ser desenvolvido não deve ser considerado como algo estático, mas que se destina a ser continuamente desenvolvido e diversificado à medida que a compreensão científica dos sujeitos e dos compostos aumenta (WOGRAM e LIESS, 2001). Por essa razão, ao aumentar a base de dados ecotoxicológicos referente aos parabenos, inserindo espécies não padronizadas e espécies de ambiente tropical, nós pretendemos aumentar a compreensão acerca da toxicidade para um número maior de espécies e buscar espécies mais sensíveis em cada ambiente, aumentando assim o grau de proteção ao realizar abordagens de SSD.

2.6. Referências Bibliográficas

ABIHPEC. Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. 2016. **Panorama do Setor 2016**. Publicado em 22/06/2016. Disponível em: <

<https://www.abihpec.org.br/novo/wp-content/uploads/PANOMARA-DO-SETOR-2016.pdf> >
Acesso em 10 de out. de 2016.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR: 12713. **Ecotoxicologia Aquática: Toxicidade aguda. Método de ensaio com *Daphnia* ssp. (Cladocera, Crustácea).** 2004.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR: 13373. **Ecotoxicologia Aquática: Toxicidade crônica. Método de ensaio com *Ceriodaphnia* ssp. (Cladocera, Crustácea).** 2005.

ALMEIDA, C.A. **Aspectos do ciclo de vida de espécies bentônicas nativas e sua utilização na avaliação da qualidade dos sedimentos de lagos naturais e reservatórios.** Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2012a. **Resolução - RDC nº 29 de 1 de junho de 2012: Lista de Substâncias de Ação Conservante permitidas para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfume.** Diário Oficial da União 04 jun 2012. Disponível em: <<http://www.jusbrasil.com.br/diarios/37577013/dou-secao-1-04-06-2012-pg-81>>

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2012b. Brasil. Ministério da Saúde. **Formulário nacional da farmacopeia brasileira** / Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2.ed. Brasília: 224 p . Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/arquivos/2012/FNFB%202_Revisao_2_COFAR_setembro_2012_atual.pdf

APHA - American Public Health Association. Water Environment Federation 1995. **Standard methods for the examination of water and wastewater.** Washington: DC. 1368 p, 1995.

APHA - American Public Health Association. Water Environment Federation. **Standard methods for the examination of water and wastewater**, Washington, 2005.

AZURAI, O.M.; YUSOFF, F.M.; SHAMSUDIN, M.N.; RAHA, R.A.; ALEKSEEV, V.R.; MATIAS-PERALTA, H.M. Effect of food density on male appearance and ephippia production in a tropical cladoceran, *Moina micrura* Krurz, 1874. **Aquaculture**, v.412-413, p.131-135, 2013.

BARCELÓ, D.; PETROVIC, M. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the environment. **Anal. Bioanal. Chem.**, v.387, p.1141–1142, 2007.

BENIJITS, T.; LAMBERT, W.; DE LEENHEER, A. Analysis of multiple endocrine disruptors in environmental waters via wide-spectrum solid-phase extraction and dual-polarity ionization LC-ion trap MS/MS. **Anal. Chem.**, v. 76, p.704–711, 2004.

BILA, D.M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, v.30(3), p. 651-666, 2007.

BJERREGAARD, P.; ANDERSEN, D.N.; PEDERSEN, K.L.; PEDERSEN, S.N.; KORSGAARD, B. Estrogenic effect of propylparaben (propylhydroxybenzoate) in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* after exposure via food and water. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 136, p. 309–317, 2003.

BOLONG, N.; ISMAIL, A.F.; SALIM, M.R.; MATSUURA, T. A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. **Desalination**, v.239 , p.229–246, 2009.

BOUCHNAK, R.; STEINBERG, C.E.W. Modulation of longevity in *Daphnia magna* by food quality and simultaneous exposure to dissolved humic substances. **Limnologia - Ecology and Management of Inland Waters**, v.40 (2), p.86–91, 2010.

BOXALL, A.B.A.; RUDD, M.A.; BROOKS, B.W.; CALDWELL, D.J.; CHOI, K. (...). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: What are the big questions? **Environmental Health Perspectives**, v.120 (9), p.1221-1229, 2012.

BRITO, N. M.; et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p.129-146, 2003.

BYFORD, J.R.; SHAW, L.E.; DREW, M.G.B.; POPE, G.S.; SAUER, M.J.; DARBRE, P.D. Oestrogenic activity of parabens in MCF7 human breast cancer cells. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v.80, p.49–60, 2002.

CABALEIRO, N.; CALLE, I.; BENDICHO, C.; LAVILLA, I. An overview of sample preparation for the determination of parabens in cosmetics. **Trends in analytical chemistry**, v.57, p.34-46, 2014.

CALAFAT, A.M.; XIAOYUN, Y.; WONG, L.Y.; BISHOP, A.M.; NEEDHAM, L.L. Urinary Concentrations of Four Parabens in the U.S. Population: NHANES 2005–2006. **Environmental Health Perspectives**, v. 118 (5), p. 679 - 685, 2010.

CALOW, P.; FORBES, V.E. Does Ecotoxicology Inform Ecological Risk Assessment? **Environmental Science & Technology**, v.147-151, 2003.

CAMPBELL, R. D. A new species of Hydra (Cnidaria: Hydrozoa) from North America with comments on species clusters within the genus. **Zool. J. Linn. Soc.**, v.91, p. 253–263, 1987.

CIR. Cosmetics Ingredients Review. 2012. Final amended report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben, isopropylparaben, butylparaben, isobutylparaben, and benzylparaben as used in cosmetic products. **Int J Toxicol** 2008; 27(Suppl. 4):1–82. Available in:
http://www.cirsafety.org/sites/default/files/paraben_build.pdf

COSTA, C.R.; OLIVI, P.; BOTTA, C.M.R.; ESPINDOLA, E.L.G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31(7), p.1820-1830, 2008.

DANISH EPA. Danish Environment Protection Agency. Ministry of Environment. 2013. **Survey of parabens**. Part of the LOUS - Review, Environmental Project n.1474.

DAUGHTON, C.G.; TERNES, T.A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? **Environmental Health Perspectives**, v.107 (6), p.907-938, 1999.

DESERTI, M. I. Cnidarios dulceacuícolas: las Hydras. **Boletín Biológico**. Teoria. v.25(6), p.4-10, 2012.

DESERTI, M.I.; ZAMPONI, M.O. *Hydra vulgaris* Pallas, 1766, (=Hydra attenuata) (Cnidaria; Hydrozoa) from the Los Padres Lagoon (Buenos Aires province, Argentina). **Revista Brasileira Biociências**, v.9, p.482-487, 2011.

DOBBINS, L.L.; USENKO, S.; BRAIN, R.A.; BROOKS, B.W. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Probabilistic Ecological Hazard Assessment of Parabens Using *Daphnia magna* and *Pimephales promelas*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28 (12), p. 2744–2753, 2009.

DOMINGUES, I.; AGRA, A.R.; MONAGHAN, K.; SOARES, A.M.V.M.; NOGUEIRA, A.J.A. Cholinesterase and Glutathione-S-Transferase activities in freshwater invertebrates as biomarkers to assess pesticide contamination. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29 (1), p. 5–18, 2010.

DORNFELD, C.B. **Utilização de *Chironomus* sp (Diptera, Chironomidae) para a avaliação da qualidade de sedimentos e contaminação por metais**. Tese (Doutorado), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006. 239p.

DUARTE, S.; BARLOCHER, F.; PASCOAL, C.; CÁSSIO, F. Biogeography of aquatic hyphomycetes: Current knowledge and future perspectives. *Fungal Ecology*, v.19, p.169–181, 2016.

ELDER, R.L. Final report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben and buthylparaben. **J. Am. Coll of Toxicol.**, v.3, p.147-209, 1984.

EPA (U.S. Environmental Protection Agency). **Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates**. EPA/600/R- 99/064. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. Washington, DC. 2000.

ESTEBAN, S.; GORGA, M.; PETROVIC, M.; GONZÁLEZ-ALONSO, S.; BARCELÓ, D.; VALCÁRCEL, Y. Analysis and occurrence of endocrine-disrupting compounds and estrogenic activity in the surface waters of Central Spain. **Science of the Total Environment**, v.466–467, p. 939–951, 2014.

ESTEVEZ, F.A. **Fundamentos de Limnologia**. Rio de Janeiro: Editora Interciência/FINEP, 575p, 1988.

EU, European Union Council Directive, 2014a. **Regulation (EC) 358/2014 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products**. No 1223/2009. April, 09.

EU, European Union Concil Directive, 2014b. **Comission Regulation n. 1004/2014 amending Annex V to Regularion EC n.1223/2009 of the European Parliament and the Council on cosmetic products**. September, 18.

EWG. Skin Deep database2007. retrieved from: <http://www.ewg.org/reports/skindeep2> . Acesso em 14 de outubro de 2013.

FAN, X.; KUBWABO, C.; RASMUSSEN, P.; JONES-OTAZO, H. Simultaneous quantitation of parabens, triclosan, and methyl triclosan in indoor house dust using solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **J. Environ. Monit.**, v.12, p.1891-1897, 2010.

FONSECA, A.L. **Avaliação da qualidade da água da bacia do Rio Piracicaba através de testes de toxicidade com invertebrados**. Tese (Doutorado), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1997. 217 p.

FONSECA, A.L., ROCHA, O. Laboratory cultures of the native species *Chironomus xanthus* Rempel, 1939 (Diptera-Chironomidae). **Acta Limnol. Bras.** v.16 (2), p.153–161, 2004.

FORBES, V.E.; CALOW, P. Extrapolation in ecological risk assessment balancing pragmatism and precaution in chemical controls legislation. **BioScience**, v. 52, p. 249-257, 2002a.

FORBES, V.E.; CALLOW, P. Species sensitivity distributions revisited: a critical appraisal. **Human and ecological risk assessment: an international journal**, v.8 (2), p.473-492, 2002b.

GAFFNEY, V.J.; CARDOSO, V.V.; RODRIGUES, A.; FERREIRA, E.; BENOLIEL, M.J.; ALMEIDA, C.M.M. Análise de fármacos em águas por SPE-UPLC-ESI-MS/MS. **Química Nova**, v.37(1), p.138-149, 2014.

GALINARO, C.A.; PEREIRA, F.M.; VIEIRA, E.M. Determination of Parabens in Surface Water from Mogi Guaçu River (São Paulo, Brazil) Using Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Based on Low Density Solvent and LC-DAD. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 26 (II), p.1-9, 2015.

GESSNER, M.O.; GULIS, V.; KUEHN, K.A. CHAUVET, E.; SUPERKROPP, K.. Fungal decomposers of plant litter in aquatic ecosystems, p. 301-324. In: **Mycota Book Series: A**

Comprehensive Treatise on Fungi As Experimental Systems for Basic and Applied Research. Kubicek C.P. & Druzhinina I.S. (Eds.). Springer- Verlag Berlin, Germany, 2007.

GHERARDI-GOLDSTEIN, E.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P.A.; ARAÚJO, R.P.A.; RAMOS, M.L.L.C.1990. **Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, São Paulo, 1990.**

GIORDANO, F.; BETTINI, R.; DONINI, C.; GAZZANIGA, A.; CAIRA, M.R.; ZHANG, G.H.G.; GRANT, D.J.W. Physical Properties of Parabens and Their Mixtures: Solubility in Water, Thermal Behavior, and Crystal Structures. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.88(11), p. 1210-1216, 1999.

GOLDEN, R.; GANDY, J.; VOLLMER, G. A Review of the Endocrine Activity of Parabens and Implications for Potential Risks to Human Health. **Critical Reviews in Toxicology**, v.35(5), p.435-458, 2005.

GONÇALVES, A.L. *Hifomicetes aquáticos*, Rev. Ciência Elem., V5(2):016, 2017.
DOI: <http://doi.org/10.24927/rce2017.016>

GOULDEN, C.E. The Systematics and Evolution of the Moinidae. **Transactions of the American Philosophical Society**, New Series, v. 58, (6), p. 1-101, 1968.

GRAÇA, M.A.S.; POZO, J.; CANHOTO, C.; ELOSEGI, A. Effects of *Eucalyptus* Plantations on Detritus, Decomposers, and Detritivores in Streams. **TheScientificWorldJOURNAL**, v. 2, p.1173–1185, 2002. ISSN 1537-744X; DOI 10.1100/tsw.2002.193

GULLEY, D.D.; BOETTER, A.M.; BERGMAN, H.L. **TOXSTAT 3.3 Computer Program.** 1991.

GUNTZEL, A.M.; MATSUMURA- TUNDISI, T.; ROCHA, O. Macrothrix flabelligera, a newly-recorded Cladocera Macrothricidae in Brazilian freshwaters. **Braz. J. Biol.**, v.64 (2), 2004.

HANDA, O.; KOKURA, S.; ADACHI, S.; TAKAGI, T.; NAITO, Y.; TANIGAWA, T.; YOSHIDA, N.; YOSHIKAWA, T. Methylparaben potentiates UV-induced damage of skin keratinocytes. **Toxicology**, v.227, p.62–72, 2006.

HC. Health Canada. 2016. **Consumer product safety: safety of cosmetic ingredients (7) Parabens**. <http://www.hc-sc.gc.ca/cps-spc/cosmet-person/labelling-etiquetage/ingredients-eng.php>

HUGGETT, R.J.; KIMERLE, R.A.; MEHRLE, P.M.J.; BERGMAN, H.L. 1992. **Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress**. Lewis, Boca Raton, FL, USA.

INGOLD, C.T. Aquatic hyphomycetes of decaying alder leaves. **Transactions of the British Mycological Society**, v.25 (4), p.339-417, 1942.

INGOLD, C.T. More spores from rivers and streams. **Transactions of the British Mycological Society**, 51(1), p.137-143, 1968.

JANKOWSKI, T.; COLLINS, A.C.; CAMPBELL, R.D. Global diversity of inland water cnidarians. **Hydrobiology**, v. 595, p.35-40, 2008.

KASPRZYK-HORDERN, B.; DINSDALE, R.M.; GUWY, A.J. 2008. The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. **Water Research**, v. 42, p.3498–3518, 2008.

KASPRZYK-HORDERN, B.; DINSDALE, R.M., GUWY, A.J. The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. **Water Res.**, v.43, p.363-380, 2009.

KWOK, K.W.H.; LEUNG, K.M.Y.; LUI, G.S.G.; CHU, V.K.H.; LAM, P.K.S; MORRITT, D.; MALTBY, L. BROCK, T.C.M.; VAN DEN BRINK, P.J.; WARNE, M.S.J.; CRANE, M. Comparison of Tropical and Temperate Freshwater Animal Species' Acute Sensitivities to Chemicals: Implications for Deriving Safe Extrapolation Factors. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 3(1), p. 49–67, 2007.

KONIG, R.; HEPP, L.U.; SANTOS, S. 2014. Colonisation of low- and high-quality detritus 649 by benthic macroinvertebrates during leaf breakdown in a subtropical stream. 650 **Limnologica**, v.45, p.61-68, 2014.

LACHER, T.E.; GOLDSTEIN, M.I. Tropical ecotoxicology: Status and needs. **Environ. Toxicol. Chem.**, v.16, p.100-111, 1997.

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

LEE, J.; JI, K.; KHO, Y.L.; KIM, P.; CHOI, K. Chronic exposure to diclofenac on two fresh water cladocerans and Japanese medaka. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.74, p.1216–1225, 2011.

LI, W.; GAO, L.; SHI, Y.; WANG, Y.; LIU, J.; CAI, Y. Spatial distribution, temporal variation and risks of parabens and their chlorinated derivatives in urban surface water in Beijing, China. **Sci. Total Environ.**, v.539, p.262–270, 2016.

LLOYD, R. Special Tests in Aquatic Toxicity for Chemical Mixtures: Interactions and Modification of Response by Variation of Physicochemical Condition. **Methods for Assessing the Effects of Mixtures of Chemicals**. Edited by V. B. Vouk, G. C. Butler, A. C. Upton, D. V. Parke and S. C. Asher. p. 491-507, 1983.

LUO, Y.; GUO, W.; NGO, H.H.; NGHIEM, L.D.; HAI, F.I. ZHANG, J.; LIANG, S.; WANG, X.C. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. **Science of the Total Environment**, v.473–474, p.619–641, 2014.

MADSEN, T.; BOYD, H.B.; NYLEN, D.; PEDERSEN, A.R.; PETERSEN, G.I.; SIMONSEN, F. **Environmental and Health Assessment of Substances in Household Detergents and Cosmetic Detergent Products**. Danish Environmental Protection Agency, Environmental Project No. 615; 2001.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2013. **Instrução normativa Conjunta MAPA, Anvisa e IBAMA sobre alteração de formulação de agrotóxicos e afins, No - 1, de 18 de abril**. ISSN 1677-7042.

MITCHELL, J.A.K.; BURGESS, J.E.; STUETZ, R.M. Developments in ecotoxicity tests. **Review in Environmental Science & Bio/Technology**, v.1, p.169–198, 2002.
MOWAD, C. M. Allergic contact dermatitis caused by Parabens: 2 case reports and a review. **American Journal of Contact Dermatitis**, v.11, p. 53-56, 2000.

NAKAGAWA, Y.; MÓLDEUS, P. Mechanism of *p*-Hydroxybenzoate Ester-induced Mitochondrial Dysfunction and Cytotoxicity in Isolated Rat Hepatocytes. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, p. 1907–1914, 1998.

OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). 2001a. Proposal of a New Guideline 218: **Sediment-water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Sediment. OECD Guidelines for Testing of Chemicals**. Draft Document February 2001. 21 pp.

OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). 2001b. **Proposal of a New Guideline 219: Sediment-water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Water**. OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Draft Document February 2001. 21 pp.

OECD, Organisation for Economic Co-operation and Development, 2004. **Guidelines for Testing of Chemicals, no. 235. Chironomus sp. Acute immobilization**.

OISHI, S. Effects of buthylpaben on the male reproductive system in rats. **Toxicology and industrial health**, v.17 (1), 2001.

OISHI, S. Effects of propylparaben on the male reproductive system in rats. **Food and chemical toxicology**, v.40 (12), p.1807-1813, 2002.

OISHI, S. Lack of spermatotoxic effects of methyl and ethyl esters of p-hydroxybenzoic acid in rats. **Food and chemical toxicology**, v.42, p.1845-1849, 2004.

OKEKE, I.N.; LAMIKANRA, A. Bacteriological quality of skin-moisturizing creams and lotions distributed in a tropical developing country. **Journal of Applied Microbiology**, 91, 922-928, 2001.

OKUBO, T.; YOKOYAMA, Y.; KANO, K., KANO, I. ER-dependent estrogenic activity of parabens assessed by proliferation of human breast cancer MCF-7 cells and expression of ER α and PR. **Food and chemical toxicology**, v.39, p.1225-1232, 2001.

PEDERSEN, K.L.; PEDERSEN, S.N.; CHRISTIANSEN, L.B.; KORSGAARD, B.; BJERREGAARD, P. The Preservatives Ethyl-, Propyl- and Butylparaben are Oestrogenic in an *in vivo* Fish Assay. **Pharmacology & Toxicology**, v.86, p. 110–113, 2000.

PETRUCI, J.F.S.; CARDOSO, A. A.; PEREIRA, E. A. Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de benzoato, sorbato, metil e propilparabenos em produtos alimentícios utilizando a eletroforese capilar. **Química Nova**, v.10, p.2-5, 2011.

PINDER, L.C.V. Biology of freshwater Chironomidae. **Ann. Rev. Entomol.**, v.31, p.1-23, 1986.

POLLINO, C.A.; BARRY, T.H.; BOLTON, B.R. Modelling Ecological Risks from Mining Activities in a Tropical System. **Australasian Journal of Ecotoxicology**, v.14 (2/3), p.119-128, 2008.

PRIETO, M.; CRUZ, L.; MORALES, M. Cultivo experimental del Cladocero *Moina* sp alimentado com *Ankistrodesmus* sp y *Saccharomyces cerevisiae*. **Rev. MVZ Córdoba**, v.11 (1), p.705-714, 2006.

PRUSAKIEWICZ, J.J.; HARVILLE, H.M.; ZHANG, Y.; ACKERMANN, C.; VOORMAN, R.L. Parabens inhibit human skin estrogen sulfotransferase activity: possible link to paraben estrogenic effects. **Toxicology**, v.3, p.248–256, 2007.

QUINN, B.; GAGNE F.; BLAISE C. Validation of a multi-well plate toxicity test to assess feeding behaviour of the cnidarian, *Hydra attenuata*. **Fresenius Environ. Bull.**, v.16 (9a), p.1100–7, 2007.

QUINN, B.; GAGNÉ, F.; BLAISE, C. *Hydra*, a model system for environmental studies. **International Journal of Developmental Biology**, v. 56, p.613 – 625, 2012.

RAMASWAMY, B.R.; SHANMUGAM, G.; VELU, G.; RENGARAJAN, B.; LARSSON, J. GC–MS analysis and ecotoxicological risk assessment of triclosan, carbamazepine and parabens in Indian rivers. **Journal of Hazardous Materials** , v.186, p.1586–1593, 2011.

RAND, G.M. **Fundamental Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment**, 2a ed. Taylor & Francis: USA, cap 31, 1995.

RAND, P.S.; STEWART, D.J.; LANTRY, B.F.; RUNDSTAM, L.G. JOHANSSON, O.E. GOYKE, A.P. BRANDT, S.B.; GORMAN, R.; ECK, G.W. Effect of lake-wide planktivory by the pelagic communit in lakes Ontario and Michigan. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, v.52, p.1546-1563, 1995.

ROUTLEDGE, E.J.; PARKER, J.; ODUM, J.; ASHBY, J.; SUMPTER, J.P. Some alkyl hydroxybenoate preservatives (parabens) are estrogenic. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.153, p.12–19, 1998.

RUPPERT, E.E.; FOX, R.S.; BARNES, R.D. **Zoologia dos invertebrados**. 6ªEd.São Paulo, Roca, 1996.

SHIRAI, S.; SUZUKI, Y.; YOSHINAGA, J.; SHIRAISHI, H.; MIZUMOTO, Y. Urinary Excretion of Parabens in Pregnant Japanese Women. **Reproductive Toxicology**, v.35, p. 96–101, 2013.

SONI, M.G.; BURDOCK, G.A.; TAYLOR, S.L.; GREENBERG, N.A. Safety assessment of propyl paraben: a review of the published literature. **Food Chemistry Toxicology**, v.39, p.513-532, 2001.

SONI, M.G.; BURDOCK, G.A.; TAYLOR, S.L.; GREENBERG, N.A. Safety assessment of propyl paraben: a review of the published literature. **Food Chemistry Toxicology**, v. 39, p. 513-532, 2005.

SUBERKROPP, K. Microorganisms and organic matter decomposition. In: **River Ecology and Management: Lessons From the Pacific Coastal Ecoregion**, Naiman R.J. & Bilby R.E. (Eds), p. 120–143. Springer, New York, 1998.

TAVARES, R.S., MARTINS, F.C., OLIVEIRA, P.J., RAMALHO-SANTOS, J., PEIXOTO, F.P. Parabens in male infertility—Is there a mitochondrial connection? **Reproductive Toxicology**, v. 27, p.1–7, 2009.

TERASAKI, M.; MAKINO, M.; TATARAZAKO, N. Acute toxicity of parabéns and their chlorinated by-products with *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri* bioassays. **Journal of Applied Toxicology**, v.29, p. 242-247, 2009.

TERASAKI, M.; TAKEMURA, Y.; MAKINO, M. Paraben-chlorinated derivatives in river waters. **Environmental Chemistry Letters**, v.10, p.401–406, 2012.

TROTTIER, S., BLAISE, C., KUSUI, T. and JOHNSON, E. M. Acute toxicity assessment of aqueous samples using a microplate-based *Hydra attenuata* assay. **Environ Toxicol Water Qual** v.12, p.265-271, 1997.

US FDA. United States Food and Drug Administration. 2016. Department of health and human services. **Cosmetics: Parabens in cosmetics**. Acesso em: 20/12/2016.
<https://www.fda.gov/Cosmetics/ProductsIngredients/Ingredients/ucm128042.htm>

VAN DEN BRINK, P.J.; BLAKE, N.; BROCK, T.C.M.; MALTBY, L. Predictive value of species sensitivity distributions for effects of herbicides in freshwater ecosystems. **Hum. Ecol. Risk Assess.**, v.12, p.645-674, 2006.

VAN STRAALLEN, N.M.; VAN RIJN, J.P. Ecotoxicological risk assessment of soil fauna recovery from pesticide application. **Review of Environmental Contamination and Toxicology**, v.154, p.85–141, 1998.

VERLICCHI, P.; GALLETTI, A.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Hospital effluents as a source of emerging pollutants: An overview of micropollutants and sustainable treatment options. **Journal of Hydrology**, v. 389, p. 416–428, 2010.

VIGHI, M.; ALTENBURGER, R.; ARRHENIUS, A. BACKHAUS, T. BODEKER, W.; BLANCK, H.; CONSOLARO, F.; FAUST, M.; FINIZIO, A.; FROEHNER, K.; GRAMATICA, P.; GRIMME, L.H. GRONVALL, F.; HAMER, V. SCHOLZE, M.; WALTER, H. Water quality objectives for mixtures of toxic chemicals: problems and perspectives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.54, p.139–150, 2003.

VO, T.T.B.; YOO, Y.M.; CHOI, K.C.; JEUNG, E.B. Potential estrogenic effect(s) of parabens at the prepubertal stage of a postnatal female rat model. **Reproductive Toxicology**, v.29, p.306–316, 2010.

WADE, A.; WELLER, P.J. Eds. Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2nd ed.; American Pharmaceutical Association: Washington, DC, 1994; p 49-51, 191-193, 310-313, 411-414.

WATKINS, D.J.; FERGUSON, K.K.; DEL TORO, L.V.A.; ALSHAWABKEH, A.N.; CORDERO, J.F.; MEEKER, J.D. Associations between urinary phenol and paraben concentrations and markers of oxidative stress and inflammation among pregnant women in Puerto Rico. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v.218, p.212–219, 2015.

WEBSTER, J. Experiments with Spores of Aquatic Hyphomycetes: I. Sedimentation, and Impaction on Smooth Surfaces. **Ann. Bot.**, v. 23 (4), p. 595-611, 1959.

WEBSTER, J.; WEBER, J. **Introduction to fungi**. Third edition. Cambridge University Press, 841 p. 2007.

WHEELER, J.R.; GRIST, E.P.M.; LEUNG, K.M.Y.; MORRITT, D.; CRANE, M. Species sensitivity distributions: data and model choice. **Marine Pollution Bulletin**, v.45, p.192–202, 2002.

WILKINSON, J.L.; HOODA, P.S.; BARKER, J.; BARTON, S.; SWINDEN, J. Ecotoxic pharmaceuticals, personal care products, and other emerging contaminants: A review of environmental, receptor-mediated, developmental, and epigenetic toxicity with discussion of proposed toxicity to humans. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**. v.46 (4), p.336-38, 2016.

WIPFLI, M.S.; RICHARDSON, J.S.; NAIMAN, R.J. Ecological linkages between headwaters and downstream ecosystems: transport of organic matter, invertebrates, and wood down headwater channels. *Journal of the American Water Resources Association*, v.43, p.72-85, 2007.

WOGRAM, J.; LIESS, M. Rank Ordering of Macroinvertebrate Species Sensitivity to Toxic Compounds by Comparison with That of *Daphnia magna*. **Environmental Contamination and Toxicology**, v. 67, p. 360–367, 2001.

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

YE, X.; BISHOP, A.M.; REIDY, J.A.; NEEDHAM, L.L.; CALAFAT, A.M. Temporal stability of the conjugated species of bisphenol A, parabens, and other environmental phenols in human urine. **Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology**, v.17, p.567–572, 2007.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. 2^a Edição, São Carlos: Editora Rima, 486 p, 2008.

Capítulo 3: Avaliação do risco ambiental para os conservantes metilparabeno e propilparabeno: uma comparação de sensibilidade para espécies tropicais e temperadas.

Resumo

As distribuições de sensibilidade de espécies são uma ferramenta preditiva importante na avaliação de risco ecológico porque essas curvas nos permitem escolher as espécies mais sensíveis para avaliações de risco ambiental. Normalmente, os dados da literatura são usados para construir SSDs, os quais em sua maioria são obtidos à partir de espécies padronizadas planctônicas de ambiente temperado. No entanto, para obter limiares de proteção adequados para as comunidades ambientais, as SSDs devem ser construídas à partir de dados ecotoxicológicos obtidos de espécies encontradas no ecossistema que deve ser protegido. Isto é particularmente verdadeiro para as espécies tropicais mas, devido à falta de dados da literatura, a construção das SSDs com espécies tropicais torna-se difícil. Assim, o objetivo do presente estudo foi elaborar SSDs utilizando-se de dados de toxicidade de espécies tropicais e compará-los com dados de sensibilidade de espécies temperadas não padronizadas e padronizadas utilizando o metilparabeno e o propilparabeno como substâncias teste. Os parabenos são compostos conservantes utilizados amplamente em PPCPs e alimentos. O metilparabeno e o propilparabeno foram selecionados porque são os conservantes mais utilizados nas formulações. Para avaliar os efeitos de toxicidade dos parabenos para a biota aquática foram realizados bioensaios laboratoriais em níveis letais e subletais. Nesse sentido, realizaram-se uma série de testes de toxicidade em espécies de invertebrados tropicais: *Ceriodaphnia silvestrii*, *Macrothrix flabelligera*, *Chironomus xanthus* e *Hydra viridissima*, além de um invertebrado de clima temperado, *Hydra attenuata*, sendo as espécies pertencentes a grupos taxonômicos e funcionais-chave, iguais ou similares aquelas para as quais já foram testadas de clima temperado. Para ambos os compostos, *C. silvestrii* e *M. flabelligera* foram as espécies mais sensíveis: *C. silvestrii* (MeP, $CE_{50}=7,56 \text{ mgL}^{-1}$ e PrP, $CE_{50}=2,90 \text{ mgL}^{-1}$) e *M. flabelligera* (MeP, $CE_{50}=8,04 \text{ mgL}^{-1}$ e PrP, $CE_{50}=3,85 \text{ mgL}^{-1}$). De posse desses resultados, fizemos a comparação de sensibilidade entre as espécies de ambiente tropical e temperado. Assim, através da construção da curva de Distribuição de Sensibilidade de Espécies (SSDs), ficou evidente a importância do uso de espécies nativas tropicais no monitoramento ecotoxicológico e dessa forma foi feita uma avaliação preliminar de risco ecológico para metilparabeno e propilparabeno.

Palavras-chave: Toxicidade de parabenos; Distribuição de sensibilidade de espécies; Ensaios de curta duração; Espécies tropicais.

3.1. Introdução

Fármacos e produtos de cuidados pessoais (PPCPs) formam uma grande família de produtos utilizados na saúde, na higiene pessoal e nos cosméticos, os quais são usados diariamente por pessoas ao redor do mundo. Dentro desse grupo, podemos considerar como pertencentes ao grupo dos produtos de cuidado pessoal: desinfetantes (triclosan), fragrâncias (almíscares), repelentes de insetos, conservantes (parabenos) e filtros UV (benzofenona) sendo todos esses compostos de uso externo e conhecidos por serem nomeadamente seguros para uso (BRAUSCH e RAND, 2011; HAN et al., 2016).

Parabenos (PBs) são ésteres de ácido p-hidroxibenzóico utilizados como conservantes antimicrobianos e antifúngicos em fórmulas de PPCPs e alimentos porque são eficazes, são baratos e são estáveis em uma ampla faixa de pH (ELDER, 1984; SONI et al., 2005; HAN et al., 2016). Dado que as concentrações de parabenos diferem regionalmente nas matrizes ambientais, para tanto são necessárias mais informações sobre a exposição de organismos aquáticos para determinar se os parabenos podem oferecer ou não risco para a biota aquática (DOBBINS et al., 2009), além disso a segurança no uso do metilparabeno (MeP) e o propilparabeno (PrP) ainda é controversa.

Devido ao seu uso extensivo nas atividades humanas diárias, os PBs são continuamente introduzidos no ambiente (BAZIN et al., 2010; TERAZAKI et al., 2012), sendo o MeP e PrP os parabenos mais frequentemente encontrados nas matrizes ambientais, uma vez que esses dois PBs são os mais utilizados individualmente e em conjunto nas formulações (SONI et al., 2005; ALBERO et al., 2012), com produção e / ou importação de MeP na União Européia variando entre 1.000 a 10.000 ton / ano e volumes de produção e/ou importação de PrP variando entre 10 e 1.000 ton / ano de acordo com o Sistema Europeu de Informações sobre Substâncias Químicas (ESIS) (SDSC, 2013).

Nas formulações de PPCPs, os PBs são utilizados em concentrações relativamente baixas; na EU, a concentração total máxima de MeP ou EtP é de 0,4% , 0,14% para PrP ou BuP e 0,8% para misturas (EU, 2014a, 2014b), segundo a legislação atualmente vigente no bloco europeu, o PrP e BuP não podem ser utilizados em produtos para crianças com menos de três anos de idade e bem como nas áreas cobertas pelas fraldas (UE, 2014b; SCCS, 2014). Também na EU, a dose diária aceitável de parabenos em alimentos é de 0 a 10 miligramas / kg de peso corporal (mg / kg de peso corporal) para MeP e EtP (EFSA, 2004), e esses são os únicos PBs autorizados como aditivos alimentares e apenas para aplicações (por exemplo, em

produtos de confeitaria, em tratamento de superfície de produtos cárneos secos, ou em petiscos à base de batata e ou em nozes revestidas). O PrP costumava ser também permitido, mas devido aos potenciais efeitos estrogênicos foi proibido para uso como aditivo alimentar no bloco europeu (DANISH EPA, 2013). Já os demais PBs: BeP, i-PrP, i-BuP, PeP e PhP foram todos proibidos para quaisquer usos na EU (EU, 2014a).

Outras agências também estabeleceram limites para o uso de PBs em produtos: i) A Agência de Proteção Ambiental dinamarquesa em 2011 proibiu o uso de PrP, BuP, i-PrP, e i-BuP em produtos infantis (<três anos) e os parâmetros da normativa da EU deve ser adotados em relação ao MeP e EtP, enquanto para PrP e BuP a concentração máxima admissível nos demais usos é de 0,14%. (DANISH EPA, 2013), ii) a Agência de controle de alimentos e medicamentos dos Estados Unidos (US FDA) considera que a utilização de PBs como conservantes em cosméticos é segura, mas estabelece limites quando PBs são utilizados em alimentos, com a concentração limite de 0,1% e o limite de ingestão diária é de 0 a 10 mg / kg de peso corporal, iii) o Canadá adotou os limites estabelecidos pelo US FDA (CIR, 2012; HC, 2016; US FDA, 2016), e iv) no Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária proíbe o uso de PrP nos alimentos, permitindo, entretanto, o uso de MeP e EtP sem estabelecer valores de referência (ANVISA, 2008, 2014).

Devido ao seu uso extensivo através das atividades humanas da vida diária, os PBs são continuamente introduzidos nas águas (KASPRZYK-HORDERN et al., 2009; GALINARO et al., 2015), sedimentos (GORGA et al., 2015), ar (RUDEL et al., 2003, 2010) e poeira (RUDEL et al., 2003). MeP, EtP, PrP e BuP foram detectados em amostras de água na gama de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$, e mais recentemente também em sedimentos e solos dentro da gama de ng até $\mu\text{g kg}^{-1}$ (HAMAN et al., 2015). As maiores concentrações foram observadas em águas superficiais para MeP, EtP, PrP e BuP (8,0, 5,8, 13,1 e 15,1 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente) (GALINARO et al., 2015) e em sedimentos de rio para MeP, EtP e PrP (435, 2,7, 51 ng g^{-1} , respectivamente) (GORGA et al., 2015). Devido à sua liberação contínua das águas de recreio, bem como dos efluentes domésticos e industriais (HAMAN et al., 2015), os PBs foram detectados em estações de tratamento de águas residuais (KASPRZYK-HORDERN et al., 2009; WANG e KANNAN, 2016) e sedimento (LI et al., 2015; WANG e KANNAN, 2016). As maiores concentrações de PBs medidas no influente e no efluente do WWTPS foram para MeP, com valores de 2,4 a 0,13 $\mu\text{g L}^{-1}$, PrP dentro do intervalo de 5,7 a 0,08 $\mu\text{g L}^{-1}$ e BuP de 1,6 até o limite de quantificação (LOQ) (de 5,1 a 26,6 ng g^{-1} de peso seco) e PrP

(de 5,6 a 44,1 ng g⁻¹ de peso seco) (ALBERO et al., 2012). Embora os PBs possam ser degradados em ETA convencionais, são frequentemente detectados em baixas concentrações em águas superficiais (GONZÁLES-MARIÑO et al., 2011; SUN et al., 2014).

A liberação constante de PBs no meio ambiente, particularmente nas águas residuais domésticas e industriais, é uma preocupação crescente de que os efeitos em longo prazo dessa exposição possam resultar em perdas de biodiversidade (TERASAKI et al., 2012, 2013; LI et al., 2015, 2016). Os parabenos atuam como compostos pseudo-persistentes com o potencial de bio-acumulação devido à sua natureza lipofílica (HAN et al., 2016) e por esse exposto se faz necessário avaliar a sua toxicidade para uma vasta gama de organismos, para avaliar de forma mais abrangente o risco da presença destes compostos nos ecossistemas aquáticos. Uma vez que a toxicidade dos PBs foi amplamente avaliada apenas para um pequeno grupo de organismos de regiões temperadas, *Daphnia magna* (MADSEN et al., 2001; DOBBINS et al., 2009; BAZIN et al., 2010; YAMAMOTO et al., 2011), e outros (**Tabela 4**), há uma lacuna de estudos para o desenvolvimento de estudos de risco em regiões tropicais com utilização de organismos representativos.

Dado que as concentrações de PBs diferem entre locais e que os dados de toxicidade disponíveis foram obtidos apenas para espécies de regiões temperadas (padrão), são necessárias mais informações sobre a exposição de organismos em diferentes regiões geográficas, para determinar de forma mais abrangente se os PBs representam ou não um risco para toda a biota aquática (DOBBINS et al., 2009; YAMAMOTO et al., 2011). Os ambientes aquáticos tropicais são ecologicamente diferentes dos habitats temperados quanto às propriedades físico-químicas e biológicas. Além disso, a biodiversidade nas regiões subtropicais e tropicais é geralmente mais elevada do que nas zonas temperadas, tornando também mais elevado o número de espécies potencialmente afetadas pela exposição a um poluente (KWOW et al., 2007). Os estudos que realizam avaliações de risco com espécies tropicais nativas, com valor ecológico relevante e / ou econômico são escassos, porque os dados de ecotoxicidade são escassos para estas espécies; existem, no entanto, alguns estudos a este respeito, mas foram todos realizados com pesticidas (DO HONG et al., 2004; LOPES et al., 2007; DAAM et al., 2009; DAAM e VAN DEN BRINK, 2010; DAAM e RICO, 2016).

Tabela 4 - Principais endpoints ecotoxicológicos (mg L⁻¹) presentes na literatura para os conservantes MeP e PrP obtidos em estudos de toxicidade com diferentes organismos aquáticos.

Parabeno	Espécies	Nível Trófico	Endpoint/Duração	CE ₅₀ /CL ₅₀	Média CE ₅₀	Referência
Metilparabeno	<i>V.fischeri</i>	Bacteria	Iluminesc., 15 min	9,6	7,75	(1)
	<i>V.fischeri</i>	Bacteria	Iluminesc., 15 min	5,9		(2)
	<i>P.leognathi</i>	Bacteria	Iluminesc., 15 min	31		(1)
	<i>P.subcapitata</i>	Algae	Cresc., 72 h	CE ₅₀ : 91	85,8	(3)
	<i>P.subcapitata</i>	Algae	Cresc., 72h	CE ₅₀ : 80		(4)
	<i>T.thermophila</i>	Protozoa	Cresc., 24h	54		(1)
	<i>D.magna</i>	Cladocera	Mobilid., 48h	11,2	30,5	(3)
	<i>D.magna</i>	Cladocera	Mobilid., 48h	21,0		(1)
	<i>D.magna</i>	Cladocera	Mobilid., 48h	62,0		(2)
	<i>D.magna</i>	Cladocera	Mobilid., 48h	24,6		(5)
	<i>D.magna</i>	Cladocera	Mobilid., 48h	34,0		(4)
	<i>D.japonica</i>	Plathielm.	Mobilid., 48h	CL50: 77		(6)
	<i>P.promelas</i>	Pisces	Mortalid., 48h	<160		(5)
Propilparabeno	<i>O.latipes</i>	Pisces	Mortalid., 96h	CL:63		(4)
	<i>V.fischeri</i>	Bacteria	Iluminesc., 15 min	2,55	1,4	(1)
	<i>V.fischeri</i>	Bacteria	Iluminesc., 15 min	0,26		(2)
	<i>P.leognathi</i>	Bacteria	Iluminesc., 15 min	21		(1)
	<i>P.subcapitata</i>	Algae	Cresc., 72 h	15	18,6	(3)
	<i>T.thermophila</i>	Protozoa	Cresc., 24h	9,7		(1)
	<i>D.magna</i>	Cladocera	Mobilid., 48h	15		(3)
	<i>D.magna</i>	Cladocera	Mobilid., 48h	23		(2)
	<i>D.magna</i>	Cladocera	Mobilid., 48h	12,3		(5)
	<i>D.magna</i>	Cladocera	Mobilid., 48h	36		(4)
	<i>D.magna</i>	Cladocera	Mobilid., 48h	7		(1)
	<i>D.japonica</i>	Plathielm.	Mobilid., 48h	CL:11		(6)
	<i>P.promelas</i>	Pisces	Mortalid., 48h	9,7		(5)
	<i>O.latipes</i>	Pisces	Mortalid., 96h	4,9		(4)

Fonte: (1) Bazin et al., (2010); (2) Terasaki et al., (2008); (3) Madsen et al., (2001); (4) Yamamoto et al., (2011); (5) Dobbins et al., (2009); (6) Mei-Hui, (2012). Onde, Cresc.: Crescimento; Iluminesc.: Iluminescência; Mobilidad.: Mobilidade; Mortalid.: Mortalidade.

Dada a ausência de dados de ecotoxicidade em PBs para organismos subtropicais / tropicais, o principal objetivo do presente estudo foi avaliar a sensibilidade de quatro invertebrados não-alvos, de água doce tropical e um de região temperada, pertencentes a grupos taxonômicos e funcionais chave, aos dois mais utilizados PBs ambientalmente detectados (MeP e PrP). Além disso, o presente estudo pretendeu realizar comparações de sensibilidade entre PBs, não somente os dois PBs selecionados, mas também entre espécies de regiões tropicais (dados obtidos no presente estudo) e temperadas (dados disponíveis na

literatura aberta, com uma exceção que foi testada também no presente estudo), para considerar se o uso exclusivo de espécies de regiões temperadas e padronizadas em avaliações de efeito protege suficientemente a biota aquática. As comparações de sensibilidade foram realizadas utilizando a abordagem de distribuição de sensibilidade de espécies (SSD), que modela a variação na sensibilidade de um grupo de espécies estabelecendo uma comunidade empírica, utilizando a relação entre a proporção de espécies afetadas, com base em um parâmetro de toxicidade comum no caso do presente estudo, quer como concentração mediana efectiva para letalidade (CL50) quer para luminescência e alimentação após exposição em curto prazo (CE50) - em função da concentração estressante; A distribuição de SSD também permite prever a concentração perigosa que afeta 5% das espécies na comunidade simulada (HC5, o valor mais conservador adotado na comunidade científica) e respectivos limites de confiança de 95% (NEWMAN et al., 2000). No presente estudo, testes de toxicidade com cinco organismos aquáticos não-alvo, quatro tropicais (dois cladóceros, um cnidário e um inseto) e uma espécie temperada (cnidário, uma vez que não foram ainda realizados testes sobre o efeito dos PBs sobre este grupo de espécies).

3.2. Materiais e métodos

3.2.1. Substâncias testadas e concentrações

Os padrões do MeP e PrP foram adquiridos da Sigma-Aldrich, pureza >99,5%. No preparo das soluções foi utilizado ultrassom para facilitar a diluição dos parabenos. Foram usados solventes de grau analítico: metanol (CH₃OH, 99,9%) Panreac Química S.L.U (Barcelona, Espanha) e ácido acético glacial (CH₃COOH, 99,7%), Synth (Diadema, Brazil). Todos os demais reagentes possuíam grau analítico. A água utilizada foi previamente destilada e deionizada usando o sistema Milli-Q Millipore (Millipore, Bedford, MA, USA).

As concentrações nominais para os testes ecotoxicológicos foram selecionadas a partir de pré-testes. Para confirmar as concentrações nominais iniciais utilizadas nos ensaios, as soluções-teste foram analisadas em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (LC-DAD) (Agilent Technologies series 1200, Waldbronn, Alemanha). As condições cromatográficas de análise foram: coluna C18 Zorbax ODS (250mm × 4,6mm × 5µm) (Agilent Technologies, USA) e temperatura de forno de 25°C. A fase móvel isocrática utilizada foi metanol: solução de ácido acético (1%) em água Milli-Q

(65:35, v/v) durante 9 minutos, seguido de *post time* de 2 minutos, com volume de injeção de 20 µL e taxa de fluxo de 1,0 mL min⁻¹. As análises foram realizadas em triplicatas segundo a metodologia validada por Galinaro et al., 2015.

Determinação do pH (pHmetro: Micronal B374), condutividade elétrica (medidor de condutividade: Orion 145A), oxigênio dissolvido (medidor OD: YSI) e dureza (titulação EDTA-APHA (1999) foram realizados no início e no final dos testes ecotoxicológicos.

3.3. Cultivo e manutenção dos organismos teste

3.3.1. *Ceriodaphnia silvestrii* e *Macrothrix flabelligera*

Cultivos de *Ceriodaphnia silvestrii* são mantidos no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática na Universidade Federal de São Carlos há mais de 15 anos e culturas da espécie *Macrothrix flabelligera* são mantidas no mesmo laboratório por pelo menos três anos. Os cultivos dos organismos foram estabelecidos de acordo com as normas padronizadas (ABNT, 2004; ABNT, 2005).

Os indivíduos foram mantidos em água reconstituída (ASTM, 2001; Freitas e Rocha, 2011) em béqueres de 2 litros, com uma densidade máxima de 140 indivíduos por béquer. A renovação da água e o fornecimento do alimento foram feitos três vezes por semana. Os organismos foram mantidos com controle de temperatura (25 ±2°C) e com fotoperíodo controlado de 16h (luz) e 8h (escuro).

As culturas foram renovadas periodicamente com organismos recém-nascidos (neonatos <24h) provenientes das 3^o e 5^o ninhadas. A alimentação dos organismos foi feita a partir de uma suspensão algal de *Pseudokirchneriella subcapitata*, cultivada em meio L.C.Oligo a uma concentração final de 10⁵ células L⁻¹. Além da alga, foi fornecido um alimento composto (levedura e ração de peixe fermentada na proporção de 1:1) na concentração de 1 mL L⁻¹, conforme descrito na norma ABNT (2005).

3.3.2. *Chironomus xanthus*

Os cultivos foram mantidos no Laboratório do Núcleo de Estudos de Ecossistemas Aquáticos da Universidade de São Paulo, localizado no Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada (Itirapina, SP).

Os organismos foram mantidos em água reconstituída ou meio ASTM (ASTM, 2001; OECD, 2004; OECD, 2008). Os indivíduos de *Chironomus xanthus* foram colocados em bandejas plásticas (45x35x7 cm) e recobertos por gaiolas de nylon para impedir a saída dos adultos emergentes. No início da cultura foram colocadas 200 larvas no I instar na bandeja, obtidas a partir de desovas eclodidas em placas de Petri. Para a montagem das bandejas foi colocado 2 kg de sedimento controle (areia IPT 100, diâmetro da partícula < 0,15mm, previamente calcinado em mufla, 550°C por 3 horas) e quatro litros de água de manutenção (pH 6,5 – 7,5 e dureza 12 -16 mg de CaCO₃L⁻¹), sendo o cultivo mantido em aeração constante, em sala com temperatura controlada (25±2°C) com fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro.

As larvas foram alimentadas inicialmente, com solução algal de *Pseudokirchneriella subcapitata*, cultivada em meio L.C.Oligo, na concentração de 10⁵ células/mL e ração para peixes TetraMin[®] triturada na proporção de 0,04 mg L⁻¹ de água, e posteriormente, foi mantida a alimentação três vezes por semana apenas com a ração, na proporção já mencionada. As condições de cultivo e teste seguiram as determinações internacionais para *Chironomidae* (OECD, 2001a; OECD, 2001b; FONSECA e ROCHA, 2004).

3.3.3. *Hydra attenuata* e *Hydra viridissima*

Os cultivos de *Hydra attenuata* e *Hydra viridissima* (Apêndice, **Figura A1**) foram mantidos na Universidade de Coimbra - Portugal, no laboratório de Ecotoxicologia por pelo menos quatro anos.

Os organismos foram cultivados em cristalizadores de vidro com volume 150 mL de meio de cultivo para hidras (TROTIER et al., 1997), sob temperatura de 20±2°C e fotoperíodo de 12 horas (luz) e 12 horas (escuro). As condições de cultivo e alimentação de *Hydra attenuata* foram estabelecidas de forma semelhante às de *Hydra viridissima*, com diferença apenas na dureza do meio: *H. attenuata* (60 a 120 mg L⁻¹ of CaCO₃) e *H. viridissima* (40 a 48 mg L⁻¹ of CaCO₃).

Os organismos de *H. viridissima* e *H. attenuata* foram alimentados com náuplios de *Artemia franciscana*. Os cistos eram mantidos congelados (-4°C), colocados em solução salina (20 g L⁻¹ de NaCl) e mantidos sob iluminação (aproximadamente 3000lux) e aeração constante por 24 horas para eclosão dos cistos (TROTIER et al., 1997; QUINN et al., 2006)

(Apêndice, **Figura A2**). Os organismos de *H.viridissima* e *H.attenuata* foram alimentados com auxílio de pipeta Pasteur, após um período de 2 horas do fornecimento do alimento, o meio era renovado para retirada do excesso de alimento, excretas e exoesqueletos, sendo o procedimento repetido após 2 horas.

A alimentação das culturas era feita três vezes na semana e a renovação era feita uma vez na semana. Os organismos utilizados nos testes não eram alimentados 24h antes do início dos testes.

3.4. Testes de toxicidade

Os testes de toxicidade foram feitos para avaliar a toxicidade dos conservantes MeP e PrP em relação aos organismos: *Chironomus xanthus*, *Ceriodaphnia silvestrii*, *Macrothrix flabelligera*, *Hydra viridissima* e *Hydra attenuata*. Os testes de toxicidade foram feitos de acordo com os protocolos (OECD, 2001a; OECD, 2001b; FONSECA e ROCHA, 2004; ABNT, 2004; ABNT, 2005; TROTTIER et al, 1997; QUINN et al., 2007; QUINN et al., 2012) sob as mesmas condições estabelecidas para os cultivos.

3.4.1. *Ceriodaphnia silvestrii* e *Macrothrix flabelligera*

Neonatos (<24 h de idade) de *C. silvestrii* e *M. flabelligera*, foram expostos em testes de toxicidade aguda de 48 horas de duração (ABNT, 2004). Cada espécie foi exposta a seis concentrações de cada parabeno mais um controle (contendo apenas o meio de cultura). Utilizou-se um controle adicional (meio de cultura mais etanol) uma vez que as soluções-mãe (MeP: 10 g L⁻¹ e PrP: 4 g L⁻¹) foram preparadas com etanol e assim foi necessário determinar um possível efeito do etanol na sobrevivência dos organismos. A quantidade máxima de solvente adicionado nas concentrações testadas foi sempre igual a 0,1% (v / v), o que não causou efeitos tóxicos em testes preliminares (dados não apresentados aqui). A gama de concentrações de MeP foi: 0, 4,0; 6,0; 9,0; 13,5; 20,3 e 30,4 mg L⁻¹ para *C. silvestrii* e 0; 10,1; 12,9; 14,7; 17,9; 23,4 e 30,4 mg L⁻¹ para *M. flabelligera*. Para PrP, o intervalo de concentrações foi de 0; 1,0; 1,5; 2,25; 3,37; 5,10 e 7,60 mg L⁻¹ para *C. silvestrii* e 0; 4,06; 4,70; 5,10; 5,60; 6,75; 8,10 mg L⁻¹ para *M. flabelligera*. Cada repetição continha cinco organismos e 10 mL de solução de teste. Os organismos não foram alimentados durante o

teste. Após o período de exposição de 48 horas, foi feita a contagem do número de organismos imóveis para avaliar a mortalidade.

3.4.2. *Chironomus xanthus*

Com o inseto *C. xanthus* foram realizados ensaios de toxicidade letal de 96 h com larvas de terceiro e quarto ínstar, seguindo os procedimentos descritos na OCDE (2004). As larvas foram expostas a seis concentrações de MeP (0; 10,1; 12,9; 14,7; 17,3; 23,4 e 30,4 mg L⁻¹) e de PrP (0; 4; 4,7; 5,1; 5,6; 6,7 e 8,1 mg L⁻¹) mais um controle (apenas meio de cultura). Adicionou-se um controle de solvente seguindo exatamente os mesmos procedimentos descritos acima para os cladóceros. Foram preparadas três repetições por solução de ensaio, contendo cada uma seis larvas, 60 g de sedimento e 240 ml da solução de ensaio; embora o desenho fosse de um teste de toxicidade com água, o sedimento foi adicionado para diminuir o estresse dos organismos. Os organismos foram alimentados, tal como descrito anteriormente para culturas estoque, apenas no momento anterior ao ensaio estabelecido, e mantido durante todo o ensaio sem alimentação e sem arejamento. O teste foi incubado sob as mesmas condições que os cultivos-estoque. Após o período de exposição de 96 h, o número de organismos mortos foi contabilizado.

3.4.3. *Hydra viridissima* e *Hydra attenuata*

Para as espécies de *H. attenuata* e *H. viridissima* foram realizados testes de alimentação pós-exposição de 48 horas de acordo com as adaptações dos procedimentos para testes de toxicidade com hidras (TROTIER et al., 1997; QUINN et al., 2007, 2012). Foi estabelecido um intervalo de 10 concentrações mais um controle para cada teste de toxicidade (água reconstituída moderadamente dura, ASTM, 2002). Para o MeP, as concentrações utilizadas foram: 0; 5,2; 7,8; 11,7; 17,6; 26,3; 39,5; 59,3; 88,9; 133 e 200 mg L⁻¹ tanto para *H. attenuata* como para *H. viridissima*. Para o PrP, para ambas as espécies de hidrantes as concentrações testadas foram: 0; 3,7; 5,2; 7,8; 11,7; 17,6; 26,3; 39,5; 59,3; 88,9; 133 e 200 mg L⁻¹. Os testes de toxicidade foram realizados em placas de 24 poços, com 12 poços replicados para o controle e 10 para cada concentração de parabeno.

Cada poço foi preenchido com 2 ml de solução de teste e um organismo, os testes foram incubados sob a mesma temperatura e condições de luz que as culturas de reserva. No

final do período de exposição de 48 h, a ocorrência alterações morfológicas foi verificada sob microscópio estereoscópico, seguindo uma classificação de cinco níveis (BLAISE e KUSUI, 1997; TROTTIER et al., 1997). Foram utilizados organismos com deformidades não letais (pontuações 1, 2 e 3) para a quantificação da alimentação pós-exposição (já as pontuações 4 e 5 são dadas para organismos mortos) (**Figura 10**). Os organismos sobreviventes foram imediatamente alimentados com 10 nauplios vivos de primeiro instar de *A. franciscana*, deixados para alimentar durante 30 min, 19 a 21 ° C na escuridão. No final do período de alimentação, o número de nauplios não ingeridos foi contado e utilizado para o cálculo das taxas de alimentação (nauplios / hidra / 30 min) (Apêndice, **Figura A3**). Embora a alimentação tenha sido realizada nas soluções de teste, foi possível verificar que no final do curto período de 30 minutos de alimentação os nauplios ainda estavam vivos e, portanto, acessíveis para serem consumidos.

3.5. Análises estatísticas

Determinar quais os dados de toxicidade aguda mais adequados para a avaliação do risco dos dois PBs selecionados para organismos aquáticos em diferentes regiões geográficas, as curvas SSD foram construídas usando todos os dados de toxicidade aguda disponíveis para uma comunidade empírica composta dos principais grupos taxonômicos, a saber, bactérias, algas, invertebrados e vertebrados juntos na mesma curva de SSD. Quando mais que um valor de toxicidade aguda estava disponível para a mesma espécie, calculou-se a média, para ser utilizada na SSD e ou quando estava disponível um parâmetro mais sensível (sendo então utilizado). Todos os valores de toxicidade recuperados de estudos anteriores são apresentados na Tabela 3, enquanto que os valores de toxicidade obtidos no presente estudo são apresentados a seguir na seção Resultados. As curvas de SSD são geralmente baseadas numa distribuição de regressão log-normal, onde são utilizados dados de espécies padrão bem como outras espécies não padronizadas. A vantagem proporcionada pelo uso dessas curvas é a redução da incerteza na análise ecológica, uma vez que um maior número de espécies testadas fornece uma amostra mais representativa das espécies que podem existir nos ecossistemas (MALTBY et al., 2009). As curvas SSD podem ser usadas tanto na avaliação prospectiva como retrospectiva de risco.

Prospectivamente, obtemos um valor de concentração (concentração de risco) que afeta uma fração (x%) da espécie, o HCx, (protegendo assim a fração de 100 %); geralmente

o HC5 está determinado a proteger 95% das taxa presentes nesse ambiente. As curvas SSD retrospectivamente permitem prever a fração potencialmente afetada (PAF) do conjunto de espécies em uma dada concentração de composto (MALTBY et al., 2005; BROCK e VAN WIJNGAARDEN, 2012). As curvas SSD foram traçadas com o software de computador ETX 2.0 (VLAARDINGEN et al., 2004). O teste de bondade de ajuste de Anderson-Darling foi usado para avaliar se os dados estavam log-normalmente distribuídos.

3.6. Resultados

Os parâmetros físicos e químicos (pH, oxigênio dissolvido, condutividade e dureza) foram medidos no início e no final de cada teste, estando dentro das exigências estabelecidas para esses parâmetros, descritas no protocolo de testes e cultivo utilizado (ABNT, 2005). A medida do pH das soluções-teste permaneceu dentro do intervalo de 7,0 e 8,4 e não variou mais do que 1,0 unidade no decorrer do teste. Assim, as medições apresentadas são: temperatura da água das soluções-teste em todos os testes de toxicidade variou entre: 24 e 25 °C e entre 20 e 22 °C e a condutividade elétrica variou de 148,9 a 159,3 $\mu\text{S cm}^{-1}$ e de 258 a 312 $\mu\text{S cm}^{-1}$.

Após a análise das soluções de ensaio em HPLC-DAD, os resultados mostraram que as concentrações de exposição reais em todos os MeP e PrP diferem em menos de 10% das concentrações nominais.

Na Tabela 5 estão representados os resultados dos testes de toxicidade aguda, podemos verificar o potencial tóxico dos dois conservantes MeP e PrP, em termos de valores médios de EC50 (48h) para os organismos testados por nós e seus respectivos intervalos de confiança. MeP e PrP foram mais tóxicos para as espécies de cladóceros, sendo *Ceriodaphnia silvestrii* e *Macrothrix flabelligera* as espécies mais sensíveis. Os microcrustáceos apresentaram maior sensibilidade do que os organismos de maior nível trófico como Chironomídeos e Hidrozoários. Nas Figuras 11 e 12 podemos ver a comparação entre a sensibilidade dos organismos tropicais e temperados sob efeito dos conservantes MeP e PrP, em curvas de Distribuição de Sensibilidade de espécies.

Tabela 5 - Resumo dos *endpoints* avaliados para os organismos expostos aos parabenos, CE₅₀ com seus respectivos intervalos de confiança e 95% em mg L⁻¹.

Espécies	Metilparabeno	Propilparabeno
<i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	7.56 (6.58 – 8.62)	2.9 (2.48 – 3.4)
<i>Macrothrix flabelligera</i>	8.04 (6.85 – 9.31)	3.85 (3.29 – 4.6)
<i>Chironomus xanthus</i>	16.24 (15.07–17.57)	5.64 (5.37 – 5.97)
<i>Hydra attenuata</i>	morfologia:40.6(34.3– 48.2)	morfologia:24.2 (21.2 –28.0)
	alimentação: 43(24.5– 61.6)	alimentação: 13.5 (8.2 –18.7)
<i>Hydra viridissima</i>	morfologia:36.8(32.0– 42.2)	morfologia: 21.9(19.3– 24.4)
	alimentação: 25.1(18.2–32.0)	alimentação: 10.5 (9.1 –11.9)
HC5	5.91 (2.23 – 10.75)	2.02 (0.92 – 3.27)

Figura 11- Distribuição de Sensibilidade das Espécies (SSD) de organismos de diferentes grupos taxonômicos, com base nos valores de CE_{50} (mg L⁻¹) para o conservante metilparabeno. Os valores de toxicidade utilizados nesse gráfico estão elencados nas Tabelas 4 e 5 do corrente capítulo. Para os organismos que apresentam dois ou mais valores de CE_{50} , nós utilizamos a média dos CE_{50} .

Figura 12- Distribuição de Sensibilidade das Espécies (SSD) de organismos de diferentes grupos taxonômicos, com base nos valores de CE₅₀ (mg L⁻¹) para o conservante propilparabeno. Os valores de toxicidade utilizados nesse gráfico estão elencados nas Tabelas 4 e 5 do corrente capítulo. Para os organismos que apresentam dois ou mais valores de CE₅₀, nós utilizamos a média dos CE₅₀.

Ao observarmos os resultados de toxicidade dispostos na curva de SSD, as espécies tropicais *Ceriodaphnia silvestrii*, *Macrothrix flabelligera*, *Chironomus xanthus* apresentaram maior sensibilidade aos parabenos do que espécies temperadas padronizadas, como *D. magna* e *P. promelas*, tendo apenas a *V. fischeri* (bacteria) um possível organismo-alvo da ação dos parabenos junto a esse grupo apresentando uma maior toxicidade.

3.7. Discussão

Nossos resultados mostraram que os Cladocera de regiões tropicais (*C. silvestrii* e *M. flabelligera*) apresentaram maior sensibilidade ao MeP e ao PrP do que os organismos padronizados e largamente utilizados em ecotoxicologia, tais como o Cladocera de região temperada *D. magna* (DANISH EPA, 2001; DOBBINS et al, 2009; BAZIN et al., 2010) e a

alga *P.subcapitata* (DANISH EPA et al, 2001; YAMAMOTO et al, 2011). Assim, as abordagens em ecotoxicologia tropical não podem ser feitas como uma simples extensão do que foi desenvolvido em latitudes temperadas. Deve-se considerar que a diversidade de organismos nos trópicos é substancialmente maior do que nas zonas temperadas, e dessa forma o número de espécies potencialmente afetadas por qualquer contaminante também será maior. Além disso, o grau de interação das espécies é maior nos trópicos bem como os efeitos diretos / indiretos da exposição ao contaminante são de certa forma mais complexos (LACHER e GOLDSTEIN, 1997). Além disso, estudos anteriores destacaram a existência de diferenças na sensibilidade a contaminantes entre regiões temperadas e tropicais (KWOK et al., 2007; FREITAS e ROCHA, 2011a).

Como no presente estudo, as curvas SSD são geralmente usadas para reduzir a incerteza existente no processo de extrapolação dos resultados de estudos ecotoxicológicos de uma única espécie de laboratório para condições de campo multiespecíficas, uma vez que as curvas SSD incorporam mais valores de toxicidade do que apenas os valores para o padrão (MALTBY et al., 2009). Como em estudos anteriores com inseticidas e herbicidas, as curvas SSD baseadas nos grupos taxonômicos mais sensíveis podem ser usadas para determinar as concentrações de limiar (concentração de risco que afeta x% das espécies em uma comunidade, HCx), que são usadas para proteger comunidades inteiras. No presente estudo, as curvas SSD construídas para os parabenos MeP e PrP mostraram que, em geral, as espécies tropicais *C. silvestrii*, *M. flabelligera* e *C. xanthus* foram mais sensíveis que as espécies temperadas padrão, como o cladóceros *D. magna* e os peixes *P. promelas*, com exceção da bactéria *V. fischeri*, sendo esse um resultado esperado uma vez que são compostos antibacterianos e antifúngicos. Quando exposta a MeP *C. silvestrii* foi quatro vezes mais sensível do que *D. magna* e em relação à exposição a PrP, *C. silvestrii* foi seis vezes mais sensível do que *D. magna*.

A alta sensibilidade de *C. silvestrii* aos contaminantes já foi demonstrada (COELHO e ROCHA, 2010; SUEITT et al., 2015, CASALI-PEREIRA et al., 2015), enquanto a importância do uso de organismos tropicais nativos em estudos de toxicidade também foram foco em diversas pesquisas (FONSECA e ROCHA, 2004; LOPES et al., 2007; DAAM e VAN DEN BRINK, 2010; FREITAS e ROCHA, 2011, 2014; MOREIRA et al., 2014). Espécies do gênero Macrothricidae também foram apontadas como uma alternativa viável para testes de toxicidade em ambientes tropicais. *Macrothrix elegans* mostrou alta sensibilidade em comparação com outras espécies endêmicas (Araújo et al, 2008) e *M.*

flabelligera foi tão sensível quanto *C. silvestrii* a Atrazine Atanor 50 SC (MOREIRA et al., 2014).

Houve um aumento na toxicidade dos parabenos de acordo com o aumento do tamanho do radical ligado ao grupo funcional (MeP <PrP), esses resultados foram semelhantes aos observados por Yamamoto et al. (2011) e Terasaki et al. (2013). A partir da construção das SSDs, os resultados de HC5 obtidos por nós reforçam esta diferença de toxicidade entre MeP e PrP com concentrações de 5,91 e 2,02 mg L⁻¹ para MeP e PrP, respectivamente.

Embora os efeitos agudos observados no presente estudo tenham sugerido que as espécies tropicais são mais sensíveis do que as espécies temperadas, os limiares de toxicidade obtidos foram, contudo, registados a concentrações de MeP e PrP muito superiores às concentrações habitualmente encontradas no ambiente. Apesar da aparente elevada concentração ambiental dos parabenos estudados, não deve ser ignorado que os parabenos são continuamente introduzidos no ambiente e, portanto, podem causar vários problemas porque eles realmente atuam como compostos pseudo-persistentes (LI et al., 2016). Uma possível explicação para a toxicidade dos parabenos observada no presente estudo para os organismos testados é que eles atuam modificando a transição de permeabilidade mitocondrial causando apoptose mesmo a concentrações muito mais baixas (mMol comparado com mg L⁻¹) do que as avaliadas nos testes ecotoxicológicos, tal como obtido em estudos com células hepáticas de ratos (NAKAGAWA e MOLDÉUS, 1998).

Em geral, a avaliação do risco ambiental para ambientes de água doce tem usado principalmente espécies nativas da Europa ou da América do Norte (MALTBY et al., 2005), é o que se percebe no conjunto de dados disponibilizado para o presente estudo. Sendo assim, para avaliação de risco em ambientes tropicais identificamos que as espécies mais adequadas são as espécies endêmicas do ecossistema a ser avaliado (DAAM e RICO, 2016). A partir dos resultados aqui obtidos, são necessários mais experimentos para complementar as diferentes vias de contaminação e toxicidade dos parabenos: água doce, água estuarina / marinha e outros habitats mais específicos, particularmente no que se refere à exposição combinada de organismos a parabenos e cloro na água da torneira. Os parabenos são muito reativos na presença de cloro, formando compostos halogenados, que são ainda mais tóxicos e persistentes (HAMAN et al., 2015). Em particular, verificou-se também que o derivado desclorado de PrP foi o parabeno clorado mais abundante que foi detectado em níveis até 25 ng L⁻¹ (TERASAKI et al., 2012). É, portanto, necessário obter mais informações sobre a

toxicidade dos parabenos e suas concentrações ambientais para melhorar os estudos de avaliação de risco e as decisões ambientais resultantes para estes grupos de compostos, que são continuamente introduzidos no ambiente (BAZIN et al., 2010). Estudos sobre a toxicidade e avaliação de risco de parabenos, com foco em espécies em regiões subtropicais / tropicais são muito necessários para uma melhor compreensão dos efeitos mundiais de parabenos.

3.8. Conclusões

Os organismos não padronizados e tropicais mostraram-se mais sensíveis aos efeitos agudos dos parabenos do que os organismos de ambiente temperado e os testes de alimentação avaliados mostraram-se um endpoint ainda mais sensível do que a toxicidade. *C. silvestrii* e *M. flabelligera* mostraram-se altamente sensíveis à ambos os parabenos.

No que diz respeito a toxicidade dos PBs e ao seu risco ecológico há outros fatores importantes a considerar: esses compostos são continuamente lançados no ambiente; os mesmos são encontrados até em águas subterrâneas o que reforça sua pseudo-persistência, obtida pela introdução continua desses compostos no ambiente; os efeitos dos PBs em misturas (misturas de PBs e misturas com outros compostos) são pouco conhecidos; estudos de longa duração, a toxicidade dos compostos halogenados e a influencia do pH, dureza e condições de alimentação precisam ser avaliados.

Sendo assim, é importante ressaltar em relação aos parabenos: (1) são necessários mais estudos para avaliar a toxicidade crônica, quais são os mecanismos de desregulação endócrina e de bioacumulação ao longo da cadeia trófica, determinar quais são as concentrações e qual o destino desses compostos no ambiente; (2) ampliar os estudos para verificação de efeitos em uma variedade maior de espécies com foco em espécies nativas tropicais com concentrações de efeito mais próximas das encontradas no ambiente, com foco em estudos multigeracionais; (3) além disso, se faz necessário implementar medidas de restrição ao uso desses compostos com efeitos severos já comprovados em humanos em dosagens atualmente permitidas.

3.9. Referências

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR: 13373. **Ecotoxicologia Aquática: Toxicidade crônica**. Método de ensaio com *Ceriodaphnia* ssp. (Cladocera, Crustácea). 2005.

ALBERO, B.; PÉRES, A.R.; SÁNCHEZ-BRUNETE, C.; TADEU, J.L. 2012. Occurrence and analysis of parabens in municipal sewage sludge from wastewater treatment plants in Madrid (Spain). **J. Haz. Mater.**, v.239–240, p.48–55, 2012.

ANVISA. Brazilian National Sanitary Inspection Agency, 2008. **Resolução RDC nº 8, de 20 de fevereiro de 2008. Proíbe o uso dos aditivos Propilparabeno e Propilparabeno de Sódio em alimentos**. Available in: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/Resolucao%2BRDC%2Bn%2B8%2Bde%2B20%2Bde%2Bfevereiro%2Bde%2B2008.pdf/142521ce-fbbb-4d72-a915-0adfbaff5c41>.

ANVISA. Brazilian National Sanitary Inspection Agency, 2014. **Resolução da Diretoria Colegiada RDC Nº 53, de 07 de outubro de 2014**. Available in: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/Resolu%25C3%25A7%25C3%25A3o%2BRDC%2Bn.%2B53_2014_Lista%2Bde%2Benzimas.pdf/680b654b-2bab-4571-a498-d77dd1cec8c4

APHA, American Public Health Association. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 20th ed, 1999.

ARAÚJO, C.V.M.; COHIN-DE-PINHO, S.J.; CHASTINET, C.B.A.; DELGADO-SANTANA, F.; DA SILVA, E.M.. Potential of the tropical cladocerans *Latonopsis australis* Sars, 1888 and *Macrothrix elegans* Sars, 1901 as biomonitors of an acidic lake. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v.20 (2), p.111-118, 2008.

ASTM, American Society for Testing and Materials. **Standard guide for conducting acute toxicity tests on test materials with fishes, macroinvertebrates, and amphibians**. E 729-96. In: Annual book of ASTM standards, vol 11.05. ASTM, Philadelphia, PA, 2002.

BAZIN, I.; GADAL, A.; TOURAUD, E.; ROIG, B. **Hydroxy benzoate preservatives(parabens) in the environment: data for environmental toxicity assessment**. In: Fatta-Kassinos, D., Bester, K., Kummerer, K. (Eds.), *Xenobiotics in the Urban Water Cycle: Mass Flows, Environmental Processes, Mitigation and Treatment Strategies*. Environ. Poll. Springer, Netherlands, 2010.

BLAISE, C.; KUSUI, T. Acute toxicity assessment of industrial effluents with a microplate-based *Hydra attenuata* assay. **Environ. Toxicol. Water Qual.**, v.12, p.53–60, 1997.

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.

BROCK, T.C.M., VAN WIJNGAARDEN, R.P.A. Acute toxicity tests with *Daphnia magna*, *Americamysis bahia*, *Chironomus riparius* and *Gammarus pulex* and implications of new EU requirements for the aquatic effect assessment of insecticides. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, v.19 (8), p.3610–3618, 2012.

CASALI-PEREIRA, M.P.; DAAM, M.A.; RESENDE, J.C.; VASCONCELOS, A.M.; ESPÍNDOLA, E.L.G.; BOTTA, C.M.R.. Toxicity of Vertimec_ 18 EC (active ingredient abamectin) to the neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Chemosphere**, v.39, p.558–564, 2015.

CIR. Cosmetics Ingredients Review. **Final amended report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben, isopropylparaben, butylparaben, isobutylparaben, and benzylparaben as used in cosmetic products**, 2008. *Int. J. Toxicol.* 27(4), 1–82., 2012.

COELHO, K.S.; ROCHA, O. Assessment of the potential toxicity of a linear alkylbenzene sulfonate (LAS) to freshwater animal life by means of cladoceran bioassays. **Ecotoxicol.**, v.19, p.812–818, 2010.

DAAM, M.A.; SATAPORNVANIT, K.; VAN DEN BRINK, P.J.; NOGUEIRA, A.J. Sensitivity of macroinvertebrates to carbendazim under semi-field conditions in Thailand: implications for the use of temperate toxicity data in a tropical risk assessment of fungicides. **Chemosphere**, v.74, p.1187–1194, 2009.

DAAM, M.A.; VAN DEN BRINK, P.J. Implications of differences between temperate and tropical freshwater ecosystems for the ecological risk assessment of pesticides. **Ecotoxicol.**, v. 19 (1), p.24-37, 2010.

DAAM, M.A.; RICO, A. Freshwater shrimps as sensitive test species for the risk assessment of pesticides in the tropics. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, p.1-9, 2016. DOI: 10.1007/s11356-016-7451-1.

DANISH EPA. Danish Environment Protection Agency. Ministry of Environment, 2001. Danish Centre for Integrated Environment and Toxicology. Environmental Project No. 615, 2001. **Environmental and Health Assessment of Substances in Household Detergents and Cosmetic Detergent Products.**

DANISH EPA. Danish Environment Protection Agency. Ministry of Environment. 2013. **Survey of parabens.** Part of the LOUS - Review, Environmental Project n.1474.

DO HONG L.C.; BECKER, V.S.; TARRADELLAS, K.J. Tropical testing with *Ceriodaphnia cornuta*. **Environ. Toxicol.**, v.19, p.497–504, 2004.

DOBBINS, L.L.; USENKO, S.; BRAIN, R.A.; BROOKS, B.W. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Probabilistic Ecological Hazard Assessment of Parabens Using *Daphnia magna* and *Pimephales promelas*. **Environ. Toxicol. Chem.**, v.28 (12), p.2744–2753, 2009.

ELDER, R.L. Final report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben and buthylparaben. **J. Am. Coll of Toxicol.** 3, 147-209, 1984.

EFSA. European Food Safety Authority, 2004. **Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a Request from the Commission related to para hydroxybenzoates (E 214-219).** 83, 1-26.

EU, European Union Council Directive, 2014a. **Regulation (EC) 358/2014 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products, No 1223/2009.** April, 09.

EU, European Union Council Directive, 2014b. **Commission Regulation n. 1004/2014 amending Annex V to Regulation EC n.1223/2009 of the European Parliament and the Council on cosmetic products.** September, 18.

FONSECA, A.L.; ROCHA, O. Laboratory cultures of the native species *Chironomus xanthus* Rempel, 1939 (Diptera-Chironomidae). **Acta Limnologica Brasiliensia**, v.16 (2), p.153–161, 2004.

FREITAS, E.C; ROCHA, O. a. Acute and Chronic Toxicity of Chromium and Cadmium to the Tropical Cladoceran *Pseudosida ramosa* and the Implications for Ecotoxicological Studies. **Environ. Toxicol.**, v.29, p.176-186, 2011.

FREITAS, E.C.; ROCHA, O. b. Acute toxicity tests with the tropical cladoceran *Pseudosida ramosa*: the importance of using native species as test organisms. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v.60, p.241–249, 2011.

GALINARO, C.A.; PEREIRA, F.M.; VIEIRA, E.M. Determination of Parabens in Surface Water from Mogi Guaçu River (Sao Paulo, Brazil) Using Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Based on Low Density Solvent and LC-DAD. **J. Brazilian Chem. Soc.**, v.26 (II), p.1-9, 2015.

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

GORGA, M.; INSA, S.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Occurrence and spatial distribution of EDCs and related compounds in waters and sediments of Iberian river. **Sci. Total Environ.**, p.503–504, v.69–86, 2015.

HAMAN, C.; DAUCHY, X.; ROSIN, C.; MUNOZ, J.F. Occurrence, fate and behavior of parabens in aquatic environments: A review. **Water Res.**, v.68 (1), p.1-11, 2015.

HAN, C.; XIA, B.; CHEN, X.; SHEN, J.; MIAO, Q.; SHEN, Y. Determination of four paraben-type preservatives and three benzophenone-type ultraviolet light filters in seafoods by LC-QqLIT-MS/MS. **Food Chem.**, v.194, p.1199–1207, 2016.

HC. Health Canada, 2016. **Consumer Product Safety- Safety of Cosmetic Ingredients**. Available in: <http://www.hc-sc.gc.ca/cps-spc/cosmet-person/labelling-etiquetage/ingredients-eng.php>

KASPRZYK-HORDERN, B.; DINSDALE, R.M., GUWY, A.J. The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. **Water Res.**, v.43, p.363-380, 2009.

KWOK, K.W.H.; LEUNG, K.M.Y.; CHU, V.K.H.; LAM, P.K.S.; MORRITT, D.; MALTBY, L.; BROCK, T.C.M.; VAN DEN BRINK, P.J.; WARNE, M.St. J.; CRANE, M. Comparison of tropical and temperate freshwater species sensitivities to chemicals:

implications for deriving safe extrapolation factors. **Integr. Environ. Asses. Manag.**, v.3, p.49–67, 2007.

LACHER, T.E.; GOLDSTEIN, M.I. Tropical ecotoxicology: Status and needs. **Environ. Toxicol. Chem.**, v.16, p.100–111, 1997.

LI, W.; SHI, Y.; GAO, L.; LI, J.; CAI, Y. Occurrence, fate and risk assessment of parabens and their chlorinated derivatives in an advanced wastewater treatment plant. **J. Hazard. Mat.**, v.300, p.29–38, 2015.

LI, W.; GAO, L.; SHI, Y.; WANG, Y.; LIU, J.; CAI, Y. Spatial distribution, temporal variation and risks of parabens and their chlorinated derivatives in urban surface water in Beijing, China. **Sci. Total Environ.**, v.539, p.262–270, 2016.

LOPES, I.; MOREIRA-SANTOS, M.; SILVA, E.M.; SOUSA J.P.; GUILHERMINO, L.; SOARES, A.M.V.M.; RIBEIRO, R. In situ assays with tropical cladocerans to evaluate edge-of-field pesticide runoff toxicity. **Chemosphere**, v.67, p.2250–2256, 2007.

MALTBY, L.; BLAKE, N.; BROCK, T.C.; VAN DEN BRINK, P.J. Insecticide species sensitivity distributions: importance of test species selection and relevance to aquatic ecosystems. **Environ. Toxicol. Chem.**, v.24 (2), p.379–88, 2005.

MALTBY, L.; BROCK, T.C.; VAN DEN BRINK, P.J. Fungicide risk assessment for aquatic ecosystems: importance of interspecific variation, toxic mode of action, and exposure regime. **Environ. Sci. Technol.**, v.43 (19), p. 7556–7563, 2009.

MOLINS-DELGADO, D.; DIAZ-CRUZ, M.S.; BARCELÓ, D. Ecological risk assessment associated to the removal of endocrine-disrupting parabens and benzophenone-4 in wastewater treatment. **J. Hazard. Mat.**, v.310, p.143–151, 2016.

MOREIRA, R.A.; MANSANO, A.S.; SILVA, L.C.; ROCHA, O. A comparative study of the acute toxicity of the herbicide atrazine to cladocerans *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia silvestrii* and *Macrothrix flabelligera*. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v.26 (1), p.1–8, 2014.

NAKAGAWA, Y.; MOLDEÚS, P. Mechanism of p-Hydroxybenzoate Ester-induced Mitochondrial Dysfunction and Cytotoxicity in Isolated Rat Hepatocytes. **Biochem. Pharmacol.**, v.55, p.1907–1914, 1998.

NEWMAN, M.C.; OWNBY, D.R.; MÉZIN, L.C.A., POWELL, D.C.; CHRISTENSEN, T.R.L.; LERBERG, S.B.; ANDERSON, B.A. Applying species-sensitivity distributions in ecological risk assessment: assumptions of distribution type and sufficient numbers of species. **Environ. Toxicol. and Chem.**, v.19 (2), p.508–515, 2000.

OECD, Organization for Economic Cooperation and Development, 1998. **Report of the OECD workshop on statistical analysis of aquatic toxicity data**. OECD Series on Testing and Assessment 10, ENV/MC/CHEM(98)18. OECD, Paris, France, 133 p.

OECD, Organisation for Economic Co-operation and Development, 2004. **Guidelines for Testing of Chemicals, no. 235**. Chironomus sp. Acute immobilization.

QUINN, B.; GAGNE F.; BLAISE C. Validation of a multi-well plate toxicity test to assess feeding behaviour of the cnidarian, *Hydra attenuata*. **Fresenius Environ. Bull.**, v.16 (9a), p.1100–7, 2007.

QUINN, B.; GAGNÉ, F., Blaise, C., 2012. Hydra, a model system for environmental studies. **Intern. J. Dev. Biol.**, v.56 (6-8), p.613-25, 2012.

RUDEL, R.A.; CAMAAN, D.E.; SPLENGER, J.D.; KORN, L.R.; BRODY, J.G. Phthalates, alkylphenols, pesticides, polybrominated diphenyl ethers and others endocrine-disrupting compounds in indoor air and dust. **Environ. Sci. Technol.**, v.37(20), p.4543–4553, 2003.

RUDEL, R.A.; DODSON, R.E.; PEROVICH, L.J.; MORELLO-FROSCH, R.; CAMANN, D.E.; ZUNIGA, M.M.; YAU, A.Y.; JUST, A.C.; BRODY, J.G. Semivolatile Endocrine-Disrupting Compounds in Paired Indoor and Outdoor Air in Two Northern California Communities. **Environ. Sci. Technol.**, v.44, p.6583–6590, 2010.

SCCS. EU Scientific Committee on Consumer Safety, 2014. **COMMISSION REGULATION (EU) No 1004/2014** of 18 September 2014. Amending Annex V to Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on cosmetic product.

SDSC. 2013. **SUBSPORT Hazardous Substance Database according to SUBSPORT Screening Criteria**. Assessing: <http://www.subsport.eu/wpcontent/uploads/data/parabens.p>

SONI, M.G.; BURDOCK, G.A.; TAYLOR, S.L.; GREENBER, N.A. Safety assessment of propyl paraben: a review of the published literature. **Food Chem. Toxicol.**, v.39, p.513-532, 2005.

SUEITT, A.P.E.; YAMADA-FERRAZ, T.M.; OLIVEIRA, A.F.; BOTTA, C.M.R.; FADINI, P.S.; NASCIMENTO, M.R.L.; FARIA, B.M.; MOZETO, A.A. Ecotoxicological risks of calcium nitrate exposure to freshwater tropical organisms: Laboratory and field experiments. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.117, p.155–163, 2015.

SUN, Q.; LU, M.; HU, A.; YANG, X.; YU, C. Seasonal variation in the occurrence and removal of pharmaceuticals and personal care products in a wastewater treatment plant in Xiamen, China. **J. Hazard. Mat.**, v.277, p.69–75, 2014.

TERASAKI, M.; MAKINO, M.; TATARAZAKO, N. Acute toxicity of parabens and their chlorinated by-products with *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri* bioassays. **J. Applied Toxicol.**, v.29, p.242-247, 2008.

TERASAKI, M.; TAKEMURA, Y.; MAKINO, M. Paraben-chlorinated derivatives in river waters. **Environ. Chem. Letters.**, v.10 (4), p.401- 406, 2012.

TERASAKI, M.; ABE, R.; MAKINO, M.; TATARAZAKO, N. Chronic Toxicity of Parabens and Their Chlorinated By-Products in *Ceriodaphnia dubia*. **Environm. Toxicol.**, v.30 (6), p. 664-673, 2013.

TROTTIER, S.; BLAISE, C.; KUSUI, T.; JOHNSON, E.M. Acute toxicity assessment of aqueous samples using a microplate-based *Hydra attenuata* assay. **Environ. Toxicol. Water Qual.**, v.12, p.265-271, 1997.

VLAARDINGEN, P.L.A.; TRAAS, T.P.; WINTERSEN, A.M.; ALDENGERG, T. ETX 2.0, **A Program to Calculate Hazardous Concentrations and Fraction Affected, Based on Normally Distributed Toxicity Data**. RIVM report 601501028/2004, 2004.

WANG, W.; KANNAN, K. Fate of Parabens and Their Metabolites in Two Wastewater Treatment Plants in New York State, United States. **Environ. Sci. Technol.**, v.50 (3), p.1174–1181, 2016.

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

Capítulo 4: Avaliação de toxicidade do propilparabeno em fungos hifomicetos aquáticos e análise de risco.

Resumo

Os parabenos são ésteres de ácido para-hidroxibenzóico, com um grupo alquil (metil, etil, propil, butil ou heptil) ou benzil. Os parabenos mais utilizados são o metilparabeno e propilparabeno. O propilparabeno possui maior ação antifúngica, solubilidade em etanol e água, é estável e não-volátil, sendo largamente utilizado em formulações cosméticas, farmacêuticas e alimentos. Os parabenos são considerados contaminantes emergentes e por isso é importante rever os conhecimentos adquiridos sobre sua ocorrência, destino e comportamento nos ambientes aquáticos. Apesar dos tratamentos que os eliminam relativamente bem das águas residuais, os parabenos estão sempre presentes em baixos níveis de concentração nos efluentes de estações de tratamento de águas residuais e são introduzidos continuamente no ambiente. Uma vez que as avaliações de risco de fungicidas para a biota aquática de regiões tropicais são realizadas sem informações sobre a toxicidade para fungos aquáticos, o que pode causar uma subestimação dos efeitos tóxicos para o sistema decompositor de ecossistemas aquáticos tropicais. Neste estudo, determinamos os efeitos de diferentes concentrações de propilparabeno diluído em solução nutritiva em diferentes espécies de fungos hifomicetos aquáticos obtidos a partir do crescimento em meio de extrato de malte. Todos os hifomicetos testados foram susceptíveis ao propilparabeno. Medimos o efeito de diferentes concentrações de propilparabeno nas sete espécies de hifomicetos usando a taxa de esporulação como *endpoint*. A concentração efetiva (CE₅₀) foi comparada com os resultados de outros organismos aquáticos obtidos a partir da literatura aberta, através da construção de uma Distribuição de Sensibilidade de Espécies (SSD). A análise comparativa indicou que os fungos *Lemmoniera aquatica* e *Lemmoniera pseudofloscula* são as espécies de hifomicetos mais sensíveis ao propilparabeno, sendo que *L. aquática* < HC5, está entre os 5% das espécies afetadas na comunidade hipotética construída a partir dos dados da SSD. Outras investigações precisam ser conduzidas com vistas a ampliar o conhecimento sobre os efeitos dos parabenos em organismos do meio aquático, e especialmente em relação aos efeitos destes nos hifomicetos, visto que esses fungos mostraram-se mais sensíveis ao composto do que os demais organismos já testados e por serem importantes na decomposição da matéria orgânica de rios e lagos.

Palavras-chave: Hifomicetos aquáticos; ensaios ecotoxicológicos; produtos de cuidado pessoal; taxa de esporulação; fungicidas.

4.1. Introdução

A micologia aquática tornou-se uma área de pesquisa promissora para entender como fungos desempenham papéis fundamentais nos ecossistemas aquáticos, conhecer a diversidade de fungos presentes no ambiente, bem como compreender o metabolismo dos fungos aquáticos, pois são organismos-chave no processo de mineralização de matéria orgânica e ciclagem de matéria e energia no ambiente aquático assegurando a saúde do ecossistema em uma escala global. A este respeito, é imperativo determinar a contribuição fúngica para os ecossistemas aquáticos, bem como a prestação de serviços ambientais, tendo em conta a sua potencial sensibilidade às alterações climáticas globais e às pressões antropogênicas (GROSSART e ROJAS-JIMENEZ, 2016).

Os hifomicetos aquáticos (fungos Ingolnianos, por causa de extensos estudos realizados por Ingold CT) representam um grupo ecológico de fungos que crescem em folhas e ramos em decomposição, estão presentes em grandes quantidades em córregos nas regiões de espuma dos córregos, dentro de áreas de florestas decíduas e têm ampla distribuição geográfica (WEBSTER e WEBER, 2007). Os hifomicetos aquáticos podem produzir esporos na água e desenvolver-se na superfície da folha em decomposição (INGOLD, 1968; KRAUSS et al., 2011). Esses esporos assexuais têm formas radiativas e sigmóides, adaptadas para a vida e dispersão em córregos (GRAÇA et al., 2016).

Acredita-se que os hifomicetos tenham sido derivados de ancestrais terrestres e sejam capazes de colonizar seu habitat em virtude de várias adaptações, tais como: mecanismos eficazes de ligação a esporos; formas diferenciadas de esporos, germinação e crescimento, associados à maior esporulação por turbulência e fluxo rápido (WEBSTER e WEBER, 2007). Sabe-se que os hifomicetos liberam uma grande quantidade de esporos assexuais (mitóticos, anamórficos) dentro da água com formas características que facilitam a identificação de espécies e pode ser necessário observar a conidiogênese para garantir classificação inequívoca (PASCOAL et al., 2005).

Os hifomicetos aquáticos são fungos decompositores, são adaptados a ambientes aquáticos: rios, riachos e lagos, fazem colônias em detritos vegetais (BARLOCHER et al., 2003, JUNGHANN et al., 2005). As atividades fúngicas suavizam os tecidos foliares, ou seja, as folhas ao ser colonizadas e amaciadas são mais facilmente pastadas e trituradas que as folhas não colonizadas por invertebrados aquáticos como *Gammarus* sp, *Asellus* sp e por larvas de insetos aquáticos que se alimentam diretamente do tecido foliar ou da matéria

orgânica particulada. Além disso, o conteúdo protéico do material foliar é aumentado pela colonização microbiana, uma vez que os fungos podem concentrar nitrogênio inorgânico presente em baixas concentrações na água em solução e usando a proteína da matéria orgânica utilizada na construção foliar. Assim, com a trituração aquática, os herbívoros podem alimentar-se diretamente a partir dos micélios fúngicos e dos esporos (WEBSTER e WEBER, 2007).

Os hifomicetos aquáticos são um grupo importante das comunidades microbianas de água doce e podem ser usados como bioindicadores em estudos ambientais (SOLÉ et al, 2008). O ambiente aquático é constantemente impactado por várias substâncias químicas, mesmo que o impacto seja causado por contaminantes que apresentam alto risco, algumas espécies e o ambiente sob estresse são pouco estudados. Desta forma, os ecossistemas prístinos tornaram-se cada vez mais escassos, porque grande impacto ocorreu em rios e riachos devido a atividades humanas como agricultura, urbanização e industrialização (PASCOAL et al., 2005).

Sabemos que a integridade ecológica dos sistemas formados por organismos decompositores - detritívoros aquáticos pode ser afetada, entre outros fatores, por fungicidas e substâncias antimicrobianas (ZUBROD et al., 2011). Os compostos fungicidas são indicados no controle de patógenos fúngicos, mas os efeitos em fungos aquáticos não visíveis não são verificados nas avaliações de risco subjacentes à autorização destes produtos químicos (DIJKSTERHUIS et al., 2011).

Entre as substâncias antimicrobianas e antifúngicas, temos a classe dos conservantes, os parabenos. Os parabenos podem ser introduzidos no ecossistema aquático através de esgotos domésticos e industriais, escoamento de fontes não pontuais e deposição de partículas atmosféricas (BLEDZKA et al., 2014).

Os parabenos são conservantes, incluídos no grupo de Produtos Farmacêuticos e de Cuidados Pessoais, são amplamente utilizados pela indústria, porque além de possuírem propriedades antifúngicas, possuem baixo custo e possuem estabilidade em uma ampla faixa de pH (ELDER, 1984; SONI et al., 2005 , YAMAMOTO et al., 2007, HAN et al., 2016). A utilização de parabenos foi largamente ampliada porque esses compostos são considerados eficazes contra fungos e leveduras e são considerados de baixa toxicidade para os seres humanos se utilizadas dentro da dose recomendada (ELDER, 1984; YAMAMOTO et al., 2007).

Os parabenos mais utilizados em formulações são metilparabeno (MeP) e propilparabeno (PrP) e conseqüentemente os mais frequentemente encontrados no ambiente (BLEDZKA et al., 2014). O propilparabeno é um ácido p-hidroxibenzóico, estável, não volátil, sem sabor e sem odor, é cristalino ou em pó pequeno (ELDER, 1984; SONI et al., 2001).

A União Européia (UE) estabeleceu parâmetros de controle para os ácidos p-hidroxibenzóicos, seus sais e ésteres no uso como conservantes, portanto, há limites para o uso de parabenos em relação às formulações cosméticas, com o valor máximo para um éster 0,4% e para as misturas de éster a 0,8%. Esta resolução da União Europeia veio em resposta a uma regra estabelecida pelo governo da Dinamarca, que proibiu a utilização de propilparabeno e butilparabeno, as suas isoformas e os seus sais, em produtos cosméticos destinados a crianças com menos de três anos, com base numa potencial atividade endócrina (DANISH EPA, 2013; CE, 2014).

A Agência de Segurança dos Alimentos e Medicamentos dos EUA (US FDA) considera o uso de parabenos como conservantes em produtos cosméticos, como seguro, mas estabelece limites quando parabenos são usados como um limite de armazenamento de alimentos de 0,1% e limite de ingestão diária de 0-10mg / kg de peso corporal/ por dia, o Canadá e o Brasil seguem as mesmas determinações da agência do FDA dos EUA (HC, 2016, US FDA, 2016, MAPA, 2013, CIR, 2012). Os parabenos são componentes indicados na farmacopeia brasileira, tanto para a composição dos produtos-mestre quanto para os produtos utilizados na preparação de outras formulações, amplamente utilizadas no país (ANVISA, 2012).

A pesquisa ecotoxicológica sobre o destino e os efeitos colaterais de produtos farmacêuticos e higiene pessoal nos ecossistemas aquáticos tem se concentrado principalmente em países de clima temperado e utilizando-se de espécies padrão como modelos. Sabe-se que as comunidades de água doce têm grande variabilidade natural em sua estrutura e função, sendo assim importante questionar se as espécies padrão utilizadas em regiões temperadas são apropriadas para ecossistemas tropicais (DAAM e RICO, 2016).

Os riscos potenciais de contaminantes emergentes, tais como os parabenos, para a saúde humana, o ambiente e os ecossistemas, estão a ser investigados com maior frequência, mas é necessário um maior conhecimento da ocorrência, destino, transporte, transformação, ecotoxicologia, mitigação e controle destes compostos (YANG, 2017).

Uma vez que nos bioensaios ecotoxicológicos os organismos mais utilizados formam um pequeno número de espécies padrão, principalmente peixes, crustáceos e algas, que representam os três principais níveis tróficos, dessa forma ao restringir apenas às espécies padrão, outras espécies que poderiam ser ainda mais sensíveis não são avaliadas (GARCIA et al., 2015). Caracterizar o risco de forma eficiente para os organismos aquáticos é um processo complexo porque os dados ecotoxicológicos para o propilparabeno são limitados às espécies padrão (**Tabela 6**). Tem se provado que o propilparabeno pode ser um eficiente agente antifúngico para diferentes espécies de fungos, em diferentes condições e promovendo inibição no crescimento (THOMPSON, 1992; BARBERIS et al., 2009; NEVES et al., 2009); contudo, ainda não foram feitos experimentos com fungos hifomicetos aquáticos.

Tabela 6 - Principais endpoints ecotoxicológicos (mg L⁻¹) presentes na literatura para o conservante PrP obtidos em ensaios ecotoxicológicos com diferentes organismos aquáticos.

Espécies	Grupo Taxonômico	Endpoint / Duração	EC50 (mg L ⁻¹)	Referências
<i>Vibrio fischeri</i>	Bacteria	Iluminescencia, 15 min	2.55	Bazin et al., (2010)
<i>Vibrio fischeri</i>	Bacteria	Iluminescencia, 15 min	0.26	Terasaki et al, (2008)
<i>Photobacterium leognathi</i>	Bacteria	Iluminescencia, 15 min	21	Bazin et al., (2010)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Algae	Crescimento, 72h	15	Yamamoto et al., (2011)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Algae	Crescimento, 72h	6.8	Pablos et al., (2015)
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Algae	Crescimento, 72h	15	Madsen et al., (2001)
<i>Tetrahymena thermophila</i>	Protozoa	Imobilidade, 24h	9.7	Bazin et al., (2010)
<i>Hydra attenuata</i>	Cnidaria	Mortalidade, 48h	24.2	Capítulo 3
<i>Hydra viridissima</i>	Cnidaria	Mortalidade, 48h	21.9	Capítulo 3
<i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	Cladocera	Imobilidade, 48h	2.9	Capítulo 3
<i>Daphnia magna</i>	Cladocera	Imobilidade, 48h	15	Madsen et al., (2001)
<i>Daphnia magna</i>	Cladocera	Imobilidade, 48h	23	Terasaki et al, (2008)
<i>Daphnia magna</i>	Cladocera	Imobilidade, 48h	12.3	Dobbins et al., (2009)
<i>Daphnia magna</i>	Cladocera	Imobilidade, 48h	36	Yamamoto et al., (2011)
<i>Daphnia magna</i>	Cladocera	Imobilidade, 48h	7	Bazin et al., (2010)
<i>Macrothrix flabelligera</i>	Cladocera	Imobilidade, 48h	3.85	Capítulo 3
<i>Chironomus xanthus</i>	Insecta	Imobilidade, 96h	5.64	Capítulo 3
<i>Dugesia japônica</i>	Plathielmintos	Imobilidade, 48h	11	Mei-Hui, (2012).
<i>Pimephales promelas</i>	Pisces	Mortalidade, 48h	9.7	Dobbins et al., (2009)

Portanto, o objetivo do presente estudo foi realizar uma avaliação de risco para o PrP usando sete espécies de hifomicetos aquáticos (fungos decompositores). Especificamente, os objetivos do presente estudo foram: (1) definir limiares de toxicidade aguda para propilparabeno utilizando fungos não-alvo com modelos (ou produção de fungos determinados a partir da taxa de esporulação); (2) propor uma Distribuição de Sensibilidade de Espécies (SSD) para comparar a toxicidade de fungos com outros organismos de ambientes

tropicais e temperados (3) propor assim a partir desses bioensaios uma metodologia simplificada para expandir o uso de hifomicetos aquáticos em estudos de ecotoxicologia.

4.2. Materiais e métodos

4.2.1. Substância testada, concentrações e solução de nutrientes

Propilparabeno (Propil-4- hidroxibenzoato, CAS: 94-13-3, $\text{HOC}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{C}_3\text{H}_7$) com pureza $\geq 99\%$ foi adquirido a Sigma-Aldrich Co. (Steinheim, Alemanha). A água utilizada nos bioensaios foi previamente destilada e ainda desionizada utilizando um sistema Milli-Q Millipore (Millipore, Bedford, MA, EUA). Todos os reagentes e solventes utilizados para os testes de ecotoxicologia e análise cromatográfica foram de grau analítico.

Prepararam-se as soluções mãe (100 mg L^{-1} e 10 mg L^{-1}) dissolvendo propilparabeno numa solução nutritiva enriquecida (100 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mg de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0,5 \text{ g}$ de MOPS (3-N-morfolinopropano Sulfônico), 100 mg de KNO_3 , $5,5 \text{ mg}$ de K_2HPO_4 e pH ajustado a 7,0, descrito em Dang et al., 2005) e fazendo diluições em série a partir desta solução (fungos grupo 1: 0; 1,07; 1,87; 3,27; 5,71; 10 mgL^{-1} e fungos grupo 2: 0; 10,7; 18,7; 32,7; 57,1; 100 mgL^{-1} , como descrito na **Figura 12**). As soluções de trabalho foram diluídas utilizando equipamento de ultrassom.

As concentrações de PrP nas amostras foram verificadas através do sistema de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) (Agilent 1200 series) (GALINARO et al., 2015). A amostra foi injetada na coluna cromatográfica (coluna de fase reversa Zorbax Eclipse XDB-C18 de $150 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$ de diâmetro interno e $5 \mu\text{m}$ de Agilent) com água desionizada / ácido acético (na proporção, 99: 1%, v / v) e metanol como fase móvel. Utilizou-se o modo de eluição isocrático: 35% de água desionizada / ácido acético e 65% de metanol, em 9 minutos, a um caudal de velocidade constante de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. O volume de injeção foi de $0,01 \text{ mL}$, utilizando um comprimento de onda de 258 nm para o propilparabeno, e a temperatura da coluna foi de 25°C .

4.2.2. Culturas de fungos

Utilizamos hifomicetos aquáticos previamente isolados de esporos de riacho Ribeira do Candal (40° 40' 44'' N and 8° 12' 10'' W; 617 m a.s.l.), mantidos em culturas-estoque puras e armazenados em placas de ágar na Universidade de Coimbra, no Departamento de Ciências da Vida. Para tanto, sete espécies de hifomicetos aquáticos foram previamente escolhidas para inoculação: *Articulospora tetracladia* Ingold, *Flagellospora curta* Webster, *Heliscus lugdunensis* Sacc. & Thérry, *Lemonniera aquatica* de Wildeman, *Lemonniera pseudofloscula* Dyko et al., *Tetracladium apienses* de R.C. Sinclair & Eicker, *Tetracladium marchalianum* de Wild.

Cada espécie fúngica foi inoculada e posta para crescer em placas de Petri estéreis contendo 25 mL de Meio de Extrato de Malte (MEA) (2%) durante 15 dias. Quando obtivemos todas as culturas fungicas em crescimento exponencial, foram feitos cortes circulares em meio contendo fungos (micélios) com um cortador metálico circular de 12 mm de diâmetro (Apêndice, **Figura A4**) e os cortes de disco de MEA+hifomicetos foram inseridos conforme explicação a seguir. Os ensaios de toxicidade foram conduzidos em frascos de vidro com boca larga de 100 mL (contendo 40 mL de solução nutritiva enriquecida (DANG et al., 2005), suplementada com uma das seis concentrações de propilparabeno (**Figura 12**) e quatro discos de ágar do respectivo fungo), com a boca do frasco vedada com parafilme. As soluções não foram renovadas durante o período de teste, sendo colocada aeração e aplicada uma dose inicial única de propilparabeno. Foram conduzidos experimentos preliminares para identificar as concentrações a ser avaliadas nos ensaios definitivos (Apêndice, **Figura A5**).

Os frascos foram incubados numa sala aclimatada a 20 ° C, com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, e a aeração foi utilizada para induzir a esporulação. A taxa de esporulação foi determinada em relação a uma cultura de controle (tratamento branco, solução nutritiva enriquecida + fungos, sem adição de propilparabeno). O desenho experimental e o tempo total de exposição encontram-se representados na **Figura 13**, a duração total de cada teste depende do tempo necessário para que a cada espécie pudesse atingir o pico da taxa de esporulação.

Figura 13 - Desenho experimental da exposição dos fungos hifomicetos ao propilparabeno. Na figura, tempo de exposição, medido em horas para as espécies expostas: **Heliscus lugdunensis* e *Flagellospora curta* (144 h); ** *Lemmoniera aquatica* (168 h); ****Lemmoniera pseudofloscula*, *Tetracladium apienses*, *Tetracladium marchalianum*, *Articulospora tetracladia* (240 h).

Após 48 horas do início do teste, retiraram-se 50 µL de suspensão de cada frasco, buscando na parte da espuma (Apêndice, **Figura A7**) e foi feita a verificação da liberação de conídios ao microscópio e foram montadas lâminas para verificação da esporulação (Apêndice, **Figura A9**) para cada réplica (Apêndice, **Figura A8**). Este procedimento foi repetido diariamente até o pico de esporulação ser atingido e assim o teste de toxicidade foi finalizado para cada espécie de fungo. Desse modo, entre 6-10 dias após o início do período de exposição ao propilparabeno (conforme **Figura 12**), as suspensões de conídios totais foram transferidas para tubos Falcon de 50 mL, com auxílio de uma pisseta com água destilada para lavar as paredes dos frascos. Dessa forma, não foram recolhidos os discos de micélios, apenas o material em suspensão, sendo fixado com a adição de 2 mL de formalina a 37%.

Adicionou-se 100 µL de Triton X-100 (0,5%) à suspensão, misturou-se com uma barra de agitação magnética para assegurar uma distribuição uniforme dos conídios e entre 1-10 mL da suspensão fungica foi filtrada através de filtros de membrana (25 mm de diâmetro, tamanho de poro de 5 µm, Millipore SMWP, Millipore Corporation, MA, EUA) (Sistema de

filtração, Apêndice **Figura A10**). Os filtros foram corados com azul de tripano a 0,05% em ácido láctico a 60% e os conídios foram contados sob um microscópio composto a uma ampliação de 200x (Membranas coradas, Apêndice **Figura A11**) (GRAÇA et al, 2005). A contagem de esporos de cada filtro foi feita de acordo com os critérios: contagem de pelo menos 7 campos; atingindo nesta contagem pelo menos 200 esporos; ou continuar a contagem até 50 campos. Este número total de esporos contados foi utilizado para calcular a taxa de esporulação, que é obtida pelo número de esporos/ por ml /por hora.

4.2.3. Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada com o uso do software ETX 2.0, Statistica 8.0 e Microsoft Excel 2007. Neste trabalho, investigamos os efeitos do propilparabeno na esporulação de sete espécies de hifomicetos aquáticos. Os efeitos do propilparabeno na reprodução foram avaliados em meio líquido enriquecido e a sensibilidade fúngica foi comparada pela determinação dos parâmetros de inibição da propilparabeno, ou seja, a concentração que inibe a reprodução em 50% (CE₅₀) e 20% (CE₂₀).

Uma curva de distribuição de sensibilidade de espécies (SSD) foi construída com uso do software de computador ETX 2.0 (VLAARDINGEN, 2004) para o propilparabeno comparando-se os resultados de CE₅₀ obtidos com os fungos hifomicetos com os resultados da literatura aberta para o PrP. Para as espécies que apresentaram mais que um resultado de toxicidade aguda foi calculada a média entre os valores tabelados (**Tabela 5**). Os valores de HC5 e HC50 e seus respectivos limites de confiança foram calculados com este software baseado na metodologia descrita por Aldenberg e Jaworska (2000). Uma vez que o modelo assume uma distribuição log-normal dos dados, a Log-normalidade foi testada com o teste Anderson-Darling incluído no software ETX, que foi avaliado em nível de significância de 1%. O software ETX foi utilizado para obter as distribuições log-normais dos valores de toxicidade (eixo x), portanto temos a fração da espécie potencialmente afetada (eixo y) da concentração perigosa (HC), onde p é a porcentagem de espécies em risco devido à presença de composto químico. As percentagens mais utilizadas são 5 e 50% (HC5 e HC50), correspondendo à 95% e 50% de espécies não-afetadas pelo composto em estudo (espécies protegidas), respectivamente.

4.3. Resultados

4.3.1. Análises químicas

Os resultados foram calculados com base em concentrações nominais porque as análises das soluções de ensaio em LC-DAD mostraram que as concentrações iniciais reais de propilparabeno nos ensaios de toxicidade fúngicas diferem menos do que 10% das concentrações nominais (ISO 10706, 2000).

4.3.2. Ensaios de toxicidade

As espécies atingiram o pico de esporulação, nas condições experimentais estabelecidas, em intervalos de tempo diferentes: *H. lugdunensis* e *F. curta* atingiram o pico de esporulação em 6 dias, *L. aquatica* em 7 dias, enquanto *A. tetracladia*, *T. apiense*, *T. marchalianum*, *L. pseudofloscula* em 10 dias. É evidente que a taxa de esporulação de todos os fungos hifomicetos aquáticos desse estudo foi afetada pela presença de propilparabeno, conforme podemos verificar abaixo (**Figura 14**).

Figura 14 - Exposição em longo prazo de sete hifomicetos aquáticos ao propilparabeno: taxa de esporulação em ensaios de toxicidade crônica. Foram feitas comparações entre as respostas de espécies do mesmo gênero e entre espécies de gênero diferente.

Não houve produção de conídios nas maiores concentrações avaliadas nos ensaios de toxicidade com propilparabeno, ou então os conídios foram produzidos em proporções muito baixas para os fungos avaliados. É evidente que o propilparabeno apresenta toxicidade para os hifomicetos aquáticos. Assim, ao verificar apenas os resultados de CE₅₀ e CE₂₀, o PrP foi nomeadamente mais tóxico para as espécies de *Lemmoniera aquatica* e *Lemmoniera pseudofloscula*. Na **Tabela 7** foi apresentado um resumo dos efeitos do propilparabeno em termos de concentrações efetivas (CE₅₀ e CE₂₀) sobre os hifomicetos aquáticos.

Tabela 7 - Concentrações efetivas (CE₅₀ e CE₂₀) e concentração HC5 para os hifomicetos aquáticos com seus respectivos limites de confiança de 95% para os testes de toxicidade realizados com propilparabeno.

Espécies	CE ₅₀ (95%) mg L ⁻¹	p (<0,05)	CE ₂₀ (95%) mg L ⁻¹	p (<0,05)
<i>Lemmoniera aquatica</i>	1,63 (1,05-2,21)	0,0030	1,14 (0,43 - 1,84)	0,014
<i>Lemmoniera pseudofloscula</i>	2,80 (-0,067-5,8)	0,05	0,79 (-0,75-2,33)	0,20
<i>Tetracladium apiense</i>	12,7 (12,2- 13,2)	0,0000042	6,98 (6,46-7,50)	0,000028
<i>Flagellospora curta</i>	14,5 (8,8- 20,2)	0,0039	8,45 (2,64-14,3)	0,019
<i>Heliscus lugdunensis</i>	15,2 (13,3-17,2)	0,00014	13,1 (10,5-15,8)	0,00056
<i>Articulospora tetracladia</i>	18,5 (-0,091-37,1)	0,05	4,99 (-5,10-15,1)	0,21
<i>Tetracladium marchalianum</i>	18,8 (17,0-20,6)	0,000058	12,6 (10,5-14,6)	0,00030
HC5	2,12 (1,10-3,28)			

A curva SSD construída para o conservante fungicida propilparabeno (**Figura 15**) mostrou que o hifomiceto aquático *Lemmoniera aquatica* foi a espécie mais sensível entre as espécies amostradas. Nesse sentido, como o valor HC5 calculado foi de 2,12 mg L⁻¹, a espécie *L. aquatica* não está entre as espécies 95% espécies protegidas junto com a bactéria *V.fischeri*, neste cenário de exposição.

Figura 15 - Distribuição de sensibilidade de espécies de hifomicetos e outras espécies aquáticas de diferentes grupos taxonômicos e regiões geográficas, com base nos valores de EC₅₀ para o conservante antifúngico propilparabeno.

4.4. Discussão

Com a entrada contínua dos PBs no ambiente através do lançamento de esgotos domésticos e industriais, os PBs podem ser classificados como compostos pseudo-persistentes, o que se tornou uma preocupação crescente devido aos possíveis efeitos da exposição em longo prazo para os organismos da biota aquática (TERASAKI et al., 2012; LI et al., 2016). Uma vez que os fungos são especialmente sensíveis a PBs (ELDER, 1984, SONI et al., 2005, YAMAMOTO et al., 2007, HAN et al., 2016), o contato constante desses compostos de ação anti-fúngica com os fungos hifomicetos torna-se um problema, pois devido ao fato do PrP reduzir a esporulação, ainda não se pode mensurar sua ação através de entrada contínua no sistema decompositor aquático, e como afetaria as relações existentes na biota.

Ao compararmos a toxicidade do propilparabeno entre diferentes espécies, o fungo hifomiceto (*L. aquatica*) foi onze vezes mais sensível ao PrP do que o hifomiceto *T. marchalianum* e também do que o cladócero padronizado *D. magna*.

O propilparabeno atuou como antifúngico, com as maiores inibições na produção de esporos (redução na taxa de esporulação) nos tratamentos com as dosagens mais elevadas do composto. Da mesma forma ocorre alteração na esporulação dessas espécies de hifomicetos quando expostos a outras classes de contaminantes, tais como os metais: (a) O cádmio reduziu a taxa de esporulação em *A. tetracladia* e *L. aquatica*, porém esta redução não acompanhou uma relação dose-resposta (MOREIRINHA et al., 2011); (b) *H. lugdunensis* e *T. marchalianum* mostraram-se tolerantes ao cobre, zinco e cádmio (MIERSH et al., 1997); (c) *H. lugdunensis* e *F. curta* foram capazes de tolerar níveis elevados de Cd (AZEVEDO e CASSIO, 2010). Assim, podemos inferir que se a elevada tolerância dessas espécies de fungos hifomicetos aos metais poderia ser comparada às respostas apresentadas no presente trabalho pelas espécies *H.lugdunesis*, *A.tetracladia* e *T.marchalianum* ao PrP, pois pode ser essa uma característica da espécie, visto que apresentaram baixa toxicidade ao PrP apesar desse composto ser fungicida.

A inibição da esporulação em fungos aquáticos expostos a compostos químicos xenobióticos ocorre devido à canalização de parte da energia disponível para reprodução e crescimento de fungos aquáticos na síntese de compostos e / ou enzimas envolvidas nos processos de desintoxicação celular (MOREIRINHA et al., 2011) .

Nos ecossistemas aquáticos, os micélios fúngicos dos hifomicetos desempenham um papel essencial, tais como: a regulação da acumulação de biomassa, a produção de conídios e a quebra de folhas em partículas finas com subsequente liberação de nutrientes inorgânicos. Além disso, os hifomicetos são fundamentais no processo de sequestrar ions metálicos e podem quebrar compostos que imitam estrogênios tais como nonilfenol (KRAUSS et al., 2011).

Como os valores de HC5 obtidos na curva de distribuição da sensibilidade das espécies não são protetores para esta comunidade de hifomicetos aquáticos, a SSD mostra que os hifomicetos aquáticos são mais sensíveis ao propilparabeno do que os outros organismos avaliados. Deve-se, no entanto levar em conta que o conjunto de dados para os parabenos ainda é pequeno, exigindo, portanto, mais estudos ecotoxicológicos e avaliações de outros parâmetros para os organismos, de modo que SSDs com maior representatividade ecológica podem ser elaborados.

A extrapolação dos dados obtidos com poucas espécies para todos os organismos que podem ser expostos a um produto químico aumenta o nível de incerteza e é particularmente

problemática para fungicidas com amplo espectro de atividade (MALTBY et al., 2009). Assim, é necessário ampliar os estudos de toxicidade com um maior número de espécies, aumentando o conhecimento sobre as espécies de regiões tropicais, que tem um maior número de espécies e cujo uso desses compostos é mais intenso.

4.5. Conclusões

A metodologia aqui desenvolvida busca unir os estudos de ecotoxicologia com micologia, através do uso de discos de placas de ágar com o mesmo tipo de meio de cultura para todas as espécies, mesmo tamanho e densidade de ágar, utilizados para inocular a solução de interesse estabelecendo-se assim uma proposta para a utilização dos fungos hifomicetos aquáticos em estudos de ecotoxicologia.

Os hifomicetos aquáticos não-alvo mostraram-se sensíveis aos efeitos do PrP. Em particular, *L. aquatica* e *L. pseudofloscula* foram altamente sensíveis ao PrP em aplicação dose única. Sendo assim, é necessário ampliar as análises ecotoxicológicas para estudos em doses múltiplas, misturas e cenários com várias espécies interagindo com mudanças de temperatura, por exemplo. Além disso, é necessário ampliar os estudos sobre a toxicidade de compostos em fungos hifomicetos, potenciais efeitos e também se faz necessário aprofundar os estudos sobre a capacidade dos hifomicetos aquáticos de metabolizar e degradar os compostos xenobióticos.

4.6. Referências

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2012. Brasil. Ministério da Saúde. **Formulário nacional da farmacopeia brasileira** / Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2.ed. Brasília: 224 p . Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/arquivos/2012/FNFB%202_Revisao_2_COFAR_setembro_2012_atual.pdf

AUGUSTIN, T.; SCHLOSSER, D.; BAUMBACH, R.; SCHMIDT, J.; GRANCHAROV, K.; KRAUSS, G.; KRAUSS, G.J. Biotransformation of 1-Naphthol by a Strictly Aquatic Fungus. **Current microbiology**, v.52, p.216-220, 2006.

BARBERIS, C.; ASTORECA, A.; FERNANDEZ-JURI, G.; CHULZE, S.; DALCERO A.; MAGNOLI, C. Use of propylparaben to control growth and ochratoxin A production by *Aspergillus* section *Nigri* species on peanut meal extract agar. **International Journal of Food Microbiology**, v.136, p.133–136, 2009.

BARLOCHER, F. **The Ecology of Aquatic Hyphomycetes**. Berlin: Springer, 1992.

BLEDZKA, D.; GROMADZINSKA, J.; WASOWICZ, W. Parabens. From environmental studies to human health. **Environment International**, v.67, p.27–42, 2014.

CIR. Cosmetics Ingredients Review. **Final amended report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben, isopropylparaben, butylparaben, isobutylparaben, and benzylparaben as used in cosmetic products**. Int J Toxicol 2008; 27(Suppl. 4):1–82, 2012.

DAAM, M.A.; RICO, A. Freshwater shrimps as sensitive test species for the risk assessment of pesticides in the tropics. **Environ Sci Pollut Res**, 1-9, 2016. DOI: 10.1007/s11356-016-7451-1

DANISH EPA. Environmental Protection Agency (Danish Ministry of Environment). **Survey of parabens**. Part of the LOUS- Review, Environmental Project n.1474, 2013.

DIJKSTERHUIS, J.; VAN DOORN, T.; SAMSONS, R.; POSTMA, J. Effects of Seven Fungicides on Non-Target Aquatic Fungi. **Water Air Soil. Pollut.**, v.222, p. 421–425, 2011. DOI 10.1007/s11270-011-0836-3

ELDER, R.L. Final report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben and butylparaben. **Journal of the American College of Toxicology**, v.3, p.147-209.

EC (European Council) . Commission Regulation No 358/2014, of 9 April 2014. **Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products (parabens & triclosan)**, Official Journal of the European Union 57° year, 2014.

GARCIA, S.O.; GARCÍA-ENCINA, P.A.; IRUSTA-MATA, R. Dose–response behavior of the bacterium *Vibrio fischeri* exposed to pharmaceuticals and personal care products. **Ecotoxicology**, v.25 (1), p.141-162, 2016. DOI 10.1007/s10646-015-1576-8.

GRAÇA, M.A.S.; HYDE, K.; CHAUVET, E. Aquatic hyphomycetes and litter decomposition in tropical e subtropical low order streams. **Fungal Ecology**, v.1 (9) , p.182-189, 2016.

GROSSART, H.P.; ROJAS-JIMENEZ, K. Aquatic fungi: targeting the forgotten in microbial ecology. **Current Opinion in Microbiology**, v.31, p.140–145, 2016.

HAN, C.; XIA, B.; CHEN, X.; SHEN, J.; MIAO, Q.; SHEN, Y. Determination of four paraben-type preservatives and three benzophenone-type ultraviolet light filters in seafoods by LC-QqLIT-MS/MS. **Food Chemistry**, v.194, p.1199–1207, 2016.

HC. Health Canada. **Consumer product safety: safety of cosmetic ingredients** (7) Parabens, 2016. <http://www.hc-sc.gc.ca/cps-spc/cosmet-person/labelling-etiquetage/ingredients-eng.php>
Acesso em: 10/02/2017.

HERNANDO, M.D.; MEZCUA, M.; FERNANDEZ-ALBA, A.R.; BARCELÓ, D. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. **Talanta**, v. 69, p.334–342, 2006.

JUNGHANNS, C.; MOEDER, M.; KRAUSS, G.; MARTIN, C.; SCHLOSSER, D. Degradation of the xenoestrogen nonylphenol by aquatic fungi and their laccases. **Microbiology**, v.151, p.45–57, 2005.

INGOLD, C.T. More spores from rivers and streams. **Transactions of the British Mycological Society**, 51(1), 137-143, IN12, 1968.

KRAUSS, G.J.; SOLÉ, M.; KRAUSS, G.; SCHLOSSER, D.; WESENBERG, D.; BARLOCHER, F. Fungi in freshwaters: ecology, physiology and biochemical potential. **Microbiology Reviews**, v.35, p.620-651, 2011.

LI, W.; GAO, L.; SHI, Y.; WANG, Y.; LIU, J.; CAI, Y. Spatial distribution, temporal variation and risks of parabens and their chlorinated derivatives in urban surface water in Beijing, China. **Science of the Total Environment**, p.539, v.262–270, 2016.

MALTBY, L.; BROCK, T.C.M.; VAN DEN BRINK, P.J. Fungicide Risk Assessment for Aquatic Ecosystems: Importance of Interspecific Variation, Toxic Mode of Action, and Exposure Regime. **Environmental Science Technology**, v.43, p.7556–7563, 2009.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil. **Instrução normativa Conjunta MAPA, Anvisa e IBAMA sobre alteração de formulação de agrotóxicos e afins, No - 1, de 18 de abril.** ISSN 1677-7042, 2013.

NEVES, E.R.; SCHAFER, S.; PHILIPS, A.; CANEJO, J.; MACEDO, M.F. Antifungal effect of different methyl and propyl paraben mixtures on the treatment of paper biodeterioration. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, p.267–272, 2009.

NIKOLCHEVA, L. G.; COCKSHUTT, A. M.; BARLOCHER, F. Determining diversity of freshwater fungi on decaying leaves: comparison of traditional and molecular approaches. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.69, p.2548–2554, 2003.

PASCOAL, C.; MARVANOVÁ, L.; CÁSSIO, F. Aquatic hyphomycete diversity in streams of Northwest Portugal. **Fungal Diversity**, v.19, p.109-128, 2005.

SOLÉ, M.; FETZER, I.; WENRICH, R.; SRIDHAR, K.R.; HARMS, H.; KRAUSS, G. **Science of The Total Environment**, v.389, p.557 – 565, 2008.

SONI, M.G.; BURDOCK, G.A.; TAYLOR, S.L.; GREENBERG, N.A. Safety assessment of propyl paraben: a review of the published literature. **Food Chemistry Toxicology**, v.39, p.513-532, 2001.

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

TERASAKI, M.; TAKEMURA, Y.; MAKINO, M. Paraben-chlorinated derivatives in river waters. **Environmental Chemistry Letters**, v.10 (4), p.401- 406, 2012.

TERASAKI, M.; ABE, R.; MAKINO, M.; TATARAZAKO, N. Chronic toxicity of parabens and their chlorinated by-products in *Ceriodaphnia dubia*. **Environmental Toxicology**, v.30 (6), p. 664-673, 2015.

THOMPSON, D.P. Inhibition of mycelia growth of mycotoxigenic fungi by phenolic antioxidants. **Mycologia**, v.84, (5), p.791-793, 1992.

U.S.F.D.A. United States Food and Drug Administration. (2016). Department of health and human services. **Cosmetics: Parabens in cosmetics**. Acesso em: 15/12/2016.
<https://www.fda.gov/Cosmetics/ProductsIngredients/Ingredients/ucm128042.htm>

VLAARDINGEN, P.L.A.; TRAAS, T.P.; WINTERSEN, A.M.; ALDENBERG, T. ETX 2.0, **A Program to Calculate Hazardous Concentrations and Fraction Affected, Based on Normally Distributed Toxicity Data**. 2004. RIVM report 601501028/2004.

WEBSTER, J.; WEBER, J. **Introduction to fungi**. Third edition. Cambridge University Press, 841 p. 2007.

YAMAMOTO, H.; WATANABE, M.; HIRATA, Y.; NAKAMURA, Y.; NAKAMURA, Y.; KITANI, C.; SEKIZAWA, J.; UCHIDA, M.; NAKAMURA, H.; KAGAMI, Y.; KOSHIO, M.; HIRAI, N.; TATARAZAKO, N. Preliminary ecological risk assessment of butylparaben and benzylparaben -1. Removal efficiency in wastewater treatment, acute/chronic toxicity for aquatic organisms, and effects on medaka gene expression. **Environmental Sciences**, v.14, p.73-87, 2011.

YANG, G.C.C. Global challenges and solutions of emerging contaminants: An editorial overview and beyond. **Chemosphere**, v.168, p.1222–1229, 2017.

ZUBROD, J.P.; BUNDSCHUH, M.; FECKLER, A.; ENGLERT, D.; SCHULZ, R. Ecotoxicological impact of the fungicide tebuconazole on an aquatic decomposer-detritivore system. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.30 (12), p. 2718–2724, 2011.

Capítulo 5: Conclusões gerais

Analizando os dados gerados durante esse trabalho, discutidos especialmente nos Capítulos (3) e (4), as seguintes conclusões puderam ser obtidas:

- **Conclusões relativas ao primeiro objetivo proposto - Avaliação dos efeitos de metilparabeno e propilparabeno sobre organismos aquáticos de regiões tropicais e temperadas**

Os resultados indicam que os Cladocera tropicais *Ceriodaphnia silvestrii* e *Macrothrix flabelligera* são espécies alternativas para serem utilizadas em ensaios de toxicidade e análise de risco de regiões de clima tropical;

Os ensaios com *Chironomus xanthus* apresentaram resultados relevantes para ensaios com os organismos de sedimento, reforçando assim a validade do uso de espécies nativas em ensaios ecotoxicológicos;

Os ensaios de toxicidade feitos com *Hydra attenuata* e *Hydra viridissima* mostraram que os testes de alimentação pós-exposição são testes rápidos, de fácil execução, de baixo custo e excelentes indicadores dos efeitos danosos dos compostos-teste, especialmente quando comparados aos efeitos de toxicidade aguda;

- **Conclusões relativas ao segundo objetivo proposto – Avaliação dos efeitos antifúngicos do propilparabeno sobre sete espécies de fungos hifomicetos aquáticos dulcícolas**

Os ensaios de toxicidade feitos com fungos hifomicetos aquáticos mostraram-se uma ferramenta viável, com fácil visualização das respostas dos organismos, porém, que requer estrutura para implementação como rotina de testes;

Os hifomicetos *Lemoniera aquatica* e *Lemoniera pseudofloscula* apresentaram elevada sensibilidade ao propilparabeno, especialmente quando comparados às demais espécies aquáticas;

- **Conclusões relativas ao terceiro objetivo proposto – Comparação entre a sensibilidade de organismos e estabelecimento do risco associado à exposição aos parabenos**

Ao compararmos a toxicidade dos organismos de ambiente tropical, *Ceriodaphnia silvestrii*, *Macrothrix flabelligera*, *Chironomus xanthus* com a espécie de ambiente temperado, padronizada e amplamente utilizada em testes de toxicidade, *Daphnia magna* para os conservantes metilparabeno e propilparabeno, os organismos tropicais mostraram-se mais sensíveis, sendo, de fato mais indicados para uso em avaliações de risco ecológico de regiões tropicais.

Com base nas concentrações que causam efeitos letais e sub-letais nos organismos (magnitude de mg L^{-1}) e nas concentrações dos parabenos encontradas no ambiente até o presente momento (magnitude de ng L^{-1} – μL^{-1}) pode-se dizer que o metilparabeno e o propilparabeno isoladamente não são capazes de causar danos severos aos organismos da biota aquática. Contudo, estudos com misturas de parabenos e de parabenos com outros contaminantes (metais, surfactantes, pesticidas, nanocompostos) são importantes para avaliações mais abrangentes.

Capítulo 6: Considerações finais e recomendações para trabalhos futuros

Os produtos de cuidados pessoais fazem parte da vida cotidiana da população mundial e são importantes na elevação da expectativa de vida e para uma rotina de qualidade. Os avanços da pesquisa na área médica, com novos fármacos, cosméticos e nutraceuticos, avanço da pesquisa nas áreas correlacionadas ao bem-estar, maior acesso aos produtos e tratamentos, não são acompanhados por avanços também na área de tratamento de resíduos o que, juntamente com o uso indiscriminado de produtos, promove a contaminação ambiental.

Através de testes ecotoxicológicos é possível mensurar os impactos dos contaminantes sobre a biota local, podendo estabelecer limites para descarte de efluentes que contenham essas substâncias. No presente estudo, foram feitas comparações de sensibilidade entre organismos de regiões tropicais e temperadas através de testes de toxicidade aguda para os conservantes metilparabeno e propilparabeno. Dados de toxicidade aguda para organismos tropicais são escassos na literatura, bem como as distribuições de sensibilidade de espécies, as quais foram construídas a partir desses resultados e com dados obtidos da literatura aberta. Além disso, testes de toxicidade elaborados com fungos hifomicetos mostraram-se um importante *endpoint* ecotoxicológico a ser mais explorado.

Dessa forma, os resultados gerados no presente estudo mostram-se de vital importância para a conscientização e a divulgação da problemática associada ao uso dos parabenos, seus problemas em relação com aos seres vivos e impactos no meio ambiente.

Em relação às recomendações para trabalhos futuros, percebe-se a necessidade de ampliar os estudos referentes aos parabenos e aos demais PPCPs em relação à temática tropical, tanto em relação à toxicidade nos organismos, quanto à quantificação dos parabenos no ambiente (água e sedimento), ao risco dos compostos e aos produtos de degradação, bem como aos metabólitos gerados pelos organismos e explorar estudos com misturas de compostos, estudos com comunidades, estudos multigeracionais, e também estudos para identificar outros mecanismos de ação desses compostos.

Apêndices

Figura A1 - (A) Cultivo de *Hydra attenuata*; (B) *Hydra viridissima*. Foto: autor.

Figura A2- *Artemia franciscana*: (A) Cistos mantidos em condições de aeração e iluminação por 24h; (B) Nauplios sendo concentrados para alimentação dos cultivos e/ou testes de alimentação pós-exposição. Foto: autor.

Figura A3 - (A) *Hydra viridissima* sendo alimentada de *A. franciscana*; (B) *H. viridissima* com *A. franciscana* no interior do corpo. Foto: autor.

Figura A4 - Cortes de discos de ágar a partir de culturas estoque de fungos hifomicetos, para posterior inoculação em testes com meio enriquecido líquido + diluições de propilparabeno. Foto: autor.

Figura A5 - Montagem do teste preliminar dos fungos com propilparabeno e **Figura A6** - Montagem do teste definitivo de fungos. Foto: autor.

Figura A7 - Detalhe da formação de bolhas e espuma no interior dos frascos. Foto: autor.

Figura A8 - (A) Placa de aquecimento para secagem das laminas antes de inserir o corante. (B) Lâminas coradas para verificação da esporulação dos fungos. Foto: autor.

Figura A9 - Esporos de *H. lugdunensis* (Aumento 200x). Foto: autor e **Figura A10** - Sistema para filtração e coloração dos esporos em membrana.

Figura A11 – Lâminas com membranas de filtro coradas, para contagem de esporos sob microscópio óptico.