UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Análise de parabenos em amostras de água de cultivo de Tilápia do Nilo
(*Oreochromis niloticus*) e efeitos em biomarcadores bioquímicos.

Daniele Caetano da Silva
Profa. Dra. Eny Maria Vieira

São Carlos – SP
– 2015 –

Daniele Caetano da Silva

Análise de parabenos em amostras de água de cultivo de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e efeitos em biomarcadores bioquímicos.

Tese apresentada ao Instituto de Física e Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutora em ciências.

Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Eny Maria Vieira

São Carlos – SP

- 2015 -

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Jorge e Isabel, e ao meu irmão Leonardo, pela dedicação e educação que me passaram até o momento. Principalmente a minha mãe, gostaria de ter estado mais presente ao seu lado para dividir o peso antes da vó Zeza falecer. E ao meu marido Lenard, por todo apoio recebido nas horas mais difíceis dessa jornada.

AGRADECIMENTO

A Deus, por todas as oportunidades oferecidas.

À minha orientadora Dra. Eny Maria Vieira, pela oportunidade de ter me aceitado em seu laboratório, pela orientação, confiança, amizade e carinho durante esses anos.

Agradeço ao professor Dr. Eduardo Alves de Almeida, pela disposição em me auxiliar durante o trabalho e por permitir, utilizar seu laboratório para as análises bioquímicas, e também a sua equipe de laboratório (principalmente a Ju e a Déia) pela atenção e ajuda fornecida durante as análises.

Ao professor Dr. Álvaro José dos Santos Neto pelas sugestões.

Aos professores Dra. Clarice Maria R. Botta e Dr. Álvaro José dos Santos Neto, pela colaboração no exame de qualificação.

À técnica Eloisa Pozzi do campus II da USP de São Carlos, por ter me mostrado a princípio, sem compromisso, como se realiza uma análise de PCR.

À professora Dra. Joanna Wilson (McMaster University, Hamilton, Canadá), por ter me aceito, durante 4 meses, em seu laboratório para fazer o doutorado sanduiche.

Ao motorista Celso, por sempre estar presente e ajudado em todas as coletas de peixes realizadas neste trabalho.

As secretárias do departamento DFQM (Gislei, Veroneide e Claudia), da pós-graduação (Andreia, Silvia e Gustavo) e do grupo de cristalografia (Shirlei e Vânia) pelo auxílio na realização desta pesquisa.

Aos funcionários das oficinas, que me ajudaram na montagem do laboratório.

Ao IQSC por todo o suporte e infra-estrutura disponibilizada para a realização deste trabalho.

Aos colegas de grupo, principalmente ao Carlos, Gabriela, Thiessa, Luciana, Tiago e Lia pelas sugestões durante todo o trabalho, pelo auxílio na parte cromatográfica e com os peixes.

Aos amigos, Maraíssa e Rodrigo pelas discussões valiosas para a conclusão da tese.

À amiga Azize, pela amizade que se fortaleceu na salinha de experimento com peixes e pelas inúmeras discussões prazerosas com relação ao trabalho.

Aos meus pais e meu marido por estarem presentes sempre, me ajudando a lavar e encher aquários, cuidar dos peixes e também no momento de abrí-los. Além de terem toda a paciência do mundo todas as vezes que eu ligava desesperada para desabafar.

À amigas de sempre, Ma, Morango e Fran pelos momentos de descontração e pela amizade que dura desde a graduação.

À CAPES, por um mês de bolsa.

À FAPESP pela concessão da bolsa de estudo (Processo nº 2012/00150-0).

As tilápias do Nilo, sem elas nada disso seria possível. Fizeram parte de todas as minhas pesquisas desde a iniciação. Meus sinceros agradecimento e respeito.

E à todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, me auxiliaram na execução deste trabalho.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

Os parabenos utilizados como conservantes nas indústrias de cosméticos, alimentos e fármacos não são removidos por completo nas estações de tratamento de água e esgoto, além disso, podem causar danos a biota aquática. O presente estudo teve como finalidade aplicar um método analítico novo para quantificar o metil (MP), etil (EP), propil (PP), butil (BP), benzilparabeno (BzP) e a mistura (metil e propilparabeno) em amostras de água dos aquários com tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). A técnica analítica usada foi a cromatografia líquida com detector de arranjo de diodo (HPLC-DAD). Avaliou-se a toxicidade dos parabenos em tilápias e os efeitos nos biomarcadores bioquímicos dos animais após 6 e 12 dias dos testes de exposição e por administração via injeção intraperitoneal. A concentração dos parabenos utilizada em todos os testes foi de 4,0 mg L⁻¹ (de cada parabeno individualmente) e de 6,0 mg L⁻¹ do metil e de 1,7 mg L⁻¹ do propilparabeno para a mistura. Foram feitas análises nos biomarcadores superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione reduced (GSH-t) e peroxidação lipídica (MDA). O limite de detecção dos parabenos foi de 0,03 mg L⁻¹ (MP e EP), 0,05 mg L⁻¹ (PP) e 0,10 mg L⁻¹ (BP e BzP), e o limite de quantificação foi de 0,13 mg L⁻¹ (MP, EP, PP), 0,18 mg L⁻¹ (BP) e 0,25 mg L⁻¹ (BzP). Foi possível quantificar somente o PP e a mistura (MP + PP) nas amostras de água dos aquários que continham peixe, no máximo 30 h após a exposição. Nas amostras de água sem a presença dos peixes, foi possível quantificar o BP e a mistura, metil e propilparabeno, durante os 12 dias de exposição. Os testes de toxicidade mostraram que a concentração letal para 50% dos indivíduos após 48 h de exposição foi de 67,11 mg L⁻¹ do MP, 24,08 mg L⁻¹ do EP, 17,34 mg L⁻¹ do PP, 7,98 mg L⁻¹ do BzP e 7,80 mg L⁻¹ do BP, sendo que estes dois últimos compostos podem ser considerados os mais tóxicos da classe. Outro modo de ação tóxica também observada dos parabenos foi a narcose, ou seja, a perda temporária da consciência e da mobilidade. À medida que aumenta o comprimento da cadeia, aumenta a lipofilicidade destas substâncias, que está relacionada com o coeficiente de partição octanol/água (Kow) das mesmas e consequentemente aumenta a toxicidade. Estes dados indicaram que quanto mais lipofílico mais tóxico é o composto. Relacionando as atividades enzimáticas testadas com os níveis de peroxidação lipídica, o metilparabeno foi o único composto capaz de provocar danos aos tecidos testados por meio das espécies reativas de oxigênio. Isso foi comprovado através da inibição da atividade das enzimas analisadas com o aumento nos níveis de MDA. Por outro lado, mesmo com as enzimas antioxidantes apresentando atividades elevadas isso não foi suficiente para impedir a redução nos níveis de GSH-t. Tais resultados indicam que os parabenos podem agir negativamente nas tilápias.

Palavras-chave: parabenos, tilápia do Nilo, toxicidade, biomarcadores.

ABSTRACT

Parabens, used as preservatives in cosmetics, foodstuffs and pharmaceuticals are not completely removed from water in sewage treatments, which may cause damage to aquatic biota. The present study addresses a new methodology to measure the quantity of methyl (MP), ethyl (EP), propyl (PP), butyl (BP), benzyl (BzP) parabens and a mixture of methyl and propylparaben in water. Aquarium water of experiments with tilapia samples was analyzed for 12 days by liquid chromatography with a diode array detector (HPLC-DAD). The toxicity of parabens in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its effects on biochemical biomarkers were also evaluated after 6 and 12 days of exposure and intraperitoneal injection. The concentrations of parabens used in all tests were 4.0 mg L⁻¹ (alone) and to mixture was 6.0 mg L⁻¹ of methyl and 1.7 mg L⁻¹ of propylparaben. Biomarkers, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione reduced (GSH-t) and lipid peroxidation (MDA) were analyzed. The results show the detection limits for the analysis of parabens were 0.03 mg L⁻¹ (MP and EP), 0.05 mg L⁻¹ (PP) and 0.10 mg L⁻¹ (BP and BzP), and the quantification limits were 0.13 mg L⁻¹ (MP, EP, PP), 0.18 mg L⁻¹ (BP) and 0.25 mg L⁻¹ (BzP). In the water sample with fish, the compounds PP and the mixture (MP + PP) could be quantified up to 30h after exposure. In the water sample without fish, the compounds BP and the mixture were quantified for 12 days of exposure. Toxicity test revealed the lethal concentrations for 50% of individuals after 48 h of exposure were 67.11 mg L⁻¹ for MP, 24.08 mg L⁻¹ for EP, 17.34 mg L⁻¹ for PP, 7.98 mg L⁻¹ for BzP and 7.80 mg L⁻¹ for BP. Therefore, BzP and BP can be considered the most toxic of the class. As the chain length grows, the lipophilicity of the substances increases. Such an increase is related to their octanol/water (Kow) partition coefficient and, consequently, increases toxicity. Another toxic action observed for the parabens was the temporary loss of consciousness and mobility of the organisms. According to the enzymatic activity tested and the lipid peroxidation levels, the methylparaben was the only compound that caused damage by reactive oxidative species, supported by the inhibition of the activities of the enzymes and the increase in the MDA levels. However, the high activity of the antioxidant enzymes to exposure and intraperitoneal injections could not prevent the reduction in the levels of GSH-t. Such results indicate parabens can cause negative effects on tilapia.

Keywords: parabens, Nile tilapia, toxicity, biomarkers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo I

Figura 1 – Estruturas dos parabenos.....	18
Figura 2 – <i>O. niloticus</i> , adulto.....	24
Figura 3 – (A) Tanques rede da piscicultura Fazolin; (B) caixa d'água 250 L onde as tilápias foram aclimatadas.....	24
Figura 4 – Esquema do experimento com os compostos metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno, benzilparabeno e mistura (metil e propil).....	25
Figura 5 – Cromatograma dos padrões de parabenos na concentração de 10,0 mg L ⁻¹ , analisados por HPLC-DAD, MP: metilparabeno, EP: etilparabeno, PP: propilparabeno, BP: butilparabeno.....	28
Figura 6 – Cromatograma do padrão benzilparabeno (BzP) na concentração de 10,0 mg L ⁻¹ , analisado por HPLC-DAD.....	29
Figura 7 – Curva analítica dos parabenos analisados.....	30
Figura 8 – Concentração do metilparabeno presente nas amostras de água dos aquários (com e sem peixes) durante as 8 primeiras horas de experimento.....	33
Figura 9 – Concentração do metilparabeno presente nas amostras de água do aquário (sem peixe) durante os 12 dias de experimento.....	33
Figura 10 – Concentração do etilparabeno presente nas amostras de água dos aquários (com e sem peixes) durante as 8 primeiras horas d experimento.....	34
Figura 11 – Concentração do etilparabeno presente nas amostras de água do aquário (sem peixe) durante os 12 dias de experimento.....	34
Figura 12 – Concentração do propilparabeno presente nas amostras de água dos aquários (com e sem peixes) durante os dois primeiros dias de experimento.....	35
Figura 13 – Concentração de propilparabeno presente nas amostras de água do aquário (sem peixe) durante os 12 dias de experimento.....	35
Figura 14 – Concentração do butilparabeno presente nas amostras de água dos aquários (com e sem peixes) durante as 8 primeiras horas de experimento.....	36
Figura 15 – Concentração do butilparabeno presente nas amostras de água do aquário (sem peixe) durante os 12 dias de experimento.....	36
Figura 16 – Cromatograma do butilparabeno na amostra de água do aquário sem a presença de peixe ao final de 12 dias de experimento.....	37
Figura 17 – Concentração do benzilparabeno presente nas amostras de água dos aquários (com e sem peixes) durante as 8 primeiras horas de experimento.....	37
Figura 18 – Concentração do benzilparabeno presente nas amostras de água do aquário (sem peixe) durante os 12 dias de experimento.....	38
Figura 19 – Concentração da mistura (metil e propilparabeno) presente nas amostras de água dos aquários (com e sem peixes) durante as 30 primeiras horas de experimento.....	38
Figura 20 – Concentração da mistura (metil e propilparabeno) presente nas amostras de água do aquário (sem peixe) durante os 12 dias de experimento.....	39
Figura 21 – Cromatograma do propilparabeno na amostra de água do aquário sem a presença de peixe para o experimento da mistura (metil e propilparabeno) ao final de 12 dias.....	39

Capítulo II

Figura 1 – Ilustração da produção do ânion superóxido e da intervenção de enzimas antioxidantes para estabilizar os radicais livres formados nas células.....	51
--	----

Figura 2 - Esquema geral da cadeia de reações da peroxidação de lipídeos levando à formação de aldeídos tais como o malondialdeído. X = radical.....	53
Figura 3 - Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	54
Figura 4 - (A) tilápia juvenil; (B) tilápia adulta.....	56
Figura 5 - (A) Tanques rede da piscicultura Fazolin; (B) caixa d'água 250 L onde as tilápias foram aclimatadas.....	56
Figura 6 - Aquários utilizados durante os testes de toxicidade.....	57
Figura 7 - Esquema do teste de toxicidade para cada contaminante.....	58
Figura 8 - Exposição de 6 e 12 dias ao metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno, benzilparabeno e mistura.....	59
Figura 9 – Atividade da SOD nas brânquias e no fígado de tilápias, após exposição aos parabenos.....	67
Figura 10 – Atividade da SOD nas brânquias e no fígado de tilápias, após injeção dos parabenos.....	68
Figura 11 – Atividade da CAT nas brânquias e no fígado de tilápias, após exposição aos parabenos.....	69
Figura 12 – Atividade da CAT nas brânquias e no fígado de tilápias, após injeção dos parabenos.....	70
Figura 13 – Atividade da GPx nas brânquias e no fígado de tilápias, após exposição aos parabenos.....	70
Figura 14 – Atividade da GPx nas brânquias e no fígado de tilápias, após injeção dos parabenos.....	71
Figura 15 – Atividade da GR nas brânquias e no fígado de tilápias, após exposição aos parabenos.....	72
Figura 16 – Atividade da GR nas brânquias e no fígado de tilápias, após injeção dos parabenos.....	73
Figura 17 – Níveis de GSH-t nas brânquias e no fígado de tilápias, após exposição aos parabenos.....	73
Figura 18 – Níveis de GSH-t nas brânquias e no fígado de tilápias, após injeção dos parabenos.....	75
Figura 19 – Níveis de MDA nas brânquias e no fígado de tilápias, após exposição aos parabenos.....	76
Figura 20 – Níveis de MDA nas brânquias e no fígado de tilápias, após injeção dos parabenos.....	76

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1 - Massa molecular, Log P e solubilidade dos parabenos.....	19
Tabela 2 - Gradiente da fase móvel usada na detecção dos parabenos.....	26
Tabela 3 - Concentrações utilizadas para cada parabeno para a construção da curva analítica.....	27
Tabela 4 - Resultados obtidos no calculo da linearidade do método analítico HPLC-DAD, para os analitos em estudo.....	30
Tabela 5 - Precisão do método utilizado para os parabenos em análise.....	31
Tabela 6 - Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) para os parabenos estudados.....	32
Tabela 7 - Temperatura e pH dos grupos experimentais durante o período de 12 dias de experimento.....	32

Capítulo II

Tabela 1 – Valores de concentração letal (LC_{50}) obtidos nos estudos com parabenos.....	48
Tabela 2 – Valores de concentração utilizados nos testes de toxicidade para os parabenos analisados.....	58
Tabela 3 – Biomarcadores analisados e suas metodologias.....	63
Tabela 4 – Média e desvio padrão do comprimento dos peixes, temperatura e pH, durante a realização dos teste de toxicidade.....	65
Tabela 5 - Concentração letal para 50% dos organismos (LC_{50}) para 48 h de exposição aos parabenos considerando toxicidade aguda em Tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) juvenis, limite de 95% de confiança (CL), Log Kow e solubilidade dos parabenos em água.....	65
Tabela 6 – Resumo dos resultados dos biomarcadores analisados.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BP	Butilparabeno
BzP	Benzilparabeno
CAT	Catalase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DAD	Detector por Arranjo de Diodos
DPR	Desvio Padrão Relativo
EP	Etilparabeno
EPA	Environmental Protection Agency
FDA	Food Drug Administration
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GC-MS	Cromatógrafo a gás acoplado com espectrômetro de massa
GPx	Glutathione Peroxidase
GR	Glutathione Redutase
GSH	Glutathione Reduzida
GSH-t	Glutathione Total
GSSG	Glutathione Oxidada
HPLC-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector de Arranjo de Diodos
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
K _{ow}	Coefficiente de partição octanol/água
LC-MS	Cromatógrafo líquido acoplado com espectrômetro de massa
LC ₅₀	Concentração Letal para 50% dos indivíduos
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
LPO	Peroxidação Lipídica
MDA	Malondialdeído
MP	Metilparabeno
HO [•]	Radical Hidroxila
O ₂ ⁻	Radical Superóxido
O ₂	Oxigênio molecular
PP	Propilparabeno
PCA	Ácido Perclórico
r	Coefficiente de correlação
SOD	Superóxido Dismutase
TBA	Ácido TioBarbitúrico
VTG	Vitelogenina

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO DA TESE.....	14
INTRODUÇÃO GERAL.....	15
CAPÍTULO I – Desenvolvimento, validação e aplicação de método analítico para análise do metil, etil, propil, butil e benzilparabeno em amostras de água de aquário de experimento contendo Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	17
I.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
I.1.1 Conservantes.....	18
I.1.2 Métodos analíticos aplicados aos parbenos.....	20
I.1.3 Validação do método.....	22
I.1.3.1 Linearidade.....	22
I.1.3.2 Precisão.....	22
I.1.3.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	23
I.2 OBJETIVO.....	23
I.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
I.3.1 Organismo-teste.....	23
I.3.2 Desenho experimental.....	24
I.3.3 Análise das amostras de água dos aquários.....	25
I.3.4 Condições cromatográficas e método aplicado para análise de parabenos nas amostras de água de aquário.....	26
I.3.5 Validação do método analítico.....	26
I.3.5.1 Linearidade.....	27
I.3.5.2 Precisão.....	27
I.3.5.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	27
I.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	28
I.4.1 Análise cromatográfica dos padrões.....	28
I.4.2 Validação do método analítico.....	29
I.4.2.1 Linearidade.....	29
I.4.2.2 Precisão.....	31
I.4.2.3 Limite de Detecção e de Quantificação.....	31
I.4.3 Análise quantitativa dos parabenos nas amostras de água dos aquários.....	32
I.5 CONCLUSÃO.....	41
REFERÊNCIAS.....	42
CAPÍTULO II – Avaliação dos efeitos em biomarcadores bioquímicos de Tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) expostas a metil, etil, propil, butil e benzilparabeno.....	46

II.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	47
II.1.1 Contaminação aquática.....	47
II.1.2 Biomarcadores.....	49
II.1.2.1 Estresse Oxidativo.....	50
II.1.2.2 Dano Oxidativo.....	52
II.1.3 Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	54
II.2 OBJETIVOS.....	55
II.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
II.3.1 Organismo teste.....	55
II.3.2 Teste de toxicidade.....	57
II.3.3 Bioensaios.....	58
II.3.4 Análise de bioquímica.....	60
II.3.4.1 Preparo das amostras para análise das enzimas antioxidantes.....	60
II.3.4.2 Preparo das amostras para análise dos níveis de glutathione total.....	60
II.3.4.3 Preparo das amostras para a análise da peroxidação lipídica.....	61
II.3.4.4 Superóxido dismutase.....	61
II.3.4.5 Catalase.....	61
II.3.4.6 Glutathione peroxidase.....	62
II.3.4.7 Glutathione redutase.....	62
II.3.4.8 Glutathione reduzida.....	62
II.3.4.9 Peroxidação lipídica.....	62
II.3.4.10 Análise de proteína.....	63
II.3.5 Análise estatística.....	64
II.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	64
II.4.1 Teste de Toxicidade.....	64
II.4.2 Análise bioquímica.....	67
II.5 CONCLUSÃO.....	79
REFERÊNCIAS.....	81
APÊNDICE I – Teste de toxicidade.....	87
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	89

APRESENTAÇÃO DA TESE

A tese está dividida em introdução geral na qual é apresentada a importância deste estudo; o capítulo I contém a parte analítica do trabalho; o capítulo II trata-se da análise de biomarcadores bioquímicos e por fim, sugestões para trabalhos futuros.

INTRODUÇÃO GERAL

Milhares de substâncias antropogênicas persistentes foram produzidas a partir da segunda metade do século 20, com o desenvolvimento do processo de industrialização e a urbanização e a disposição destas no meio ambiente, sem estudo prévio da toxicidade fizeram com que o impacto ambiental aumentasse (KINANI et al.; 2010). Entre os compostos presentes no esgoto sanitário estão os Produtos Farmacêuticos e de Cuidado Pessoal, com uma média de 100 toneladas por ano (KASPRZYK-HORDERN; DINSDALE; GUWY, 2008). Estas classes de produtos possuem em suas composições conservantes, que são substâncias orgânicas consideradas emergentes (RAMASWAMY et al.; 2011, SILVA; COLLINS, 2011).

O sistema aquático é um dos principais ecossistemas que recebe grande parte dos poluentes orgânicos por meio de descarga dos resíduos urbanos e industriais (KASPRZYK-HORDERN; DINSDALE; GUWY, 2008, HALLING-SØRENSEN et al.; 1998¹, apud CARLSSON et al.; 2006). A presença destes produtos no esgoto pode provocar danos à fauna e flora local, bem como aos seres humanos (LEE; PEART; SVOBODA, 2005), visto que não há um método específico capaz de eliminar totalmente essas substâncias nas estações de tratamento de esgoto.

Desta forma, é recente a preocupação com as consequências dos efeitos tóxicos dos conservantes sobre a comunidade dos peixes (BJERREGAARD et al.; 2008, DOBBINS et al.; 2009, TERASAKI et al.; 2009, YAMAMOTO et al.; 2011, RAMASWAMY et al.; 2011). Estudos revelam que os parabenos, uma classe de conservantes utilizados em cosméticos, podem causar efeitos adversos na reprodução, desenvolvimento e fertilidade de peixes (INUI et al., 2003; PEDERSEN et al., 2000; BJERREGAARD et al., 2003; ALSLEV; KORSGAARD; BJERREGAARD, 2005).

A análise de biomarcadores bioquímicos é uma das maneiras de verificar os danos causados pelos poluentes orgânicos nos animais aquáticos, ou seja, qualquer alteração nos parâmetros bioquímicos que reflete a interação ocorrida entre a substância química considerada tóxica e o sistema biológico, indicando uma modificação no estado normal, em nível molecular, celular e/ou fisiológico (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

¹ HALLING-SØRENSEN, B.; NORS NIELSEN, S.; LANZKY, P.F.; INGERSLEV, F.; HOLTZEN LÜTZHØFT H-C, JØRGENSEN, S.E. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment — a review. *Chemosphere*, v. 36, p. 357-393, 1998.

Este estudo é de grande importância, pois não há pesquisas sobre os efeitos da exposição de parabenos nos biomarcadores bioquímicos de peixes. Na literatura, encontram-se somente trabalhos sobre os efeitos do butil e metilparabeno nos biomarcadores de ratos e usando os parâmetros catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione reduced (GSH) e malondialdeído (MDA) (SHAH; VERMA, 2011, POPA et al.; 2011).

Dentre as técnicas analíticas mais utilizadas para identificar e quantificar parabenos em diferentes matrizes a cromatografia em fase líquida em amostras de sedimento, solo (NÚÑEZ et al.; 2010), saliva, creme dental (ZOTOU; SAKLA; TZANAVARAS, 2010) e xarope para tosse (GROSA et al.; 2006). A eletroforese capilar em amostras de espuma de xampu (LABAT et al.; 2000), xarope, creme para as mãos, base em pó (ROSSI; DESIDERIO, 2002) e água (BLANCO et al.; 2009).

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma das mais importantes técnicas de separação de amostras contendo um grande número de analitos similares. Quando acoplado ao detector de absorvância na região do UV-VIS, que pode analisar em diferentes comprimentos de onda, como o detector por arranjo de diodo (DAD) apresenta vantagens como: espectros tridimensionais; melhor detectabilidade, eliminando os picos de interferentes; permite análises qualitativas; pode-se determinar a pureza do pico cromatográfico, além de reduzir o desvio e o ruído da linha de base (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Assim, é importante conhecer, identificar e avaliar as condições e o comportamento dos parabenos no meio ambiente e nos sistemas bioquímicos de peixes, com a finalidade de fornecer informações importantes para estudos de campo.

CAPÍTULO I

Validação e aplicação de método analítico para análise do metil, etil, propil, butil e benzilparabeno em amostras de água de aquário de experimento contendo Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

I.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

I.1.1 Conservantes

Os conservantes são compostos biologicamente ativos cuja finalidade é inibir o crescimento de microrganismos em cosméticos, fármacos e alimentos durante a fabricação e estocagem, além de proteger os produtos contra contaminação externa. Entretanto, essas substâncias podem afetar organismos não alvos (CARLSSON et al.; 2006, ANVISA, 2012).

Para um conservante ser considerado ideal é necessário apresentar um amplo espectro antimicrobiano, ser estável, eficaz em uma ampla margem de pH, não tóxico e não irritante (LEY; MENDAZA; GÓMEZ, 2006). Caso o conservante não possua todas estas características, outros produtos de mesma finalidade são utilizados em formulações.

Entre os diversos conservantes permitidos pela legislação brasileira estão o ácido p-hidroxibenzóico, parabeno e seus ésteres (metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno e benzilparabenos), Figura 1.

Figura 1 – Estrutura dos parabenos.

$R = \text{CH}_3$	Metilparabeno
$R = \text{CH}_2\text{CH}_3$	Etilparabeno
$R = (\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$	Propilparabeno
$R = (\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$	Butilparabeno
$R = \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	Benzilparabeno

Fonte: Autoria própria.

Tendo em vista as características visuais, pH e tamanho de gota oleosa, os parabenos são os compostos mais adequados para serem utilizados como agentes antimicrobianos (ANGELOV; VLASENKO; TASHKOV, 2007), antifúngico e antibacteriano (KANG et al.; 2013). Além disso, à medida que aumenta o comprimento da cadeia carbônica do grupo alquil e a massa molecular, aumenta o caráter lipofílico, efeito que concomitantemente aumenta o potencial conservante do produto (NÚÑEZ et al.; 2010). A Tabela 1 apresenta a massa molecular, o log do coeficiente octanol/água e a solubilidade dos parabenos em água a 25 °C.

Tabela 1 – Massa molecular, Log P e solubilidade em água dos parabenos.

Parabenos	Massa molecular (g mol⁻¹)	Log P	Solubilidade a 25 °C (mg L⁻¹)
Metilparabeno	152,15	1,96	2500
Etilparabeno	166,17	2,47	885
Propilparabeno	180,2	3,04	500
Butilparabeno	194,23	3,57	207
Benzilparabeno	228,24	3,70	23

Fonte: Adaptado de Dobbins e colaboradores (2009).

Os parabenos possuem baixa reatividade, amplo espectro de atividade antimicrobiana, são estáveis a mudança de pH, inodoros, incolores, não-voláteis, resistentes a hidrólise em aquecimento, resfriamento de água (autoclave) e em meio ácido, além disso, tem um custo reduzido, baixa absorção em embalagens, não descolorem e nem endurecem formulações (BRAUSCH; RAND, 2011, GOLDEN; GANDY; VOLLMER, 2005, SONI; CARABIN; BURDOCK, 2005).

Atualmente existem sete diferentes parabenos que são utilizados como conservantes: etilparabeno, metilparabeno, propilparabeno, isopropilparabeno, butilparabeno, isobutilparabeno e benzilparabeno (BRAUSCH; RAND, 2011). Nas formulações de cosméticos, fármacos e alimentos, muitas vezes são usados a misturas de dois ou mais parabenos, por apresentarem efeito sinérgico (SONI; CARABIN; BURDOCK, 2005). Destes sete parabenos, o metil e o propil são os mais utilizados (ZOTOU; SAKLA; TZANAVARAS, 2010). Para atuarem corretamente como conservantes, devem possuir estabilidade metabólica e serem resistentes a biodegradação (LI; LI; RANDAK, 2010).

Para exercer atividade antimicrobiana, os parabenos devem estar na forma não ionizada, assim, a redução do pH de um cosmético acarreta em um aumento na proporção de moléculas não ionizadas para atuarem nos microrganismos, facilitando a penetração nas membranas celulares e executando sua ação inibitória. Esses ácidos lipofílicos alteram a permeabilidade da membrana celular e interferem nas reações metabólicas do crescimento e da atividade celular microbiana (SONI; CARABIN; BURDOCK, 2005).

Os parabenos podem entrar em contato com os seres humanos e organismos aquáticos através da ingestão, inalação ou absorção dérmica (KANG et al.; 2013). Como conservante em alimentos, uma mistura com o metil e propilparabeno é a mais usada, na proporção de: 3:1 em tortas, bolos, glacês e recheios; 2:1 em refrigerantes, geléias e gelatina; 0,1% em combinação, em cremes, pastas, azeite e conservas; 0,7% em combinação, em xaropes.

Sozinhos ou em combinação também são usados nas formulações de muitos cosméticos para pele, cabelos, lábios, mucosas, axilas e unhas. No uso farmacológico, o propilparabeno é um dos fungicidas mais efetivos utilizados nas formulações de supositórios, anestésicos, pílulas, xaropes, contraceptivos e soluções injetáveis. A concentração do propilparabeno pode variar de produto para produto, embora a Food and Drug Administration (FDA) classifique os parabenos como ingredientes inativos em contraceptivos, analgésicos e em medicamentos injetáveis e de inalação (SONI; CARABIN; BURDOCK, 2005).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), é quem regulariza o uso de parabenos em produtos de higiene pessoal, fármacos e alimentos. De acordo com a resolução - RDC nº 29 de 1º de junho de 2012 da ANVISA, são permitidos concentrações máximas para o ácido 4-hidroxibenzóico, seus sais e ésteres (parabenos) 0,4% (expresso como ácido) individual e 0,8% (expresso como ácido) para mistura dos sais e ésteres. Essa resolução é baseada na diretiva 76/768/EEC, da Comunidade Européia, que estabelece um limite máximo de 1% de parabenos em produtos farmacêuticos (OISHI, 2002, EC, 2005).

1.1.2 Métodos analíticos aplicados aos parabenos

A presença de parabenos no ambiente tem gerado um elevado interesse da sociedade científica em separá-los, identificá-los, e quantificá-los em diferentes matrizes. Em vista disto, pesquisadores dispõem de técnicas analíticas, tais como a cromatografia, dentre outras, com adequada seletividade e sensibilidade para analisá-los (RIBANI et al.; 2004).

A cromatografia a gás com detector de massas (GC-MS) é uma técnica específica para substâncias voláteis. Entretanto, para a análise de parabenos, esta técnica requer a etapa de derivatização devido a polaridade das moléculas e a baixa volatilidade dos mesmos (ALBERO et al.; 2012, YE et al.; 2008).

A GC-MS foi usada para analisar parabenos em amostras de poeira do interior de residências (CANOSA et al.; 2007) (RAMÍREZ; MARCÉ; BORRULL, 2011), em esgoto sanitário antes e depois de tratado em cidades do sul de Ontário (Canadá) (LEE; PEART; SVOBODA, 2005), em amostras de água do rio Colorado, sul da Califórnia (Estados Unidos) (LORAIN; PETTIGROVE, 2006), em esgoto sanitário tratado da cidade de Madrid (Espanha) (ALBERO et al.; 2012) e em amostras do ar de dentro e de fora de residências de pessoas não fumantes nos Estados Unidos (RUDEL et al.; 2010).

A cromatografia líquida com espectrometria de massas (LC-MS) tem um caráter de alta seletividade e sensibilidade. Além de fornecer informações da estrutura química dos

analitos, também contribui na identificação dos mesmos. Embora, uma das limitações seja o efeito matriz (BENIJTS et al.; 2004), muitos trabalhos na literatura utilizam esse detector devido a alta complexidade das matrizes ambientais e biológicas.

Esta técnica foi utilizada para identificar parabenos na urina de crianças menores de 6 anos nos Estados Unidos entre 2005 e 2006 (CALAFAT et al.; 2010), em lodo de esgoto (NIETO et al.; 2009), em leite materno (YE et al.; 2008), em água do rio Schelde (Bélgica) (BENIJTS et al.; 2004), em águas superficiais no sul do país de Gales (Reino Unido) (KASPRZYK-HORDERN; DINSDALE; GUWY, 2008), em águas dos rios de Aveiro (Portugal) (JONKERS et al.; 2010) e em amostras de esgoto bruto de cidades da região da Galícia (Espanha) (GONZÁLEZ-MARIÑO et al.; 2009).

Outra técnica muito usada também é a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo (HPLC-DAD), que se baseia na absorbância de luz pelo analito e permite trabalhar em diferentes comprimentos de onda. Possui alta seletividade e permite análise qualitativa e quantitativa. Esta técnica foi utilizada na análise de parabenos em cosméticos, embora os LD encontrados fossem altos em comparação aos detectores MS e de luminiscência, Fei e colaboradores (2011) relataram que a sensibilidade do DAD é suficientemente alta.

Shen e colaboradores (2007) também utilizaram a técnica HPLC-DAD para melhor separar e determinar os parabenos metil, etil, propil e butil em 15 tipos de cosméticos. Delgado e colaboradores (2012) usaram a técnica HPLC-DAD para separar e determinar butilparabeno em sedimentos marinhos.

Em amostras de água de torneira, de piscina, de estuário da cidade de Lisboa (Portugal), Almeida e Nogueira (2014), utilizaram a técnica HPLC-DAD para determinar metil, etil, propil e butilparabeno, tendo uma boa análise para monitorar simultaneamente esses parabenos em matrizes reais. Grosa e colaboradores (2006) relataram que a técnica HPLC-DAD é eficiente para separação simultânea de metil e propilparabeno em xarope para tosse.

Assim, esta técnica se mostra eficiente para detectar simultaneamente vários analitos utilizando diferentes comprimentos de onda, porque a partir do espectro de cada composto é possível eliminar os picos interferentes e melhorar a detectabilidade da técnica (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

I.1.3 Validação do método

Para garantir que uma metodologia analítica gere dados confiáveis e forneça informações adequadas é necessário que se avalie os diferentes parâmetros de validação com a finalidade de fornecer resultados fidedigno e reprodutíveis, caso contrário, esses resultados podem levar a conclusões errôneas (RIBANI et al.; 2004).

Para que o método atenda as exigências analíticas para este estudo, deve-se apresentar os parâmetros de linearidade, precisão, limite de detecção e limite de quantificação, adequados à análise.

I.1.3.1 Linearidade

A linearidade é a capacidade do método em mostrar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, dentro de um intervalo específico de concentração. É recomendado que a linearidade seja determinada com no mínimo 5 concentrações diferentes (ANVISA, 2003). A linearidade do método pode ser analisada pela verificação do coeficiente angular e pelo coeficiente de correlação (r) da reta.

Além disso, deve-se verificar a ausência de valores discrepantes para cada nível de concentração e a homocedasticidade dos dados, ou homogeneidade da variância dos resíduos (INMETRO, 2010). A homocedasticidade deve garantir que os erros obtidos através dos gráficos de resíduos são aleatórios e não seguem uma tendência.

I.1.3.2 Precisão

A precisão avalia a proximidade dos resultados entre ensaios independentes e pode ser expressa de diferentes formas como repetitividade, reprodutibilidade e precisão intermediária (INMETRO, 2010).

De acordo com a ANVISA (2003), a precisão pode ser analisada pelo desvio padrão relativo (DPR) na forma de repetitividade, recomendando-se a avaliação de três níveis de concentrações (baixo, médio e alto) e fazendo-se no mínimo 5 determinações de cada concentração (RIBANI et al.; 2004).

I.1.3.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O limite de detecção (LD) é a menor concentração do analito que pode ser detectada pelo método, mas não necessariamente quantificada. Pode ser calculado de três formas diferentes: pelos métodos instrumentais (razão sinal/ruído e baseados nos parâmetros da curva analítica) ou não instrumentais (método visual) (INMETRO, 2010, ANVISA, 2003).

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração encontrada do analito na amostra analisada sob as condições experimentais estabelecidas, para se determinar esse parâmetro pode-se utilizar os mesmos métodos anteriormente descritos: sinal/ruído, visual ou baseados nos parâmetros da curva analítica (INMETRO, 2010, ANVISA, 2003).

I.2 OBJETIVO

- Validar e aplicar o método analítico utilizando HPLC-DAD para análise dos parabenos, metil, etil, propil, butil, e benzil em amostras de água de aquário de experimento com Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

I.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos com peixes submetidos aos parabenos, metil, etil, propil, butil e benzil, foram feitos após aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo (USP), Campus de Ribeirão Preto, processo nº 12.1.382.53.5.

I.3.1 Organismo-teste

Para estes experimentos utilizou-se espécimes adultas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (*Peciforme, Cichlidae*), machos, de 10-15 cm de comprimento (Figura 2).

Figura 2 – *O. niloticus*, adulto.

Fonte: Autoria própria.

Os peixes eram sexualmente invertidos e foram adquiridos na piscicultura “Fazolin”, localizada no município de Socorro, São Paulo, Brasil. Na piscicultura os animais ficavam em tanques rede (Figura 3A). Após o transporte até o laboratório, os peixes foram aclimatados por 15 dias em caixa d’água de 250 L (Figura 3B) à temperatura média de 27 °C, com aeração constante e fotoperíodo de 16 h claro/8 h escuro. As tilápias foram alimentadas uma vez ao dia, com ração própria para peixes.

Figura 3 - (A) Tanques rede da piscicultura Fazolin; (B) caixa d’água 250 L onde as tilápias foram aclimatadas.

Fonte: Autoria própria.

I.3.2 Desenho experimental

O experimento foi feito em 12 aquários com medidas de 22 cm x 46 cm x 26 cm e volume de 20 L de água, sendo 6 com peixe e os outros 6 sem, Figura 4. Os animais permaneceram por 2 dias nos aquários para adaptação às condições dos mesmos.

Posteriormente os compostos foram adicionados à água dos aquários, considerando uma concentração de 10 vezes menos do que o limite máximo permitido na legislação brasileira para uso de parabenos em cosmético, 0,4% quando adicionado individualmente e 0,8% quando utilizados em misturas, seguindo-se a resolução - RDC nº 29 de 1º de junho de 2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2012). Assim, a concentração dos compostos usados separadamente em cada aquário foi de $4,0 \text{ mg L}^{-1}$, e para a mistura, utilizou-se os dois parabenos mais usados nas formulações de cosméticos, metil e propil, com uma relação de 80% ($6,0 \text{ mg L}^{-1}$) do metil e 20% ($1,7 \text{ mg L}^{-1}$) do propilparabeno. Esta porcentagem foi usada segundo testes de toxicidade do presente estudo (Capítulo II). A duração do experimento foi de 12 dias, mesmo tempo utilizado nos bioensaios de exposição e por injeção intraperitoneal do capítulo II, para verificar se os compostos permaneceriam ou não na água durante o tempo do experimento.

Figura 4 – Esquema do experimento com os compostos metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno, benzilparabeno e mistura (metil e propil).

Fonte: Autoria própria.

Ao final deste experimento, a água dos aquários foi passada por filtro de carvão ativado antes de ser lançada em esgoto comum. As carcaças dos animais foram coletadas por uma empresa especializada em tratamento de resíduos biológicos. Os resíduos químicos resultantes das análises foram armazenados em recipientes apropriados e encaminhados ao Laboratório de Resíduos do Campus da USP de São Carlos.

1.3.3 Análise das amostras de água dos aquários

Foram coletados 1,5 mL de amostra de água de cada aquário (com e sem peixe) de hora em hora a partir do tempo zero, durante os dois primeiros dias e de três em três horas nos 10 dias posteriores. Em seguida, foram feitas as análises cromatográficas dos parabenos nas amostras de água dos aquários sem extração.

I.3.4 Condições cromatográficas e método aplicado para análise de parabenos nas amostras de água de aquário

Os padrões analíticos dos parabenos foram adquiridos junto à empresa Sigma Aldrich com grau de pureza $\geq 99\%$. As soluções utilizadas para determinar as condições cromatográficas foram preparadas a partir da solução estoque na concentração de $50,0 \text{ mg L}^{-1}$ em metanol grau HPLC (Panreac Química S.L.U). Todas as soluções foram armazenadas em frascos âmbar e refrigeradas a -4°C .

Os parabenos foram analisados utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência com detector com arranjo de diodos (HPLC-DAD) da marca Agilent Technologies, modelo 1200 Series (USA), com desgaseificador G1322A, bomba quaternária G1311A, amostrador automático ALS G1329A, compartimento da coluna termostatizado G1315A e detector de arranjo de diodos G1315D. Foram utilizadas também uma pré-coluna e uma coluna C8, Zorbax SBC8, $4,6 \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$ de tamanho de partícula (Agilent Technologies, USA).

Os parâmetros para a otimização das condições cromatográficas do método tiveram como base a pesquisa de Labat e colaboradores (2000) com algumas modificações. O volume de injeção da amostra foi de $100 \mu\text{L}$, temperatura da coluna 25°C e comprimento de onda 258 nm . A fase móvel selecionada para análise dos parabenos foi água com 1% de ácido acético / metanol ($35:65$, v/v), com vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e tempo de corrida de 20 minutos, em modo gradiente para garantir a limpeza da coluna antes da próxima injeção, Tabela 2.

Tabela 2- Gradiente da fase móvel usada na análise dos parabenos.

Tempo (min)	Ác. acético (%)	Metanol (%)	Vazão (mL min^{-1})
9,0	35,0	65,0	1,0
11,0	0,0	100,0	1,0
14,0	0,0	100,0	1,0
16,0	35,0	65,0	1,0
20,0	35,0	65,0	1,0

Fonte: Autoria própria.

I.3.5 Validação do método analítico

Após a otimização das condições cromatográficas, a validação do método analítico foi feita avaliando os seguintes parâmetros:

I.3.5.1 Linearidade

A linearidade foi determinada a partir da injeção em triplicata de sete soluções preparadas com a matriz mais os padrões a partir da solução estoque com concentração de 50,0 mg L⁻¹, Tabela 3.

Tabela 3- Concentrações utilizadas para cada parabeno para a construção da curva analítica.

Parabeno	conc. 1 (mg L ⁻¹)	conc. 2 (mg L ⁻¹)	conc. 3 (mg L ⁻¹)	conc. 4 (mg L ⁻¹)	conc. 5 (mg L ⁻¹)	conc. 6 (mg L ⁻¹)	conc. 7 (mg L ⁻¹)
Metil	10,0	7,5	5,0	1,25	0,5	0,13	0,13
Etil	10,0	7,5	5,0	1,25	0,5	0,13	0,13
Propil	10,0	7,5	5,0	1,25	0,5	0,13	0,13
Butil	10,0	7,5	5,0	1,25	0,5	0,13	0,18
Benzil	10,0	7,5	5,0	1,25	0,5	0,13	0,25

Fonte: Autoria própria.

Para verificar a homogeneidade de variância aplicou-se o teste F. Todas as curvas foram no programa da Microsoft Excel[®], determinando-se a equação da regressão linear ponderada e obtendo-se o coeficiente linear e angular, além do coeficiente de determinação, coeficiente de correlação para cada composto estudado.

I.3.5.2 Precisão

Os testes para a determinação da precisão foram feitos em um mesmo dia, com o mesmo equipamento e mesmo analista, por meio da utilização do desvio-padrão relativo (DPR) a partir de cinco injeções nos níveis de concentração alto, médio e baixo, segundo Ribani e coladores (2004). Como os compostos estudados estavam em concentrações de mg L⁻¹, o critério de aceitação foi do DPR entre 1 a 2%.

I.3.5.3 Limite de Detecção e Quantificação

Para o cálculo do limite de detecção (LD) e do limite de quantificação (LQ) foi considerada a relação sinal/ruído da linha de base igual a 3 para o LD, e de 10 para o LQ, segundo ANVISA (2003).

I.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

I.4.1 Análise cromatográfica dos padrões

As Figuras 5 e 6 apresentam os cromatogramas dos padrões metil, etil, propil e butilparabeno e o do padrão benzilparabeno, respectivamente, obtidos por HPLC-DAD.

Figura 5 - Cromatograma dos padrões de parabenos na concentração de $10,0 \text{ mg L}^{-1}$, analisados por HPLC-DAD, MP: metilparabeno, EP: etilparabeno, PP: propilparabeno, BP: butilparabeno.

Fonte: Autoria própria.

Figura 6 - Cromatograma do padrão benzilparabeno (BzP) na concentração de $10,0 \text{ mg L}^{-1}$, analisado por HPLC-DAD.

Fonte: Autoria própria.

Estes resultados foram semelhantes aos encontrados por Shen e colaboradores (2007) e Zotou, Sakla e Tzanavaras (2010). Pode-se observar, a partir dos cromatogramas, que o tempo de análise total dos parabenos foi de aproximadamente 20 minutos. Nota-se boa separação e resolução dos picos cromatográficos referentes aos parabenos em estudo, exceto para os compostos butil e benzilparabeno que coeluem, então, fez-se análise do BzP separado dos demais.

I.4.2 Validação do método analítico

I.4.2.1 Linearidade

Para a obtenção da linearidade, foram construídas curvas analíticas seguindo a equação, $y = bx + a$, com sete concentrações. A Tabela 4 apresenta as equações obtidas por regressão linear ponderada, o coeficiente de correlação (r) das curvas dos parabenos e a faixa de trabalho utilizada. A Figura 7 apresenta a curva analítica dos parabenos analisados.

Tabela 4 - Resultados obtidos no cálculo da linearidade do método analítico HPLC-DAD, para os analitos em estudo.

Parabenos	Faixa de trabalho (mg L ⁻¹)	Equação de regressão linear	Coefficiente de correlação
Metilparabeno	0,13 – 10,0	$y = (584,29) x - 5,91$	0,996
Etilparabeno	0,13 – 10,0	$y = (527,42) x - 4,41$	0,994
Propilparabeno	0,13 – 10,0	$y = (542,89) x - 6,28$	0,996
Butilparabeno	0,18 – 10,0	$y = (433,88) x - 15,69$	0,994
Benzilparabeno	0,25 – 10,0	$y = (303,54) x - 13,63$	0,999

Fonte: Autoria própria.

Figura 7 – Curva analítica dos parabenos analisados.

Fonte: Autoria própria.

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003) o valor do coeficiente de correlação não deve ser inferior a 0,99. Como pode se observar, pelos dados da Tabela 4, os coeficientes de correlação foram superiores a 0,99, o que demonstra que a resposta do detector DAD está de acordo com as normas da ANVISA (2003). Isto indica um

ajuste ideal dos dados para a equação de regressão linear ponderada. Para a análise dos parabenos, a faixa de concentração estudada foi linear.

I.4.2.2 Precisão

A precisão foi avaliada a partir da análise cromatográfica das soluções na concentração de 0,13 mg L⁻¹ para o metil, etil, e propilparabeno e 0,18 mg L⁻¹ para o butil e 0,25 mg L⁻¹ para benzilparabeno para nível baixo; 2,5 mg L⁻¹ nível médio e 10,0 mg L⁻¹ nível alto. Foram feitas análises para cada solução em quintuplicata. A precisão foi determinada a partir do desvio-padrão relativo, Tabela 5.

Tabela 5 – Precisão do método utilizado para os parabenos em análise.

Parabenos	Concentração (mg L ⁻¹)	Precisão (%)
Metilparabeno	1,3 x 10 ⁻¹	1,3
	2,5 x 10 ⁰	1,6
	1,0 x 10 ¹	1,7
Etilparabeno	1,3 x 10 ⁻¹	1,0
	2,5 x 10 ⁰	1,4
	1,0 x 10 ¹	1,3
Propilparabeno	1,3 x 10 ⁻¹	1,5
	2,5 x 10 ⁰	1,5
	1,0 x 10 ¹	1,8
Butilparabeno	1,8 x 10 ⁻¹	1,4
	2,5 x 10 ⁰	1,6
	1,0 x 10 ¹	1,7
Benzilparabeno	2,5 x 10 ⁻¹	1,7
	2,5 x 10 ⁰	1,6
	1,0 x 10 ¹	1,9

Fonte: Autoria própria.

A precisão ficou entre 1 e 2% do desvio padrão relativo, indicando boa precisão do método (RIBANI et al.; 2004).

I.4.2.3 Limite de Detecção e de Quantificação

Para a determinação do limite de detecção e do limite de quantificação utilizou-se o procedimento descrito no item 1.4.2, Tabela 6.

Tabela 6 - Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) para os parabenos estudados.

Parabenos	LD(mg L⁻¹)	LQ(mg L⁻¹)
Metilparabeno	0,03	0,13
Etilparabeno	0,03	0,13
Propilparabeno	0,05	0,13
Butilparabeno	0,07	0,18
Benzilparabeno	0,08	0,25

Fonte: Autoria própria.

Pode se notar que os LD variaram de 0,03 a 0,08 mg L⁻¹ e os LQ variaram de 0,13 a 0,25 mg L⁻¹. De acordo com Labat e colaboradores (2000) os LD encontrados por esses autores para os compostos metil, etil, propil e butilparabeno estão bem próximos com os do presente estudo.

1.4.3 Análise dos parabenos presentes nas amostras de água dos aquários

A temperatura foi controlada por meio de um aquecedor. O pH e a temperatura da água dos aquários foram medidos diariamente durante todo o período do experimento e estes parâmetros permaneceram constantes, Tabela 7.

Tabela 7 – Temperatura e pH da água dos aquários durante o período de 12 dias de experimento.

Grupo	Temperatura (°C)	pH
Metilparabeno	(27,58 ± 1,10)	(7,98 ± 0,25)
Etilparabeno	(27,40 ± 1,03)	(7,99 ± 0,23)
Propilparabeno	(27,75 ± 0,93)	(7,93 ± 0,25)
Butilparabeno	(27,69 ± 0,86)	(7,98 ± 0,19)
Benzilparabeno	(27,50 ± 0,86)	(7,90 ± 0,24)
Mistura (metil e propil)	(27,33 ± 0,92)	(7,92 ± 0,26)

Fonte: Autoria própria.

Observa-se pelos gráficos da Figura 8, que não foi possível quantificar o metilparabeno nas amostras de água do aquário contendo peixe após aproximadamente 5 h de exposição. Isso sugere que a concentração do metilparabeno está abaixo do LD do método, é provável que o composto tenha sido absorvido pelo peixe. Porém este comportamento não foi observado quando se analisou amostras de água do aquário que não havia peixe, Figura 8.

Figura 8 – Concentração do metilparabeno presente nas amostras de água dos aquários (com e sem peixes) durante as 8 primeiras horas de experimento.

Fonte: Autoria própria.

Nota-se pelo gráfico da Figura 9 que nas amostras de água do aquário sem a presença do peixe durante os quatro primeiros dias de experimento praticamente não ocorreu alteração da concentração inicial do metilparabeno. A partir do 5º dia a concentração começou a reduzir e ao final do 11º dia não foi mais possível quantificar o composto. Provavelmente a concentração do metilparabeno no final do experimento, estava abaixo do LQ.

Figura 9 – Concentração do metilparabeno presente nas amostras de água do aquário (sem peixe) durante os 12 dias de experimento.

Fonte: Autoria própria.

Observa-se pelos gráficos da Figura 10, que o etilparabeno apresentou um comportamento parecido ao do metilparabeno, isto significa que na água do aquário que continha o peixe, a concentração do etilparabeno reduziu, provavelmente atingindo valores abaixo do LD do método usado neste estudo. Nas amostras de água do aquário que não continha o peixe este resultado não foi observado durante o mesmo período de análise, 8 h, pois a concentração do etilparabeno permaneceu praticamente a mesma do início do experimento.

Figura 10 – Concentração do etilparabeno presente nas amostras de água dos aquários (com e sem peixes) durante as 8 primeiras horas de experimento.

Fonte: Autoria própria.

Após aproximadamente o quarto dia de experimento, o etilparabeno que estava presente na água do aquário que não continha o peixe começou a reduzir a concentração. Ao final do 8º dia de experimento, Figura 11, observa-se pico cromatográfico referente ao etilparabeno, porém, não foi possível quantificá-lo.

Figura 11 – Concentração do etilparabeno presente em amostras de água do aquário (sem peixe) durante os 12 dias de experimento.

Fonte: Autoria própria.

Nota-se pelos gráficos da Figura 12 que o propilparabeno, um dos mais utilizados como conservantes em cosméticos, permaneceu na água do aquário que continha peixe durante todo o primeiro dia de experimento e a concentração deste composto diminuiu em aproximadamente 30 h. Após esse período, o propilparabeno não foi detectado, provavelmente a concentração atingiu valores abaixo do LD. Na amostra de água do aquário que não continha peixe, a concentração do propilparabeno praticamente não foi alterada durante o mesmo período de 30 h.

Figura 12 – Concentração do propilparabeno presente em amostras de água dos aquários (com e sem peixes) durante os dois primeiros dias de experimento.

Fonte: Autoria própria.

A partir do 4º dia do experimento, a concentração do propilparabeno começou a diminuir e em aproximadamente 9 dias foi possível detectá-lo mas não quantificá-lo. Pode-se notar que o comportamento do propilparabeno é muito parecido com do etilparabeno durante os 10 dias de experimento, em que a concentração do composto começa a reduzir após o 4º dia e em 9 dias o composto foi detectado mas não quantificado. Figura 13.

Figura 13 – Concentração de propilparabeno presente em amostras de água do aquário (sem peixe) durante os 12 dias de experimento.

Fonte: Autoria própria.

Observa-se pelos gráficos da Figura 14 que a concentração do butilparabeno na água do aquário com peixe, diminuiu em até 7 h de experimento. Após esse período de tempo, não observa-se pico cromatográfico referente ao butilparabeno não sendo possível quantificá-lo segundo o método proposto para este estudo. A concentração do butilparabeno permaneceu praticamente a mesma do início do experimento na amostra de água do aquário que não continha o peixe, durante o mesmo período de experimento, 8 h.

Figura 14 – Concentração do butilparabeno presente em amostras de água dos aquários (com e sem peixes) durante as 8 primeiras horas de experimento.

Fonte: Autoria própria.

A partir do final do 3º dia de experimento, Figura 15, a concentração do butilparabeno começou a diminuir, porém até o final do experimento, 12 dias, foi possível observar a presença de pico cromatográfico referente ao butilparabeno na concentração de 0,99 mg L⁻¹ (Figura 16) quantificado pelo método usado neste estudo. Este foi o único parabeno dos estudados que foi quantificado nas amostras de água do aquário sem a presença de peixe. Este resultado pode indicar sua permanência, quando introduzido em corpos d'água por meio de esgoto sanitário e industrial, podendo ser prejudicial aos organismos aquáticos.

Figura 15 – Concentração do butilparabeno presente em amostras de água do aquário (sem peixe) durante os 12 dias de experimento.

Fonte: Autoria própria.

Figura 16 – Cromatograma do butilparabeno na amostra de água do aquário sem a presença de peixe ao final de 12 dias de experimento.

Fonte: Autoria própria.

O benzilparabeno, entre todos os parabenos estudados, foi o que permaneceu menos tempo na água, segundo o método usado neste estudo, tanto na água do aquário que continha peixe como no que não continha. Após 2 h de experimento, não foi possível detectar o benzilparabeno, nem quantificá-lo na água do aquário que continha peixe segundo o método usado neste estudo, Figura 17. Porém na amostra de água do aquário que não continha peixe durante as 8 h de experimento, a concentração não se alterou permanecendo a mesma do início do experimento.

Figura 17 – Concentração do benzilparabeno presente em amostras de água dos aquários (com e sem peixes) durante as 8 primeiras horas de experimento.

Fonte: Autoria própria.

Nota-se pelo gráfico da Figura 18 que ao final do 2 dia de experimento, a concentração do benzilparabeno começou a diminuir e que no começo do 6º dia não foi possível notar pico

cromatografico referente ao composto estudado. A ausência de pico cromatográfico ocorreu antes do final do experimento, 12 dias segundo o método analítico usado neste estudo.

Figura 18 – Concentração do benzilparabeno presente em amostras de água do aquário (sem peixe) durante os 6 dias de experimento.

Fonte: Autoria própria.

Observa-se pelos gráficos da Figura 19, que o comportamento do metil e do propilparabeno, usados juntos, foi muito parecido quando comparado com os gráficos das Figuras 8 e 12 em que o metil e o propilparabeno foram estudados separadamente, estudo em que foi feito com a presença de peixe. Ressalta-se que o metil e o propilparabeno são os mais utilizados em combinação como conservantes em cosméticos. A concentração do metil e do propilparabeno não foi alterada na amostra de água do aquário que não continha peixe, durante as primeiras 30 h de experimento.

Figura 19 – Concentração da mistura (metil e propilparabeno) presente em amostras de água dos aquários (com e sem peixes) durante as 30 primeiras horas de experimento.

Fonte: Autoria própria.

Nota-se pelo gráfico da Figura 20, que o metil e o propilparabeno apresentaram o mesmo comportamento, quando estes foram utilizados separadamente na água dos aquários,

durante os 6 primeiros dias. Ao atingir o final do experimento, 12 dias, concentração do propilparabeno reduziu e atingiu o valor de $0,53 \text{ mg L}^{-1}$ (Figura 21), valor este obtido pelo método usado neste estudo. Verifica-se que o resultado foi diferente quando comparado ao experimento em que o propilparabeno foi usado sozinho na água do aquário, que em aproximadamente 9 dias foi possível detectá-lo mas não quantificá-lo, Figura 13. Este resultado sugere que a combinação dos dois parabenos fez com que o propilparabeno permanecesse por mais tempo na água do aquário do experimento que não continha peixe, quando comparado ao propilparabeno usado sozinho na água do aquário.

Figura 20 – Concentração da mistura (metil e propilparabeno) presente em amostras de água do aquário (sem peixe) durante os 12 dias de experimento.

Fonte: Autoria própria.

Figura 21 – Cromatograma do propilparabeno na amostra de água do aquário sem a presença de peixe para o experimento da mistura (metil e propilparabeno) ao final de 12 dias.

Fonte: Autoria própria.

Um experimento paralelo foi feito para verificar se o comportamento dos parabenos seria parecido em concentrações abaixo e acima e nas mesmas condições de temperatura e pH utilizadas nos experimentos. Constatou-se que a independente da concentração, o tempo de redução da concentração foi muito próximo.

Kamble, Singh e Singh (2011) relataram que, quando o metil e o propil parabeno são utilizados juntos ocorre o sinergismo. Estes dois parabenos são frequentemente adicionados a formulações aquosas de cosméticos (BERENBAUM, 1977, op. cit. SONI; CARABIN; BURDOCK, 2005). A mistura desses conservantes que possuem ação sinérgica pode contribuir na longevidade dos produtos e na redução de custos financeiros do produto final (ORTH; ANDERSON; MILSTEIN, 1989).

A concentração do metil e do propilparabeno na água dos aquários, quando usados separadamente, reduziu ao longo dos 12 dias de experimento, nas mesmas condições de temperatura e pH, Tabela 7. Quando usados juntos no experimento, Figura 20, o propilparabeno permaneceu por mais tempo na água, também na mesma temperatura e pH, Tabela 7. Existem estudos que consideram o período de meia vida dos parabenos relativamente curto, cerca de algumas horas. Blaug e Great (1974) relataram que o tempo de meia vida dos parabenos diminui com o aumento do pH e da temperatura. Nesse estudo foi possível observar que o comportamento dos parabenos é particular para cada substância desta classe e outras variáveis devem ser levadas em consideração além da temperatura e pH, como a presença de outros parabenos e de animais, no caso, peixes.

1.5 CONCLUSÃO

A análise cromatográfica dos parabenos nas amostras de água dos aquários com os peixes demonstraram resultados parecidos para todos os parabenos testados em que os compostos foram absorvidos durante os dois primeiros dias de exposição. O butilparabeno foi o único composto que ao final do experimento foi possível quantificá-lo nas amostras de água dos aquários sem a presença dos peixes. Estes dados mostraram que o tempo de permanência dos compostos na água é diferente e isso pode ser prejudicial aos organismos que estão continuamente expostos as águas que recebem estas substâncias.

Nas amostras de água dos aquários contendo a mistura(metil e propilparabeno) sem a presença dos peixes o tempo de persistência do propil na água aumenta. Esses resultados mostraram que quando em mistura, o tempo de permanência dos parabenos na água pode aumentar.

O método analítico utilizado para análise do metil, etil, propil, butil e benzilparabeno presentes na água dos aquários, nos experimentos com a presença e ausência de peixe durante os 12 dias de experimento, foi eficiente, sem um método de extração para esta aplicação, pois apresentou boa separação cromatográfica e boa resolução dos picos. Sendo assim, o volume de reagente, resíduo e solvente foi bastante reduzido, seguindo os princípios da química verde em minimizar os riscos e danos ambientais.

REFERÊNCIAS

- ALBERO, B.; PÉREZ, R.A.; SÁNCHEZ-BRUNETE, C.; TADEO, J.L. Occurrence and analysis of parabens in municipal sewage sludge from wastewater treatment plants in Madrid (Spain). **Journal of Hazardous Materials**, v. 239-240, p. 48-55, 2012.
- ALMEIDA, C.; NOGUEIRA, J.M.F. Determination of trace levels of parabens in real matrices by baradsorptive microextraction using selective sorbent phases. **Journal of Chromatography A**, v. 1348, p. 17-26, 2014.
- ANGELOV, T.; VLASENKO, A.; TASHKOV, W. HPLC Determination of pKa of parabens and investigation on their lipophilicity parameters. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 31, n. 2, p. 188-197, 2007.
- BENIJTS, T.; LAMBERT, W.; 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. **Analytical Chemistry**, v. 76, p. 704-711, 2004.
- BLANCO, E.; CASAIS, M. C.; MEJUTO, M. C.; CELA, R. Combination of off-line solid-phase extraction and on-column sample stacking for sensitive determination of parabens and *p*-hydroxybenzoic acid in Waters by non-aqueous capillary electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v. 647, p. 104–111, 2009.
- BLAUG, S. M.; GRANT, D. E. Kinetics of degradation of the Parabens. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 25, p. 495-506, 1974.
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE nº 899 ANVISA, 29 de maio de 2003.
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 29 ANVISA, 01 de junho de 2012.
- 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.
- CALAFAT, A. M.; YE, X.; 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, n. 5, p. 679-685, 2010.
- CANOSA, P.; RODRÍGUEZ, I.; RUBÍ, E.; CELA, R. Determination of Parabens and Triclosan in Indoor Dust Using Matrix Solid-Phase Dispersion and Gas Chromatography with Tandem Mass Spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 79, 1675-1681, 2007.
- CARLSSON, C.; JOHANSSON, A. K.; ALVAN, G.; BERGMAN, K.; KÜHLER, T. Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part II: Environmental risk assessments of selected pharmaceutical excipients. **Science of the Total Environment**, v. 364, p. 88-95, 2006.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2006. 456p.

DOBBINS, L. L.; USENKO, S.; BRAIN, R. A.; BROOKS, B. W. Probabilistic ecological hazard assessment of parabens using daphnia magna and pimephales promelas. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, n. 12, p. 2744-2753, 2009.

DELGADO, B.; PINO, V.; ANDERSON, J.L.; AYALA, J.H.; AFONSO, A.M.; GONZÁLEZ, V. An *in-situ* extraction–preconcentration method using ionic liquid-based surfactants for the determination of organic contaminants contained in marine sediments. **Talanta**, v. 99, p. 972-983, 2012.

EUROPEAN COMMISSION, Regulation 76/768/EEC. Implementing Council Directive 2003/83/EC concerning the restrictions on materials listed in Annex VI of Directive 76/768/EEC on cosmetic products. **Official Journal of European Communities**, 8p., 2005.

FEI, T.; LI, M.; DING, M.; ITO, M.; LIN, J.M. Determination of parabens in cosmetic products by solid-phase microextraction of poly(ethylene glycol) diacrylate thin film on fibers and ultra high-speed liquid chromatography with diode array detector. **Journal of Separation Science**, v. 34, p. 1599-1606, 2011.

GONZÁLEZ-MARIÑO, I.; QUINTANA, J. B.; RODRÍGUEZ, I.; CELA, R. Simultaneous determination of parabens, triclosan and triclocarban in water by liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 23, p. 1756-1766, 2009.

GIOVANNANDREA, R.; DIANA, L.; FIORI, M.; FERRETTI, E.; FOGLIETTA, G.; CARONNA, R.; SEVERINI, G. Determination of ethyl-*p*-hydroxybenzoate in sow pancreatic juice by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 751, p. 365-369, 2001.

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, p. 435-458, 2005.

GROSA, G.; GROSSO, E. D.; RUSSO, R.; ALLEGRONE, G. Simultaneous, stability indicating, HPLC-DAD determination of guaifenesin and methyl and propyl-parabens in cough syrup. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 798-803, 2006.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. DOQ-CGCRE-008. Revisão 2003. 2010.

JONKERS, N.; SOUSA, A.; GALANTE-OLIVEIRA, S.; BARROSO, C. M.; KOHLER, H. P. E.; GIGER, W. Occurrence and sources of selected phenolic endocrine disruptors in Ria de Aveiro, Portugal. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 17, p. 834-843, 2010.

KAMBLE, R.; SINGH, S.G.; SINGH, S. Simultaneous Determination of Preservatives (Methyl Paraben and Propyl Paraben) in Sucralfate Suspension Using High Performance Liquid Chromatography. **E-Journal of Chemistry**, v. 8, p. 340-346, 2011.

KANG, S.; KIM, S.; PARK, J.; KIM, H.J.; LEE, J.; CHOI, G.; CHOI, S.; KIM, S. KIM, S.Y.; MOON, H.B.; KIM, s.; KHO, Y.L.; CHOI, K. Urinary paraben concentrations among pregnant women and their matching newborn infants of Korea, and the association with oxidative stress biomarkers. **Science of the Total Environment**, v. 461-462, p. 214-221, 2013.

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

KINANI, S.; BOUCHONNET, S.; CREUSOT, N.; BOURCIER, S.; BALAGUER, P.; PORCHER, J. M.; SÉLIM, A. Bioanalytical characterisation of multiple endocrine- and dioxin-like activities in sediments from reference and impacted small rivers. **Environmental Pollution**, v. 158, p. 74-83, 2010.

LABAT, L.; KUMMER, E.; DALLET, P.; DUBOST, J. P. Comparison of high-performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis for the determination of parabens in a cosmetic product. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 23, p. 763-769, 2000.

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.

LEY, B. D.; MENDAZA, F. H.; GÓMEZ, L. C. S. Parabenos: ¿mito o realidad? **Piel**, v. 21, p. 231-240, 2006.

LI, Z.H.; LI, P.; RANDAK, T. Effect of a human pharmaceutical carbamazepine on antioxidant responses in brain of a model teleost *in vitro*: an efficient approach to biomonitoring. **Journal of Applied Toxicology**, v. 30, p. 644-648, 2010.

LORAIN, G. A.; PETTIGROVE, M. E. Seasonal variations in concentrations of pharmaceuticals and personal care products in drinking water and reclaimed wastewater in southern California. **Environmental Science & Technology**, v. 40, p. 687-695, 2006.

NIETO, A.; BORRULL, F.; MARCÉ, R. M.; POCURULL, E. Determination of personal care products in sewage sludge by pressurized liquid extraction and ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 5619-5625, 2009.

NÚÑEZ, L.; TURIEL, E.; MARTIN-ESTEBAN, A.; TADEO, J. L. Molecularly imprinted polymer for the extraction of parabens from environmental solid samples prior to their determination by high performance liquid chromatography–ultraviolet detection. **Talanta**, v. 80, p. 1782-1788, 2010.

OISHI, S. Effects of propyl paraben on the male reproductive system. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 1807-1813, 2002.

ORTH, D.S.; ANDERSON, C.M.L.; SMITH, D.K.; MILSTEIN, S.R. Synergism of preservative system components: Use of the survival curve slope method to demonstrate anti-Pseudomona synergy of methyl paraben and acrylic acid homopolymer/copolymers in vitro. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 40, p. 347-365, 1989.

RAMÍREZ, N.; MARCÉ, R.M.; BORRULL, F. Determination of parabéns in house dust by pressurised hot water extraction followed by stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 6226-6231, 2011.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROSSI, A. D.; DESIDERIO, C. Fast capillary electrochromatographic analysis of parabens and 4-hydroxybenzoic acid in drugs and cosmetics. **Electrophoresis**, v. 23, p. 3410-3417, 2002.

RUDEL, R.A.; DODSON, R.E.; PEROVICH, L.J.; FROSCH, R.M.; 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. **Environmental Science & Technology**, v. 44, p. 6583-6590, 2010.

SHEN, H. Y.; JIANG, H. L.; MAO, H. L.; PAN, G.; ZHOU, L.; CAO, Y. F. Simultaneous determination of seven phthalates and four parabens in cosmetic products using HPLC-DAD and GC-MS methods. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 48-54, 2007.

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.

YE, X.; BISHOP, A. M.; NEEDHAM, L. L.; CALAFAT, A. M. Automated on-line column-switching HPLC-MS/MS method with peak focusing for measuring parabens, triclosan, and other environmental phenols in human milk. **Analytica Chimica Acta**, v. 622, 150-156, 2008.

ZOTOU, A.; SAKLA, I.; TZANAVARAS, P. D. LC-determination of five paraben preservatives in saliva and toothpaste samples using UV detection and a short monolithic column. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, p. 785-789, 2010.

CAPÍTULO II

Avaliação dos efeitos em biomarcadores bioquímicos de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas ao metil, etil, propil, butil e benzilparabeno

II.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1.1 Contaminação aquática

Com o aumento do uso de fármacos e produtos de cuidado pessoal pela população humana, muitas destas substâncias são lançadas no ambiente aquático (TERASAKI et al.; 2009) por meio de esgoto sanitário e industrial (GONZÁLEZ-MARIÑO et al.; 2009, SILVA; COLLINS, 2011). Como as estações de tratamento de esgoto não apresentam uma remoção efetiva dos parabenos, eles podem ser encontrados em amostras ambientais em concentração acima de ng L^{-1} (GONZÁLEZ-MARIÑO et al.; 2009; DOBBINS et al.; 2009), podendo prejudicar a qualidade da água (BROOKS; RILEY; TAYLOR, 2006) em virtude da constante introdução nas águas de rios e lagos (ALBERO et al.; 2012).

De acordo com o estudo feito por Canosa e colaboradores (2006) em amostras de esgoto bruto na Espanha, foi possível confirmar a presença do metil, etil, propil e do butilparabeno na concentração de até 3 ng mL^{-1} . Da mesma forma, Jonkers e colaboradores (2010) quantificaram esses 4 parabenos (metil, etil, propil e butil) além do benzil em concentrações na faixa de ng L^{-1} , em amostras de água do rio de Aveiro, Portugal.

González-Mariño e colaboradores (2009) estudaram cinco parabenos (metil, etil, n-propil, n-butil e benzil), em amostras de esgoto bruto na região da Galícia, Espanha. Desses foram quantificados o metil e o n-propilparabenos na concentração de $1,1$ a $5,1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ e isômeros de butilparabeno na concentração de 100 - 200 ng L^{-1} .

Lee, Peart e Svoboda (2005) encontraram metil, etil, propil e butilparabeno, na faixa de concentração de $\mu\text{g L}^{-1}$ em amostras de esgoto sanitário antes e depois de tratado em oito estações na região sul de Ontário, Canadá, no período de maio a julho de 2004. Na região sul da Califórnia, San Diego, Estados Unidos, Loraine e Pettigrove (2006) encontraram em amostra de água de reuso da estação de tratamento e em amostra de esgoto antes de tratado coletadas no período de seca/verão, concentrações de $2,21 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ e de $46,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de metilparabeno, respectivamente, e $18,6 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ em amostra de esgoto antes de tratado no período chuvoso/inverno.

No sul do país de Gales (Reino Unido), Kasprzyk-Hordern, Dinsdale e Guwy (2008) encontraram concentração de metil, etil, propil e butilparabeno na ordem de ng L^{-1} em amostras de água do rio Ely, no período de seca. Apesar de que existam tecnologias avançadas para o tratamento secundário e terciário, muitas estações de tratamento de esgoto ainda não dispõem destes recursos (ALBERO et al.; 2012).

Um dos pontos importantes que deve ser levado em consideração, além da introdução dessas substâncias no ambiente aquático, é a sua bioacumulação na cadeia alimentar, uma vez que os parabenos podem se acumular nos tecidos dos organismos devido a constante exposição à baixas concentrações.

Jakimska e colaboradores (2013) constataram a presença do benzil e do metilparabeno em músculo de peixes coletados em quatro rios localizados na Espanha. Nas Filipinas, foram encontrados os parabenos metil, etil, propil e butil em músculo de três espécies de peixes, pertencentes a baía de Manila (KIM et al.; 2011). Em outro estudo, também realizado na baía de Manila, porém com 20 espécies de peixes adquiridas no comércio, foram encontrados os mesmos quatro parabenos (RAMASWAMY et al.; 2011). Esses autores atribuíram a presença dos parabenos nos músculos dos peixes ao elevado volume de esgoto tratado despejado nos corpos d'águas.

Ainda que os parabenos sejam encontrados em músculo de peixes, são poucos os estudos focados na toxicidade (aguda e crônica) sobre esses organismos aquáticos. Dobbins e colaboradores (2009) e Yamamoto e colaboradores (2011) realizaram testes de toxicidade aguda com larvas de *Pimephales promelas* (48 h) nativa da América do Norte e peixes do sudeste asiático da espécie *Oryzias latipes* com 10 dias de idade, 96 h exposição, respectivamente, Tabela 1.

Tabela 1 – Valores de concentração letal (LC₅₀) obtidos nos estudos com parabenos.

Composto (mg L ⁻¹)	<i>Pimephales</i> <i>promelas</i> (LC ₅₀ , 48 h)	<i>Oryzias</i> <i>latipes</i> (LC ₅₀ , 96 h)
Benzilparabeno	3,3	0,73
Butilparabeno	4,2	4,6
Isobutilparabeno	6,9	3,1
Propilparabeno	9,7	4,5
Isopropilparabeno	17,5	4,9
Etilparabeno	34,3	14,0
Metilparabeno	>160	63,0

Fonte: Adaptado de Dobbins e colaboradores (2009) e Yamamoto e colaboradores (2011).

Como o consumo de produtos que contêm parabenos nas formulações é elevado e a introdução no ambiente destes compostos é contínua, a exposição a baixas concentrações de parabenos por um longo período de tempo também pode provocar alterações nos processos

bioquímico, fisiológico e reprodutivo dos organismos aquáticos (BROOKS; RILEY; TAYLOR, 2006, ALBERO et al.; 2012).

II.1.2 Biomarcadores

As alterações nas respostas biológicas dos organismos aquáticos são usadas para avaliar os efeitos que uma substância pode causar na biota aquática. O estresse gerado no organismo pelos contaminantes ambientais provoca mudanças em diferentes parâmetros moleculares, fisiológicos, histológico, imunológico, de estresse oxidativo, dentre outros, que são conhecidos como biomarcadores (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; LÓPEZ-BAREA; PUEYO, 1998).

A finalidade de se usar um biomarcador é analisar as condições ambientais que podem provocar efeitos adversos aos organismos expostos a estas substâncias. Logo, para evitar danos maiores a biota aquática, é necessário compreender os mecanismos de respostas rápidas a fim de esclarecer a real situação do ambiente.

Muitos estudos utilizam a vitelogenina como biomarcador para exposição de contaminantes estrogênicos em ambientes aquáticos (YAMAMOTO et al.; 2011; BJERREGAARD et al.; 2008; ALSLEV; KORSGAARD; BJERREGAARD, 2005; BJERREGAARD et al.; 2003; INUI et al.; 2003). A vitelogenina (VTG) é uma lipofosfoproteína precursora da gema de ovo, geralmente encontrada em fêmeas. Porém, em peixes machos pode apresentar níveis alterados quando esses estão expostos a ambientes contaminados por substâncias que possuem atividade estrogênica (BOWLEY et al.; 2010).

Pedersen e colaboradores (2000) utilizaram a VTG como biomarcador e analisaram níveis dessa lipofosfoproteína no sangue de truta arco-íris juvenis, após 6 e 12 dias de exposição aos parabenos etil, propil e butil por meio de injeção intraperitoneal. Inui e colaboradores (2003) também utilizaram a VTG como biomarcador para a exposição ao propilparabeno por 7 dias em peixes machos adultos da espécie *Oryzias latipes*. Em ambos estudos, os autores concluíram que os parabenos testados foram capazes de alterar a concentração de VTG no sangue dos peixes.

Muitos estudos na literatura utilizam a VTG como biomarcador para a exposição a parabenos, porém, não há muitas informações sobre biomarcadores de estresse oxidativo em organismos aquáticos expostos a parabenos. Shah e Verma (2011) analisaram a peroxidação lipídica, enzimas não oxidantes e enzimas oxidantes, em fígado de fêmeas de ratos, expostos por 30 dias ao butilparabeno. Popa e colaboradores (2011) mediram os níveis de peroxidação

lipídica em sangue de fêmeas de ratos, expostos por 10 dias ao metilparabeno. Estes pesquisadores constataram que ambos compostos provocaram estresse oxidativo nos animais.

II.1.2.1 Estresse Oxidativo

Várias circunstâncias podem fazer com que o oxigênio (O_2) presente no ambiente aeróbio se torne danoso ao sistema biológico, ou seja, geração de estresse oxidativo. Entre estas circunstâncias está a interação do xenobiótico com o oxigênio molecular ou a influência da substância em processos de transferência de elétrons em reações redox (ALMEIDA et al.; 2007), causando redução incompleta do oxigênio ou subprodutos do metabolismo do oxigênio. Estas condições podem gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) tais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion superóxido (O_2^-) e o radical hidroxila ($HO\bullet$), que possuem um ou mais elétrons desemparelhados no seu orbital mais externo e apresentam a característica de serem altamente reativos. Estas EROs atacam e provocam modificações em estruturas como lipídios, proteínas e DNA, oxidando-as e podendo inclusive levá-las a morte (HARRIS, 1992).

Para se proteger os organismos possuem sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos específicos, que agem diretamente sobre a EROs gerando substratos menos ofensivos e garantindo uma maior proteção celular. As principais enzimas que constituem o sistema de defesa contra as EROs são: catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR). As enzimas antioxidantes primárias (SOD, CAT e GPx) inativam as EROs em intermediários, além disso são hidro e lipossolúveis.

As SOD são um grupo de metaloenzimas que acelera a dismutação do radical O_2^- em H_2O_2 e O_2 na presença do próton H^+ , Figura 1 (HARRIS, 1992). Ela é a primeira enzima que atua na defesa contra o estresse oxidativo (ATLI; CANLI, 2010), transportando elétrons de um radical a outro (JOSEPHY, 1997). Além disso, tem se mostrado mais sensível em virtude do aumento da formação de EROs (BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003). Porém, uma desvantagem desta enzima é que um dos produtos gerados é o H_2O_2 (GIULIO; MEYER, 2008).

Para metabolizar o H_2O_2 existem as enzimas CAT e GPx. A CAT é uma enzima encontrada em diferentes tecidos dentro do peroxissomo da maioria das células. Essa heme proteína é capaz de transformar o H_2O_2 , reduzindo-o em água e oxigênio molecular, Figura 1

(HARRIS, 1992). A CAT também pode oxidar substratos orgânicos e inorgânicos, atuando como agente redutor ou oxidante (JOSEPHY, 1997).

A GPx, está presente no citosol, na mitocôndria e na membrana, auxiliando na redução do H_2O_2 a água (H_2O) e de peróxidos lipídicos a álcoois, usando a glutathiona reduzida (GSH) como doadora de elétrons, oxidando-a em glutathiona oxidada (GSSG), Figura 1 (HARRIS, 1992). Ademais, exerce um papel importante na proteção de membranas contra danos causados pelas peroxidações lipídicas (BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003).

Outra enzima que atua juntamente com a GPx é a GR. Apesar de não agir diretamente sob as EROs, a GR reduz a GSSG em GSH em um ciclo metabólico da glutathiona, Figura 1 (VILLANUEVA; KROSS, 2012). A GR é uma enzima antioxidante secundária, sendo solúvel apenas em água (NOORI, 2012).

Figura 1 – Ilustração da produção do ânion superóxido e da intervenção de enzimas antioxidantes para estabilizar os radicais livres formados nas células.

Fonte: Adaptado de Villanueva e Kross (2012).

Na literatura não existem resultados de pesquisa associando as enzimas antioxidantes com a exposição de peixes aos parabenos. Asnani e Verma (2009) estudaram o efeito dos parabenos nas enzimas CAT, SOD e GPx em camundongos por meio da administração via oral após 30 dias. Shah e Verma (2011) observaram a indução do estresse oxidativo no fígado de ratos que foram contaminados via oral a três diferentes doses de butilparabeno durante 30 dias. Ambos estudos mostraram que as atividades das enzimas antioxidantes foram alteradas pela exposição contínua aos parabenos.

II.1.2.2 Dano Oxidativo

A glutathiona é um dos compostos tiois não-protéicos mais abundantes nos organismos vivos, sendo que 90% dela está normalmente presente na forma reduzida (LI; WEI; CHEN, 2006). A GSH possui várias funções como armazenamento de enxofre (BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003), além disso, atua contra a formação de radicais livres, na manutenção do balanço redox da célula e na defesa contra agentes eletrofílicos.

Quando a GSH se conjuga com eletrófilos do xenobiótico, age como um potencial desintoxicante, tornando-o mais hidrofílico e facilitando a sua eliminação (NUSETTI et al.; 2001¹ apud ANDERSEN et al.; 2006). No compartimento celular, a GSH junto com a GSSG mantém um equilíbrio redox, Figura 1. Esta é a principal função da GSH, preservar as condições normais do início ao fim do processo de desintoxicação (BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003).

A peroxidação lipídica (LPO) é um processo complexo formado a partir de danos provocados às macromoléculas celulares por meio de radicais livres gerados pelo estresse oxidativo (BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003). As EROs atacam o ácido graxo insaturado presente na membrana lipídica celular, eliminando um átomo de hidrogênio do grupo metileno. Em seguida, o radical gerado na presença de oxigênio forma um novo radical, a peroxila. Esse radical reage com o átomo de hidrogênio que foi isolado, formando um hidroperóxido lipídico. E por fim, ocorre a destruição dos radicais formando os alcanos, alcenos, aldeídos, entre outros, Figura 2 (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

¹ NUSETTI, O.; ESCLAPES, M.; SALAZAR, G.; NUSETTI, S.; PULIDO, S. Biomarkers of oxidative stress in the polychaete *Eurythoe complanata* (Amphinomidae) under short-term copper exposure. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 66, p. 576-581, 2001.

Figura 2 - Esquema geral da cadeia de reações da peroxidação de lipídeos levando à formação de aldeídos tais como o malondialdeído. X[•] = radical.

Fonte: Adaptado de Halliwell e Gutteridge (1999).

Essa cadeia de reações é resultado da incapacidade de defesa das enzimas antioxidantes (BOURAOUI et al, 2009) ou do estresse oxidativo gerado pela exposição a xenobióticos (ORUÇ; USTA, 2007).

Noori (2012) relatou uma visão geral de estresse oxidativo e defesas antioxidante e comentou que o malondialdeído (MDA) é um potente aldeído, produto do processo de peroxidação lipídica, um dos marcadores aceitos para o estresse oxidativo e muito utilizado como biomarcador do dano da membrana celular.

II.1.3 Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Tilápia é o nome destinado a um grupo de diferentes espécies de peixes pertencentes a família dos ciclídeos. O gênero utilizado neste estudo como organismo-teste foi a *Oreochromis niloticus*, Figura 3, também conhecida como tilápia do Nilo, cujas fêmeas incubam seus ovos na boca (PULLIN; LOWE-MCCONNELL, 1982).

Figura 3 - Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

Autor: David Hodges.

Fonte: Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/mortandade/peixe_doce1.php

A tilápia do Nilo é oriunda do leste da África (bacia do rio Nilo) e foi disseminada para regiões de clima tropical e subtropical como Sudoeste Asiático (Indonésia, Filipinas e Formosa), África e América (Estados Unidos, México, Panamá, Brasil) (BALARIN; HATTON, 1979). No Brasil, foi introduzida em 1971 a princípio no estado do Ceará, vinda da África Oriental e se espalhando em todo o país devido à semelhança no clima e crescimento acelerado (LINDE-ARIAS et al.; 2008, FUJIMURA; OKADA, 2007), além disso, é muito utilizada na piscicultura por apresentar uma boa aceitação pela população devido ao paladar suave, possui um bom valor econômico e importância comercial.

São peixes termofílicos em que a temperatura ideal para seu desenvolvimento varia entre 25 °C e 30 °C, tendo seu crescimento afetado abaixo de 15 °C e não resistindo em temperatura por volta de 9 °C (PULLIN; LOWE-MCCONNELL, 1982).

As tilápias se adaptam a águas salobras, doces e salinas, em que a salinidade pode atingir até 30‰, além disso, podem tolerar pH de 8 a 11 e baixos teores de oxigênio dissolvido. Sua alimentação é diversificada incluindo insetos, algas, larvas de peixes, matéria orgânica em decomposição, crustáceos e moluscos (SOUZA; TEIXEIRA-FILHO, 1985).

Esta espécie apresenta grandes escamas, listras verticais na nadadeira caudal, manchas esbranquiçadas no ventre e coloração prateada no dorso. Possuem também um comportamento agressivo que depende principalmente do tamanho do peixe, do território e do distanciamento visual do peixe vizinho (PULLIN; LOWE-MCCONNELL, 1982).

A tilápia foi escolhida para o estudo porque é o organismo teste mais utilizado em programas de biomonitoramento de poluição aquática em regiões tropicais, podendo indicar mudanças nos ecossistemas aquáticos.

II.2 OBJETIVOS

- Avaliar as respostas bioquímicas por meio dos biomarcadores, superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione reduzida e de danos oxidativos, nos tecidos de fígado e de brânquias de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*).
- E determinar os valores de concentração letal para 50% dos indivíduos (LC₅₀, 48 h) para as tilápias expostas aos parabenos, metil, etil, propil, butil e benzil.

II.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os bioensaios foram feitos depois da aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo (USP), Campus de Ribeirão Preto, processo nº 12.1.382.53.5.

II.3.1 Organismo-teste

Para os testes de toxicidade utilizou-se espécimes juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (*Peciforme, Cichlidae*), machos, de 6-8 cm de comprimento, Figura 4A, em função da maior sensibilidade. Para os bioensaios por exposição e via injeção intraperitoneal, utilizou-se indivíduos adultos de 10-15 cm de comprimento, Figura 4B. A escolha por indivíduos adultos foi em decorrência da maior quantidade de amostras do fígado e das brânquias.

Figura 4 - (A) tilápia juvenil; (B) tilápia adulta.

Fonte: Autoria própria.

Os peixes eram sexualmente invertidos e foram adquiridos na piscicultura “Fazolin”, localizada no município de Socorro, São Paulo, Brasil. Na piscicultura os peixes ficavam em tanques rede, Figura 5A. Após o transporte até o laboratório os animais foram aclimatados por 15 dias em caixa d’água de 250 L, Figura 5B à temperatura média de 27 °C, com aeração constante e fotoperíodo de 16 h claro/8 h escuro. As tilápias foram alimentadas uma vez ao dia, com ração para peixes.

Figura 5 - (A) Tanques rede da piscicultura Fazolin; (B) caixa d’água 250 L onde as tilápias foram aclimatadas.

Fonte: Autoria própria.

Os parabenos utilizados no estudo foram benzilparabeno, butilparabeno, propilparabeno, etilparabeno e metilparabeno, todos com grau de pureza $\geq 99\%$ e adquiridos junto a Sigma Aldrich, Brasil.

II.3.2 Teste de toxicidade

Os testes de toxicidade foram feitos em 50 aquários com medidas de 22 cm x 46 cm x 26 cm e volume de 20 L de água, Figura 6. Cada grupo experimental continha 10 animais, separados em aquários individuais, sendo consideradas, réplicas verdadeiras. Este teste seguiu o protocolo do Environmental Protection Agency (EPA), EPA-821-R-02-012 (Métodos para Medir a Toxicidade Aguda de Efluentes e Águas Receptores de Água Doce em Organismos Marinhos). O tempo de exposição corresponde a 48 h e a concentração de maior valor foi considerada como 100%. As demais concentrações foram 75, 50, 25 e 12,5% calculadas em função da maior concentração, Tabela 2 e Figura 7. A escolha da concentração em porcentagem dos parabenos nos testes para determinar a LC_{50} foram baseados no artigo de Dobbins e colaboradores (2009), considerando a princípio os valores de LC_{50} para larvas de peixe da espécie *P. promelas* como sendo a $LC_{12,5}$ para as tilápias deste estudo.

Figura 6 - Aquários utilizados durante os testes de toxicidade.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 2 – Valores de concentração utilizados nos testes de toxicidade para os parabenos analisados.

Composto	Conc. 100% (mg L ⁻¹)	Conc. 75% (mg L ⁻¹)	Conc. 50% (mg L ⁻¹)	Conc. 25% (mg L ⁻¹)	Conc. 12,5% (mg L ⁻¹)
Benzilparabeno	16,9	12,7	8,4	4,2	2,1
Butilparabeno	21,5	16,1	10,7	5,4	2,7
Propilparabeno	24,8	18,6	12,4	6,2	3,1
Etilparabeno	43,9	32,9	21,9	11,0	5,5
Metilparabeno	136,5	102,4	68,3	34,1	17,1

Fonte: Autoria própria.

Figura 7 - Esquema do teste de toxicidade para cada contaminante.

Fonte: Autoria própria.

Os valores estimados da LC₅₀ (48 h), para as tilápias expostas aos parabenos, foram calculados por meio do método Trimmed Spearman-Kärber, utilizando o programa Spearman.

II.3.3 Bioensaios

Os bioensaios, por exposição e via injeção intraperitoneal, foram feitos, cada um, em 42 aquários, com um organismo em cada, sendo que 6 indivíduos representaram um grupo

experimental. Os peixes permaneceram por 2 dias nos aquários para adaptação às condições dos mesmos.

Para o bioensaio por exposição, os compostos foram adicionados à água dos aquários, com concentração 10 vezes menor que o limite máximo permitido na legislação brasileira para uso de parabenos em cosmético, 0,4% quando adicionado individualmente e 0,8% quando utilizado em misturas, seguindo a resolução - RDC nº 29 de 1º de junho de 2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2012).

Assim, a concentração dos compostos usados individualmente em cada aquário foi de $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ e a da mistura metil e propilparabeno foi de uma relação de 80% ($6,0 \text{ mg L}^{-1}$) do metil e 20% ($1,7 \text{ mg L}^{-1}$) do propilparabeno de acordo com os testes de toxicidade realizados no presente estudo. Conforme disponibilidade dos aquários, os experimentos ocorreram em duas etapas: a primeira com 6 dias e a segunda com 12 dias de exposição, Figura 8. Os peixes foram anestesiados com $3,0 \text{ mL L}^{-1}$ de fenoxietanol e sacrificados para retirada dos tecidos do fígado e das brânquias. Em seguida, as amostras foram congeladas a -80°C para posteriores análises.

Figura 8 – Experimento com tilápias em período de 6 e 12 dias de exposição ao metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno, benzilparabeno e mistura.

Para o experimento de administração via injeção intraperitoneal dos parabenos nos peixes, a concentração da solução injetada foi de $4,0 \text{ mg kg}^{-1}$ quando usado individualmente e para a mistura foi de $6,0 \text{ mg kg}^{-1}$ metil e $1,7 \text{ mg kg}^{-1}$ propil, diluídos em soro fisiológico injetável. Aguardou-se um período de 6 e 12 dias após a injeção e em seguida os peixes foram

anestesiados e sacrificados para a retirada do fígado e das brânquias. Em seguida, as amostras foram congeladas a -80°C para análises posteriores.

A escolha da injeção intraperitoneal se deve à menor interferência nos dados, pois gera pouco estresse ao peixe no manuseio e, além disso, é de fácil aplicação, segura e muito útil na administração em massa corpórea de peixes de todos os tamanhos (SELVARAJ; SAMPATH; SEKAR, 2006).

Para determinar o tempo de exposição dos animais aos parabenos, seguiu-se o artigo de Alslev, Korsgaard e Bjerregaard (2005). Esse estudo mostrou que em machos de truta arco-íris após 6 e 12 dias de exposição ao butilparabeno, ocorreu um aumento na produção da proteína vitellogenina, normalmente produzida por fêmeas.

Ao final deste experimento, a água dos aquários foi tratada antes de ser lançada em esgoto comum, passando-a por filtros de carvão ativado ficando retidos os resíduos tóxicos. As carcaças dos animais foram coletadas por uma empresa especializada em tratamento de resíduos biológicos. Os resíduos químicos resultantes das análises foram armazenados em recipientes apropriados e encaminhados ao Laboratório de Resíduos do Campus da USP de São Carlos.

II.3.4 Análise bioquímica

II.3.4.1 Preparo das amostras para análise das enzimas antioxidantes

As amostras de fígado e de brânquias foram pesadas e homogeneizadas (1:4, massa:volume) em solução tampão ($20,0\text{ mmol L}^{-1}$ de Tris; $1,0\text{ mmol L}^{-1}$ de EDTA; $1,0\text{ mmol L}^{-1}$ de DL-Ditiotreitol (DTT); $0,5\text{ mol L}^{-1}$ de sacarose e $0,15\text{ mol L}^{-1}$ de KCl em pH 7,5) contendo $1,0\text{ mol L}^{-1}$ de inibidor de protease *Phenylmethanesulfonyl Fluoride* (PMSF), em seguida, centrifugadas a 7.426 g por 20 minutos a 4°C .

A porção sobrenadante foi coletada e submetida a uma segunda centrifugação por uma hora a 50.000 g para obtenção da fração citosólica. Após esta etapa, foram analisadas as atividades das enzimas SOD, CAT, GPx, GR (LU et al.; 1969).

II.3.4.2 Preparo das amostras para análise dos níveis de glutatona total

As amostras de fígado e de brânquias foram pesadas e homogeneizadas em ácido perclórico (PCA) $0,5\text{ mol L}^{-1}$ na proporção 1:9 (massa: volume), centrifugado por dois

minutos a 15000 g a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e congelado à -80 °C para as determinações dos níveis de GSH-t (TORRES et al.; 2002).

II.3.4.3 Preparo das amostras para a análise da peroxidação lipídica

As amostras de fígado e de brânquias foram pesadas e homogeneizadas (1:3 massa:volume) em solução tampão Tris, 0,1 mol L⁻¹ pH 8,0. Em seguida, foram adicionados 300 µL de solução de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) 0,4% diluído em HCl 0,2 mol L⁻¹. As amostras foram incubadas por 40 minutos a 90 °C. A reação do MDA com o TBA formou uma solução de coloração rosa nas amostras que foram colocadas no banho de gelo para resfriar a amostra e foi adicionado a cada uma delas 1,0 mL de álcool n-butílico. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1123 g, por três minutos, sendo coletados 700 µL do sobrenadante para posterior análise (HONG et al.; 2000).

II.3.4.4 Superóxido dismutase

A atividade da SOD (EC 1.15.1.1) foi medida em comprimento de onda 550 nm por um minuto, de acordo com a metodologia de McCord e Fridovich (1969). O meio de reação foi composto por solução tampão fosfato de potássio 50 mmol L⁻¹ (pH 7,8), 0,1 mmol L⁻¹ EDTA, citocromo c, 0,2 U xantina oxidase (XO), solução de xantina e amostra. Na reação, o citocromo c e a SOD da amostra competem entre si pelo radical superóxido, gerado pelo sistema xantina/XO.

II.3.4.5 Catalase

A atividade da CAT (EC 1.11.1.6) foi determinada por meio da decomposição do peróxido de hidrogênio empregando-se espectrofotômetro com comprimento de onda de 240 nm a 30 °C, de acordo com a metodologia de Beutler (1975). A diminuição na absorbância foi medida utilizando-se cubeta contendo meio de reação (solução tampão Tris 1,0 mol L⁻¹; 5,0 mmol L⁻¹ de EDTA (pH 8,0) e H₂O₂) e a amostra do extrato enzimático.

II.3.4.6 Glutathiona peroxidase

A GPx (EC 1.11.1.9) foi analisada pelo método descrito por Sies et al. (1979), utilizou-se meio de reação (solução tampão de fosfato de potássio 0,1 mol L⁻¹ e EDTA 5,0 mmol L⁻¹ em pH 7,0, glutathiona redutase (GR), NADPH, GSH e água livre de orgânicos). A atividade foi medida por meio do decréscimo de absorbância durante a redução da glutathiona oxidada (GSSG), catalisada pela GR, na presença de NADPH, em comprimento de onda de 340 nm, por três minutos.

II.3.4.7 Glutathiona redutase

A atividade da GR (EC 1.6.4.2) foi medida segundo o método descrito por Carlberg e Mannervik (1985), na qual o consumo do NADPH é estimado por meio da variação de absorbância, acompanhado por dois minutos com comprimento de onda de 340 nm à 30 °C, na presença do substrato GSSG. O processo consiste na redução da GSSG à GSH pela glutathiona redutase, por meio da oxidação do NADPH. O ensaio enzimático foi feito em tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0, EDTA 5,0 mM, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida (NADPH) e o substrato glutathiona oxidada (GSSG) 2,0 mM.

II.3.4.8 Glutathiona reduzida

Para determinar os níveis de GSH seguiu-se o método desenvolvido por Tietze (1969)² adaptado por Akerboom e Sies (1981). O ensaio enzimático foi realizado em 412 nm, por quatro minutos, em tampão fosfato de potássio 0,25 M, NADPH 0,1 M, DTNB 5,0 mM e como substrato GR 5,0 U mL⁻¹.

II.3.4.9 Peroxidação lipídica

A análise de peroxidação lipídica foi feita empregando-se UHPLC da marca Shimadzu, modelo Prominence Nexera XR, com desgaseificador DGU20A_{3R}, bomba LC-

² TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 27, n. 3, p. 502-22, 1969.

20AD_{XR}, amostrador automático SIL-20AC_{XR}, compartimento da coluna CTO-20AC e detector de DAD SPD-M20A e fluorescência RF-20A. Foi utilizada uma coluna Shim-pack XR-ODS II, 3,0 x 100 mm, 2,2 µm de tamanho de partícula. O volume de injeção da amostra foi 4 µL, temperatura da coluna 40 °C, com comprimento de onda de 533 nm do produto formado entre o MDA e o TBA de coloração rosa, (ALMEIDA et al., 2003, 2004).

A fase móvel consistiu de uma solução de fosfato de potássio monobásico 50 mmol L⁻¹ (pH 7,0) com 40% de metanol, e fluxo de 0,5 mL min⁻¹. Para quantificar o MDA formado, foi feita uma curva de calibração, com concentrações conhecidas (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5) nmol de MDA derivatizado com o TBA. Os dados foram expressos em nmol de TBAR g⁻¹ de tecido.

II.3.4.10 Análise de proteína

A estimativa da concentração de proteína nos extratos, das amostras do fígado e das brânquias, foi feita segundo o método de Bradford (1976) usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

Em resumo, a Tabela 3 apresenta os biomarcadores analisados, os equipamentos utilizados para a sua determinação e as referências das metodologias.

Tabela 3 – Biomarcadores analisados e suas metodologias.

Biomarcadores	Equipamento	Metodologia
SOD	Espectrofotômetro	MCCORD; FRIDOVICH, 1969
CAT	Espectrofotômetro	BEUTLER, 1975
GSH-t	Espectrofotômetro	AKERBOOM; SIES, 1981
GPx	Leitor de microplaca	SIES et al, 1979
GR	Leitor de microplaca	CARLBERG; MANNERVIK, 1985
Proteína	Leitor de microplaca	BRADFORD, 1976
LPO	HPLC-UV	ALMEIDA et al, 2003,2004

Fonte: Autoria própria.

Mesmo que as referências dos métodos sejam antigas, são clássicas para esse tipo de análise bioquímica.

II.3.5 Análise estatística

Aplicou-se o programa de estatística Statistica 7.0 nos resultados das análises dos biomarcadores bioquímicos. Primeiro, foi feito o teste Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos dados. Para os dados que apresentaram distribuição normal foi aplicado o teste do tipo ANOVA, seguido do teste *post hoc* de Dunnett para comparação entre o grupo controle e os tratamentos nos bioensaios por exposição e por injeção intraperitoneal. Para os dados que não apresentaram distribuição normal foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. Para as diferenças estatísticas encontradas entre os tratamentos (metil, etil, propil, butil, benzilparabeno e mistura) foram aceitas significativas apenas os valores de $p < 0,05$.

II.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

II.4.1 Teste de toxicidade

Os parabenos são muito utilizados em cosméticos, como conservantes, por isso existem vários estudos na literatura mostrando a toxicidade e os efeitos adversos que podem provocar nos seres humanos. Entretanto, existem poucas informações sobre a consequência que estas substâncias podem causar aos organismos aquáticos, visto que são dispostos nos corpos d'água sem serem totalmente removidos pelas estações de tratamento de esgoto sanitário e industrial.

Em virtude disto, o presente estudo foi feito com organismos aquáticos que são muito utilizados em regiões de clima tropical as tilápias do Nilo. Os peixes utilizados durante todos os testes de toxicidade com o metil, etil, propil, butil e benzilparabeno apresentaram comprimento médio de $(7,3 \pm 0,2)$ cm. Como a temperatura da água foi controlada por um aquecedor, ela permaneceu praticamente constante durante todo o experimento. A temperatura e o pH da água dos aquários foram medidos diariamente no mesmo horário durante todo o período de análise para cada parabeno estudado. A Tabela 4 apresenta a média da temperatura e do pH da água dos aquários durante as 48 h de experimento.

Tabela 4 - Média e desvio padrão do comprimento dos peixes, temperatura e pH, durante a realização dos testes de toxicidade.

Teste de toxicidade	Comprimento das tilápias (cm)	Temperatura (°C)	pH
Benzilparabeno	6,99 ± 0,29	25,43 ± 0,95	7,76 ± 0,08
Butilparabeno	7,39 ± 0,38	28,47 ± 0,84	7,63 ± 0,24
Propilparabeno	7,44 ± 0,42	28,93 ± 1,08	7,75 ± 0,10
Etilparabeno	7,22 ± 0,35	28,08 ± 1,10	7,61 ± 0,22
Metilparabeno	7,50 ± 0,35	27,06 ± 2,24	7,15 ± 0,50

Fonte: Autoria própria.

Durante o período de exposição dos peixes aos parabenos, a porcentagem de mortalidade das tilápias juvenis foi proporcional a concentração utilizada em cada teste na água (APÊNDICE I). Assim, o valor estimado da $LC_{50}(48\text{ h})$ nos peixes expostos aos parabenos foi menor nos parabenos de maior cadeia carbônica e maior nos de menor cadeia, Tabela 5. Foi observado que as tilápias muitas vezes tentaram saltar para fora dos aquários após exposição as concentrações mais elevadas dos parabenos metil, etil, propil, butil e benzil. As alterações comportamentais começaram nos primeiros cinco minutos e terminaram após 10 horas de experimento.

Tabela 5 - Concentração letal para 50% dos organismos (LC_{50}) para 48 h de exposição aos parabenos considerando toxicidade aguda em Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) juvenis, limite de 95% de confiança (CL), Log P e solubilidade dos parabenos em água.

Parabenos	LC_{50} (95% CL) (mg L ⁻¹)	Log P	Solubilidade a 25 °C (mg L ⁻¹)
Benzilparabeno	7,98 (5,38 – 11,83)	3,70	23
Butilparabeno	7,80 (6,16 – 9,89)	3,57	207
Propilparabeno	17,36 (14,63 – 20,61)	3,04	500
Etilparabeno	24,08 (18,70 – 31,02)	2,47	885
Metilparabeno	67,11 (56,61 – 79,57)	1,96	2500

Fonte: Autoria própria.

Os valores da LC_{50} para as tilápias expostas ao benzilparabeno e ao butilparabeno foram menores do que para os outros parabenos, o propil, etil e metilparabeno. Segundo Dobbins e colaboradores (2009) o benzil e o butilparabeno também foram os mais tóxicos para larvas de peixe da espécie *Pimephales promelas* (LC_{50} foi 3,3 mg L⁻¹ e 4,2 mg L⁻¹, respectivamente) e *Daphnia magna* (LC_{50} foi 4,0 mg L⁻¹ e 5,3 mg L⁻¹, respectivamente). Estes resultados indicam que o butil e benzilparabeno são mais tóxicos do que o metil, etil e

propilparabeno. Isto pode estar relacionado ao tamanho da cadeia carbônica do butil e do benzilparabenos e com o coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}) (0,51 e 0,55, respectivamente), que prediz a tendência de uma substância em atravessar a membrana celular de um organismo que é constituída por lipídios, em comparação com porções aquosas (SANDERMANN, 2008).

Embora o butil e o benzilparabeno não sejam os conservantes mais utilizados em cosméticos, por serem considerados mais tóxicos e menos solúveis, Rastogi e colaboradores (1995) encontraram esses dois compostos em 16% dos 215 diferentes tipos de cosméticos consumidos na Dinamarca, porém em protetor solar e removedor de maquiagem dos olhos não foram encontrados esses parabenos.

Dobbins e colaboradores (2009) apresentaram resultados que indicaram um possível modo de ação tóxica dos parabenos em organismos aquáticos e observaram a narcose em larvas de peixe (*Pimephales promelas*) durante testes de toxicidade com parabenos. De acordo com Van Wezel e Opperhuizen (1995) a acumulação de poluentes industriais na porção lipofílica dos organismos aquáticos pode causar a narcose, que é definida como perda reversível da consciência ou mobilidade, ou até mesmo à morte do organismo, sendo esta relacionada à alterações nas porções lipídicas das membranas neurais (SANDERMANN, 2008).

Alterações no comportamento das tilápias foram observadas durante os experimentos da presente pesquisa, como alta rotação no eixo longitudinal das mesmas, alta excitação e perda do equilíbrio. Foi possível notar este fato alguns minutos, após exposição, em que os animais permaneceram imóveis no fundo do aquário, provavelmente a frequência respiratória deve ter diminuído nesta fase de imobilização, e no dia seguinte voltaram ao normal. Segundo Van Wezel e Opperhuizen (1995), é comum esse comportamento em peixes após serem expostos a compostos que causem a narcose.

Observou-se uma vermelhidão em torno das brânquias nos peixes que vieram a óbito. Também se observou que os peixes ficaram com coloração mais escura, características estas que segundo Van Wezel e Opperhuizen (1995) são respostas comuns em estudos de laboratório com peixes após exposição a poluentes que causam narcose.

Dobbins e colaboradores (2009) observaram em seus estudos a perda na atividade natatória em *Daphnia magna* e em larvas de peixes da espécie *Pimephales promelas* nos testes de toxicidade aguda para os mesmos parabenos estudados, após 48 h de exposição. O efeito narcótico dos parabenos aumenta de acordo com a lipofilicidade destas substâncias que

está relacionada com o coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}) dos mesmos (SANDERMANN, 2008; DOBBINS et al.; 2009).

Como os parabenos são compostos lipofílicos, à medida que aumenta o número de carbonos da cadeia alquil, aumenta o K_{ow} (GOLDEN; GANDY; VOLLMER, 2005, KANG et al.; 2013) e isso aumenta a toxicidade (SONI; CARABIN; BURDOCK, 2005), causando assim a atividade narcótica. A relação observada entre a toxicidade dos parabenos, a lipofilicidade e a narcose é confirmada por meio de estudos descritos na literatura (DOBBINS et al.; 2009, YAMAMOTO et al.; 2011).

II.4.2 Análise Bioquímica

O estresse oxidativo, de modo geral, expressa os danos gerados pelas EROs a níveis moleculares e celulares. Assim, foi possível notar os efeitos dos parabenos por meio da indução das atividades das enzimas que atuaram sob as EROs. A primeira enzima que exerce ação contra os danos induzidos pelas EROs é a SOD. Como se pode observar na Figura 5, o benzilparabeno induziu a atividade da enzima em $16,3 \text{ U mg prot}^{-1}$, e a mistura (metil e propilparabeno) em $14,3 \text{ U mg prot}^{-1}$, nas amostras de brânquias de tilápia do Nilo após 6 dias de exposição, em comparação com a atividade enzimática do grupo controle que apresentou um valor de $10,2 \text{ U mg prot}^{-1}$. Os parabenos etil, propil, butil, benzil, e a mistura, também provocaram aumento da atividade da SOD, apresentando valores de, $12,8 \text{ U mg prot}^{-1}$, $16,6 \text{ U mg prot}^{-1}$, $14,9 \text{ U mg prot}^{-1}$, $19,0 \text{ U mg prot}^{-1}$ e $16,0 \text{ U mg prot}^{-1}$, respectivamente, após 12 dias de exposição, em comparação com o grupo controle que expressou uma atividade de $11,3 \text{ U mg prot}^{-1}$.

Figura 9 – Atividade da SOD nas brânquias e no fígado de tilápias, após exposição aos parabenos.

(*) Diferença significativa em relação ao controle, para $p < 0,05$. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Fonte: Autoria própria.

Notou-se nas amostras de fígado dos peixes após 6 dias de exposição, Figura 9, que o parabenos butilparabeno provocou indução na atividade enzimática, apresentando valor de $172,9 \text{ U mg prot}^{-1}$ em relação ao grupo controle que expressou uma atividade de $130,5 \text{ U mg prot}^{-1}$, ao contrário, da exposição à mistura, que provocou uma redução na atividade da SOD no valor de $90,7 \text{ U mg prot}^{-1}$. Após 12 dias de exposição aos parabenos estudados, apenas o metil e o etilparabeno causaram aumento na atividade da SOD, atingindo valores de $113,5 \text{ U mg prot}^{-1}$ e $132,4 \text{ U mg prot}^{-1}$, respectivamente, em relação ao grupo controle que apresentou uma atividade de $82,2 \text{ U mg prot}^{-1}$.

Sendo assim, o benzilparabeno e o etilparabeno foram os compostos que provocaram simultaneamente indução na atividade enzimática após 6 e 12 dias de exposição, respectivamente, nas amostras de brânquias e de fígado das tilápias. Isto indica que a enzima exerceu sua função no ataque as EROs. Além disso, para o experimento de exposição, a enzima SOD nas amostras de brânquias após 12 dias de exposição aos parabenos, foi mais afetada em comparação à exposição de 6 dias. Estes resultados sugerem que com o passar do tempo a toxicidade dos parabenos aumenta, gerando uma maior quantidade de EROs nos tecidos estudados.

Figura 10 – Atividade da SOD nas brânquias e no fígado de tilápias, após injeção dos parabenos.

(*) Diferença significativa em relação ao controle, para $p < 0,05$. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Fonte: Autoria própria.

A Figura 10 apresenta os gráficos da atividade da SOD nas amostras das brânquias e do fígado de tilápias do Nilo após 6 e 12 dias de administração via injeção intraperitoneal do metil, etil propil, butil, benzilparabeno e da mistura. Foi possível observar que a atividade enzimática foi menos afetada em comparação ao experimento de exposição, Figura 9. Apenas o grupo exposto ao propilparabeno apresentou uma atividade enzimática elevada de $19,0 \text{ U mg prot}^{-1}$, nas amostras de brânquias após 6 dias de administração em relação ao grupo controle que expressou uma atividade de $14,8 \text{ U mg prot}^{-1}$.

A mistura, metil e propilparabeno, provocou uma indução na atividade da enzima de 206,9 U mg prot⁻¹, nas amostras de fígado pela administração após 12 dias de experimento em comparação ao grupo controle que apresentou uma atividade enzimática de 143,2 U mg prot⁻¹. Estes resultados indicaram que as administrações dessas substâncias causaram alteração na atividade enzimática, exercendo sua função no ataque contra as EROs.

Entretanto, após 6 dias de administração via injeção, apenas o metilparabeno foi capaz de reduzir a atividade da SOD para 69,2 U mg prot⁻¹, nas amostras de fígado com relação ao grupo controle que apresentou uma atividade de 129,5 U mg prot⁻¹. Zhang e colaboradores (2008)³ apud Li, Li e Randak (2010) explicam que a inibição na atividade da SOD pode ser devido ao fluxo de radicais superóxido resultando em aumento de H₂O₂ na célula.

Figura 11 – Atividade da CAT nas brânquias e no fígado de tilápias, após exposição aos parabenos.

Fonte: Autoria própria.

A Figura 11, apresenta a atividade da enzima CAT nas amostras de brânquias e de fígado de tilápias do Nilo após 6 e 12 dias de exposição ao metil, etil, propil, butil, benzilparabeno e mistura (metil e propilparabeno). Observa-se que mesmo apresentando redução e indução na atividade enzimática nos dois tecidos, estes resultados não apresentaram diferença significativa, ilustrado pelo asterisco (*) nos gráficos.

³ ZHANG X.; YANG F.; ZHANG X.; XU Y.; LIAO T.; SONG S.; WANG H. Induction of hepatic enzymes and oxidative stress in Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) exposed to waterborne hexabromocyclododecane (HBCDD). *Aquatic Toxicology*. v. 86, p. 4-11, 2008.

Figura 12 – Atividade da CAT nas brânquias e no fígado de tilápias, após injeção dos parabenos.

(*) Diferença significativa em relação ao controle, para $p < 0,05$. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Fonte: Autoria própria.

A atividade da CAT, enzima de detoxicação de peróxidos, foi induzida nas amostras de brânquias após 6 dias da administração intraperitoneal da mistura (metil e propilparabeno) apresentando uma atividade de $9,4 \text{ U mg prot}^{-1}$ e da injeção do butilparabeno, $9,3 \text{ U mg prot}^{-1}$, em comparação ao grupo controle que expressou uma atividade de $7,1 \text{ U mg prot}^{-1}$, Figura 12. A atividade enzimática também foi elevada após 12 dias da administração intraperitoneal do metil, etil, butil e benzilparabeno de $9,7 \text{ U mg prot}^{-1}$; $9,1 \text{ U mg prot}^{-1}$; $9,2 \text{ U mg prot}^{-1}$ e $11,0 \text{ U mg prot}^{-1}$, respectivamente, quando comparado ao grupo controle que apresentou uma atividade de $7,2 \text{ U mg prot}^{-1}$.

Estes resultados sugerem que a enzima atuou na decomposição dos peróxidos gerados a partir da administração dos parabenos. Após 6 e 12 dias de administração ao benzilparabeno e após 12 dias ao metilparabeno, a atividade enzimática aumentou apresentando um valor de $51,9 \text{ mg prot}^{-1}$, $60,4 \text{ U mg prot}^{-1}$ e $53,1 \text{ U mg prot}^{-1}$, quando analisou-se amostras de fígado, embora a atividade enzimática tenha diminuído após 6 dias de administração do metilparabeno atingindo o valor de $21,3 \text{ U mg prot}^{-1}$. Observa-se que o benzilparabeno foi o composto que mais afetou a atividade da enzima CAT para as condições estudadas.

Figura 13 – Atividade da GPx nas brânquias e no fígado de tilápias, após exposição aos parabenos.

(*) Diferença significativa em relação ao controle, para $p < 0,05$. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Fonte: Autoria própria.

A Figura 13 apresenta a atividade da GPx nas amostras de brânquias e de fígado de Tilápia do Nilo após 6 e 12 dias de exposição aos parabenos metil, etil, propil, butil, benzil e mistura (metil e propilparabeno). Observa-se que após 6 dias de exposição dos peixes ao metil, etil e propilparabeno a atividade enzimática foi induzida apresentando valores de 31,2 U mg prot⁻¹, 32,5 U mg prot⁻¹ e 34,6 U mg prot⁻¹, respectivamente, com relação ao grupo controle que expressou uma atividade de 16,7 U mg prot⁻¹. Após 12 dias, a atividade da GPx aumentou, devido a exposição ao etilparabeno, benzilparabeno e a mistura apresentando valores de 24,1 U mg prot⁻¹, 28,0 U mg prot⁻¹ e 24,8 U mg prot⁻¹, respectivamente, nas amostras de brânquias em comparação ao grupo controle que expressou uma atividade de 15,6 U mg prot⁻¹.

A atividade enzimática nas amostras de fígado, após 6 dias de exposição dos peixes à mistura, foi induzida e apresentou o valor de 14,1 U mg prot⁻¹, com relação ao grupo controle que apresentou uma atividade de 4,8 U mg prot⁻¹. Após 12 dias de experimento, a atividade também aumentou nos grupos que foram expostos ao butil e ao benzilparabeno, apresentando atividades de 10,9 U mg prot⁻¹ e 11,9 U mg prot⁻¹, respectivamente, em comparação ao grupo controle que expressou uma atividade de 5,3 U mg prot⁻¹. Esses resultados sugerem que a GPx atuou na decomposição dos peróxidos, auxiliando no mecanismo de defesa celular do peixe.

Figura 14 – Atividade da GPx nas brânquias e no fígado de tilápias, após injeção dos parabenos.

(*) Diferença significativa em relação ao controle, para $p < 0,05$. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Fonte: Autoria própria.

Para o experimento em que foi feita administração via injeção intraperitoneal dos parabenos, Figura 14, a atividade da enzima GPx nas amostras de brânquias das tilápias do Nilo após 12 dias de experimento ao etil, propil, e butilparabeno, aumentou apresentando valores de 42,1 U mg prot⁻¹, 53,6 U mg prot⁻¹ e 58,2 U mg prot⁻¹, respectivamente, em comparação ao grupo controle que apresentou atividade de 23,0 U mg prot⁻¹.

A atividade enzimática nas amostras de fígado após 6 dias de administração da mistura, foi induzida atingindo o valor de $19,9 \text{ U mg prot}^{-1}$ em relação ao grupo controle que teve uma atividade de $7,8 \text{ U mg prot}^{-1}$. Estes resultados indicam que essa enzima exerceu sua função na degradação dos peróxidos. Por outro lado, a atividade enzimática nas amostras de brânquias foi reduzida após 6 dias de administração ao etilparabeno, apresentando uma atividade de $15,6 \text{ U mg prot}^{-1}$ em comparação ao grupo controle que expressou um valor de $31,4 \text{ U mg prot}^{-1}$. Isto mostra que a eliminação dos radicais livres foi eficiente, como sugere Shah e Verma (2011) em seu experimento, após administração oral de butilparabeno durante 30 dias de experimento com ratos.

Figura 15 – Atividade da GR nas brânquias e no fígado de tilápias, após exposição aos parabenos.

(*) Diferença significativa em relação ao controle, para $p < 0,05$. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Fonte: Autoria própria.

A Figura 15 apresenta a atividade da GR nas amostras de brânquias e de fígado de tilápias do Nilo expostas aos parabenos metil, etil, propil, butil, benzil e mistura. A atividade da enzima GR nas amostras de fígado, após 12 dias de experimento, foi induzida nos grupos expostos ao metil, etilparabeno e a mistura, apresentando valores de $39,9 \text{ U mg prot}^{-1}$, $43,7 \text{ U mg prot}^{-1}$ e $40,7 \text{ U mg prot}^{-1}$, em comparação ao grupo controle que expressou uma atividade de $27,6 \text{ U mg prot}^{-1}$.

A atividade enzimática nas amostras de brânquias após 6 dias de exposição ao propilparabeno, foi induzida apresentando valor de $62,0 \text{ U mg prot}^{-1}$ com relação ao grupo controle que expressou uma atividade de $41,1 \text{ U mg prot}^{-1}$. Entretanto, nota-se nas amostras de brânquias do grupo exposto ao butilparabeno após 12 dias de experimento, que a atividade foi reduzida apresentando o valor de $44,7 \text{ U mg prot}^{-1}$, respectivamente, sugerindo a decomposição das EROs.

Figura 16 – Atividade da GR nas brânquias e no fígado de tilápias, após injeção dos parabenos.

(*) Diferença significativa em relação ao controle, para $p < 0,05$. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Fonte: Autoria própria.

Para o experimento de administração via injeção intraperitoneal após 12 dias da administração ao metil e ao etilparabeno, Figura 16, observa-se aumento da atividade da GR nas amostras de brânquias nos valores de $58,8 \text{ U mg prot}^{-1}$ e de $62,2 \text{ U mg prot}^{-1}$, respectivamente, em comparação ao grupo controle que apresentou atividade de $35,3 \text{ U mg prot}^{-1}$. A indução da atividade da GR nas amostras de fígado, foi notada após 6 dias de administração ao butil e ao benzilparabeno, apresentando valores de $33,6 \text{ U mg prot}^{-1}$ e de $30,3 \text{ U mg prot}^{-1}$, respectivamente, com relação ao grupo controle que expressou uma atividade de $20,0 \text{ U mg prot}^{-1}$.

Figura 17 – Níveis de GSH-t nas brânquias e no fígado de tilápias, após exposição aos parabenos.

(*) Diferença significativa em relação ao controle, para $p < 0,05$. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Fonte: Autoria própria.

Com relação aos níveis de GSH-t nas amostras de fígado, após 6 dias de exposição dos peixes aos parabenos, Figura 17, foi possível observar redução da GSH-t, exceto para os animais expostos ao benzilparabeno que apresentou níveis de $3,6 \text{ U mg prot}^{-1}$. Essa inibição é confirmada por Asnani e Verma (2009) que estudaram os efeitos dos parabenos em camundongos e relataram que a presença dos mesmos provocou diminuição significativa dos

níveis de GSH-t. Esta alteração pode indicar a presença de radicais livres gerados pelo estresse oxidativo. Esta afirmação pode ser sustentada pela pequena inibição na atividade da CAT após 6 dias de exposição dos peixes ao propilparabeno, Figura 11. Esta inibição na atividade da CAT pode também estar relacionada com a redução nos níveis de GSH-t, indicando que a atividade desta enzima foi afetada, não protegendo o tecido adequadamente contra as EROs geradas e consequentemente reduziu os níveis de GSH-t. De acordo com Pandey e colaboradores (2008)⁴ apud Li, Li e Randak (2010), a relação da redução dos níveis de GSH-t intracelular com a diminuição na atividade antioxidante pode ser devido a um desequilíbrio oxidativo, induzindo a processos oxidativos e levando a morte celular.

Por outro lado, mesmo as enzimas SOD, CAT, GR e GPx, Figuras 9, 11, 15 e 13, apresentando aumento nas atividades nas amostras de fígado, isto não foi suficiente para a proteção celular contra as EROs, pois os níveis de GSH-t foram reduzidos nas amostras de fígado quando os peixes foram expostos ao butil, metil e etilparabeno, e mistura (metil e propilparabeno), após 6 dias de experimento, apresentando valores de 1,6 U mg prot⁻¹, 1,5 U mg prot⁻¹ e 1,5 U mg prot⁻¹, e 1,7 U mg prot⁻¹, respectivamente.

Nota-se aumento nos níveis de GSH-t nas amostras de fígado após 12 dias de exposição para todos os parabenos, Figura 17. Os níveis de GSH-t estudados nas amostras de brânquias com 12 dias após exposição ao butilparabeno foram elevados, apresentando valor 0,3 U mg prot⁻¹.

Pode-se observar também que os níveis GSH-t foram diferentes nos dois períodos de exposição, com níveis menores no experimento de 6 dias e níveis maiores no experimento de 12 dias. Estes dados corroboram com os do estudo realizado por Lima e colaboradores (2006) em que tilápias foram expostas a efluentes da indústria de carne suína após 7 e 90 dias e os níveis de GSH-t foram menores com 7 dias de exposição e maiores com 90 dias.

⁴ PANDEY S.; PARVEZ S.; ANSARI R.A.; ALI M.; KAUR M.; HAYAT F.; AHMAD F.; RAISUDDIN S. Effects of exposure to multiple trace metals on biochemical, histological and ultrastructural features of gills of a freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. **Chemico-Biological Interactions**, v. 174, p. 183-192, 2008.

Figura 18 – Níveis de GSH-t nas brânquias e no fígado de tilápias, após injeção dos parabenos.

(*) Diferença significativa em relação ao controle, para $p < 0,05$. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Fonte: Autoria própria.

A Figura 18 mostra os níveis de GSH-t nas amostras de brânquias e de fígado de tilápias do Nilo, após administração via injeção intraperitoneal do metil, etil, propil, butil, benzilparabeno e da mistura (metil e propilparabeno). Foi possível observar nas amostras de brânquias apenas indução nos níveis de GSH-t, com valor de $0,3 \text{ U mg prot}^{-1}$ para a administração da mistura, após 6 dias.

Foi possível observar redução nos níveis de GSH-t nas amostras de fígado após 12 dias de administração dos parabenos, exceto para o propilparabeno que apresentou valor de $1,6 \text{ U mg prot}^{-1}$. Pode-se relacionar estas inibições nos níveis de GSH-t com as induções apresentadas pelas enzimas CAT e SOD, Figuras 12 e 10, para as administrações do metil, benzilparabeno e mistura (metil e propilparabeno), respectivamente, após 12 dias de experimento. Mesmo a enzima atuando contra as EROs, não foi suficiente para impedir a redução nos níveis de GSH-t.

Nota-se que, para os níveis de GSH-t em comparação a defesa antioxidante enzimática, as amostras de fígado foram as que mais responderam às condições estudadas. Estes resultados sugerem que, como o fígado é o principal tecido de biotransformação, este seja o tecido mais responsivo para todos os parabenos estudados.

Figura 19 – Níveis de MDA nas brânquias e no fígado de tilápias, após exposição aos parabenos.

(*) Diferença significativa em relação ao controle, para $p < 0,05$. Dados expressos em media $\pm$ desvio padrão. Fonte: Autoria própria.

A partir da Figura 19 observa-se tanto nas amostras de brânquias como nas de fígado que a defesa antioxidante foi eficiente, pois os níveis de MDA formado foram baixos. Embora os resultados não tenham sido estatisticamente significativos, ilustrados com asterisco, para as amostras de brânquias dos dois períodos de exposição e para as de fígado com 6 dias de experimento.

Entretanto, nas amostras de fígado após 12 dias de exposição ao butilparabeno e a mistura (metil e propilparabeno), observa-se que a inibição na formação de MDA pode estar relacionada com as enzimas antioxidantes analisadas. Provavelmente as enzimas SOD, GPx e GR, Figuras 9, 13 e 15, foram capazes de atuar nas EROs produzidas, aumentando a proteção celular durante a exposição ao butilparabeno e a mistura, respectivamente, e impedindo a formação de MDA. Observa-se que tanto o tecido das brânquias como o do fígado não foram lesados.

Figura 20 – Níveis de MDA nas brânquias e no fígado de tilápias, após injeção dos parabenos.

(*) Diferença significativa em relação ao controle, para $p < 0,05$. Dados expressos em media $\pm$ desvio padrão. Fonte: Autoria própria.

Nota-se pela Figura 20, aumento nos níveis de MDA formado nas amostras de brânquias de tilápias do Nilo após 6 dias de administração via injeção intraperitoneal do butil, do benzilparabeno e da mistura (metil e propilparabeno). Apenas quando foi feita a

administração da mistura é que foi possível relacionar os níveis elevados de MDA com a indução da atividade da CAT, Figura 8. Este resultado sugere que mesmo a enzima atuando contra as EROs formadas, não foi possível impedir a formação de MDA.

O mesmo ocorreu com as amostras de fígado após 6 dias de administração do butil e do benzilparabeno. As enzimas GR e CAT, Figura 16 e 12, apresentaram atividade elevada após as administrações do butil e do benzilparabeno, respectivamente, porém a atuação dessas enzimas não foi suficiente para impedir a formação de MDA.

Foi possível relacionar o aumento nos níveis de MDA formado com a inibição da atividade da SOD e CAT nas amostras de fígado quando foi feita a administração ao metilparabeno após 6 dias Figuras 10 e 12. Shah e Verma (2011) também observaram redução na atividade da SOD nas amostras de fígado de rato ao aplicar três diferentes doses, baixa, média e alta, de butilparabeno, por via oral, durante 30 dias. Os autores correlacionaram a redução nas atividades enzimáticas com os altos níveis de MDA nas amostras de fígado, sugerindo que ocorreu um aumento na produção de EROs na membrana plasmática da célula, devido à incorporação do butilparabeno ou diminuição do sistema antioxidante, resultando na alteração do potencial redox da célula.

Estes dados veem comprovar os resultados do presente estudo, em que ocorreu a diminuição da atividade da SOD, Figura 10, após 6 dias da administração do metilparabeno, em que a atividade foi $69,2 \text{ U mg prot}^{-1}$ nas amostras de fígado, quando comparada aos resultados dos peixes do grupo controle, que apresentaram atividade de $129,5 \text{ U mg prot}^{-1}$ e indução nos níveis de MDA, Figura 20.

Quando Asnani e Verma (2009) expuseram ratos a tratamento via oral por 30 dias aos parabenos, relacionaram a inibição enzimática da CAT nas amostras do fígado com a indução nos níveis de MDA, sugerindo que o mecanismo de defesa antioxidante celular diminuiu, aumentando assim os níveis de peroxidação lipídica. Estes resultados corroboram com os dados apresentados no presente estudo, em que os altos níveis de MDA nas amostras do fígado, Figura 20, após 6 dias de administração do metilparabeno, podem estar associados também à inibição na atividade da CAT, Figura 12.

Foi possível relacionar o aumento da atividade da GPx e CAT nas amostras de brânquias, após 12 dias de administração, via injeção intraperitoneal, do butil, benzilparabeno e mistura (metil e propilparabeno), Figura 14 e 12, com a diminuição dos níveis de MDA formado após 12 dias da administração do butil e do benzilparabeno. Estes resultados sugerem que as enzimas antioxidantes atuaram para uma maior proteção celular. Porém, para a administração da mistura (metil e propilparabeno), pode ser que outra enzima antioxidante,

não analisada nesse estudo, tenha apresentado indução na atividade, causando redução nos níveis de MDA.

Pode-se notar que tanto nas amostras de brânquias como nas de fígado, para as administrações via injeções intraperitoneal após 6 dias, as enzimas antioxidantes não foram eficientes na atuação contra as EROs, gerando assim lesão celular.

De um modo geral, foi possível observar que os tecidos apresentaram resultados distintos nos bioensaios realizados, tanto na exposição como administração via injeção intraperitoneal. No experimento de exposição, mesmo as atividades enzimáticas sendo induzidas, tanto nas enzimas presentes nas amostras de brânquias como nas de fígado, foram capazes de atuar contra as EROs geradas, pois não houve formação de MDA.

No experimento de administração via injeção intraperitoneal, foram apresentados poucos resultados com relação ao aumento nas atividades enzimáticas, porém, encontrou-se lesão celular nas amostras de brânquias e de fígado após 6 dias de experimento e baixos níveis de GSH-t nas amostras de fígado após 12 dias de experimento (Tabela 6). De acordo com Soni, Carabin e Burdock (2005), a eliminação e a metabolização dos parabenos podem ser diferentes, dependendo da rota de exposição.

Tabela 6 – Resumo dos resultados dos biomarcadores analisados.

Exposição		Injeção	
Brânquias	Fígado	Brânquias	Fígado
↑SOD	↑SOD	↑SOD	↑SOD
-	-	↑CAT	↑CAT
↑GPx	↑GPx	↑GPx	↑GPx
↑GR	↑GR	↑GR	↑GR
-	↓GSH-t	-	↓GSH-t
-	-	↑MDA	↑MDA

Fonte: Autoria própria.

II.5 CONCLUSÃO

Os testes de toxicidade aguda (48 h) demonstraram que as tilápias foram mais sensíveis aos parabenos de maior cadeia carbônica do que os de cadeias de carbono menores. O efeito letal que o benzilparabeno causou nas tilápias é maior em baixa concentração ($16,9 \text{ mg L}^{-1}$), quando comparado com as concentrações utilizadas nos outros parabenos estudados. Estes resultados têm grande relevância em estudos de monitoramento ambiental, como em estudos de campo, apesar de que são necessárias mais informações sobre a toxicidade dos parabenos e seus efeitos sobre os organismos aquáticos.

Com relação aos bioensaios de exposição, apesar dos efeitos negativos na atividade da GR nas amostras de brânquias após 12 dias e da atividade da SOD e GPx nas amostras de fígado após 6 dias, a defesa antioxidante foi capaz de atuar nas EROs geradas, não acarretando em prejuízo oxidativo e impedindo a formação de MDA, tanto nas brânquias como no fígado.

Por outro lado, para os bioensaios via injeção intraperitoneal, as enzimas antioxidantes não foram eficazes na atuação contra as EROs, tanto nas amostras de fígado como nas brânquias, após 6 dias da injeção ao propil, butil, benzilparabeno e mistura. Estes resultados demonstraram que com o passar do tempo os parabenos no sistema biológico do peixe teve uma atuação rápida, provavelmente foram eliminados ou biotransformados, deixando de ser prejudiciais ao organismo nos bioensaios após 12 dias.

Como as enzimas antioxidantes apresentaram atividade elevada, indicando que houve ataque contra as EROs nas exposições e na administração via injeção intraperitoneal, isto não foi o suficiente para impedir a redução nos níveis de GSH-t.

Confirmado pelo teste de toxicidade, o benzilparabeno foi o composto que mais afetou as atividades enzimáticas, embora, o metilparabeno tenha sido o único capaz de inibir as atividades enzimáticas da CAT e SOD nas amostras de fígado, provocando aumento nos níveis de MDA.

É importante lembrar que neste trabalho foram utilizadas concentrações consideradas 10 vezes menos que o limite máximo permitido na legislação brasileira para uso de parabenos em cosmético, seguindo a resolução - RDC nº 29 de 1º de junho de 2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2012).

Sendo assim, sabendo-se que o ambiente aquático está continuamente recebendo descarga de resíduos urbanos e industriais, que nas estações de tratamento de esgoto não há um processo específico para remoção de conservantes e que há trabalhos na literatura que

comprovam os efeitos adversos dos parabenos na reprodução, desenvolvimento e fertilidade dos peixes, estes dados poderão auxiliar estudos de monitoramento ambiental com o intuito de fornecer informações relevantes e servir como ferramenta complementar em trabalhos de campo.

REFERÊNCIAS

- AKERBOOM, T. P.; SIES, H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. **Methods Enzymol**, v.77, p. 373-382, 1981.
- ALBERO, B.; PÉREZ, R.A.; SÁNCHEZ-BRUNETE, C.; TADEO, J.L. Occurrence and analysis of parabens in municipal sewage sludge from wastewater treatment plants in Madrid (Spain). **Journal of Hazardous Materials**, v. 239-240, p. 48-55, 2012.
- ALMEIDA, E. A.; MARQUES, S.A.; KLITZKE, C.F.; BAINY, A.C.; DE MEDEIROS, M.H.; DI MASCIO, P.; LOUREIRO, A.P. DNA damage in digestive gland and mantle tissue of the mussel *Perna perna*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 135, p. 295-303, 2003.
- ALMEIDA E.A.; MIYAMOTO, S.; BAINY, A.C.; DE MEDEIROS, M.H.; DI MASCIO, P. Protective effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna perna* exposed to different metals. **Marine Pollution Bulletin**, v. 49, n. 5-6, p. 386-92, 2004.
- ALMEIDA, E. A.; BAINY, A. C. D.; LOUREIRO, A. P. M.; MARTINEZ, G. R.; MIYAMOTO, S.; ONUKI, J.; BARBOSA, L. F.; GARCIA, C. C. M.; PRADO, F. M.; RONSEIN, G. E.; SIGOLO, C. A.; BROCHINI, C. B.; MARTINS, A. M. G.; MEDEIROS, M. H. G.; MASCIO, P. D. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. **Comparative Biochemistry and Physiology A, Molecular & Integrative Physiology**, v. 145, p. 588-600, 2007.
- ALSLEV, B.; KORSGAARD, B.; BJERREGAARD, P. Estrogenicity of butylparaben in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* exposed via food and water. **Aquatic Toxicology**, v. 72, p. 295-304, 2005.
- ANDERSEN, L.; SIU, W. H. L.; CHING, E. W. K.; KWOK, C. T.; MELVILLE, F.; PLUMMER, C.; STOREY, A.; LAM, P. K. S. **Antioxidant enzymes as biomarkers of environmental stress in oysters in Port Curtis**. Indooroopilly: Cooperative Research Centre for Coastal Zone, Estuary and Waterway Management, 2006. 96p.
- ATLI, G.; CANLI, M. Response of antioxidant system of freshwater fish *Oreochromis niloticus* to acute and chronic metal (Cd, Cu, Cr, Zn, Fe) exposures. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p. 1884-1889, 2010.
- ASNANI, V.M.; VERMA, R.J. Ameliorative effects of ginger extract on paraben-induced lipid peroxidation in the liver of mice. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 66, n. 3, p. 225-228, 2009.
- BALARIN, J. D. & HATTON, J. P. **Tilápia: A guide to their biology and culture in Africa**. Stirling: University of Stirling, Scotland, 1979. 174p.
- BEUTLER, E. **Red cell metabolism: a manual of biochemical methods**. New York: Grune & Stratton, 1975. 166p.

BJERREGAARD, P.; HANSEN, P. R.; LARSEN, K. J.; ERRATICO, C.; KORSGAARD, B.; HOLBECH, H. Vitellogenin as a biomarker for estrogenic effects in brown trout, *Salmo trutta*: laboratory and field investigations. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n. 11, p. 2387-2396, 2008.

BJERREGAARD, P.; HANDERSEN, 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 Part C**, v. 136, p. 309-317, 2003.

BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, oxidative damage, and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, v. 91, p. 179-194, 2003.

BOWLEY, L. A.; ALAM, F.; MARENTETTE, J. R.; BALSHINE, S.; WILSON, J. Y. Characterization of vitellogenin gene expression in round goby (*Neogobius melanostomus*) using a quantitative polymerase chain reaction assay. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 12, p. 2751-2760, 2010.

BOURAOUI, Z.; BANNI, M.; GHEDIRA, J.; CLERANDEAU, C.; NARBONNE, J. F.; BOUSSETTA, H. Evaluation of enzymatic biomarkers and lipoperoxidation level in *Hediste diversicolor* exposed to copper and benzo[a]pyrene. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 1893-1898, 2009.

BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principles of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 29 ANVISA, 01 de junho de 2012.

BROOKS, B.W.; RILEY, T.M.; TAYLOR, R.D. Water quality of effluent-dominated ecosystems: ecotoxicological, hydrological, and management considerations. **Hydrobiologia**, v. 556, p. 365-379, 2006.

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

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods in Enzymology**, v. 113, p. 484-90, 1985.

DOBBINS, L. L.; USENKO, S.; BRAIN, R. A.; BROOKS, B. W. Probabilistic ecological hazard assessment of parabens using daphnia magna and pimephales promelas. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, n. 12, p. 2744-2753, 2009.

FUJIMURA, K.; OKADA, N. Development of the embryo, larva and early juvenile of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). Developmental staging system. **Develop. Growth Differ.**, v. 49, p. 301-324, 2007.

GIULIO, R.T.D.; MEYER, J.N. Reactive Oxygen Species and Oxidative stress. **In:** GIULIO, R.T.D.; HINTON, D.E. **The Toxicology of Fishes**. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, London: New York, 2008.

GONZÁLEZ-MARIÑO, I.; QUINTANA, J. B.; RODRÍGUEZ, I.; CELA, R. Simultaneous determination of parabens, triclosan and triclocarban in water by liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 23, p. 1756-1766, 2009.

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, p. 435-458, 2005.

HALLIWELL, B.; GUITTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. New York: Clarendon Press, 1999.

HARRIS, E. D. Regulation of antioxidant enzymes. **The FASEB Journal**, v. 6, p. 2675-2683, 1992.

HODGES, D. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, São Paulo. 2011
Disponível em: < http://www.cetesb.sp.gov.br/mortandade/peixe_doce1.php > Acesso em: 06 de jul. 2011.

HONG, Y.L.; YEH, S.L.; CHANG, C.Y.; HU, M.L. Total plasma malondialdehyde levels in 16 taiwanese college students determined by various thiobarbituric acid tests and an improved high-performance liquid chromatography-based method. **Clinical Biochemistry**. v. 33, p. 619-625, 2000.

INUI, M.; ADACHI, T.; TAKENAKA, S.; INUI, H.; NAKAZAWA, M.; UEDA, M.; WATANABE, H.; MORI, C.; IGUCHI, T.; MIYATAKE, K. Effect of UV screens and preservatives on vitellogenin and choriogenin production in male medaka (*Oryzias latipes*). **Toxicology**, v. 194, p. 43-50, 2003.

JAKIMSKA, A.; HUERTA, B.; BARGANSKA, Z.; KOT-WASIK, A.; RODRÍGUEZ-MOAZ, S.; BARCELÓ, D. Development of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry procedure for determination of endocrine disrupting compounds in fish from Mediterranean rivers. **Journal of Chromatography A**, v. 1306, p. 44-58, 2013.

JONKERS, N.; SOUSA, A.; GALANTE-OLIVEIRA, S.; BARROSO, C. M.; KOHLER, H. P. E.; GIGER, W. Occurrence and sources of selected phenolic endocrine disruptors in Ria de Aveiro, Portugal. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 17, p. 834-843, 2010.

JOSEPHY, P. D. **Molecular toxicology**. New York: Oxford University Press, 1997.

KANG, S.; KIM, S.; PARK, J.; KIM, H.J.; LEE, J.; CHOI, G.; CHOI, S.; KIM, S KIM, S.Y.; MOON, H.B.; KIM, s.; KHO, Y.L.; CHOI, K. Urinary paraben concentrations among pregnant women and their matching newborn infants of Korea, and the association with oxidative stress biomarkers. **Science of the Total Environment**, v. 461-462, p. 214-221, 2013.

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

KIM, J.W.; RAMASWAMY, B.R.; CHANG, K.H.; ISOBE, T.; TANABE, S. Multiresidue analytical method for the determination of antimicrobials, preservatives, benzotriazole UV stabilizers, flame retardants and plasticizers in fish using ultra high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 3511-3520, 2011.

LINDE-ARIAS, A.R.; INÁCIO, A.F.; ALBUQUERQUE, C.; FREIRE, M.M.; MOREIRA, J.C. Biomarkers in an invasive fish species, *Oreochromis niloticus*, to assess the effects of pollution in a highly degraded Brazilian River. **The Science of the Total Environment**, v. 399, p. 186-192, 2008.

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.

LI, Z.H.; LI, P.; RANDAK, T. Effect of a human pharmaceutical carbamazepine on antioxidant responses in brain of a model teleost *in vitro*: an efficient approach to biomonitoring. **Journal of Applied Toxicology**, v. 30, p. 644-648, 2010.

LI, Y.; WEI, G.; CHEN, J. Glutathione: a review on biotechnological production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, p. 233-242, 2006.

LIMA, P. L.; BENASSI, J. C.; PEDROSA, R. C.; MAGRO, J. D.; OLIVEIRA, T. B.; WILHELM FILHO, D. Time-course variations of DNA damage and biomarkers of oxidative stress in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to effluents from a swine industry. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.50, n.1, p.23-30. 2006

LÓPEZ-BAREA, J.; PUEYO, C. Mutagen content and metabolic activation of promutagens by molluscs as biomarkers of marine pollution. **Mutation Research**, v. 399, p. 3-15, 1998.

LORAIN, G. A.; PETTIGROVE, M. E. Seasonal variations in concentrations of pharmaceuticals and personal care products in drinking water and reclaimed wastewater in southern California. **Environmental Science & Technology**, v. 40, p. 687-695, 2006.

LU, A.Y.H.; JUNK, K.W.; COON, M. Resolution of the cytochrome P-450-containing omega-hydroxylation system of liver microsomes into three components. **Journal of Biological Chemistry**. v. 244, p. 3714-3721, 1969.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). **Biology Chemistry**. v. 244, p. 6049-6055, 1969.

NOORI, S. An overview of oxidative stress and antioxidant defensive system. **Open Access**, v. 1, n. 8, p. 1-8, 2012.

ORUÇ, E. Ö.; USTA, D. Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 23, p. 48-55, 2007.

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.

POPA, D. S.; KISS, B.; VLASE, L.; POP, A.; IEPURE, R.; PĂLTINEAN, R.; LOGHIN, F. Study of oxidative stress induction after exposure to bisphenol a and methylparaben in rats. **Farmacia**, v. 59, n. 4, p. 539-549, 2011.

PULLIN, R.S.V.; LOWE-MCCONNEL, R.H. The biology and culture of tilapias. International center for living aquatic resources management. **ICLARM Conference Proceedings 7, International Center for Living Aquatic Resources Management**, Manila, Philippines, 1982. 432 p.

RAMASWAMY, B. R.; KIM, J. W.; ISOBE, T.; CHANG, K. H.; AMANO, A.; MILLER, T. W.; SIRINGAN, F. P.; TANABE, S. Determination of preservative and antimicrobial compounds in fish from Manila Bay, Philippines using ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, and assessment of human dietary exposure. **Journal of Hazardous Materials**, v. 192, p. 1739-1745, 2011.

RASTOGI, S. C.; SCHOUTEN, A.; KRUIJF, N.; WEIJLAND, J. W. Contents of methyl-, ethyl-, propyl-, butyl- and benzylparaben in cosmetic products. **Contact Dermatitis**, v. 32, p. 28-30, 1995.

SANDERMANN, H. Ecotoxicology of narcosis: stereoselectivity and potential target sites. **Chemosphere**, v. 72, p. 1256-1259, 2008.

SELVARAJ, V.; SAMPATH, K.; SEKAR, V. Adjuvant and immunostimulatory effects of β -glucan administration in combination with lipopolysaccharide enhances survival and some immune parameters in carp challenged with *Aeromonas hydrophila*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 114, p. 15-24, 2006.

SHAH, K. H.; VERMA, R. J. Butyl *p*-hydroxybenzoic acid induces oxidative stress in mice liver ñ an *in vivo* study. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 68, n. 6, p. 875-879, 2011.

SIES, H.; KOCH, O. R.; MATINO, E.; BOVERIS, A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. **FEBS Letters**, v. 103, n. 2, p. 287-290, 1979.

SILVA, C. G. A.; COLLINS, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 665-676, 2011.

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.

SOUZA, E.C.P.M.; TEIXEIRA-FILHO, A.R. **Piscicultura fundamental**. 2ª ed. São Paulo: Nobel, 1985.

TERASAKI, M.; KAMATA, R.; SHIRAISHI, F.; MAKINO, M. Evaluation of estrogenic activity of parabens and their chlorinated derivatives by using the yeast two-hybrid assay and the enzyme-linked immunosorbent assay. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, p. 204-208, 2009.

TORRES, M.A.; TESTA, C.P.; GÁSPARI, C.; MASUTTI, M.B.; PANITZ, C.M.N.; CURI-PEDROSA, R.; ALMEIDA, E.A.; MASCIO, P.D.; FILHO, D.W. Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. **Marine Pollutant Bulletin**. v. 44, p. 923-932, 2002.

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

VAN WEZEL, A. P.; OPPERHUIZEN, A. Narcosis due to environmental pollutants in aquatic organisms: residue-based toxicity, mechanisms, and membrane burdens. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 25, n. 3, p. 255-279, 1995.

VILLANUEVA, C.; KROSS, R. D. Antioxidant-Induced Stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 2091-2109, 2012.

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.

APÊNDICE I – Teste de toxicidade

Tabela 1 – Teste de toxicidade para benzilparabeno, concentrações utilizadas e mortalidade média (%) em tilápia do Nilo (*O. niloticus*) após 48 h.

Concentração (mg L⁻¹)	Mortalidade (%)
2,11	0
4,22	30
8,45	40
12,67	80
16,90	80

Fonte: Autoria própria.

Tabela 2 – Teste de toxicidade para butilparabeno, concentrações utilizadas e mortalidade média (%) em tilápia do Nilo (*O. niloticus*) após 48 h.

Concentração (mg L⁻¹)	Mortalidade (%)
2,69	0
5,38	20
10,75	70
16,13	100
21,50	100

Fonte: Autoria própria.

Tabela 3 – Teste de toxicidade para propilparabeno, concentrações utilizadas e mortalidade média (%) em tilápia do Nilo (*O. niloticus*) após 48 h.

Concentração (mg L⁻¹)	Mortalidade (%)
3,10	0
6,21	0
12,42	20
18,62	30
24,83	100

Fonte: Autoria própria.

Tabela 4 – Teste de toxicidade para etilparabeno, concentrações utilizadas e mortalidade média (%) em tilápia do Nilo (*O. niloticus*) após 48 h.

Concentração (mg L⁻¹)	Mortalidade (%)
5,49	0
10,98	0
21,95	50
32,93	60
43,90	90

Fonte: Autoria própria.

Tabela 5 – Teste de toxicidade para metilparabeno, concentrações utilizadas e mortalidade média (%) em tilápia do Nilo (*O. niloticus*) após 48 h.

Concentração (mg L⁻¹)	Mortalidade (%)
17,07	0
34,13	0
68,26	40
102,40	100
136,53	100

Fonte: Autoria própria.

TRABALHOS FUTUROS

- 1 Desenvolver, validar e aplicar metodologia analítica para quantificar os parabenos (metil, etil, propil, butil e benzil) e a mistura (metil e propilparabeno) nos tecidos brânquias, fígado e músculo de tilápias do Nilo nos bioensaios de exposição e injeção intraperitoneal, após 6 e 12 dias;
- 2 Investigar quais as alterações morfológicas os parabenos provocaram nas brânquias e nas gônadas das tilápias, após 6 e 12 dias de exposição e injeção intraperitoneal;
- 3 Avaliar os possíveis efeitos genotóxicos e mutagênicos dos parabenos para a tilápia do Nilo, através dos testes de cometa e da ocorrência de alterações eritrocíticas nucleares.