

I-034 - AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE METILPARABENO E PROPILPARABENO NO AMBIENTE AQUÁTICO E SEUS POTENCIAIS ESTROGÊNICOS E A TOXICIDADE AGUDA

Carolina Gomes Moreira⁽¹⁾

Engenheira de Alimentos pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Mestre em Engenharia Ambiental pela Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ). Doutoranda em Processos Químicos e Bioquímicos pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Louise da Cruz Felix

Gestora Ambiental pelo Centro Federal de Educação Tecnológica Celso Suckow da Fonseca (CEFET-RJ). Graduada em Engenharia Cartográfica pela Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ).

Eline Simões Gonçalves

Pesquisadora, CESTEH/ENSP/FIOCRUZ.

Daniele Maia Bila

Engenheira Química pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Mestre, Doutora em Engenharia Química pela COPPE/UFRJ. Prof. Adjunto no Depto. de Engenharia Sanitária e do Meio Ambiente da FEN/UERJ

Endereço⁽¹⁾: Rua Isidro Borges, 583, Quadra: 72, Lote: 02 - Fazenda Caxias – Seropédica - Rio de Janeiro - CEP: - Brasil - Tel: +55(21)3787-7700 - e-mail: carolinagomesmoreira@gmail.com

RESUMO

Atualmente no cenário mundial a qualidade da água tem gerado muitas preocupações. Milhares de produtos sintéticos são produzidos para facilitar muitas práticas industriais, domésticas e pessoais e com isso diversas substâncias químicas utilizadas para esses fins são introduzidas no meio ambiente. Os parabenos são substâncias químicas utilizadas pelas indústrias farmacêuticas, de alimentos e cosméticos, cuja função é a conservação. Contudo, há muitos questionamentos em relação a sua segurança, pois alguns estudos têm mostrado que a exposição aos parabenos pode modular ou perturbar o sistema endócrino e com isso gerar consequências prejudiciais à saúde humana e de outros animais. Esse estudo teve como objetivo avaliar a presença dos parabenos metil- e propilparabeno no ambiente aquático lacustre, seus potenciais estrogênicos e toxicidade aguda. A metodologia se desenvolveu a partir do ensaio *in vitro* YES para a determinação da atividade estrogênica, ensaios de toxicidade aguda com os organismos-teste *Daphnia similis* e *Aliivibrio fischeri* e a quantificação dos parabenos na água do Rio Maracanã-RJ pela cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa. Os resultados obtidos para a CE50 dos MP e PP, a partir do ensaio *in vitro* YES, foram de 18,91 mgL⁻¹ e 7 mgL⁻¹ e a magnitude da resposta foi de 10⁻⁵ e 10⁻⁴ menos potente que 17β-estradiol para o MP e o PP, respectivamente. Os valores de CE50 obtidos no ensaio com a *Daphnia similis*, foram de 29,42 mgL⁻¹ e 9,94 mgL⁻¹ e para o *Aliivibrio fischeri* foram de 3,047 mgL⁻¹ e 1,946 mgL⁻¹, respectivamente. Com isso, observou-se que o PP é mais tóxico para todos os organismos testados. A água do Rio Maracanã não apresentou toxicidade para a *Daphnia similis* em nenhum dos pontos de coleta, já para o *Aliivibrio Fischeri* apresentou toxicidade em apenas um dos pontos. As concentrações encontradas de MP e PP foram maiores na água coletada no ponto do rio, onde de acordo com os parâmetros físico-químicos, a qualidade da água não está dentro dos padrões exigidos pela legislação federal. Contudo é válido ressaltar que os desreguladores endócrinos não são encontrados no meio ambiente aquático separados, eles interagem entre si e provocam efeitos aditivos ou sinérgicos, sendo muito difícil de prever qual o efeito, por isso é importante o conhecimento do potencial estrogênico das substâncias simples, pois em um estudo com uma matriz ambiental, pode-se observar se houve algum efeito aditivo ou sinérgico de outras substâncias.

PALAVRAS-CHAVE: Contaminantes Emergentes, Parabenos, Ensaio *in vitro* YES, Toxicidade Aguda, Desreguladores Endócrinos.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas a presença dos micropoluentes emergentes no ambiente aquático tem gerado uma grande preocupação a nível mundial. São denominados assim, pois estão presentes em concentrações vestigiais, variando de ngL^{-1} a ugL^{-1} , e são oriundos de atividades antrópicas e de substâncias naturais, como os produtos farmacêuticos, de higiene pessoal, hormônios esteróides, substâncias químicas industriais, pesticidas e muitos outros compostos. Por estarem presentes em concentrações tão pequenas e por sua diversidade, os métodos de detecção e análise nem sempre são efetivos, com isso há a necessidade do desenvolvimento de uma única metodologia para a determinação dos mesmos em amostras ambientais (BILA; DEZOTTI, 2007; SANSON, 2012; LUO et al., 2014).

Dentre os micropoluentes estão os desreguladores endócrinos (DEs) que são substâncias químicas suspeitas de causarem efeitos adversos ao sistema endócrino de seres humanos e outros animais. Com isso, é crescente o interesse da comunidade científica pela presença desses micropoluentes no meio ambiente, são suspeitos de serem responsáveis pela incidência de anomalias no sistema endócrino de animais, câncer em humanos, a redução na quantidade de esperma, o desenvolvimento de resistências em bactérias, entre outras (BILA; DEZOTTI, 2003). Pertencentes a esse grupo dos DEs destacam-se os parabenos que mesmo apresentando atividade estrogênica fraca passaram a ter um interesse considerável dos seus efeitos tóxicos em uma contínua exposição a baixos níveis devido à descoberta de parabenos em amostras de tecidos humanos de tumores da mama (DARBRE, 2004; CANOSA, 2006).

Os parabenos (e/ou seus sais) são ésteres do ácido p-hidroxibenzóico, diferindo apenas no grupo alquil (radical substituinte), que resultam na formação do metilparabeno (MP), do etilparabeno (EP), do propilparabeno (PP) e do butilparabeno (BP). São antimicrobianos amplamente utilizados em cosméticos, como loções para pele, cremes e shampoos (SONI et al., 2005; YAMAMOTO et al., 2011). Alguns são utilizados em alimentos, bebidas e produtos farmacêuticos. Os mais utilizados pelas indústrias são o MP e o PP (SONI et al., 2005). Esses conservantes fazem parte de cerca de 80% dos produtos de cuidados pessoais. No mercado dinamarquês, cerca de 36% dos 751 produtos analisados continham parabenos. E um estudo norueguês revelou que estavam presentes em 32% dos 117 produtos testados utilizados em bebês. A estimativa é que o BP está presente em 13%, enquanto que o PP e/ou MP em 48% de cosméticos e produtos de higiene pessoal (BLEDZKA et al., 2014).

Autores levantaram a hipótese de uma associação entre o uso de cosméticos nas axilas contendo tais substâncias com o aumento da incidência de câncer de mama (DARBRE, 2004; SONI et al., 2005).

Estudos em laboratório confirmaram que a presença de parabenos e de outras substâncias com potenciais estrogênicos relativamente fracos (por exemplo, genisteína, benzofenona, bisfenol A, etc) em uma mesma amostra e em concentrações abaixo do nível de efeito não observado, pode resultar em uma considerável atividade estrogênica global para a amostra, isso devido ao efeito sinérgico que resulta em um efeito estrogênico maior nos ambientes aquáticos. Portanto, parabenos devem ser adicionados à lista de produtos químicos domésticos cujos níveis ambientais devem ser mantidos sob vigilância (CANOSA, 2006).

O presente estudo investiga a presença dos parabenos MP e PP nas águas do Rio Maracanã –RJ pela cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa, além da toxicidade aguda com os organismos-teste *Daphnia similis* e *Aliivibrio fischeri* e atividade estrogênicas pelo ensaio *in vitro* YES dessas substâncias.

MATERIAIS E MÉTODOS

Na primeira parte desse estudo foram realizados ensaios para determinar a atividade estrogênica pelo ensaio *in vitro* YES e testes para determinar a toxicidade aguda em *Daphnia similis* e em *Aliivibrio fischeri* a partir de amostras sintéticas de diferentes concentrações dos padrões MP e PP ambos da marca Sigma-Aldrich Chemical. Os frascos contendo os conservantes em pó foram estocados a temperatura ambiente durante todo o experimento, conforme determina o fabricante.

Na segunda parte desse estudo realizaram coletas de amostra de água do Rio Maracanã, localizado na cidade do Rio de Janeiro, a qualidade das águas foi determinada por parâmetros físico-químicos e a análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa para a identificação e a quantificação dos parabenos.

- Determinação da atividade estrogênica através do ensaio *in vitro* YES das amostras sintéticas com diferentes concentrações dos padrões MP e PP.

As amostras foram preparadas a partir de diferentes concentrações dos padrões sintéticos de MP e PP diluídos em etanol (Tedia) e conservadas a 4°C durante todo o experimento. Inicialmente foi preparada uma solução estoque de 1000 mgL⁻¹ de cada um dos parabenos e a partir dessa solução estoque foram preparadas soluções em diversas concentrações, são elas, 0,5 mgL⁻¹ (MP e PP), 10 mgL⁻¹ (MP e PP), 100 mgL⁻¹ (MP e PP), 800 mgL⁻¹ (MP). Para a obtenção de uma curva sigmoidal dos parabenos similar a curva do 17β-estradiol (padrão de comparação) obtida no ensaio YES, realizou-se os ensaios com soluções iniciais de 3200mgL⁻¹ de MP e 200 mgL⁻¹ de PP.

A metodologia utilizada para a determinação da atividade estrogênica pelo ensaio *in vitro* YES foi à desenvolvida por Routledge e Sumpter, (1996), seguindo as orientações e adaptações de Bila (2005). O ensaio *in vitro* YES é prático e altamente sensível, por detectar concentrações baixas de 17β-estradiol na ordem de 2 ngL⁻¹ e de substâncias químicas que são capazes de bloquear, mimetizar, estimular ou inibir a atividade de um estrogênio produzido naturalmente pelos seres vivos. Para o cálculo do CE50 utilizou-se o método apresentado por Alexander et al (1999).

O principal fundamento do ensaio *in vitro* YES é a interação de substâncias químicas com o receptor de estrogênio humano (REh) inserido em uma cepa da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A levedura foi modificada para conter este receptor, que teve a sequência de seu DNA integrado ao cromossomo principal da levedura. A levedura contém ainda plasmídeos com o gene de resposta Lac-Z, que quando expressado produz a enzima β-galactosidase. À medida que é secretada no meio, a β-galactosidase metaboliza o substrato cromogênico clorofenol vermelho-β-D-galactopiranosida (CPRG) em lactose e em vermelho de clorofenol, o meio que antes era amarelo passa a ser vermelho, podendo ser quantificado a 540nm. Assim, a expressão da β-galactosidase pode ser quantificada por espectrofotometria, o que permite estimar a concentração de substâncias no meio que possuem comportamento estrogênico. No ensaio *in vitro* YES a levedura fica permanentemente transformada se o crescimento ocorrer sob condições apropriadas (ROUTLEDGE; SUMPTER, 1996).

Para avaliar o potencial estrogênico de cada substância em relação ao 17β-estradiol, determinou-se a potência relativa estrogênica (PR) de cada uma (BILA, 2005). Esta relação é definida pela equação 1

$$PR = \frac{CE50 \text{ estradiol}}{CE50 \text{ da amostra}} \quad \text{Equação 1}$$

- Determinação da toxicidade aguda em microcrustáceo *Daphnia similis* e em bactéria *Aliivibrio fischeri* a partir de amostras sintéticas com diferentes concentrações dos padrões MP e PP.

Soluções estoque de 300 mgL⁻¹ de cada parabeno para ambos os testes foram preparadas diferindo apenas o diluente, que no caso da *Daphnia similis* as soluções foram preparadas em água de cultivo e para o *Aliivibrio fischeri* foram preparadas em NaCl 2%.

O cultivo de *Daphnia similis* e os ensaios seguiram o procedimento descrito na norma NBR 12713 (ABNT, 2009). Indivíduos jovens, neonatos (6-24 horas de idade) de *Daphnia similis* provenientes de uma cultura de fêmeas, foram expostos a várias concentrações do agente químico, durante 48 horas, em temperatura 20°C±2, em fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro. Os organismos-teste foram retirados dos frascos de cultivo 6 horas antes da exposição às amostras. Essa exposição ocorreu em tubos aferidos de 10 mL com 8 diluições (em quadruplicatas) e a amostra-controle (também em quadruplicatas), sendo que foram colocados 5 organismos em cada tubo. Antes do início do teste, foram medidos o pH, o oxigênio dissolvido, a condutividade e a dureza da água de cultivo e alguns parâmetros da amostra bruta (pH, condutividade, oxigênio dissolvido). Ao fim do ensaio, foi determinado o número de organismos imóveis e foram medidos o oxigênio dissolvido e o pH final das amostras e suas diluições. Utilizou-se o programa TRIMMED SPEARMAN-LCPIN para o cálculo da concentração que provocará a inibição de 50% dos organismos-teste, o CE50.

A bactéria *Aliivibrio fischeri* foi adquirida comercialmente em forma liofilizada, por uma empresa revendedora certificada e armazenada no freezer a -20° C até o momento do uso. Para a realização dos ensaios

com *Aliivibrio fischeri* foram utilizados a Norma Técnica NBR 15411-3 (ABNT, 2012) e o protocolo “Basic Test” do manual do equipamento Microtox da SDI. Para determinar o efeito tóxico da amostra, o *software* MICROTOX OMNI 4.1 fez a comparação com a amostra-controle em função da luz emitida, que é menor quanto maior toxicidade da amostra. Logo a toxicidade relativa da amostra foi obtida em mgL^{-1} da substância comparada ao controle. Procedeu-se primeiramente a leitura no tempo zero, que foi uma leitura da luminescência das bactérias sem a presença da amostra. Após essa primeira leitura, a amostra bruta e as suas diluições foram transferidas para as cubetas onde estavam as bactérias. Assim, no próprio *software* estavam programados os tempos para leitura em 5, 15 e 30 minutos.

- Determinação da presença de MP e PP em ambiente lacustre através da cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massa (CLAE-EM/EM) e a toxicidade aguda em microcrustáceo *Daphnia similis* e em bactéria *Aliivibrio fischeri*.

Foram realizadas duas coletas no Rio Maracanã - RJ em dois pontos diferentes, sendo que o primeiro está localizado no Alto da Boa vista em uma área onde aparentemente não existe nenhuma fonte de contaminação e o segundo em área urbana, aparentemente muito poluído, e com odor muito desagradável.

Em laboratório, 1 L de amostra foi filtrado em membrana de fibra de vidro de 0,7 μm de porosidade e em membrana de nylon com 0,45 μm de porosidade, em seguida foi ajustado o pH para 2 com solução de HCl 3M. Antes do início da extração foi adicionado 1g de EDTA para cada 1L de amostra. Para a extração em fase sólida (EFS), foram utilizados os cartuchos Oasis® HLB de 6 mL e 500 mg de sorvente. Oasis® HLB é um sorvente polimérico de fase reversa universal e oferece mecanismos de retenção para compostos ácidos, básicos e neutros. O condicionamento dos cartuchos EFS foi realizado com 8 mL de metanol, 8 mL de água ultra pura e 8 mL de água ultrapura com pH ajustado para 2, com solução de HCl 3M. As amostras foram percoladas nos cartuchos sob vácuo, com vazão aproximada de 3 mL min^{-1} . O cartucho, depois de percoladas as amostras, foi lavado com 10 mL de água ultrapura com pH 2 e mantido sob vácuo por 10 minutos para a remoção do excesso de água. Em seguida, os cartuchos foram armazenados em freezer (com temperatura de -20 °C) até o momento da análise por CLAE-EM/EM. Previamente as análises por CLAE-EM/EM, os analitos foram eluídos dos cartuchos com 10 mL de metanol e acondicionados em tubos de vidro com capacidade de 20 mL utilizando o sistema manifold sem o vácuo, sob efeito da gravidade e levados à secura com fluxo de nitrogênio e reconstituídos com 1mL de metanol:água ultrapura, 70:30 (v/v). Em seguida, procedeu-se a injeção no CLAE-EM/EM.

A detecção dos compostos MP e PP no espectrômetro de massa *tandem* (EM-EM) foi otimizada no modo de monitoramento de reação seletiva (MRS). A energia de colisão (“CID”) e a voltagem do tubo de lentes foram otimizados pela infusão direta com seringa no espectrômetro de massa com soluções-padrão de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contendo cada composto individualmente, em solução de metanol 100%, sob o fluxo de 10 $\mu\text{L min}^{-1}$. Já no cromatógrafo a líquido foi bombeada uma solução de metanol e água (70:30, v/v), sob o fluxo de 300 $\mu\text{L min}^{-1}$. A técnica de ionização utilizada em todo o experimento foi a Ionização por *Electrospray* (ESI).

A Tabela 1 apresenta as condições otimizadas para a operação no EM para a determinação dos parabenos em matrizes aquáticas.

Tabela1: Condições cromatográficas do método utilizado para a determinação dos parabenos.

Modo Negativo	
Volume de Extrato Introduzido	10 μL
Modo de Introdução do Extrato	Preenchimento parcial do loop do amostrador
Coluna Cromatográfica	Symmetry C18 Waters (2,1 x 150 mm column; 5 μm de tamanho de partícula)
Temperatura da Coluna	25 °C
Vazão do Eluente	0,3 mL min^{-1} .
Pressão Máxima	130 bar
Composição da Fase Móvel	A: Metanol B: Acetato de Amônio 10 mM
Gradiente de Concentração dos Eluentes	Isocrático
Tempo Total de Análise (CLAE-EM/EM)	6 min.

Na Tabela 2 são apresentados o modo de ionização, o tempo de retenção (Tr), o íon precursor e os MRS1 e MRS2 correspondentes aos MP e PP.

Tabela 2: Transições precursor-produto, modo de análise e tempo de retenção de cada composto

Compostos	Modo de análise	Tr (min)	Íon Precursor (m/z)	MRS1	MRS2
Metilparabeno	[M-H] ⁻	1,57	151	92	136
Propilparabeno	[M-H] ⁻	2,43	179	92	136

Para a quantificação, foram construídas as curvas analíticas para cada tipo de parabeno (concentração x área) usando metanol/água (70:30, v/v) como solvente e as concentrações do padrão variando de 5 a 500 ppb.

Os parâmetros físico-químicos da água do Rio Maracanã foram determinados segundo o AWWA (APHA, 2012), tais como temperatura (2550), condutividade (2510 B), pH (4500 -H⁺ B), alcalinidade (2320 B), série de sólidos (2540 B, 2540 C, 2540 D, 2540 E, 2540 F, 2540 G), DQO (5220 D), oxigênio dissolvido (4500-O C), fósforo total (4500-PE), turbidez (2130 B), cor (2120 D), nitrito (4500-NO₂B) e nitrogênio amoniacal (4500-NH₃ D).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

• Ensaio *in vitro* YES das substâncias MP e PP

Foram realizados diversos ensaios *in vitro* YES com diferentes concentrações das amostras sintéticas dos conservantes MP e PP diluídas em etanol até a obtenção de uma curva dose resposta que caracterizasse o potencial estrogênico de cada substância estudada.

A Figura 1 apresenta uma foto das placas de 96 poços de um dos ensaios realizados para a obtenção da curva do potencial estrogênico característico de cada substância estudada, sendo esta a que melhor apresentou o formato sigmoidal, similar ao da curva do 17β-estradiol. Na placa, as linhas apresentam diferentes concentrações em cada poço de cada amostra a partir de uma previa diluição serial de cada uma. A placa da esquerda contém as amostras de MP, a $1,6 \times 10^8$ ngL⁻¹ nas linhas A e C e PP, a 1×10^7 ngL⁻¹ nas linhas E e G e a placa da direita a amostra do padrão, o 17β-estradiol, a $2,7 \times 10^3$ ngL⁻¹ nas linhas A e C.

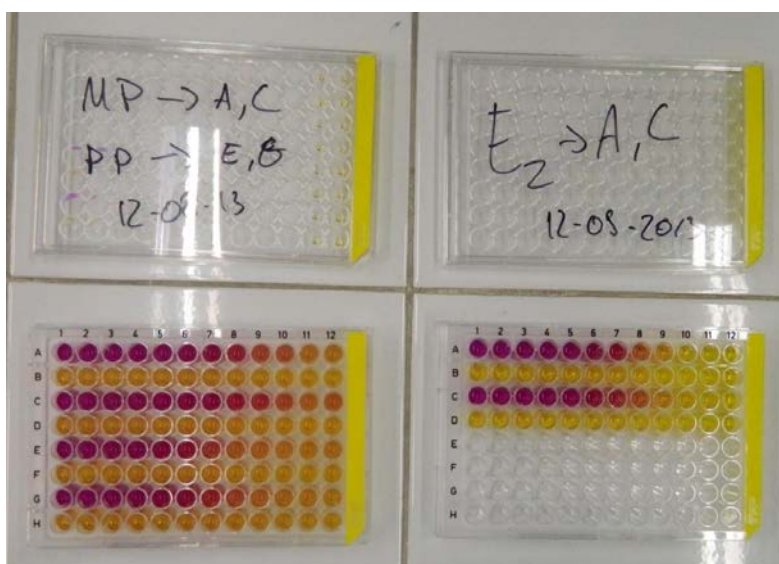


Figura 1: Foto das placas de 96 poços no ensaio YES das amostras de MP a $1,6 \times 10^8$ ngL⁻¹, de PP 1×10^7 ngL⁻¹ e do 17β-estradiol a $2,7 \times 10^3$ ngL⁻¹.

A Figura 2 apresenta as curvas dose resposta no ensaio YES para o 17 β -estradiol e os parabenos (MP e PP) às concentrações variáveis do MP e PP em relação ao 17 β -estradiol, sendo que a curva do 17 β -estradiol abrangeu a faixa de concentração de $2,7 \times 10^3 \text{ ngL}^{-1}$ a $1,3 \text{ ngL}^{-1}$, a do MP de $1,6 \times 10^8 \text{ ngL}^{-1}$ a $7,8 \times 10^4 \text{ ngL}^{-1}$ e a do PP foi de $1 \times 10^7 \text{ ngL}^{-1}$ a $4,9 \times 10^3 \text{ ngL}^{-1}$.

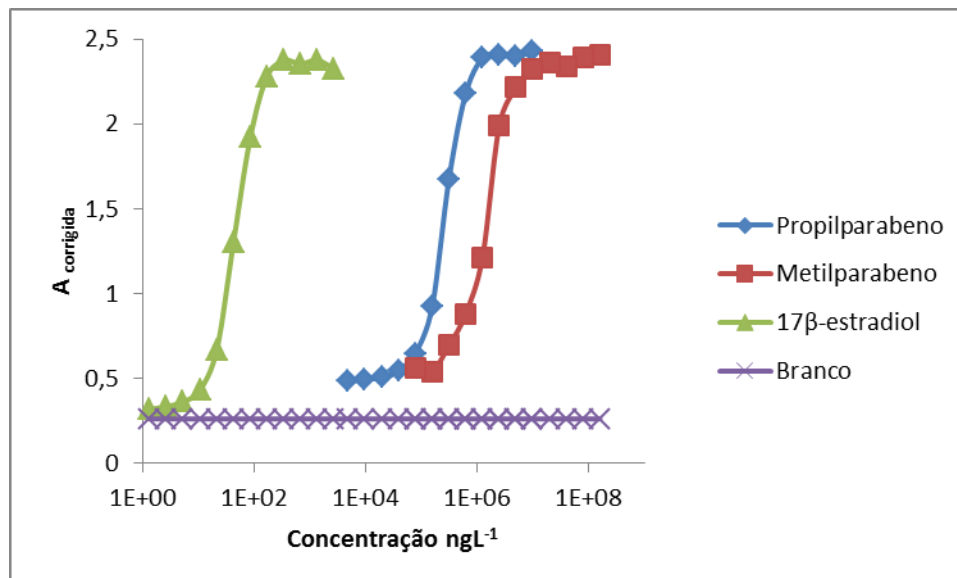


Figura 2: Curvas dose resposta no ensaio *in vitro* YES.

Com base na Figura 2 o MP e o PP apresentam curva dose resposta similar a do 17 β -estradiol, com isso podemos afirmar que apresentam atividade estrogênica diferindo apenas na intensidade de seus efeitos, pois precisam estar presentes em concentrações maiores para causarem os mesmos efeitos do 17 β -estradiol.

A Tabela 3 apresenta os valores de CE50 e de potência relativa (PR) obtidos através do ensaio YES para o MP, PP e o valor da CE50 do 17 β -estradiol.

Tabela 3: Valores da CE_{máxima}, CE50, CE_{mínima} e PR das substâncias estudadas obtidas pelo ensaio *in vitro* YES.

Variáveis	MP	PP	17 β -estradiol
CE _{máxima} (ngL ⁻¹)	5×10^6	$6,2 \times 10^5$	85,1
CE50 (ngL ⁻¹)	$9,4 \times 10^5$	$3,5 \times 10^5$	52,7
CE _{mínima} (ngL ⁻¹)	$3,1 \times 10^5$	$7,8 \times 10^4$	21,3
Potência Relativa (PR)	$5,6 \times 10^{-5}$	$1,5 \times 10^{-4}$	-

O MP e o PP apresentaram CE50 de $9,4 \times 10^5$ e $3,5 \times 10^5 \text{ ngL}^{-1}$ e magnitude de resposta de 10^5 e 10^4 menos potente que 17 β -estradiol, respectivamente. Routledge e Sumpter (1998) realizaram o mesmo ensaio *in vitro* YES, com os parabenos, metil, etil, propil e butil e obtiveram magnitudes de resposta de 10^5 , 10^5 , 10^4 e 10^4 , menos potente que 17 β -estradiol, respectivamente. Com isso, observa-se que a magnitude da resposta é igual à da literatura. Contudo, só que uma resposta estrogênica fraca quando comparada a outras substâncias, como a estrona com 10^1 de magnitude de resposta, segundo Silva et al. (2007). O PP apresentou maior atividade estrogênica quando comparado com o MP, pois obteve uma CE50 menor e a PR mais próxima de 1.

- Comparação dos resultados dos ensaios de toxicidade aguda e do ensaio *in vitro* YES

A Tabela 4 apresenta os valores de CE50 do MP e do PP obtidas nos testes de toxicidade aguda em *Daphnia similis*, *Aliivibrio fischeri* e ensaio *in vitro* YES

Tabela 4: Resultados dos valores de CE50 do MP e do PP obtidos em todos os testes.

Organismo-teste	Substâncias	CE50 (mgL ⁻¹)
<i>Daphniasimilis</i>	MP	29,42
	PP	9,94
<i>Aliivibrio fischeri</i>	MP	3,047
	PP	1,946
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (YES)	MP	0,945
	PP	0,35

Na Tabela 4 observa-se que os valores da CE50 são distintos para ambos os organismos-teste para cada substância, como cada organismo tem o seu metabolismo reagem de maneiras diferentes frente as substâncias tóxicas. Observou-se também que dentre esses ensaios o organismo-teste que apresentou mais sensibilidade em ambas as substâncias foi a *Saccharomyces cerevisiae*, pois apresentou o valor de CE50 menor.

Yamamoto et al. (2011) estudaram a toxicidade aguda dos parabenos com outros organismos-teste, tais como em algas (*Psuedokirchneriella subcapitata*) e peixes da espécie medaka (*Oryzias latipes*) e obtiveram resultados de CE50 para as algas de 80 mgL⁻¹ e 36 mgL⁻¹ para o MP e o PP, respectivamente. Para o peixe medaka valores da CE50 foram 63 mgL⁻¹ e 4,9 mgL⁻¹ para o MP e o PP, respectivamente. Com isso, observou-se que o PP também foi mais tóxico para esses outros organismos-teste do que o MP.

• Caracterização físico-química da água do Rio Maracanã

Foi realizado uma caracterização físico-química das amostras da água do Rio Maracanã para avaliar a qualidade da água.

A Tabela 5 apresenta os resultados dos parâmetros físico-químicos da água do Rio Maracanã da primeira coleta, realizada no dia 10 de fevereiro de 2014 e da segunda coleta, realizada no dia 13 de março de 2014, em ambos os pontos.

Tabela 5: Resultados dos parâmetros físico-químicos da água do Rio Maracanã na primeira e na segunda coleta

Parâmetros		1ª coleta		2ª coleta	
		Ponto 1	Ponto 2	Ponto 1	Ponto 2
Temperatura (°C)		22	30	21	34
Oxigênio Dissolvido (mgL ⁻¹)		8	2	7	0,7
pH		6,7	7,1	7,3	7,7
Nitrogênio Amoniacal (mgL ⁻¹)		<1	1,6	3,4	15,6
Nitrito (mgL ⁻¹)		0,4	2	3,5	0,6
Fósforo Total (mgL ⁻¹)		0,1	1,1	0,1	1,3
Condutividade (mScm ⁻²)		55,3	164,8	122	344
SST (mgL ⁻¹)		2	28	32	50
SSV (mgL ⁻¹)		2	26	26	42
SDT (mgL ⁻¹)		222	220	133	235
DQO (mg de O ₂ L ⁻¹)		3	47	0	35
Cor	Verdadeira (mgPtCoL ⁻¹)	0	50	13	28
	Aparente (mgPtCoL ⁻¹)	0	100	193	100
	Turbidez (UTN)	0,4	0,7	0,1	14
Alcalinidade (mgCaCO ₃ L ⁻¹)		6	80	14	76,5

SST: Sólidos Suspensos Totais; SSV: Sólidos Suspensos Voláteis; SDT: Sólidos Dissolvidos Totais; DQO: Demanda Química de Oxigênio

De acordo com a DZ-106 (INEA, 1977), diretriz de classificação dos corpos receptores da Bacia da Baía da Guanabara, o Rio Maracanã é rio de diluição de despejos, estético e para abastecimento industrial. Segundo o Boletim de Qualidade das águas da região hidrográfica V – Baía de Guanabara Bacia da Baía de Guanabara (INEA, 2014), as águas do Rio Maracanã já se encontram impróprias para tratamento convencional visando abastecimento público, sendo necessários tratamentos mais avançados.

Ainda não há uma determinação da classe do Rio Maracanã e para tal o artigo 42 da Resolução CONAMA nº 357 (BRASIL, 2005) preconiza que “enquanto não aprovados os respectivos enquadramentos, as águas doces serão consideradas classe 2, as salinas e salobras classe 1, exceto se as condições de qualidade atuais forem melhores, o que determinará a aplicação da classe mais rigorosa correspondente.”

De acordo com a Tabela 5 e a Resolução CONAMA nº 357 (BRASIL, 2005), a qualidade da água do Rio Maracanã encontra-se imprópria para os usos a que foi designada, como sendo um rio de classe 2, como exemplos, a concentração de oxigênio dissolvido que se encontra abaixo do valor exigido pela legislação (5 mgL^{-1}), o teor de fósforo total acima do permitido ($0,1 \text{ mgL}^{-1}$) e a amônia acima do permitido de $3,7 \text{ mgL}^{-1}$ apenas no ponto 2 na segunda coleta. Tais parâmetros são característicos de que há descargas de esgoto doméstico no Rio Maracanã e a área onde se encontra o ponto 2 já está totalmente poluída, havendo a necessidade de tratamentos mais avançados na água.

- Quantificação dos MP e PP na água do Rio Maracanã

Com os resultados dos parâmetros físico-químicos (Tabela 5) concluiu-se que a qualidade da água do Rio Maracanã não se encontra em boas condições, sendo que no ponto onde a qualidade da água foi a pior (Ponto 2) a concentração de parabenos foi maior, sendo de MP e PP, em torno de 1426 e 1496 ngL^{-1} , respectivamente, com isso podemos dizer que nos ambientes aquáticos onde há mais interferência humana, a concentração de parabenos é maior. E de acordo com os dados obtidos da literatura, o Rio Maracanã se aproxima das concentrações de MP obtidas em um Rio Chinês que segundo Peng et al. (2008) apresenta uma concentração de 1062 ngL^{-1} , sendo que no Rio Maracanã ainda está mais alta, com um valor de 1426 ngL^{-1} e para o PP o autor encontrou 3142 ngL^{-1} . Em outras localidades foram encontradas concentrações na faixa de $<0,3 - 676 \text{ ngL}^{-1}$ para o MP e $<0,2 - 207 \text{ ngL}^{-1}$ para o PP.

Os valores da CE50 obtidos através dos ensaios *in vitro* YES e de ecotoxicidade são bem maiores que as concentrações encontradas na água do Rio Maracanã, com isso pode-se dizer que os seus resíduos ambientais não irão comprometer o sistema hormonal dos seres aquáticos, mas nem por isso descarta-se o possível efeito gerado quando dois ou mais DEs reagem entre si (efeito sinérgico).

- Toxicidade Aguda da água do Rio Maracanã

A água do Rio Maracanã não apresentou toxicidade aguda ao microcrustáceo *Daphnia similis* e só apresentou no ponto 1 na primeira coleta à bactéria *Aliivibrio fischeri*, mas não quer dizer que no outro ponto não tenha toxicidade, contudo uma toxicidade crônica possa existir.

CONCLUSÕES

A ocorrência de contaminantes emergentes, como os parabenos, é pouco estudada em águas superficiais brasileiras, enquanto que na Europa, EUA, Ásia, China, os estudos a respeito desse tema vem crescendo. Desde o momento que foi comprovada a estrogenicidade dos parabenos, no Brasil, há poucos estudos sobre seus efeitos tanto nos seres humanos como nos ambientes aquáticos.

Com esse contexto, esse estudo teve como intuito avaliar a presença do Metilparabeno e Propilparabeno no ambiente aquático e seus potenciais estrogênicos e a toxicidade aguda. Os resultados mostraram a partir do ensaio *in vitro* YES, uma estrogenicidade de ambas as substâncias estudadas variando na potência relativa de cada um quando comparados ao 17β -estadiol, o PP se mostrou mais potente estrogenicamente que o MP. Além disso o PP se mostrou mais tóxico que o MP para ambos os organismos-teste avaliados (*Daphnia similis*, *Aliivibrio fischeri*), com isso observa-se que quanto maior a cadeia do radical substituinte no parabeno maior será a toxicidade.

As concentrações encontradas de MP e PP foram mais significativas onde a qualidade da água não está de acordo com a legislação vigente (BRASIL, 2005), segundo os parâmetros físico-químicos analisados. A quantificação foi na ordem de ngL^{-1} , mesmo assim é válido ressaltar que os DEs não são encontrados no meio ambiente separados, eles interagem entre si e provocam efeitos aditivos ou sinérgicos, sendo muito difícil de prever qual o efeito, por isso é importante o conhecimento do potencial estrogênico das substâncias simples, pois em um estudo com uma matriz ambiental, pode-se observar se houve algum efeito aditivo ou sinérgico de outras substâncias.

O Rio Maracanã apresentou toxicidade aguda em apenas um ensaio, mas nem por isso é descartada a possibilidade de haver toxicidade nos outros, podendo haver toxicidade crônica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALEXANDER, B.; BROWSE, D. J.; READING, S. J.; BENJAMIN, I. S. *A simple and accurate mathematical method for calculation of the EC50*. J Pharmacol Toxicol 41, 55–58, 1999.
2. APHA; AWWA; *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 22nd ed. Washington, DC: WEF. 2012.
3. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12713, *Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Aguda – Método de Ensaio com Daphnia sp (Crustacea, Cladocera)*, 3ª edição, 2009.
4. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15411, *Ecotoxicologia Aquática – Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de Vibrio fischeri (Ensaio de bactéria luminescente)*, 2ª edição, 2012.
5. BILA, D. M. *Degradação e Remoção da Atividade Estrogênica do Desregulador Endócrino 17 β -Estradiol pelo Processo de Ozonização*. Tese - Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Rio de Janeiro, 281 p., 2005.
6. BILA, D. M.; DEZOTTI, M. *Fármacos no Meio Ambiente*. Revista Química Nova, V. 26, n. 4, p. 523-530, 2003.
7. BILA, D. M.; DEZOTTI, M. *Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências*. Química Nova, v.30, p.651-666, 2007.
8. BLEDZKA, D.; GROMADZINSKA, J.; WASOWICZ, W. *Parabens. From environmental studies to human health*. Environment international 67, 27-42, 2014.
9. BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução Nº 357, de 17 de março de 2005. *Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências*. Diário Oficial da União, 18 de março de 2005, p. 58-63.
10. CANOSA, P.; RODRÍGUEZ, I.; RUBÍ, E.; BOLLAÍN, 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, 1124, 3–10, 2006.
11. DARBRE, P.D.; ALJARRAH, A.; MILLER, W.R.; COLDHAM, N.G.; SAUER, M.J.; POPE, G.S. *Concentrations of Parabens in Human Breast Tumours*. J. Appl. Toxicol. 24, 5-13, 2004.
12. Instituto Estadual do Meio Ambiente. *Boletim de Qualidade das águas da região hidrográfica V – Baía de Guanabara Bacia da Baía de Guanabara*. Rio de Janeiro. 2014.
13. Instituto Estadual do Meio Ambiente. *Diretriz de classificação dos corpos receptores da Bacia da Baía de Guanabara-106*. Rio de Janeiro. 1977.
14. LUO, Y.; GUO, W.; NGO, H. H.; NGHIEM, L. D.; HAI, F. I.; ZHANG, J.; LIANG, S.; WANG, X. C. *A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment*. Sci Total Environ 473-474, 619-641, 2014.
15. PENG, X.; YU, Y.; TANG, C.; TAN, J.; HUANG, Q.; WANG, Z. *Occurrence of steroid estrogens, endocrinedisrupting phenols, and acid pharmaceutical residues in urban riverine water of the Pearl River Delta, South China*. Sci Total Environ 397, 158–66, 2008.
16. ROUTLEDGE, E. J.; SUMPTER, J. P. *Estrogenic Activity of Surfactants and Some of their Degradation Products Assessed Using a Recombinant Yeast Screen*. Environmental Toxicology and Chemistry, 15 (3), 241-248, 1996.
17. ROUTLEDGE, E. J.; PARKER, J.; ODUM, J.; ASHBY, J.; SUMPTER, J.P. *Some Alkyl Hydroxy Benzoate Preservatives (Parabens) Are Estrogenic*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 153, 12-19, 1998.
18. SANSON, A. L. estudo da Extração e Desenvolvimento de Metodologia para Determinação Simultânea de Microcontaminantes Orgânicos em Água Superficial por GC-MS e Métodos Quimiométricos.

- Dissertação de Mestrado em Engenharia Ambiental. Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) – Ouro Preto-MG, 2012.
19. SILVA, D. P.; MELO, C. F.; OLIVEIRA, J. L. M. *Avaliação in vitro da desregulação estrogênica causada por poluentes orgânicos*. Saúde & Ambiente em Revista, Duque de Caxias, v.2, n°.2, p.82-91, 2007.
 20. SONI, M.G.; CARABIN, I.G.; BURDOCK, G.A. *Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens)*. Food and Chemical Toxicology 43, 985–1015, 2005.
 21. YAMAMOTO, H. Y.; TAMURA, I.; HIRATA, Y.; KATO, J.; KAGOTA, K.; KATSUKI, S.; YAMAMOTO, A. Y.; KAGAMI, Y.; TATARAZAKO, N. *Aquatic toxicity and ecological risk assessment of seven parabens: Individual and additive approach*. Science of the Total Environment, 410-411, 102–111, 2011.