

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

ISABELA BORIN OLSEMANN

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO FOTOPROTETOR
2-ETILHEXIL 4-METOXICINAMATO EM *OREOCHROMIS NILOTICUS* E
*ASTYANAX ALTIPARANA*E**

DISSERTAÇÃO

CURITIBA

2022

ISABELA BORIN OLSEMANN

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO FOTOPROTETOR
2-ETILHEXIL 4-METOXICINAMATO EM *OREOCHROMIS NILOTICUS* E
*ASTYANAX ALTIPARANAE***

**TOXICITY EVALUATION OF PHOTOPROTECTIVE 2-ETHYLHEXYL 4-
METHOXYCINNAMATE IN *OREOCHROMIS NILOTICUS* AND
*ASTYANAX ALTIPARANAE***

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

Orientadora: Profa. Dra. Wanessa Algarte Ramsdorf Nagata

Coorientadora: Profa. Dra. Adriane Martins de Freitas

CURITIBA

2022



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Esta licença permite que outros distribuam, remixem, adaptem e criem a partir do seu trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que lhe atribuam o devido crédito pela criação original.



ISABELA BORIN OLSEMANN

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO FOTOPROTETOR 2-ETILHEXIL 4-METOXICINAMATO EM
OREOCHROMIS NILOTICUS E ASTYANAX ALTIPARANAE**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Ciência E Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Tecnologias E Processos Ambientais.

Data de aprovação: 21 de Junho de 2022

Dra. Wanessa Algarte Ramsdorf Nagata, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Adriane Martins De Freitas, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Ana Carolina De Deus Bueno Krawczyk, Doutorado - Universidade Estadual do Paraná (Unespar)

Dr. Daniel Bussolaro, Doutorado - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Paraná (Ifpr)

Dra. Marta Margarete Cestari, Doutorado - Universidade Federal do Paraná (Ufpr)

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 21/06/2022.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Wanessa Algarte Ramsdorf Nagata pela oportunidade, confiança e apoio para a realização desse trabalho. Agradeço por ter me recebido tão bem no laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) e por compartilhar seus conhecimentos e experiências.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da UTFPR, por viabilizar a presente pesquisa, ao disponibilizar laboratórios e materiais. Aos professores do PPGCTA, em especial aos professores Júlio Cezar e Valdir Fernandes pelas conversas e orientações sobre o tema.

Aos membros da banca avaliadora da qualificação, Dr^a Taynah Vicari e Dr. Flávio Henrique Tincani Osório, e da defesa, Dr^a Marta Margarete Cestari, Dr. Daniel Bussolaro e Dr^a Ana Carolina de Deus Bueno Krawczyk, por aceitarem compor a banca e pelas sugestões.

Aos meus amigos de laboratório, Eberton e Yorrannys, por toda ajuda oferecida durante o desenvolvimento da pesquisa. Agradeço por compartilharem as suas experiências, ideias e técnicas e, principalmente por tornarem meus dias no laboratório mais divertidos e agradáveis.

A prof^a Dr^a Kátia Kalko, por ensinar algumas técnicas para o manejo de tilápias. A mestrand Luana do Laboratório multiusuários de equipamentos e análises ambientais (LAMEAA), por auxiliar nas análises do ensaio de estabilidade da molécula estudada. A minha irmã Rafaela, futura engenheira química, por me ajudar no laboratório antes dos sacrifícios dos peixes.

Aos meus pais Angela e Rafael pelo apoio, carinho, amor, ensinamentos e incentivo.

As minhas amigas de graduação, Luciane e Melissa por poder compartilhar os desafios do mestrado em um período de pandemia, e também pelo apoio e carinho.

Ao Mateus, por todo amor, companheirismo e incentivo. Agradeço pelos inúmeros conselhos e gestos de carinho.

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma com o desenvolvimento deste trabalho.

À UTFPR pela concessão de bolsa de estudo com recursos próprios (número do processo SEI 23064.022414/2020/01).

RESUMO

OLSEMANN, Isabela Borin. **Avaliação da toxicidade do fotoprotetor 2-etilhexil 4-metoxicinamato em *Oreochromis niloticus* e *Astyanax altiparanae***. 81 f. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2022.

O 2-etilhexil 4-metoxicinamato (EHMC) é um filtro ultravioleta orgânico amplamente utilizado na fabricação de produtos de cuidados pessoais e industriais para a fotoproteção. Devido ao intenso uso, um nível significativo do filtro tem sido detectado na água e na comunidade biológica, resultando em preocupações sobre os potenciais efeitos ecotoxicológicos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade do EHMC em *Oreochromis niloticus* e *Astyanax altiparanae* após a exposição hídrica subcrônica de 22 dias. Os bioensaios com as duas espécies foram conduzidos separadamente, em condições semelhantes de experimentação. Os indivíduos foram expostos a três concentrações ambientalmente relevantes de EHMC (100, 500 e 1000 ng·L⁻¹) em um sistema semi-estático com renovação diária de ¾ da água e do contaminante, para posterior avaliação da saúde dos peixes (fator de condição de Fulton - K), genotoxicidade (ensaio cometa), mutagenicidade (teste do micronúcleo píceo) e dos parâmetros bioquímicos (AChE, GST, CAT e LPO). Ao final dos bioensaios, o fator de condição de Fulton indicou que o fotoprotetor não afetou o estado fisiológico e nutricional dos peixes. Em ambas as espécies, os resultados do ensaio cometa com eritrócitos e tecido renal mostraram que a exposição não causou efeitos genotóxicos. Apesar disso, foi observado um aumento significativo na alteração morfológica nuclear do tipo vacuolated em *A. altiparanae* expostos a maior concentração estudada, sugerindo um potencial efeito genotóxico. A atividade da acetilcolinesterase (AChE) e glutathiona S-transferase (GST) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação aos grupos controle negativo, para as duas espécies estudadas. As respostas dos biomarcadores de estresse oxidativo mostram que, apenas nos indivíduos da espécie *O. niloticus* expostos a maior concentração EHMC foi constatado um aumento na atividade da catalase (CAT), entretanto, essa alteração não se estende a outras respostas de estresse oxidativo, como a lipoperoxidação (LPO). Dessa forma, pode-se concluir que a maior concentração ambiental estudada de EHMC mostrou apenas um potencial efeito genotóxico em *A. altiparanae* e aumento na atividade da enzima de defesa antioxidante CAT em *O. niloticus*, sugerindo que nessas condições de experimentação o EHMC não se mostrou tóxico.

Palavras-chave: octinoxato; filtro UV; protetor solar; ensaio cometa; micronúcleo; biomarcadores bioquímicos.

ABSTRACT

OLSEMANN, Isabela Borin. **Toxicity evaluation of photoprotective 2-ethylhexyl 4-methoxycinnamate in *Oreochromis niloticus* and *Astyanax altiparanae***. 81 f. Thesis (Master's in Environmental Science and Technology) – Federal University of Technology – Paraná, Curitiba, 2022.

2-Ethylhexyl 4-methoxycinnamate (EHMC) is an organic ultraviolet filter widely used in the formulations of personal care products and industrial products for photoprotection. Due to its heavy use, a significant level of the filter has been detected in the water and biological communities, resulting in concerns about potential ecotoxicological effects. The present study aimed to evaluate the toxicity of EHMC in *Oreochromis niloticus* and *Astyanax altiparanae* after 22 days of subchronic exposure. The bioassays with the two species were conducted separately, under similar experimental conditions. The individuals were exposed to three environmentally relevant concentrations of EHMC (100, 500, and 1000 ng·L⁻¹) in a semi-static system with daily renewal of $\frac{3}{4}$ of the water and the contaminant, for later evaluation of the health of the fish (Fulton's condition factor - K), genotoxicity (comet assay), mutagenicity (piscine micronucleus test) and biochemical parameters (AChE, GST, CAT, and LPO). At the end of the bioassays, Fulton's condition factor indicated that the sunscreen did not affect the physiological and nutritional status of the fish. In both species, the comet assay results with erythrocytes and kidney tissue showed that exposure did not cause genotoxic effects. Despite that, EHMC was able to induce the formation of vacuolated nuclear morphological changes in *A. altiparanae* exposed to the highest concentration studied. Acetylcholinesterase (AChE) and glutathione S-transferase (GST) activity did not show statistically significant differences for the two species studied. The responses of oxidative stress biomarkers show that only in individuals of the species *O. niloticus* exposed to higher EHMC concentration, an increase in catalase (CAT) activity was observed; however, this change does not extend to other oxidative stress responses, such as lipoperoxidation (LPO). Thus, it can be concluded that the highest environmental concentration of EHMC studied showed only a potential genotoxic effect on *A. altiparanae* and alteration in the activity of the antioxidant defense enzyme CAT of *O. niloticus*, suggesting that, under these experimental conditions, EHMC was not proved toxic.

Keywords: octinoxate; UV filter; sunscreen; comet assay; micronucleus; biochemical biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do 2-Etilhexil 4-metoxicinamato (EHMC) e seus fotoprodutos.....	17
Figura 2 – Exemplar de <i>Oreochromis niloticus</i> (Tilápia-do-nylo).....	23
Figura 3 – Exemplar de <i>Astyanax altiparanae</i> (Lambari).....	25
Figura 4 - Registro de um cometa: cabeça e cauda.....	28
Figura 5 - Figura - Esquema da finalização da transmissão de impulsos nervosos.....	30
Figura 6 - Aclimação de <i>Oreochromis niloticus</i> e <i>Astyanax altiparanae</i> em laboratório.....	34
Figura 7 - Representação esquemática do bioensaio subcrônico.....	35
Figura 8 - Esquema dos métodos aplicados no ensaio cometa alcalino.....	38
Figura 9 - Análise da estabilidade do EHMC em água.....	43
Figura 10 - Valores do Fator de Condição de Fulton (K) dos bioensaios de <i>Oreochromis niloticus</i> (a) e <i>Astyanax altiparanae</i> (b).....	47
Figura 11 - Nucleóides classificados de acordo com o grau de migração do DNA após ensaio cometa.....	48
Figura 12 - Escores do ensaio cometa utilizando eritrócitos de <i>Oreochromis niloticus</i> (a) e <i>Astyanax altiparanae</i> (b).....	49
Figura 13 - Escores do ensaio cometa do tecido renal de <i>Oreochromis niloticus</i> (a) e <i>Astyanax altiparanae</i> (b).....	50
Figura 14 - Classificação dos núcleos de eritrócitos encontrados nas espécies <i>Oreochromis niloticus</i> e <i>Astyanax altiparanae</i>	52
Figura 15 - Frequências das alterações morfológicas nucleares e dos micronúcleos de <i>Oreochromis niloticus</i> expostos ao EHMC.....	53
Figura 16 - Frequências das alterações morfológicas nucleares e dos micronúcleos de <i>Astyanax altiparanae</i> expostos ao EHMC.....	54
Figura 17 – Análise da atividade da acetilcolinesterase (AChE) dos músculos de <i>Oreochromis niloticus</i> (a) e <i>Astyanax altiparanae</i> (b) após a exposição subcrônica ao EHMC.....	56

Figura 18 - Análise da atividade da acetilcolinesterase (AChE) dos cérebros de <i>Oreochromis niloticus</i> (b) e <i>Astyanax altiparanae</i> (b) após a exposição subcrônica ao EHMC.....	57
Figura 19 – Análise da atividade da glutathiona-S-transferase (GST) em (a) <i>O. niloticus</i> e (b) <i>A. altiparanae</i> após a exposição ao EHMC.....	58
Figura 20 – Análise da atividade da enzima catalase (CAT) em (a) <i>O. niloticus</i> e (b) <i>A. altiparanae</i> após a exposição ao EHMC.....	59
Figura 21 - Análise da peroxidação lipídica (LPO) em <i>O. niloticus</i> após a exposição ao EHMC.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AChE	Acetilcolinesterase
AMN	Alterações morfológicas nucleares
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASTM	Sociedade Americana para Materiais e Testes
AVO	Avobenzona
BP-3	Benzofenona-3
BP-4	Benzofenona-4
CAT	Catalase
CENO	Concentração de efeito não observável
CE ₅₀	Concentração da amostra que causa efeito a 50% dos organismos expostos
CN	Controle Negativo
CS	Controle de Solvente
DCI	Denominação Comum Internacional
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EHMC	2-ethylhexyl 4-metoxicinamato
FDA	Administração Federal de Alimentos e Medicamentos
GST	Glutathione S-transferase
INCI	Nomenclatura Internacional de Ingredientes Cosméticos
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
ISSO	Organização Internacional para a Padronização
K	Fator de Condição de Fulton
LMP	Agarose de Baixo Ponto de Fusão
LPO	Peroxidação Lipídica
MN	Micronúcleo
OCT	Octocrileno
OMC	Metoxicinamato de Octila
PA	Padrão analítico
SBF	Soro Bovino Fetal
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1.1 Objetivo geral	14
2.1.2 Objetivos específicos	14
3 REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 FILTRO ULTRAVIOLETA	15
3.1.1 EHMC	16
3.2 ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS	19
3.2.1 Peixes como organismos teste	22
3.2.1.1 <i>Oreochromis niloticus</i>	23
3.2.1.2 <i>Astyanax altiparanae</i>	24
3.3 BIOMARCADORES	25
3.3.1 Biomarcador Somático	26
3.3.2 Biomarcadores Genéticos	26
3.3.2.1 Ensaio Cometa Alcalino	26
3.3.2.2 Teste do Micronúcleo Písceo	28
3.3.3 Biomarcadores Bioquímicos	29
3.3.3.1 Neurotoxicidade	29
3.3.3.2 Biotransformação	30
3.3.3.3 Estresse oxidativo	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 2-ETILHEXIL-4-METOXICINAMATO (EHMC)	33
4.1.1 Método cromatográfico	33
4.1.2 Ensaio de Estabilidade e Assimilação do EHMC	33
4.2 BIOENSAIO	34
4.2.1 Aquisição e aclimação	34
4.2.2 Ensaio Subcrônicos	35
4.2.3 Coleta do material biológico	36
4.2.4 Biomarcador Somático	36
4.2.5 Biomarcadores genéticos	37
4.2.5.1 Genotoxicidade	37

4.2.5.2 Mutagenicidade	39
4.2.6 Biomarcadores bioquímicos	39
4.2.6.1 Proteínas totais	40
4.2.6.2 Acetilcolinesterase (AChE)	40
4.2.6.3 Glutathiona-S-transferase (GST)	40
4.2.6.4 Catalase (CAT)	41
4.2.6.5 Peroxidação lipídica (LPO)	41
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 DETERMINAÇÃO ANALÍTICA: ESTABILIDADE DO EHMC	43
5.2 BIOENSAIOS	44
5.2.1 Condições de exposição da espécie <i>O. niloticus</i>	44
5.2.2 Condições de exposição da espécie <i>A. altiparanae</i>	45
5.3 BIOMARCADOR SOMÁTICO	46
5.4 BIOMARCADORES GENÉTICOS	48
5.4.1 Genotoxicidade	48
5.4.2 Mutagenicidade	52
5.5 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS	56
5.5.1 Neurotoxicidade	56
5.5.2 Biotransformação	58
5.5.3 Estresse Oxidativo	59
5.6 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE OS BIOENSAIOS	61
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos últimos anos, popularizou-se a recomendação do uso diário do protetor solar para evitar problemas causados pela superexposição à radiação ultravioleta, como queimaduras solares, envelhecimento e câncer de pele (PATHAK, 1987; HUANG et al., 2021). Atrelado a isto, outros produtos de higiene pessoal e cosméticos passaram a ser formulados para garantir a fotoproteção, utilizando como base filtros ultravioletas capazes de refletir, absorver ou dissipar os raios UV (ABDELRAHEEM et al., 2015).

Dentre os filtros ultravioletas, destaca-se o 2-ethylhexyl 4-metoxicinamato (EHMC) pertencente à classe dos cinamatos, um filtro UV-B potente capaz de absorver radiação com comprimento de onda entre 270-328 nm (STEIN et al., 2017). O EHMC compõe a maioria dos produtos comercializados para fotoproteção e é bem aceito no mercado, pois além de ser um filtro de fácil aplicação e de baixa viscosidade, raramente causa reações alérgicas (PALM; O'DONOGHUE, 2007).

Sob o ponto de vista ecológico, a intensificação da fabricação e uso do EHMC tem levantado preocupações, visto que o seu principal destino são os ecossistemas aquáticos, incluindo rios, lagos, águas residuárias e mares (SILVA; EMÍDIO; DE MARCHI, 2015; RODIL; MOEDER, 2008; FENT et al., 2010; LANGFORD; THOMAS, 2008; WU et al., 2019). Em estudos de monitoramento ambiental, o EHMC foi frequentemente detectado na faixa de $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$, devido às suas características químicas que facilitam a persistência no ambiente e a bioacumulação na comunidade biológica (FENT et al., 2010). Por consequência, o EHMC tem sido quantificado em matrizes ambientais de diferentes países, principalmente no verão (MAGI et al., 2013).

A sua presença no meio ambiente pode refletir negativamente sobre os organismos aquáticos, ao induzir respostas de bioacumulação e de efeito. Em pesquisas de Fent et al. (2010), o EHMC foi detectado em bivalves filtradores (22 a $150 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ lipídios), crustáceos (91 a $133 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ lipídios), em várias espécies de peixes (9 a $337 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ lipídios) e aves (16 a $701 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ lipídios). Isso gera grande preocupação, uma vez que alguns efeitos toxicológicos têm sido associados ao composto, como alterações em genes (CHRISTEN; ZUCCHI; FENT, 2011; CHU et

al., 2021), desregulação endócrina (CHU et al., 2021; LEE et al., 2019), alterações na reprodução (LEE et al., 2019) e no desenvolvimento embrionário (PAULA, 2019).

Os peixes têm se mostrado excelentes organismos modelos para testar a toxicidade de xenobióticos, inclusive de filtros UVs (ALMEIDA et al., 2019; LEE et al., 2019; CHRISTEN; ZUCCHI; FENT, 2011), devido a sensibilidade, posição na cadeia alimentar, importância comercial e principalmente pela complexidade sistêmica do organismo, que permite estudar os efeitos desde o nível molecular até níveis mais complexos, como populacional e comunidade. A tilápia *Oreochromis niloticus* e o lambari *Astyanax altiparanae* são espécies de peixes de água doce amplamente empregadas em ensaios ecotoxicológicos para avaliação do potencial tóxico de diversas substâncias químicas, pois apresentam sensibilidade, fácil manejo, valor nutricional para a espécie humana e técnicas para estudo (RAMSDORF et al., 2009; DISNER et al., 2017; REQUE et al., 2021; ABDALLA et al., 2019; MARINS et al., 2021).

Os efeitos associados à exposição da comunidade biológica ao EHMC ainda não foram bem estabelecidos, principalmente em concentrações detectadas no ambiente. Portanto, o presente estudo pretende oferecer um perfil toxicológico do filtro EHMC em concentrações ambientalmente relevantes, tanto para espécie exótica comercial *O. niloticus*, quanto para a espécie nativa *A. altiparanae*, utilizando biomarcadores somático, genéticos e bioquímicos em diferentes tecidos.

2 OBJETIVOS

2.1.1 Objetivo geral

Avaliar a toxicidade do fotoprotetor 2-etilhexil 4-metoxicinamato (EHMC) em *Oreochromis niloticus* e *Astyanax altiparanae* após a exposição hídrica subcrônica (22 dias).

2.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar as condições de saúde dos peixes após a exposição, por meio do fator de condição de Fulton.
- Avaliar a genotoxicidade do EHMC em eritrócitos e em células do tecido renal de peixes, por meio do ensaio cometa alcalino.
- Avaliar a mutagenicidade do EHMC em eritrócitos de peixes, por meio do ensaio micronúcleo písceo.
- Analisar os biomarcadores bioquímicos (catalase, lipoperoxidação e glutathione-S-transferase em fígado e acetilcolinesterase cerebral e muscular) dos peixes após a exposição.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 FILTRO ULTRAVIOLETA

Os filtros ultravioletas (UV) têm sido utilizados desde 1930 para evitar os danos causados pela exposição à radiação ultravioleta. Desde então, muitos compostos foram descobertos, combinados e melhorados para potencializar a ação de filtros nos diferentes comprimentos de onda da radiação UV (UVA e UVB) (SINGER et al., 2019). Os filtros UV podem oferecer proteção contra a radiação UVA (400 a 320 nm) que induz a produção de radicais oxidativos associados ao fotoenvelhecimento e fotodermatoses e a radiação UVB (320 a 280 nm), que interage com o tecido epitelial em nível molecular (LAJCÍKOVÁ; PEKÁREK, 2009; KAISER et al., 2012).

Os fotoprotetores são classificados como filtros orgânicos absorventes (químicos) ou filtros inorgânicos (físicos) dependendo da estrutura e da forma de ação. Os filtros inorgânicos refletem e espalham os raios UV, por exemplo, dióxido de titânio e óxido de zinco, enquanto os filtros orgânicos absorvem os raios UV e os liberam na forma de calor, como a benzofenona-3 (BP-3), benzofenona-4 (BP-4), avobenzona (AVO), octocrileno (OCT) e 2-ethylhexyl 4-metoxicinamato (EHMC) (ABDELRAHEEM et al., 2015). Comumente, os filtros orgânicos e inorgânicos são combinados para oferecer melhor proteção contra a radiação, proporcionando maior estabilidade e duração de ação das moléculas (BRATKOVICS et al., 2015).

Atualmente, mais de 33 filtros orgânicos e inorgânicos são incorporados em filtros solares, produtos de higiene pessoal (como maquiagens, cremes, xampus, etc.) e em produtos industriais (plásticos, adesivos, tinta e borracha) (SÁNCHEZ-QUILES; TOVAR-SÁNCHEZ, 2015). A regulamentação da fabricação destes produtos contendo agentes fotoprotetores difere entre as agências reguladoras dos diferentes países, quanto à concentração máxima e os princípios ativos que são permitidos para uso. No Brasil, por exemplo, a concentração máxima permitida de alguns filtros orgânicos é de 15% do peso do produto final, e de filtros inorgânicos até 25% (ANVISA, RDC nº 600, 9 de fevereiro de 2022). Neste cenário, nota-se que os potenciais efeitos ambientais dos filtros UVs para organismos não-alvo não foram levados em consideração quando estipuladas as recomendações de limites de uso.

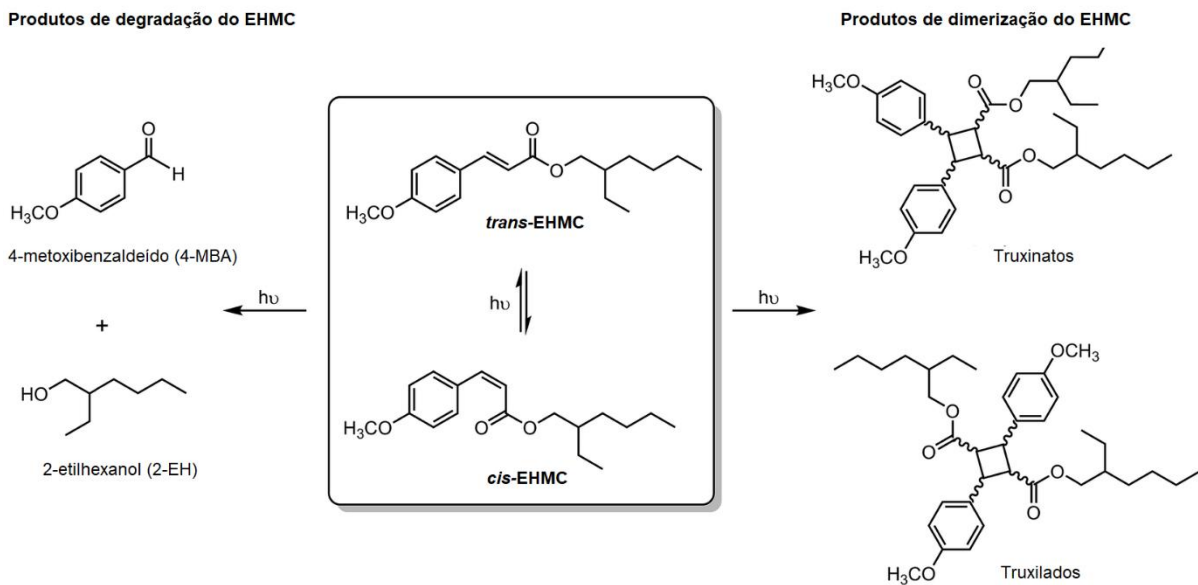
Os filtros UVs fabricados e utilizados chegam aos corpos hídricos por duas vias de contaminação: direta e indireta. Diretamente, o filtro solar é liberado no ecossistema aquático durante atividades recreativas ou por lançamento de efluentes não tratados, ou ainda, indiretamente, pela lixiviação de resíduos e lançamento de efluentes tratados ineficientemente (FENT et al., 2010). Deste modo, o contínuo lançamento de filtros UVs e a ineficiência dos tratamentos para remoção dos mesmos no ambiente levaria à perturbação dos diferentes organismos expostos, o que os caracterizaria como contaminantes emergentes (HOPKINS; BLANEY, 2016).

3.1.1 EHMC

O 2-ethylhexyl 4-metoxicinamato (EHMC), também conhecido como metoxicinamato de octila (OMC), p-metoxicinamato de octila e octinoxate, é um dos filtros orgânicos mais utilizados no mundo para a proteção contra raios UVB (DÍAZ-CRUZ et al., 2008; STEIN et al., 2017). O EHMC pode compor até 10% de muitos protetores solares, batons, cremes e de outros produtos de higiene pessoal em todo o mundo (KRAUSE et al., 2012). O filtro é bem aceito no mercado, estima-se que a produção anual é de centenas de toneladas (MACMANUS-SPENCER et al., 2011) e que seja manipulado em mais de 90% das formulações de uso tópico para fotoproteção, por apresentar fácil aplicação, aderência e de raros casos de irritações na pele ou dermatite alérgica (PALM; O'DONOGHUE, 2007).

Embora o EHMC seja um filtro UVB eficiente, o mesmo pode sofrer fotodegradação, formando produtos que também podem ser potencialmente perigosos. Em produtos comerciais, o EHMC é sintetizado predominantemente na forma de isômero trans-EHMC, mas quando exposto a radiação UV é transformado no isômero cis-EHMC (STEIN et al., 2017). Ambos os isômeros podem formar produtos da fotodegradação, como o 4-metoxibenzaldeído (4-MBA) e o 2-etilhexanol (2-EH), e podem dimerizar de modo a formar dímeros de ciclobutano (Figura 1) (MACMANUS-SPENCER et al., 2011). Logo, a fotodegradação reduz gradativamente sua eficiência de absorção dos raios UV (DÍAZ-CRUZ; LLORCA; BARCELÓ, 2008), sendo assim, muitas vezes são adicionados outros filtros UV ou aditivos para aumentar a estabilidade da molécula.

Figura 1 - Estrutura química do 2-Etilhexil 4-metoxicinamato (EHMC) e seus fotoprodutos.



Legenda: O trans-EHMC fabricado pode se transformar em cis-EHMC quando exposto a radiação UV. Ambos os isômeros trans e cis-EHMC podem formar produtos da fotodegradação (4-metoxibenzaldeído e 2-etilhexanol) e da fotodimerização (truxinato e truxilato). Fonte: Stein et al. (2017).

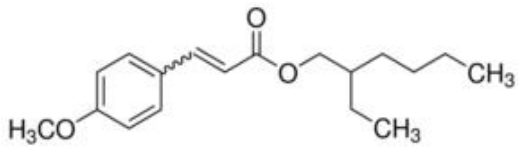
Nos últimos anos, o uso contínuo e a entrada persistente do EHMC no ambiente têm levantado preocupações. Globalmente, tem sido detectado em diferentes ambientes, variando entre 10 - 1040 ng·L⁻¹ em rios (MAGI et al., 2012; SILVA; EMÍDIO; DE MARCHI, 2015; KAMEDA; KIMURA; MIYAZAKI, 2011; HE et al., 2018), 107 ng·L⁻¹ em lagos (RODIL; MOEDER, 2008), 390 ng·L⁻¹ em águas costeiras (LANGFORD; THOMAS, 2008), 10 - 100 ng·L⁻¹ em águas residuárias tratadas e 500 - 19.000 ng·L⁻¹ em águas residuárias não tratadas (BALMER et al., 2005). Dentre os estudos, dependendo da estação, localização, atividades recreativas do entorno e métodos de análise, sua faixa de concentração foi de ng·L⁻¹ a µg·L⁻¹.

O EHMC também foi detectado na água de torneira (260 ng·L⁻¹) e na água potável (75 - 256 ng·L⁻¹) (LORAINE; PETTIGROVE, 2006; SILVA; EMÍDIO; DE MARCHI, 2015; DÍAZ-CRUZ et al., 2012), o que indica que os tratamentos convencionais de água não removem eficientemente filtros UV. Além do mais, não existe regulamentação a respeito dos filtros UV na água para abastecimento público após tratamento (PORTARIA 888, de 4 de maio de 2021).

No sistema biológico, a estrutura química do EHMC (Quadro 1) facilita a bioacumulação nos organismos. O baixo peso molecular e a alta lipofilicidade da

molécula facilitam a absorção cutânea e sistêmica em humanos via exposição tópica (JANJUA et al., 2004), inclusive em alguns estudos, como o de Schlumpf et al. (2010), o EHMC foi detectado no leite materno. Além disso, a sua lipofilicidade ($\log Kow = 5,8$) é um indicativo de potencial bioacumulação nos tecidos dos seres vivos, já tendo sido detectado em espécies aquáticas, tanto de água doce (GAGO-FERRERO, DÍAZ-CRUZ, BARCELÓ et al., 2015; PICO et al., 2019) quanto de água salgada (FENT et al., 2010; BACHELOT et al., 2012; GÓMEZ et al., 2021).

Quadro 1 - Propriedades físicas e químicas do 2-Etilhexil 4-metoxicinamato (EHMC)

Nomenclaturas	IUPAC	2-Etilhexil 4-metoxicinamato
	INCI	etilhexil metoxicinamato
	INN	octinoxato
	Substância	metoxicinamato de octila (OMC)
Peso molecular		290.40 g·mol ⁻¹
Fórmula estrutural ¹		
Número de registro no CAS		5466-77-3
Classe química ¹		Cinamatos
Solubilidade em água ¹		0,156 mg·L ⁻¹
Ponto de fusão ²		-68.3 °C
Coeficiente de partição ($\log Kow$) ¹		5,80
Absorção ($\log Koc$) ³		4.124 a 20 °C
Meia vida em água ⁴		23 horas

Legenda: IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada, INCI - Nomenclatura Internacional de Ingredientes Cosméticos e DCI - Denominação Comum Internacional. Fonte: 1: Díaz-Cruz et al. (2012), 2: NCBI; 3: Agência Europeia de Produtos Químicos e 4: O'Malley et al. (2021).

Embora o uso do EHMC seja regulamentado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pela agência norte-americana *Food and Drugs Administration* (FDA) e amplamente aplicado em produtos comerciais, foi proibida a venda em alguns estados turísticos, devido a preocupações com o branqueamento dos recifes de corais, como as Ilhas Virgens dos Estados Unidos da América (EUA) em março de 2020; os estados Havaí e Key West dos EUA em janeiro de 2021 (NARLA; LIM, 2020). Segundo He e colaboradores (2019), o EHMC é tóxico às espécies de corais, ao induzir a redução da densidade de zooxantelas, e ao levar o branqueamento e a mortalidade.

3.2 ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS

Os ensaios ecotoxicológicos são conduzidos para avaliar os efeitos de substâncias naturais ou sintéticas sobre organismos, populações ou comunidades de um ecossistema. A compreensão da toxicidade dos agentes a organismos vivos possibilita, além da avaliação de impacto ao meio ambiente, estabelecer limites máximos de lançamento de substâncias químicas em corpos hídricos que não interfiram na saúde dos seres vivos (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Os estudos ecotoxicológicos foram desenvolvidos e aperfeiçoados rapidamente desde o seu surgimento, devido à série de substâncias novas que foram formuladas e lançadas no ambiente, e também devido aos graves acidentes industriais que ocorreram, como os de Seveso, Minamata e Exxon Valdez (KAHRU; DUBOURGUIER, 2010). Em geral, estes ensaios passaram por normalização e ou padronização de métodos, visto que diferentes condições dos ensaios geram diferentes resultados (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). Diversos métodos dos ensaios encontram-se padronizados nacionalmente e internacionalmente por associações ou organizações, por exemplo, Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), Sociedade Americana para Materiais e Testes (ASTM), Organização Internacional para a Padronização (ISO), entre outras.

Nos ensaios, organismos sensíveis são expostos a uma série de diluição de uma amostra para avaliar a mortalidade, imobilidade, genotoxicidade, mutagenicidade, citotoxicidade ou outros efeitos no sistema biológico. Dentre as condições de experimentação e delineamento experimental, há a separação de

grupo controle negativo (sem adição de contaminante) e de grupos expostos em diferentes níveis de concentração de uma determinada substância para a comparação de eventuais efeitos. Comumente nestes testes os autores sugerem principalmente: o uso de espécies sensíveis e representativas, métodos fáceis e de baixo custo, boa repetibilidade de resultados e, pelo menos, o uso de três níveis de concentração/dose de um contaminante via a exposição mais provável do organismo (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008; MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008).

Os ensaios de toxicidade são classificados em agudos, subcrônicos e crônicos, considerando o período de exposição, a concentração do composto químico e o efeito causado no organismo após a exposição. Nestes ensaios, são estabelecidas relações mensuráveis entre a exposição do organismo ao xenobiótico com os efeitos observados, como análise de mortalidade, imobilidade, crescimento, atividade enzimática, entre outros parâmetros (WRIGHT; WELBOURN, 2002; CONNELL et al., 2009).

Os testes de ecotoxicidade aguda determinam os efeitos após uma exposição de curta duração (0 a 96 horas) a concentrações mais altas de agentes químicos. Neste ensaio, geralmente é avaliada a mortalidade ou imobilidade dos organismos-teste, e o resultado dos efeitos são expressos em CL_{50} e CE_{50} (concentração da amostra que causa letalidade ou efeito agudo a 50% dos organismos expostos) (BERTOLETTI, 2013).

Nos testes subagudos e subcrônicos são avaliados os efeitos de uma exposição química sucessiva durante um período que não exceda 10% da vida do organismo-teste (BALLANTYNE; SULLIVAM, 1997). Os testes são conduzidos para estabelecer: o tempo de latência para o surgimento dos efeitos de um composto, aparecimento de lesões e a reversibilidade de efeitos (AZEVEDO; CHASIN, 2004).

Em testes de toxicidade crônica, os organismos são expostos a uma concentração menor de contaminante durante um período de tempo mais longo, excedendo 10% da vida do mesmo. Neste ensaio, os organismos-teste são examinados frequentemente em testes bioquímicos, hematológicos e provas funcionais, até o final do ensaio, onde serão coletados tecidos para diferentes análises histológicas e moleculares. O ensaio permite identificar anormalidades e doenças da exposição prolongada e os valores dos efeitos são expressos em CENO

e CEO (concentração de efeito não observável e concentração de efeito observável) (AZEVEDO; CHASIN, 2004).

Os estudos ecotoxicológicos do EHMC publicados ainda são escassos, considerando as concentrações, os testes e os organismos-teste utilizados. O EHMC pode provocar diferentes respostas, dependendo da espécie exposta a ele, o estágio de vida, a concentração testada e análise, como mostra o resumo dos ensaios ecotoxicológicos encontrados até o presente momento (Quadro 2).

Quadro 2 – Ensaio de ecotoxicidade aguda, subcrônica e crônica do EHMC (continua).

Ensaio	Organismo-teste	Concentração	Período	Efeito	Referência
Ensaio Agudo	<i>Daphnia magna</i>	10 até 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	48 h	Imobilidade = $\text{CE}_{50(48\text{h})}$ 0,5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	Paula (2019)
	<i>Artemia salina</i>	10 até 800 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	24 h	Imobilidade = $\text{CE}_{50(48\text{h})}$ 0,37 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	
	<i>Desmodesmus subspicatus</i>	6 a 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	72 h	Inibição = CE_{50} 0,37 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	
	<i>Rhamdia quelen</i>	0,0061 e 0,224 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	96 h	Anomalias morfológicas nos embriões (cérebro, nadadeira e abdômen) e aumento do estresse oxidativo	
	<i>Seriatopora aliendrum</i> e <i>Pocillopora damicornis</i>	0,1 a 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	7 dias	Bioacumulação, mortalidade e branqueamento	He et al. (2019)
	<i>Danio rerio</i>	3500, 34000 e 62000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	96 h	Inibição da enzima acetilcolinesterase e danos histopatológicos	Nataraj et al. (2020)

Quadro 2 - Ensaios de ecotoxicidade aguda, subcrônica e crônica do EHMC (conclusão).

Ensaio	Organismo-teste	Concentração	Período	Efeito	Referência
Ensaio Subcrônico	<i>Danio rerio</i>	1, 3, 10 e 30 μM	21 dias	Alterações de genes de neurotoxicidade e de regulações hormonais	Chu et al. (2021)
	<i>Pimephales promelas</i>	30, 300, 1000 e 3000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	14 dias	Induziu alterações histológicas nas gônadas e alteração da expressão gênica (<i>esr1</i>) para atividade antiestrogênica	Christen, Zucchi e Fent (2011)
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	6,9, 96 e 395,6 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	42 dias	Alteração do metabolismo de sacarídeos, lipídios e proteínas e redução da atividade antioxidante	Cahova et al. (2021)
Ensaio Crônico	<i>D. magna</i>	6 a 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	21 dias	taxas de reprodução = CENO de 0,009 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	Paula (2019)

FONTE: A autora (2022).

3.2.1 Peixes como organismos teste

Os peixes são considerados organismos modelos fundamentais e de grande relevância para avaliações ecotoxicológicas (STADNICKA-MICHALAK et al., 2015), uma vez que respondem a xenobióticos em níveis moleculares ou até mesmo em nível populacional. As espécies de peixes escolhidas nos estudos geralmente: ocupam diferentes níveis tróficos, respondem de modo semelhante aos vertebrados superiores, são sensíveis, estão presentes na dieta humana e os recursos técnicos são acessíveis e bem estabelecidos na literatura (LINS et al., 2010; AL-SABTI, 1991).

Em estudos ecotoxicológicos, é interessante que o pesquisador considere o uso de diferentes espécies de peixes para avaliar o efeito de uma amostra, visto que as respostas podem não ser as mesmas para uma determinada condição de

exposição (GRAY, 2002; LEWIS; PRYOR; WILKING, 2011). Além disso, alguns estudos que avaliaram a toxicidade de xenobióticos mostraram que as espécies nativas e exóticas responderam de formas diferentes a uma mesma contaminação (CAMPAGNA et al., 2008 , MURUSSI et al., 2014 , PIANCINI et al., 2015).

3.2.1.1 *Oreochromis niloticus*

A espécie *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), conhecida popularmente como tilápia do Nilo, possui ampla distribuição geográfica, sendo natural das bacias de rios africanos e introduzida em países tropicais e subtropicais para atividade de piscicultura (COWARD; BROMAGE, 2000; GRACA; PAVANELLI, 2007). Dentre as principais características para a identificação da espécie, destacam-se as listras verticais escuras no corpo e na nadadeira dorsal, anal e caudal (Figura 2), e o seu hábitat, ambientes salobros e de água doce.

Figura 2 – Exemplar de *Oreochromis niloticus* (Tilápia-do-nilo).



8 mm

Fonte: A autora (2022).

A tilápia-do-nilo é um peixe tropical com características desejáveis para a exploração comercial, devido ao rápido crescimento, fácil manejo, alta prolificidade, baixa exigência de instalações (a espécie não precisa de muito oxigênio e aguenta variações de temperatura) e alto valor nutricional da carne (KOBBERSTEIN, 2003). Diante disso, a tilápia tem sido objeto de estudo há muitos anos para melhoramento da comercialização da carne, e mais recentemente na área da ecotoxicologia tem sido estudada e utilizada como organismo-teste.

A espécie é um importante organismo para avaliação da exposição de xenobióticos, uma vez que há muita pesquisa técnica e científica disponível sobre os seus aspectos biológicos e reprodutivos; disponibilidade durante o ano todo para testes; e valor econômico e nutricional (SILVA; EMÍDIO; DE MARCHI, 2015; SILVA et al., 2019; ANDRADE et al., 2015). Além disso, é amplamente utilizada em ensaios ecotoxicológicos por mostrar sensibilidade após exposição a agentes químicos (RUBIO-VARGAS et al., 2021; MARINS et al., 2021).

Considerando que o EHMC possui potencial de bioacumulação nos tecidos de diferentes espécies de peixes (FENT et al., 2010), é importante avaliar os seus efeitos em níveis molecular e celular nas tilápias, visto que pode afetar a saúde do peixe que é comumente consumido.

3.2.1.2 *Astyanax altiparanae*

Astyanax altiparanae (GARUTTI, BRITSKI, 2000), conhecido popularmente como lambari-do-rabo-amarelo ou tambiú, é uma espécie endêmica da região sudeste do Brasil, encontrada principalmente na bacia do rio Paraná (AGOSTINHO et al., 2007). A espécie apresenta elevado valor ecológico, pois desempenha um papel importante na cadeia alimentar, e valor econômico, por servir de isca viva na pesca esportiva e de alimento pelo valor nutricional e sabor (BARASSA; CORDEIRO; ARANA, 2003).

A. altiparanae é caracterizada pela mancha preta no pedúnculo caudal, mancha amarelo-ferrugem acima da pupila e coloração amarela nas nadadeiras caudal, anal e pélvica (GARUTTI; BRITSKI, 2000) (Figura 3). A espécie apresenta dimorfismo sexual aparente ao atingir o período reprodutivo, no qual as fêmeas apresentam formato corpóreo mais redondo e atingem de 12 a 15 cm de comprimento, enquanto os machos, de 7 a 12 cm (CAMARGO, 2016).

Figura 3 – Exemplar de *Astyanax altiparanae* (Lambari)



10 mm

Fonte: A autora (2022).

Em ensaios ecotoxicológicos, os lambaris têm sido utilizados com sucesso para avaliar genotoxicidade, mutagenicidade, neurotoxicidade, alterações bioquímicas e histológicas, mostrando ser sensível aos agentes químicos estudados, como fotoprotetores (ALMEIDA; VIEIRA, 2013), hidrocarboneto aromático (DISNER et al., 2017), medicamentos (REQUE et al., 2021; MUÑOZ-PEÑUELA et al., 2021; GODOI et al., 2020), agrotóxicos (DESTRO et al., 2021), metais (ABDALLA et al., 2019; PINHEIRO et al., 2019; CORREIA et al., 2021) e misturas em monitoramento ambiental (FREIRE et al., 2015). Além disso, os lambaris também se mostraram sensíveis a agentes químicos mesmo em baixas concentrações de exposição (ARMILIATO, 2014).

3.3 BIOMARCADORES

Os biomarcadores são definidos como respostas mensuráveis dos organismos a estressores, que podem ser analisadas em nível bioquímico, celular, histológico, fisiológico ou comportamental. Neste sentido, os biomarcadores permitem relacionar a exposição com o efeito ao sistema biológico, além de possibilitar a avaliação de uma série de alterações reversíveis e não reversíveis (DEPLEDGE, 1994; BUCHELI; FENT, 1995).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 1993), os biomarcadores podem ser classificados em biomarcadores de exposição, de efeito e de

suscetibilidade. Os biomarcadores de exposição estimam as concentrações de um xenobiótico ou dos seus metabólitos no interior do organismo exposto. Os biomarcadores de efeito evidenciam respostas bioquímicas, tecidual, fisiológica ou comportamental, a indivíduos expostos a xenobióticos. E os biomarcadores de suscetibilidade são as mudanças das respostas do organismo exposto ao contaminante ao longo do tempo e entre a exposição e o efeito.

Ao selecionar um biomarcador, o pesquisador deve considerar alguns fatores do estudo, como o tempo de exposição ao contaminante, características gerais da espécie que são variantes (idade, sexo, peso, temperatura, salinidade, etc.) e significância biológica (LIVINGSTONE, 1985), a fim de compreender melhor a ação do agente químico/físico estudado sob os organismos vivos.

3.3.1 Biomarcador Somático

O Fator de Condição de Fulton (K) pertence à classe dos biomarcadores somáticos e é um índice comumente utilizado para obter informações sobre estado nutricional e a saúde relativa de peixes. O índice morfométrico usa medidas externas do peixe, partindo do princípio de que há uma relação entre o comprimento total e a massa corporal. Segundo Bolger e Connolly (1989), o índice sugere que um peixe de maior massa com comprimento correspondente, possui maior reserva energética e consequentemente está em melhores condições.

O índice mostrou resultados satisfatórios para estabelecer a saúde geral dos peixes em trabalhos de monitoramento ambiental (ENCINA; LORENCIO, 1997; LIZAMA; AMBRÓSIO, 2002; SANTOS et al., 2004) e mais recentemente, tem sido utilizado para avaliar a saúde de peixes após a exposição a agentes químicos em bioensaios, mesmo em concentrações baixas ($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ a $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) em curto intervalo de tempo, como nos trabalhos de Almeida et al. (2019) e Huang et al. (2020).

3.3.2 Biomarcadores Genéticos

3.3.2.1 Ensaio Cometa Alcalino

O ensaio cometa, também conhecido como teste de células individualizadas em gel de agarose, é uma técnica aplicada para detectar danos precoces ao DNA

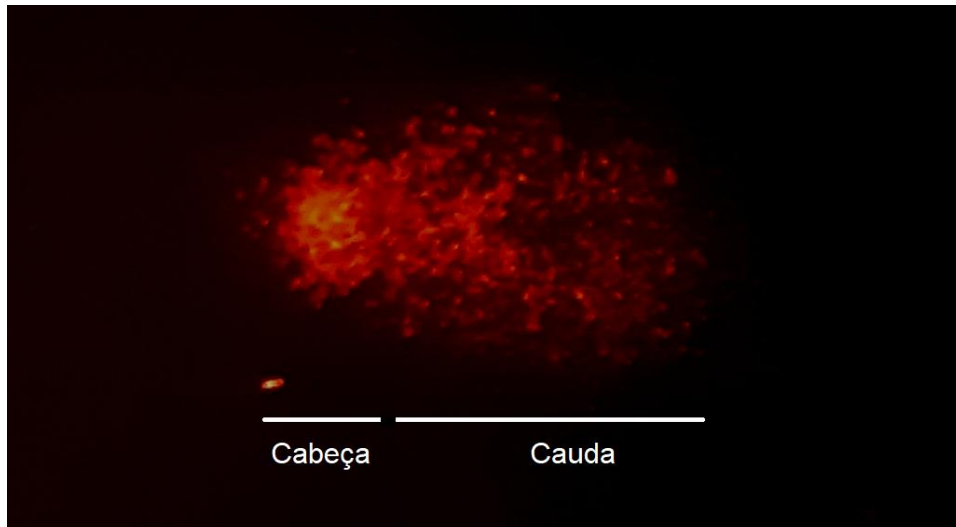
em células depois de uma corrida eletroforética (SINGH et al., 1988). O método descrito por Östling e Johanson (1984) e modificado por Singh et al. (1988), rapidamente tornou-se popular devido a sensibilidade, rapidez, precisão, exigência de um pequeno número de células e principalmente pela possibilidade de utilizá-lo em diferentes tipos de células nucleadas de eucariontes (MØLLER, 2018; LEE, 2004; BRENDLER-SCHWAAB et al., 2005).

O protocolo do ensaio cometa alcalino consiste basicamente na lise das membranas celulares e nucleares para posterior eletroforese sob condições alcalinas ($\text{pH} > 13$), no qual é aplicado um campo elétrico que promove a migração do material genético por polaridade. O DNA, que apresenta carga negativa, se estende em direção a carga positiva do ânodo (eletrodo positivo da cuba de eletroforese) (AFANASIEVA; SIVOLOB, 2018). Nestas condições, o DNA íntegro tende a migrar de forma homogênea formando um círculo, enquanto que no DNA danificado, a migração ocorre de acordo com as fragmentações do DNA, com fragmentos menores migrando mais rapidamente quando comparados aos fragmentos maiores, originando nucleóides com rastros eletroforéticos denominados de “cometa” por causa da formação de uma cauda (OLIVE; BANÁTH; DURAND, 1990) (Figura 4).

As lesões genômicas que facilitam a formação de cometas podem ser reparadas antes das análises (BEEDANAGARI et al., 2014). No entanto, o estudo de Espina e Weiss (1995) mostra que o reparo do DNA é mais lento em organismos aquáticos quando comparados aos mamíferos.

Em peixes, comumente são utilizados eritrócitos para realizar o ensaio cometa, devido o maior contato com o contaminante, facilidade em obtenção de suspensão celular e ainda por 97% das células serem nucleadas. Também são utilizados outros órgãos/tecidos no ensaio cometa, de acordo com o tipo de interação com o contaminante, pois os efeitos podem ser tecido-específicos (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998), como as brânquias, o primeiro órgão receptor do contaminante e de contínua exposição; fígado, responsável pela metabolização dos compostos; e o rim, tecido produtor de sangue em teleósteos (BELPAEME; COOREMAN; KIRSCH-VOLDERS, 1998).

Figura 4 - Registro de um cometa: cabeça e cauda.



Fonte: A autora (2022).

3.3.2.2 Teste do Micronúcleo Písceo

O teste do micronúcleo písceo, que avalia micronúcleos e alterações morfológicas nucleares, é utilizado para identificar potenciais danos citogenéticos causados por agentes químicos (OECD, 1994), visto à simplicidade, preço, rapidez, precisão do método e aplicabilidade em pesquisas laboratoriais ou de campo (CANEDO et al., 2021). Em análise, o teste permite detectar quebras e perdas de cromossomos, defeitos na segregação de cromossomos e eventos de reparo de excisão em peixes (FENECH, 1997, 2006; 2008; HAYASHI, 2016).

Os micronúcleos (MNs) são cromossomos inteiros ou fragmentos cromossômicos que não se integram ao núcleo principal nas células filhas durante a divisão celular, dando origem a uma pequena esfera de diâmetro que varia entre 1/16 a 1/3 do diâmetro do núcleo principal (BOMBAIL; GORDON; BATTY, 2001). A sua formação pode estar relacionada à exposição a substâncias que induzem quebras cromossômicas (agentes clastogênicos), ou por falhas em componentes celulares, como falhas na associação de cromossomos e na montagem das fibras do fuso mitótico (FENECH et al., 2020).

Além da avaliação convencional dos MNs, nas mesmas lâminas preparadas para o teste, é possível quantificar e classificar outros diferentes tipos de alterações morfológicas nucleares (ANs) em eritrócitos de peixes, que aumentam de frequência após a exposição a substâncias químicas (BOTELHO et al., 2015; POLLO et al.,

2015; BRAHAM et al., 2017). As ANs são indicativos de genotoxicidade em muitos trabalhos ecotoxicológicos, por exemplo, trabalhos que avaliaram os efeitos de filtros UV (ALMEIDA et al., 2019; DE OLIVEIRA-LIMA; DIAS DA CUNHA; DE BRITO-GITIRANA, 2022), agrotóxicos (BOTELHO et al., 2015; TRIVEDI et al., 2021; SHARMA; JINDAL, 2022; RITU et al., 2022), produtos químicos industrializados (DISNER et al., 2017; SRIVASTAVA, 2022), entre outros.

As alterações morfológicas nucleares são caracterizadas e nomeadas como: núcleos com evaginação na membrana nuclear (*Blebbbed*); núcleos com um corte central regular (*Notched*); núcleos com evacuações mais largas e irregulares quando comparados aos blebbed (*Lobed*); núcleos com porção central sem material visível (*Vacuolated*); dois núcleos bem definidos (Binúcleo) (CARRASCO; TILBURY; MYERS, 1990; FENECH, 2000); e núcleos com forma de oito (*Eightshaped*) (FURNUS et al., 2014). De modo geral, os binúcleos são formados quando não há divisão citoplasmática durante a citocinese (PERA; SCHWARZACHER, 1968), enquanto as demais ANs podem ser formadas pela amplificação do DNA (BARŠIENĖ et al., 2010).

3.3.3 Biomarcadores Bioquímicos

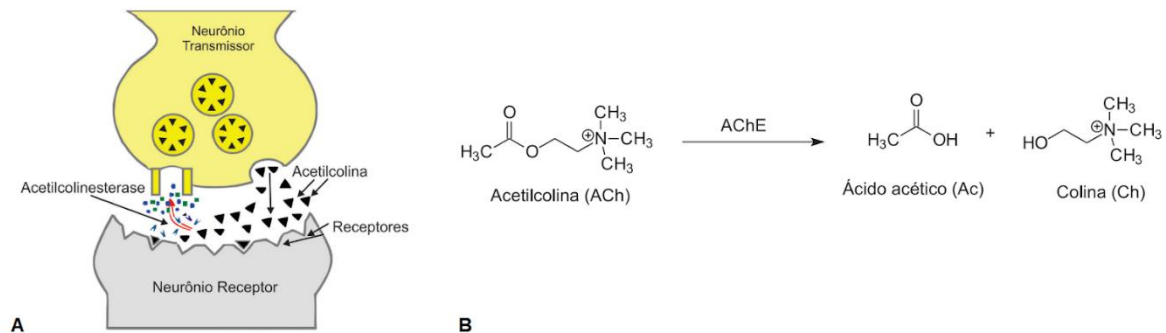
Os biomarcadores bioquímicos são utilizados em ensaios ecotoxicológicos com o objetivo de detectar precocemente alterações sofridas após a exposição a substâncias tóxicas, ou ainda para avaliar o risco de contaminação e efeitos tóxicos. Estes biomarcadores estão entre os mais estudados, devido à sensibilidade, especificidade e facilidade das análises (BUCHELI; FENT, 1995). Dentre os principais parâmetros bioquímicos, pode-se destacar os de neurotoxicidade, de biotransformação e de estresse oxidativo.

3.3.3.1 Neurotoxicidade

A enzima acetilcolinesterase (AChE) pertence à família das colinesterases e encontra-se no cérebro e nos músculos dos organismos para controlar o sistema nervoso. A AChE atua após a transmissão de um impulso nervoso, interrompendo a interação entre os neurotransmissores ACh (acetilcolina) com os receptores que

geram os impulsos, por meio da hidrólise da ACh em ácido acético e colina (Figura 5) (PETRONILHO; PINTO; VILLAR, 2011).

Figura 5 - Figura - Esquema da finalização da transmissão de impulsos nervosos.



Legenda: (a) ilustra a transmissão nervoso nas sinapses e (b) a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina pela acetilcolinesterase. Fonte: Petronilho; Pinto; Villar, 2011.

A atividade da AChE pode ser afetada quando o organismo é exposto a agentes tóxicos, como pesticidas organofosforados, carbamatos e metais (PUNDIR; CHAUHAN, 2012; SCHLENK, 2005). Neste cenário, o agente químico pode alterar a atividade da AChE através da ligação de um grupo químico a seu sítio ativo, o que impede a hidrólise ACh e consequentemente leva a um excesso de transmissão nervosa (EDDLESTON et al., 2002).

Em peixes, a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) tem sido utilizada como um importante biomarcador de neurotoxicidade, a fim de monitorar e/ou estabelecer os efeitos de xenobióticos (CIMBALUK et al., 2018; PAULA, 2019; REQUE et al., 2021; RUBIO-VARGAS et al., 2021). Nestes estudos, o método mais utilizado é o de Ellman et al. (1961) adaptada para microplaca por Silva de Assis (1998), que parte do princípio que a AChE da amostra biológica hidrolisa um substrato sintético (iodeto de acetiltiocolina) em tiocolina e acetato, e a tiocolina resultante interage com um reagente (5,5-ditio-bis-2 nitrobenzoato), formando ânion 5-Tio-2-nitrobenzoato que pode ser mensurado por aumento da absorvância.

3.3.3.2 Biotransformação

A biotransformação de substâncias exógenas em substâncias mais fáceis de serem eliminadas pelo organismo ocorre geralmente no fígado e envolve uma série

de reações enzimáticas (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). A princípio, a biotransformação é um processo de conversão de compostos químicos lipofílicos (solúveis em gordura), que são absorvidos pelo organismo, em compostos hidrofílicos (solúveis em água) que são facilmente excretados. Neste processo, pode ser alterada a toxicidade de um agente químico de modo benéfico (desintoxicação) ou prejudicial (bioativação: transformando-o em um metabólito reativo) ao organismo (PARKINSON; OGILVIE, 2008).

A biotransformação de xenobióticos é descrita em duas fases de reações. As reações de fase I são as de oxidação, redução ou hidrólise da molécula, ao inserir ou remover um grupo funcional (-OH, -NH₂, -COOH ou -SH) pelas enzimas esterases, desidrogenases, oxidases e monooxigenases com subunidades de citocromo P-450 (CYP450) ou de flavinas (FMO). Nas reações de fase II, o xenobiótico que passou ou não pela fase I, é conjugado por enzimas transferases (como a glutatona, sulfatos, aminoácidos, acetilas e metilas) para formar uma molécula mais polar, ou seja, mais hidrofílica. Em ambas as fases, as reações desencadeadas tendem a aumentar a solubilidade do xenobiótico em água, o que pode facilitar sua excreção (OGA; CARMARGO; BATISTUZZO, 2008; PARKINSON; OGILVIE, 2008).

Dentre as enzimas que atuam nas reações de biotransformação, foi utilizada a glutatona-S-transferase (GST) como biomarcador de efeito. As GSTs são enzimas multifuncionais que atuam na Fase II da biotransformação e são responsáveis pela homeostase e detoxificação de diversas substâncias exógenas (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). As GSTs estão presentes no citoplasma das células hepáticas que atuam na formação de conjugados com GSH, no transporte intracelular (heme, bilirrubina e ácidos biliares), na biossíntese (leucotrienos e prostaglandinas) e na defesa contra danos oxidativos (GEORGE, 1994).

A atividade da GST foi utilizada como parâmetro para detectar efeitos de vários compostos exógenos. A exposição de peixes a filtros UV (NATARAJ et al., 2020), fungicidas (CONTARDO-JARA; KLINGELMANN; WIEGAND, 2009) e fármacos anti-hipertensivos (REQUE et al., 2021) resultaram em aumento da atividade da GST, enquanto que a exposição a pesticidas (MARINS et al., 2021) e nanomateriais (CIMBALUK et al., 2018) reduziram a sua atividade. Portanto, a

resposta biológica aos xenobióticos pode variar de acordo com o tipo de contaminante.

3.3.3.3 Estresse oxidativo

O potencial de agentes tóxicos e/ou seus metabólitos de interagir com o sistema biológico e induzir o estresse oxidativo e, conseqüentemente promover danos oxidativos tem sido avaliado de forma crescente em estudos de biomonitoramento e bioensaios (VAN DER OOST, BEYER, VERMEULEN, 2003). Nos organismos, o estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre as espécies reativas e os sistemas antioxidantes, o que pode levar a alterações no material genético, membranas biológicas, proteínas, carboidratos e lipídios (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Para a prevenção de danos oxidativos, os seres vivos contam com um sistema de defesa antioxidante enzimático, por exemplo, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), ou ainda por antioxidantes não enzimáticos (TOCHER et al., 2002; SONG et al., 2006).

A CAT é uma das primeiras enzimas antioxidante de defesa contra espécies reativas (ZHENG et al., 2016). A enzima degrada o peróxido de hidrogênio, uma espécie reativa de oxigênio, em água e oxigênio, para evitar os danos oxidativos (GAETANI et al., 1989) ao DNA, RNA, as proteínas, lipídios e membranas celulares. Então, quando os organismos são expostos a agentes que induzem a produção de espécies reativas, a atividade da enzima pode ser alterada (VAN DER OOST, BEYER, VERMEULEN, 2003).

Dentre as estruturas celulares mais suscetíveis a danos causados pelas espécies oxidativas, a membrana plasmática é a mais atingida por meio de um processo de peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO) (HIGUCHI, 2003). Neste processo, os hidroperóxidos se ligam a porção hidrofóbica dos ácidos graxos, o que altera as interações lipídicas e, como resultado, acaba modificando as membranas e as lipoproteínas ali presentes (GIROTTI, 2002). Em consequência, a membrana perde a sua integridade e permeabilidade, o que facilita a entrada destas espécies reativas no interior da célula e a interação com outras estruturas celulares (HIGUCHI, 2003).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 2-ETILHEXIL-4-METOXICINAMATO (EHMC)

O composto avaliado foi o padrão analítico 2-etilhexil-4-metoxicinamato (Número CAS 5466-77-3) da Sigma-Aldrich®. No ensaio de estabilidade e nos bioensaios foram preparadas soluções estoque de $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de EHMC utilizando o etanol P.A. (96%) como solvente. As soluções foram armazenadas no escuro a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ entre os períodos de uso.

4.1.1 Método cromatográfico

A análise química do EHMC foi realizada em um cromatógrafo HPLC-DAD após o ensaio de estabilidade, seguindo o método descrito e validado por Reichert (2021). O cromatógrafo utilizado foi o modelo 1260 infinity com detector de espectroscopia de massas (Agilent, modelo ultivo LC/TQ) e a coluna superficialmente porosa com diâmetro de $2,1 \times 100 \text{ mm} \times 2,7 \text{ micron}$ (infinity lab Poroshell 120 EC-C18).

4.1.2 Ensaio de Estabilidade e Assimilação do EHMC

Para determinar o tempo de reposição do contaminante durante a experimentação foi realizado um ensaio prévio utilizando a concentração intermediária do estudo como parâmetro ($500 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$) e as mesmas condições abióticas dos bioensaios subsequentes (aeração, fotoperíodo e temperatura).

O ensaio foi conduzido em seis recipientes de vidro, três foram completados com 2 L de água filtrada/declorada e, mantidos sob baixa agitação magnética para simular a movimentação dos peixes e manter a molécula na coluna d'água, enquanto os outros três recipientes foram completados com 10 L de água filtrada/declorada e após 24 horas de aeração, adicionados 3 peixes com peso conhecido em cada recipiente. No ensaio foi considerada a proporção de 1 grama de peixe por litro, conforme recomendação de bem-estar animal do CONCEA Resolução nº 34 (2017) e a proporção aproximada a ser utilizada nos bioensaios. Na

sequência, foi adicionada a solução estoque de $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de EHMC, $10 \text{ }\mu\text{L}$ da solução nos recipientes com 2 L de água e $50 \text{ }\mu\text{L}$, nos recipientes com 10 L, para resultar na concentrações-teste de $500 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$. Após, os recipientes foram fechados com papel filme, monitorados para verificar a formação de precipitado e nos intervalos de 15 minutos, 3, 6 e 24 horas foram retiradas amostras de $1,5 \text{ mL}$ da água de exposição para posterior avaliação no cromatógrafo.

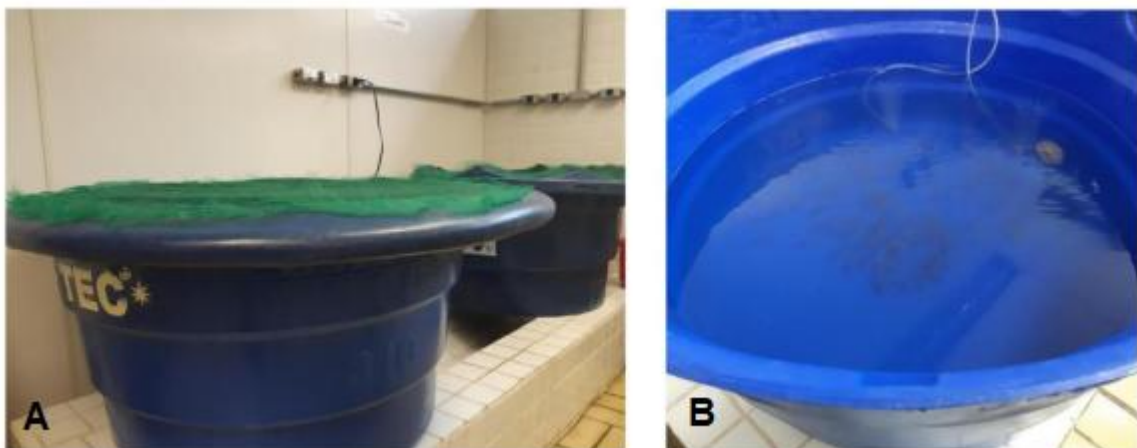
4.2 BIOENSAIO

Os bioensaios iniciaram após a aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), com o protocolo 2019/35 (processo: 23064.054111/2019-13 - Anexo I).

4.2.1 Aquisição e aclimação

Os espécimes de *Oreochromis niloticus* ($n=110$) e *Astyanax altiparanae* ($n=110$) foram adquiridos comercialmente em piscicultura local para a realização de dois bioensaios conduzidos separadamente. A aclimação dos peixes ocorreu no Laboratório de Ecotoxicologia da UTFPR durante 22 dias em tanques de 250 L (Figura 6) e mais 7 dias em aquários de 24 L contendo água filtrada e declorada, sob aeração constante e fotoperíodo natural.

Figura 6 - Aclimação de *Oreochromis niloticus* e *Astyanax altiparanae* em laboratório.



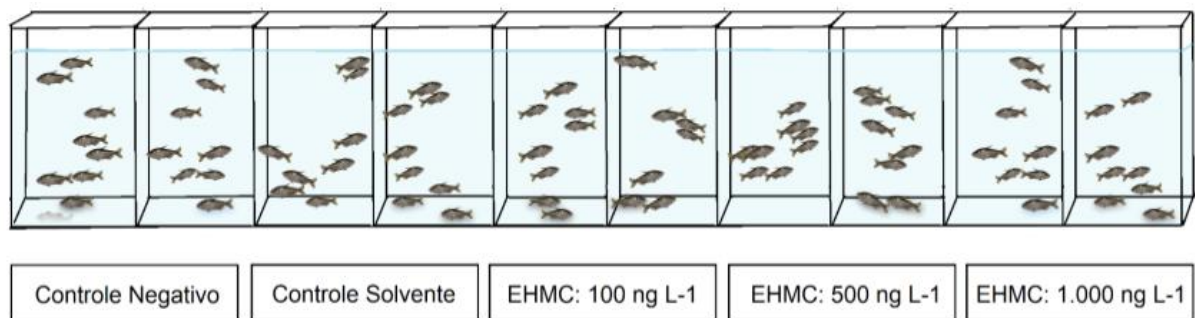
Legenda: (a) os tanques do laboratório no Laboratório de Ecotoxicologia e (b) os peixes durante a aclimação.
Fonte: A autora (2022).

Diariamente foram monitoradas as condições da aclimação (temperatura, pH, mortalidade e a presença/ausência de fungos ou alterações comportamentais dos peixes) e realizada a higienização e a troca parcial da água de clorada dos tanques ou aquários. A alimentação foi realizada três vezes ao dia com ração comercial flutuante contendo 46% de proteínas a 1,7 mm.

4.2.2 Ensaio Subcrônicos

Os bioensaios foram conduzidos separadamente em condições semelhantes às da aclimação (aeração constante, pH, temperatura, fotoperíodo, frequência de alimentação e limpeza). Em cada bioensaio foram estabelecidos cinco grupos de exposição: controle negativo (CN), controle de solvente (CS) e três concentrações ambientalmente relevantes de EHMC (100, 500 e 1000 ng·L⁻¹). Cada grupo experimental foi formado por 2 aquários de 24L contendo 8 indivíduos (n= 16 indivíduos por grupo), totalizando 80 indivíduos em cada bioensaio (Figura 7). Tais grupos foram testados em duplicatas para manter a densidade de estocagem dos aquários adequada (entre 0,5-2 g de peixe para cada L de água), conforme recomendado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA (2017).

Figura 7 - Representação esquemática do bioensaio subcrônico.



Fonte: A autora (2022)

As concentrações de EHMC empregadas nos bioensaios foram escolhidas considerando os valores frequentemente detectados em rios e lagos em estudos de monitoramento ambiental. A menor concentração de exposição (100 ng·L⁻¹) foi estabelecida considerando a faixa de 30 a 101 ng·L⁻¹ de EHMC detectado por Silva,

Emídio e Marchi (2015), Wu et al. (2019), Fent et al. (2010) e Tang et al. (2018); a concentração intermediária ($500 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$) per se; e a concentração mais alta estudada ($1.000 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$) foi baseada na maior concentração detectada por Kameda, Kimura e Miyazaki (2011) de $1.040 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$.

O método para exposição foi o subcrônico, com 22 dias de exposição em um sistema semi-estático com renovação parcial diária de $\frac{3}{4}$ do contaminante e da água. Então, no primeiro dia de contaminação foi preparado uma solução estoque de $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de EHMC solubilizado em etanol P.A. (96%) e pipetado nos aquários dos grupos de exposição 24, 120 e 240 μL da solução em 24 L de água, resultando nas concentrações-teste de 100, 500 e $1.000 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Enquanto que nos demais dias de exposição, foi pipetada a solução estoque proporcionalmente aos $\frac{3}{4}$, ou seja, 18, 90 e 180 μL para resultar nas respectivas concentrações-teste de 100, 500 e $1.000 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$.

4.2.3 Coleta do material biológico

Ao final da exposição, os peixes foram anestesiados em benzocaína 10% para a coleta de dados, como sexagem, peso, comprimento padrão, comprimento total e observações morfológicas. Após, foi coletado o sangue dos peixes por punção cardíaca utilizando um capilar heparinizado para o ensaio cometa e ensaio do micronúcleo pisco. Na sequência, os peixes foram eutanasiados por secção medular para a retirada do rim, que foi usado no ensaio cometa. Os demais tecidos (fígado, músculo e cérebro) foram retirados para a análise dos biomarcadores bioquímicos, e armazenados em ultrafreezer a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.2.4 Biomarcador Somático

Os dados morfométricos coletados de cada indivíduo foram utilizados para calcular o Fator de Condição Fulton (K) (Fulton, 1904), conforme equação:

$$K=W/L^3$$

Onde:

W = peso do indivíduo (g)

L = comprimento total (cm)

4.2.5 Biomarcadores genéticos

4.2.5.1 Genotoxicidade

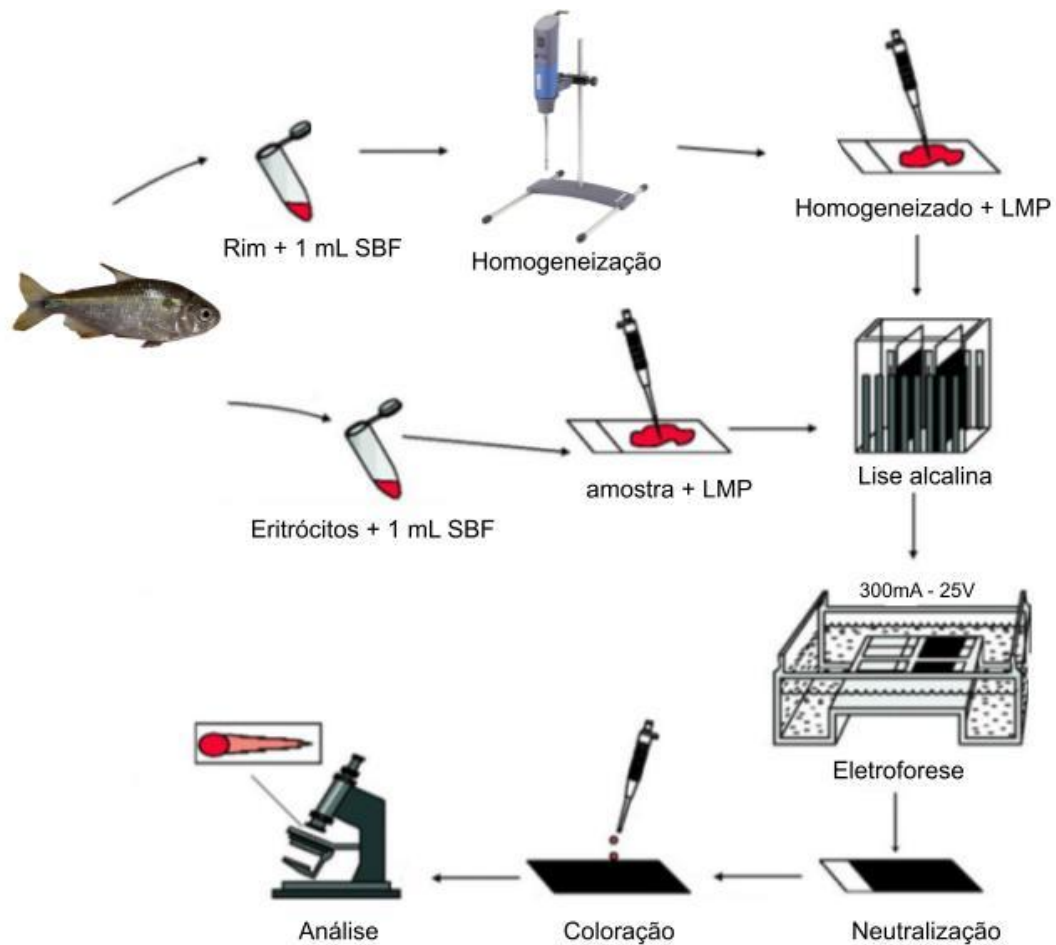
A genotoxicidade foi determinada seguindo o protocolo do ensaio cometa alcalino de Speit e Hartmann (1999), com modificações para eritrócitos por Ferraro et al. (2004) e Cestari et al. (2004) e tecido renal de peixes por Ramsdorf et al. (2009b).

Inicialmente, os eritrócitos e fragmentos de rins coletados dos peixes foram colocados em microtubos contendo 1 mL de soro bovino fetal (SBF), a fim de conservar o material biológico (Ramsdorf et al., 2009a). As amostras de tecido renal imersas em SBF foram homogeneizadas utilizando um desagregador de tecidos modelo ultra-turrax (Meclab). Em seguida, 15 μL de cada amostra foram diluídos em 120 μL de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) para então a suspensão celular ser homogeneizada com micropipeta, adicionada em uma lâmina de microscopia previamente coberta com agarose de fusão normal (1,5%) e coberta com uma lamínula. Após, as lâminas foram mantidas na geladeira por aproximadamente 15 minutos para a solidificação da agarose LMP.

Na próxima etapa, as lamínulas foram removidas cuidadosamente e as lâminas colocadas em cubetas contendo solução de lise uso (triton X100 (1%), DMSO (10%) na solução de lise estoque (NaCl (2,5 M), EDTA (100 mM), Tris (10 mM), NaOH (0,8%), N-lauril-sarcosinato (1%)) por 24 horas a 4°C. Após, as lâminas foram dispostas em uma cuba horizontal e imersas em uma solução tampão de eletroforese gelada alcalina (pH>13; NaOH (10 N) e EDTA (200 mM)) por 25 minutos para desnaturar o DNA, e então, foi realizada a eletroforese a 300mA - 25V por 25 minutos. As etapas seguintes foram três banhos de neutralização em 0,4 M Tris (pH 7,5) e a fixação em álcool etílico P.A. por 10 minutos. Ao final, as lâminas foram coradas usando 20 μL de brometo de etídeo diluído a 20 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ para observação de nucleóides em microscópio de epifluorescência (Leica DMLS2) em aumento de 400 vezes. Todas as etapas do ensaio cometa foram desenvolvidas no escuro.

Os procedimentos descritos para a realização do ensaio cometa, como o preparo de lâmina, corrida eletroforética e coloração, foram esquematizados na Figura 8.

Figura 8 - Esquema dos métodos aplicados no ensaio cometa alcalino.



Fonte: Adaptado de Speit e Hartmann (2006)

Em cada lâmina de peixe, foram classificados cem nucleóides em cinco classes de dano: classe 0 (sem dano), classe 1 (dano mínimo), classe 2 (dano médio), classe 3 (dano intenso) e classe 4 (dano máximo). O score foi calculado multiplicando o total de nucleóides classificados em uma classe pelo número da classe, em seguida foi realizada a somatória das multiplicações, conforme mostra a equação:

$$\text{Score} = (0 \times n) + (1 \times n) + (2 \times n) + (3 \times n) + (4 \times n)$$

onde:

“n” representa o total de danos de uma classe (0, 1, 2, 3 ou 4) avaliados em uma lâmina.

Para melhor avaliação e classificação de danos, foram desconsiderados cometas sobrepostos e também cometas com cabeça pequena, sem a formação de cabeça e com grandes caudas difusas, uma vez que estas características são associadas à morte celular, como apoptose e necrose celular (OLIVE; BANÁTH, 1995).

4.2.5.2 Mutagenicidade

A mutagenicidade foi analisada através do teste do micronúcleo písceo (considerando micronúcleo e alterações morfológicas nucleares) em eritrócitos, seguindo a metodologia de Heddle (1973) e Schmid (1975). O sangue coletado para o teste foi adicionado sobre uma lâmina de microscopia previamente limpa e então, utilizando uma lamínula, foi realizado um esfregaço com as células sanguíneas. As lâminas preparadas foram mantidas em temperatura ambiente para secagem por 24 horas. Após, o material foi fixado em etanol 96% por 30 minutos e esperado o período de “*overnight*” para secagem. Na sequência, o material foi corado com Giemsa 10% (diluído em tampão fosfato pH 6.8) durante 13 minutos, lavado em água corrente para remover o excesso de corante e seco ao ar.

As lâminas foram observadas em microscópio óptico em aumento de 1.000 vezes. Em cada lâmina foram avaliadas e classificadas 2.000 células de acordo com as morfologias nucleares: sem alteração, blebbed, lobed, notched, vacuolated e micronúcleo, descritas por Carrasco, Tilbury, Myers (1990); binucleadas por Fenech et al. (2003) e eightshaped por Furnus et al. (2014).

4.2.6 Biomarcadores bioquímicos

As amostras de órgãos foram pesadas e na sequência homogeneizadas, seguindo uma proporção 1:2 (m/v) de músculo e 1:3 (m/v) de cérebro em tampão fosfato (0,1 mol·L⁻¹, pH 7,5), e proporção 1:3 (m/v) de fígado em tampão fosfato (0,1 mol·L⁻¹, pH 6,5). A homogeneização foi realizada utilizando um desagregador de tecidos modelo ultra-turrax (Meclab). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 20 min a 4° C e o sobrenadante foi separado e armazenado no ultrafreezer (- 80 °C) até a realização dos testes.

As análises dos biomarcadores bioquímicos, como a concentração de proteínas e atividades enzimáticas, foram realizadas em quadruplicatas usando microplacas de 96 poços e a leitora de microplacas FluoStar Omega®.

4.2.6.1 Proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi determinada utilizando o método de Bradford (1976) para normalizar as amostras. Primeiramente foi feita uma curva de calibração utilizando soro de albumina bovina (BSA) nas concentrações de 0, 125, 250, 500, 750 e 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, sendo adicionado 10 μL de BSA para 250 μL de reativo de Bradford diluído em água destilada (1:5) em cada poço da microplaca. Na sequência foram quantificadas as proteínas das amostras, diluindo novamente os homogenatos na proporção 1:20 em seus respectivos tampões (50 μL do homogenato em 950 μL de tampão), e em cada poço da microplaca também foi adicionado o volume 10 μL da amostra diluída para 250 μL de reativo de Bradford diluído (1:5). Durante a leitura, a absorbância foi mensurada a 595 nm.

4.2.6.2 Acetilcolinesterase (AChE)

A atividade da acetilcolinesterase em cérebro e músculo foi determinada baseando-se na metodologia de Ellman et al. (1961) adaptada para microplaca por Silva de Assis (1998).

As amostras homogeneizadas foram diluídas em tampão fosfato (0,1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,5) na proporção 1:5 (100 μL do homogenato em 400 μL de tampão) e agitadas no vórtex. Em cada poço da microplaca foi colocado 50 μL da amostra diluída, 200 μL de reagente DTNB (5,5-ditio-bis-2 nitrobenzoato) e 50 μL de ATC (iodeto de acetiltiocolina) a 9 mM. A absorbância foi medida a 405 nm durante 9 min, a cada 40 s.

4.2.6.3 Glutathiona-S-transferase (GST)

A avaliação da atividade da enzima GST foi realizada seguindo o método de Keen, Habig e Jakoby (1976). Inicialmente, o sobrenadante obtido a partir do fígado foi diluído em tampão fosfato (0,1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 6,5) na proporção 1:4 (100 μL de

homogenato em 300 μ L de tampão). Após, na microplaca foi pipetado 50 μ L da amostra e 150 μ L da solução de reação de GSH (2 mM glutathiona reduzida) e CDNB (2,5 mM 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno). A absorbância foi medida a 340 nm durante 2 minutos, com ciclos de 20 segundos.

4.2.6.4 Catalase (CAT)

A atividade da enzima CAT foi determinada seguindo o método descrito por Aebi (1984) e adaptado para microplaca por Vicentini et al. (2022). O método consiste em medir o quanto do peróxido de hidrogênio foi degradado pela enzima CAT. Para a avaliação, foi adicionado na microplaca de quartzo 5 μ L do sobrenadante do fígado e 295 μ L de solução reação (Tampão Tris 1M / EDTA 5 mM com pH 8,0; 20 mM peróxido de hidrogênio e água destilada). A absorbância foi medida a 240 nm durante 1 minuto, com ciclos de 18 segundos.

4.2.6.5 Peroxidação lipídica (LPO)

A peroxidação lipídica foi avaliada seguindo o protocolo proposto por Jiang et al. (1992). As amostras de fígado homogeneizadas foram diluídas em metanol 90% na proporção 1:2, agitadas em vórtex e levadas para a centrifuga por 20 min a 4°C e 10.000 x g. Após, foi pipetado na microplaca 30 μ L o sobrenadante e 270 μ L a solução de reação (laranja de xilenol 100 32 μ M, H₂SO₄ 25 mM, BHT 4 μ M, sulfato ferroso amoniacal 250 μ M, metanol 90%), e reservada a placa embrulhada em papel alumínio por 30 minutos para posterior leitura em espectrofotômetro a 570 nm.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism ® versão 9 para o conjunto de dados. Primeiramente, foi verificada a normalidade dos dados dos diferentes biomarcadores pelo teste de Shapiro-Wilk. No biomarcador somático, os valores do Fator de Condição de Fulton foram avaliados pelo teste de ANOVA. Nos biomarcadores genéticos, os escores do ensaio cometa e os dados do teste do micronúcleo písceo foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, aplicando o pós-teste de Dunns. Os valores dos ensaios bioquímicos foram

avaliados quanto à normalidade e também de homoscedasticidade (teste de Bartlett), e depois testados ANOVA one-way com pós-teste de Bonferroni.

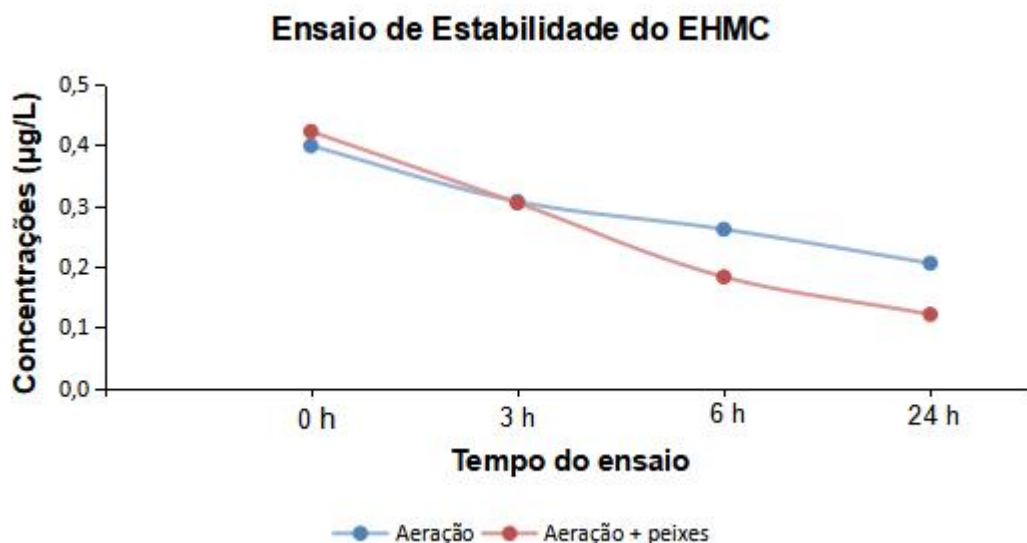
Os resultados obtidos foram apresentados com média \pm desvio para os grupos experimentais (grupos controle negativo, controle solvente e de exposição nas concentrações de 100, 500 e 1.000 ng·L⁻¹ de EHMC) e foram considerados diferentes significativamente quando o valor de $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO ANALÍTICA: ESTABILIDADE DO EHMC

As concentrações do fotoprotetor EHMC na água foram determinadas por HPLC-DAD após 15 minutos, 3, 6 e 24 horas de exposição. No primeiro tempo do ensaio de estabilidade, período que a molécula está sofrendo dissipação no meio aquoso, a concentração nominal estabelecida ($0,500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) apresentou médias de $0,3987 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ nos sistemas com apenas a aeração e $0,4222 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ nos sistemas com aeração e peixes. Em análise, estas concentrações diminuíram após 3, 6 e 24 horas de exposição, com valores consideravelmente menores após as 24 horas nos sistemas com aeração ($0,2053 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e nos sistemas com aeração e peixes ($0,1210 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), conforme mostra a figura 9.

Figura 9 - Análise da estabilidade do EHMC em água.



Legenda: Relação entre as concentrações de EHMC sistemas sem peixes e com aeração (dados em azul) e um sistema com peixes e com aeração (dados em vermelho). Fonte: A autora (2022).

Ao comparar as concentrações de EHMC avaliadas, o sistema com peixes apresentou concentrações mais baixas de fotoprotetor a partir das 6 e 24 horas de ensaio, em relação aos sistemas que receberam apenas a aeração. Em análise, a redução da concentração observada nos sistemas com peixes pode ser um

indicativo de assimilação/absorção das moléculas ou ainda, uma interação entre o fotoprotetor com matéria orgânica e muco secretado diariamente pelos peixes.

As características químicas do EHMC e seu potencial efeito de bioacumulação podem explicar a diferença de concentração detectada nos diferentes tempos dos sistemas. Em ensaios de estabilidade realizados por Pattanaargson e Limphong (2001), Crista (2012) e Gackowska et al., (2014) o EHMC mostrou baixa estabilidade, sofrendo isomerização de EHMC-trans para EHMC-cis logo nas primeiras horas, tanto em condições isoladas, como também em associação com outros filtros UV, aditivos e outras substâncias (exemplo, o cloro). Além disso, o EHMC pode ser metabolizado, ou ainda bioacumulado nos tecidos dos peixes, como mostra o trabalho de Fent (2010), devido às suas características lipofílicas.

Considerando os resultados obtidos no ensaio de estabilidade, foi estabelecido um ensaio semi-estático com a renovação de $\frac{3}{4}$ da água e do fotoprotetor a cada 24 horas para tentar manter a concentração inicial da experimentação.

5.2 BIOENSAIOS

5.2.1 Condições de exposição da espécie *O. niloticus*

No bioensaio utilizando a espécie *O. niloticus*, a temperatura média da água dos aquários foi $22,25 \pm 1,59$ °C e a média do pH, $7,7 \pm 0,25$, com variações de 2°C a menos entre o 11° ao 13° dia. Durante e após a variação da temperatura da água, foi registrada a morte de três indivíduos que apresentaram a doença dos pontos brancos (ictiofitiríase), sendo uma morte no aquário 6 (exposto a $100 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ de EHMC), uma morte no aquário 3 (controle solvente) e uma no aquário 8 (exposto a $500 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ de EHMC). A ictiofitiríase é uma doença comum em espécies de peixes, principalmente no período em que há mudanças de temperatura da água, mas com o manejo e condições adequadas, a própria espécie pode vir a eliminar o parasita, usando como mecanismo de defesa o muco e as células mononucleadas (ROBERTS, 2001).

As condições experimentais as quais os peixes foram submetidos não geraram alterações comportamentais em nenhum dos grupos monitorados. Em bioensaios, a presença de um contaminante pode interferir no comportamento animal (natação, alimentação ou reprodução). Além disso, uma série de condições do ensaio pode influenciar na saúde e fisiologia dos organismos, como o número de organismos por litro de água, frequência de alimentação, iluminação, etc., por isso, foram seguidas as recomendações do CONCEA e de estudos de especialistas em tilápias, na tentativa de evitar ou minimizar estressores que comprometessem os resultados da exposição ao fotoprotetor.

Ao final do bioensaio, a massa corpórea e o comprimento total dos peixes foram avaliados. O peso médio foi de $2,9 \pm 1,06$ g no grupo controle negativo, $3,55 \pm 0,98$ g no grupo controle solvente, $3,26 \pm 1,62$ g no grupo exposto à $100 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$, $2,86 \pm 1,06$ g no grupo exposto à $500 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ e $2,96 \pm 0,92$ g no grupo exposto $1.000 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ do fotoprotetor EHMC. O comprimento total médio foi $5,65 \pm 0,70$ cm no grupo controle, $6,0 \pm 0,64$ cm no grupo controle solvente e $5,85 \pm 0,83$, $5,65 \pm 0,58$ e $5,85 \pm 0,49$ cm respectivamente, nos grupos de exposição a 100, 500 e $1.000 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$. Os valores do peso e comprimento total foram submetidos ao teste de ANOVA e, ao nível 5% de significância, não mostraram diferenças significativas entre os grupos de avaliados.

Neste bioensaio não foi possível determinar o sexo dos peixes devido ao estágio jovem de desenvolvimento dos indivíduos. Segundo Turra (2010), a tilápia não apresenta dimorfismo sexual aparente, então a sexagem é realizada através da avaliação da papila urogenital em indivíduos com a massa superior ou próxima a 100g, na qual as fêmeas possuem três orifícios genitais (ânus, oviduto e uretra) e os machos apenas dois orifícios (ânus e uretra).

5.2.2 Condições de exposição da espécie *A. altiparanae*

No bioensaio usando *A. altiparanae* não foi registrada nenhuma morte durante o ensaio e as condições abióticas se mantiveram constantes ao longo da experimentação ($T = 17 \pm 1,4$ °C e $\text{pH} 7,5 \pm 0,2$).

No final da experimentação, o peso médio dos peixes foi de $2,73 \pm 1,71$ g no grupo controle negativo, $2,055 \pm 1,06$ g no grupo controle solvente, $1,87 \pm 0,62$ g no

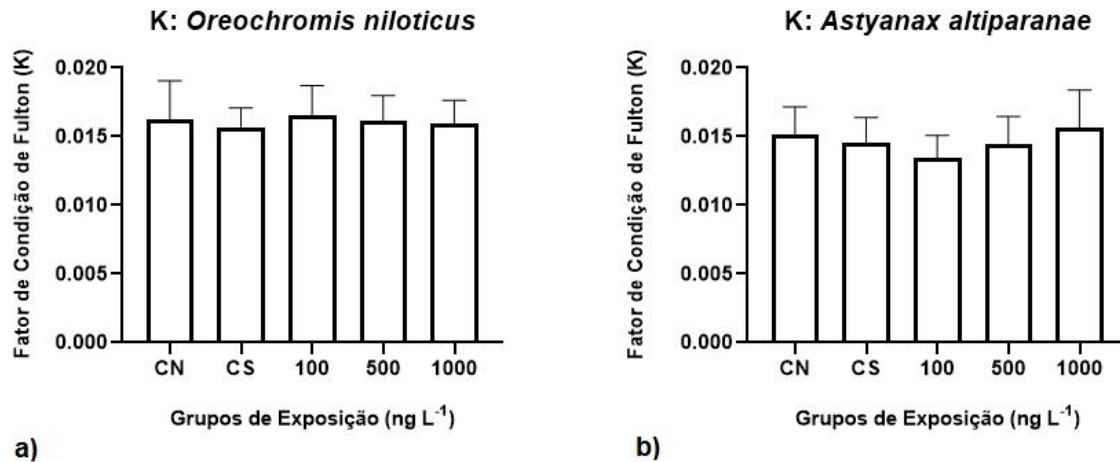
grupo exposto a $100 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$, $1,875 \pm 0,88 \text{ g}$ no grupo exposto a $500 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ e $2,49 \pm 0,87 \text{ g}$ no grupo exposto a $1.000 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ de EHMC. Enquanto a média do comprimento total foi de $5,25 \pm 0,74 \text{ cm}$ no grupo controle negativo, $5,3 \pm 0,61 \text{ cm}$ no grupo controle solvente e $5,15 \pm 0,56$, $5,05 \pm 0,66$ e $5,2 \pm 0,53 \text{ cm}$ nos respectivos grupos de exposição a 100 , 500 e $1.000 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ de EHMC. Avaliando o peso e comprimento dos indivíduos pelo teste de ANOVA ao nível de 5% de significância, os valores não apresentaram diferença estatística entre os grupos de exposição em relação aos grupos controle.

Neste bioensaio foi possível determinar o sexo dos peixes manualmente após o término do bioensaio, analisando a nadadeira anal lisa em fêmeas e, áspera em machos (ALMEIDA, 2007), a fim de caracterizar a proporção de machos e fêmeas utilizados. A porcentagem de fêmeas distribuídas nos aquários foi de 75% no grupo controle negativo e controle solvente, 87% no grupo exposto a $100 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$, 75% no grupo exposto a $500 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ e 81,25 % no grupo exposto a $1.000 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ de EHMC.

5.3 BIOMARCADOR SOMÁTICO

Ao avaliar os dados obtidos dos bioensaios separadamente, os valores do Fator de Condição de Fulton (K) indicaram normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e não apresentaram diferença significativa entre os grupos pelo teste de ANOVA ao nível de significância de 5% para os dois testes ($p > 0,05$). Esses dados indicam que a exposição hídrica subcrônica ao fotoprotetor EHMC e ao solvente não interferiu nas condições fisiológicas das espécies dos dois bioensaios (Figura 10).

Figura 10 - Valores do Fator de Condição de Fulton (K) dos bioensaios de *Oreochromis niloticus* (a) e *Astyanax altiparanae* (b).



Legenda: Os resultados apresentados com média \pm desvio padrão dos grupos: controle negativo (CN), controle solvente (CS) e das concentrações de 100, 500 ou 1000 ng·L⁻¹ de EHMC. Fonte: A autora (2022).

O resultado de K reflete o estado nutricional e de saúde dos peixes, ao correlacionar valores de comprimento e peso (BOLGER; CONNOLLY, 1989). Em avaliação, considerando as concentrações de EHMC testadas e o tempo de exposição, a reserva energética dos indivíduos possivelmente não foi afetada pois o filtro apresenta baixo peso molecular e rápida metabolização, o que pode não interferir/bloquear os tecidos digestório, excretor e outros tecidos que promovam o ganho de massa ou o crescimento; ou ainda, o filtro pode não ter promovido estresse em níveis bioquímico e fisiológico a ponto de interferir na nutrição ou na saúde dos indivíduos.

O fator de condição (K) não foi aplicado em outros estudos que avaliaram a toxicidade do filtro EHMC. Apesar disso, o K foi utilizado para a avaliação do estado nutricional de fêmeas adultas de *Poecilia reticulata* após a exposição a outro tipo de filtro orgânico, a benzofenona-3 (BP-3), nas concentrações de 10, 100 e 1.000 ng·L⁻¹. Neste estudo de Almeida et al. (2019), o filtro BP-3 não foi capaz de alterar a saúde dos indivíduos após as 96 horas do bioensaio. Da mesma forma, o índice de Fulton também foi utilizado em ensaios subcrônicos com a espécie deste trabalho, a espécie *O. niloticus*, para avaliar outros xenobióticos, como o 17 α -Ethinilestradiol a 100 - 400 mg·kg⁻¹ (JUÁREZ-JUÁREZ et al., 2017) e 2,2',4,4'-tetrabromodifenil éter em concentrações de 0.253, 2.53, 25.3 ng·g⁻¹ (LEÃO-BUCHIR et al., 2019); em ambos os ensaios foi constatado diferenças significativas entre o grupo controle e os

grupos de exposição, mostrando que as exposições afetaram a saúde dos indivíduos e que o valor de K é um potencial biomarcador para a espécie.

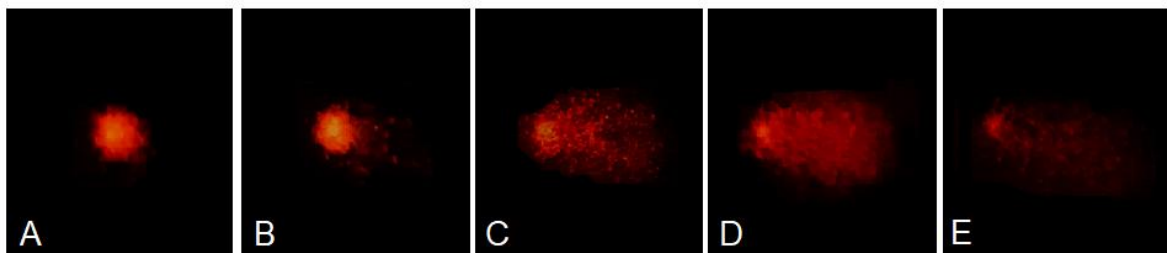
Embora o Fator de Condição de Fulton (K) não seja uma das ferramentas mais sensíveis para avaliar efeitos tóxicos de uma substância em situações de bioensaio, o índice permite o uso de dados simples em escala macro para comparar a saúde e nutrição dos peixes entre os grupos experimentais, complementando outros dados dos experimentos. Deste modo, os valores de K são utilizados em frequentemente em bioensaios de exposição subcrônica/crônica em espécies jovens, como nos estudos de Juárez-Juárez et al. (2017), Leão-Buchir et al. (2019), Almeida et al. (2019) e Huang et al. (2020).

5.4 BIOMARCADORES GENÉTICOS

5.4.1 Genotoxicidade

Os danos ao DNA em eritrócitos e tecido renal de *O. niloticus* e *A. altiparanae* foram avaliados por meio do ensaio cometa alcalino. A figura 11 mostra a classificação dos danos do DNA realizada visualmente utilizando a microscopia de epifluorescência para a determinação da genotoxicidade do EHMC.

Figura 11 - Nucleóides classificados de acordo com o grau de migração do DNA após ensaio cometa.

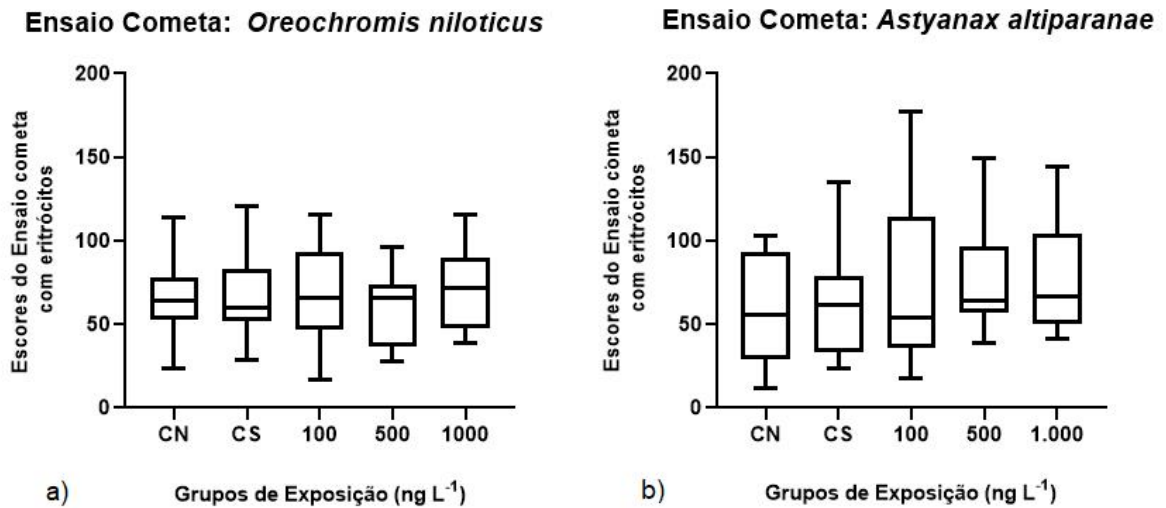


Legenda: Imagens capturadas no microscópio de epifluorescência em aumento de 400 vezes, mostrando (A) classe 0, (B) classe 1, (C) classe 2, (D) classe 3, (E) classe 4. Fonte: A autora (2022).

O EHMC não induziu danos ao DNA em eritrócitos periféricos de *O. niloticus*, não tendo sido observada diferença estatística entre os escores dos grupos de exposição ao filtro solar nas concentrações 100, 500 e 1000 ng·L⁻¹ em relação ao grupo controle solvente e grupo controle negativo. No ensaio com *Astyanax*

altiparanae também não foram observadas diferenças significativas entre os grupos avaliados (Figura 12).

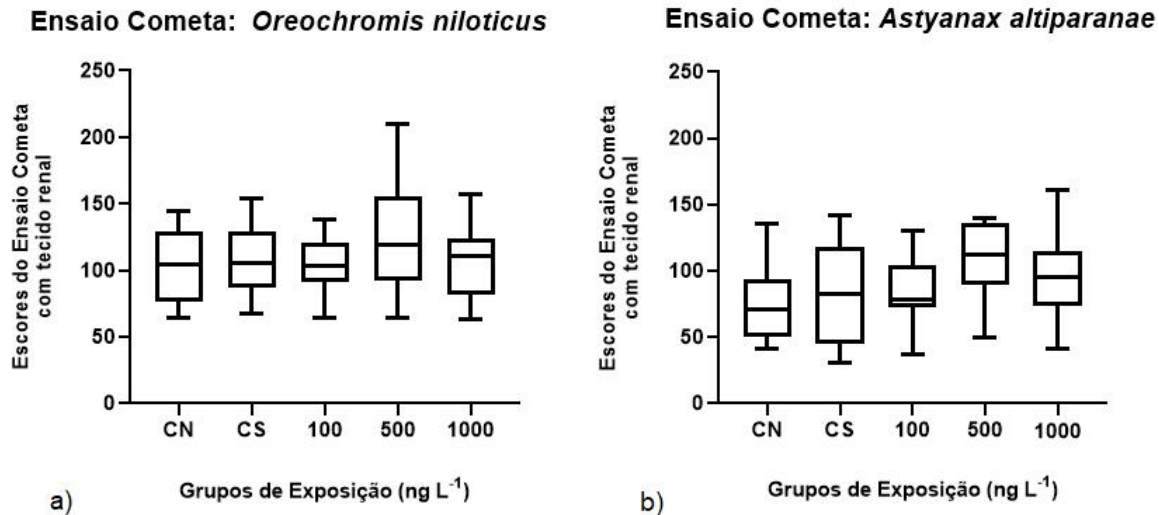
Figura 12 - Escores do ensaio cometa utilizando eritrócitos de *Oreochromis niloticus* (a) e *Astyanax altiparanae* (b).



Legenda: Grupo controle negativo (CN), controle solvente (CS) e das três concentrações ambientalmente relevantes de EHMC em 100, 500 e 1000 ng·L⁻¹. Fonte: A autora (2022).

Na análise dos nucleóides de tecido renal do ensaio cometa também não foi observada diferença significativa nos escores, quando comparados os grupos expostos ao EHMC com grupos controles, tanto para a espécie *O. niloticus*, como para e *A. altiparanae* (Figura 13).

Figura 13 - Escores do ensaio cometa do tecido renal de *Oreochromis niloticus* (a) e *Astyanax altiparanae* (b)



Legenda: Grupo controle negativo (CN), controle solvente (CS) e das três concentrações ambientalmente relevantes de EHMC em 100, 500 e 1000 ng·L⁻¹. Fonte: A autora (2022).

O ensaio cometa é um dos métodos mais adequados para avaliar a atividade de agentes genotóxicos em organismos aquáticos. Neste ensaio são avaliadas quebras de DNA de fita simples/dupla e locais álcali-lábeis induzidas após a exposição a agentes químicos e físicos (SPEIT; HARTMANN, 2006). Os danos ao DNA podem levar a mutações, alteração de bases nitrogenadas, carcinogênese e outros problemas na saúde do organismo (KURELEC, 1993), como também, podem ser reparados parcialmente ou por completo pela maquinaria celular (BEEDANAGARI et al., 2014).

Embora os mecanismos de ação do EHMC sobre o DNA dos organismos expostos ainda não sejam bem estabelecidos, o resultado não genotóxico deste trabalho pode ser explicado partindo de que, nas condições experimentais, o fotoprotetor não aumentou as espécies reativas a ponto de causar danos oxidativos. Além do mais, é possível que em concentrações mais altas ou em um maior tempo de exposição, o EHMC pode apresentar efeitos genotóxicos, pois o filtro estudado é uma molécula lipofílica, o que facilita sua interação com as membranas celulares, levando a alterações químicas e físicas nas mesmas, e permitindo o acesso de radicais livres ao material genético do indivíduo. Segundo Yazar e Gökçek (2018), os

filtros UV orgânicos podem alterar o DNA de células humanas, por meio dos radicais livres.

Os trabalhos publicados sobre os efeitos genotóxicos do EHMC se concentram principalmente em estudos *in vitro* com linhagens de células humanas, como os de Nečasová et al. (2017) e Sharma et al. (2017). Estes estudos usam concentrações mais altas do fotoprotetor, na faixa de $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, uma vez que a exposição humana ao composto é maior pela via dérmica. Sharma et al. (2017), por exemplo, mostraram os efeitos genotóxicos dos isômeros *cis* e *trans* do EHMC por meio do ensaio cometa em células tronco de fígado e linfoblastóides de humano adulto nas maiores concentrações estudadas (1,56 a $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Os resultados dos estudos *in vitro* mostram que o filtro UV pode causar danos genéticos diretos ou indiretos, como a quebra de fitas, formação de adutos de DNA ou morte celular, devido ao estresse oxidativo (YAZAR; GÖKÇEK, 2018; SHARMA et al., 2017).

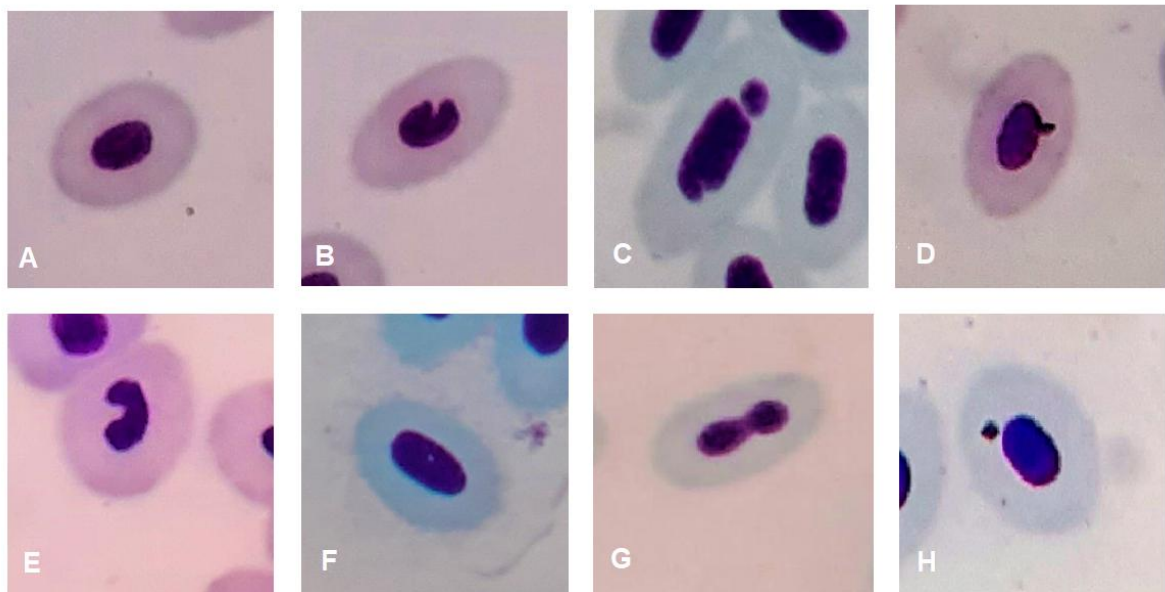
Por outro lado, ainda são escassos os estudos que avaliam a genotoxicidade de fotoprotetores em espécies aquáticas. Almeida e Vieira (2013) usaram o ensaio cometa para avaliar os efeitos genéticos em eritrócitos da espécie *Astyanax* sp. após ensaio agudo (96 horas) e ensaio subcrônico (21 dias) de exposição ao EHMC (10, 100 e $1.000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) combinado com BP-3 (23, 233 e $2.333 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Os resultados obtidos indicaram genotoxicidade em todos os grupos expostos a mistura de EHMC com BP-3 quando comparados aos grupos controle. Além disso, a concentração mais alta dos filtros UV (1.000 e $2.333 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) provocou a morte de alguns indivíduos durante o ensaio crônico. O efeito genotóxico observado pelos autores pode ser resultado da ação dos filtros em mistura, ou ainda, um efeito exclusivo da BP-3, visto que Almeida et al. (2019) observaram danos ao DNA de peixes *P. reticulata* expostos a concentrações baixas de 100 a $1.000 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ após ensaio agudo (96 horas) por meio do mesmo ensaio cometa, e neste trabalho, nenhum efeito genotóxico foi registrado após a exposição subcrônica ao EHMC.

Além do EHMC causar danos a estrutura do DNA em concentrações mais altas de exposição, Nataraj et al. (2022) mostraram que EHMC é capaz de alterar o nível transcricional de genes ligados ao sistema antioxidante e de estresse no fígado de *Danio rerio* em concentração ambientalmente relevante ($3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

5.4.2 Mutagenicidade

Os eritrócitos de *O. niloticus* e *A. altiparanae* apresentaram alterações morfológicas nucleares e micronúcleos após a exposição subcrônica de 22 dias ao fotoprotetor EPMC (Figura 14).

Figura 14 - Classificação dos núcleos de eritrócitos encontrados nas espécies *Oreochromis niloticus* e *Astyanax altiparanae*.

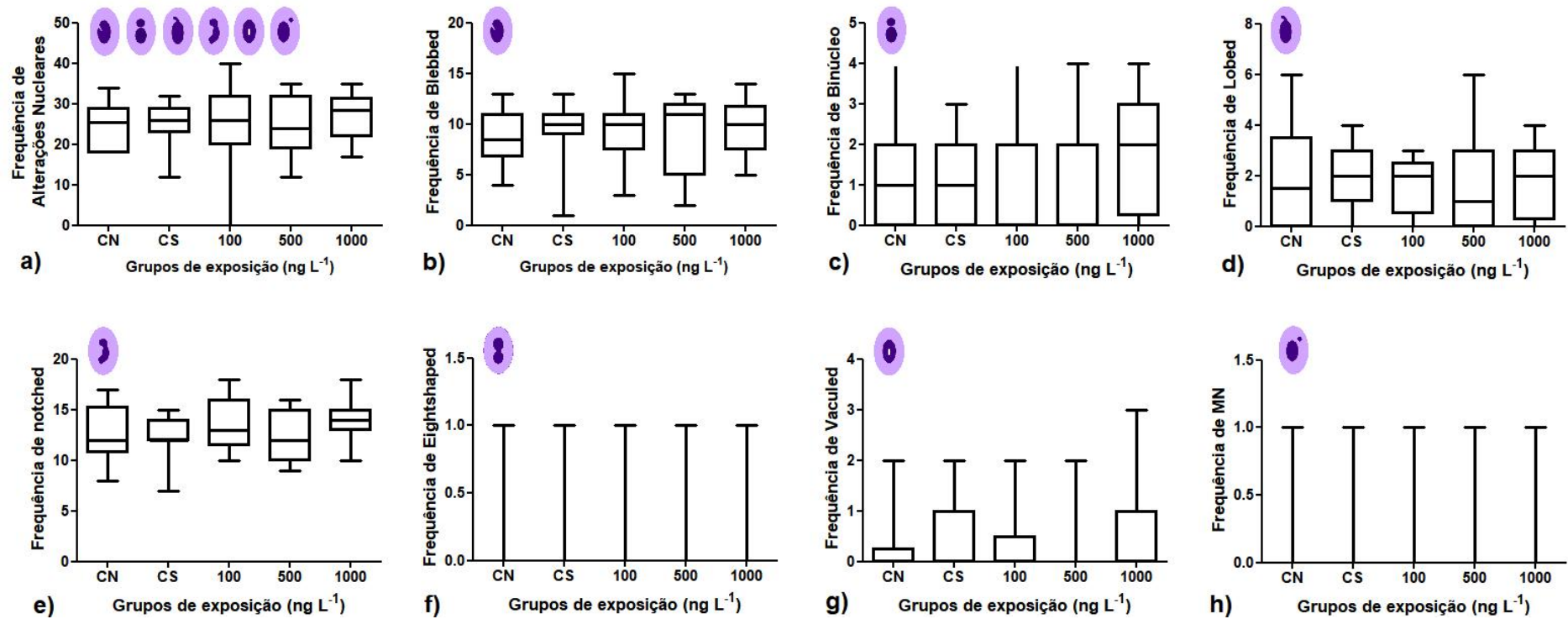


Legenda: Imagens capturadas do microscópio óptico em aumento de 1000x mostram: núcleo sem alteração (A) e núcleos com alterações morfológicas nucleares: blebbed (B), binúcleo (C), lobed (D), notched (E), Vacuolated (F), eightshaped (G) e micronúcleo (H). Fonte: a autora (2022).

As alterações morfológicas nucleares mais frequentes em *O. niloticus* foram notched > blebbed > lobed > binúcleo > vacuolated > eightshaped. Comparando a frequência de alterações nucleares e de MN pelo teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns, não foi constatada diferença significativa entre os grupos avaliados (Figura 15).

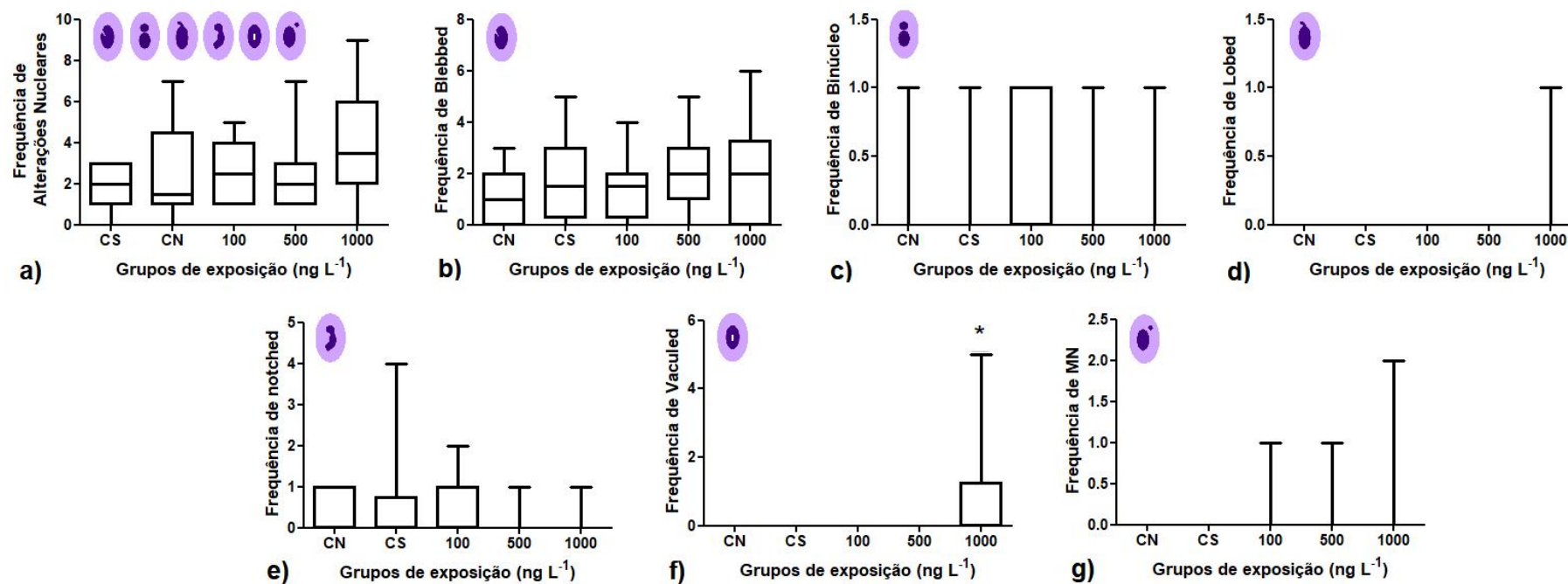
Nos eritrócitos de *A. altiparanae* as alterações nucleares mais observadas foram blebbed > notched > vacuolated > binúcleo > lobed. Os resultados (Figura 16), mostram que a única alteração nuclear com diferença estatística foi a do tipo vacuolated para o grupo exposto a maior concentração do fotoprotetor EPMC a $1.000 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ em relação ao grupo controle negativo ($p = 0,0002$) e grupo solvente ($p = 0,0002$).

Figura 15 - Frequências das alterações morfológicas nucleares e dos micronúcleos de *Oreochromis niloticus* expostos ao EHMC.



Legenda: (CN) controle negativo (CS) controle solvente e as três concentrações ambientalmente relevantes de EHMC em 100, 500 e 1000 ng L⁻¹. Fonte: A autora (2022).

Figura 16 - Frequências das alterações morfológicas nucleares e dos micronúcleos de *Astyanax altiparanae* expostos ao EHMC.



Legenda: (CN) controle negativo (CS) controle solvente e as três concentrações ambientalmente relevantes de EHMC em 100, 500 e 1000 ng·L⁻¹.

* Representa diferença estatística entre os grupos experimentais pelo teste ANOVA ($p < 0,05$). Fonte: A autora (2022).

O teste do micronúcleo písceo, a frequência de MN e de AN, permitem a avaliação dos danos (ao DNA e proteínas responsáveis pelo processo de divisão celular) induzidos por contaminantes. Os MN e AN podem ser formados pela interação entre os grupos eletrofílicos reativos de contaminantes com o DNA do organismo, como também, por processos de metabolização e interação do contaminante. Especificamente neste segundo processo, o contaminante é metabolizado pelo organismo e é transformado em reativos intermediários que podem interagir com o DNA e proteínas (CANEDO; ROCHA, 2021). Em ambos os processos, os reativos do contaminante interferem: no esqueleto fosfodiéster de DNA; nas fitas de DNA; nas enzimas de reparo do DNA (RPA e rad51); na metilação de bases nitrogenadas que causam disfunção do centrômero e do cinetocoro; ou interrompem a síntese de proteínas (tubulina e actina) que são importantes para a separação de cromossomos durante a divisão celular. A formação dos danos é influenciada pelo tipo de contaminante (clastogênico e/ou aneugênico), estágio do ciclo celular (FENECH, 2019) e a espécie estudada.

O teste do micronúcleo písceo mostrou que o EHMC não foi mutagênico nas concentrações estudadas, indicando, novamente, que as condições de exposição não promoveram o aumento de espécies reativas que são capazes de se associar ao DNA ou de causar disfunções no mecanismo de divisão celular. Entretanto, a análise das alterações morfológicas nucleares sugere um potencial efeito genotóxico ou citotóxico do EHMC para *O. niloticus* indicado pelo aumento significativo das alterações do tipo vacuolated.

Até o presente momento não foram encontrados trabalhos que utilizam os parâmetros AN e MN para avaliação da mutagenicidade e genotoxicidade do EHMC em organismos aquáticos, apenas em testes *in vitro* e *in silico* com linhagens de células humanas, em concentrações superiores às detectadas no meio ambiente. Em testes *in silico* realizados por Jentzsch et al. (2016), o EHMC não mostrou ser mutagênico pelo modelo de micronúcleo analisado no software CASE Ultra, porém utilizando diferentes parâmetros de análise com o software Leadscope, o teste prevê que os produtos de fototransformação do EHMC mostram-se capazes de induzir a formação de micronúcleos.

Apesar de existirem poucos estudos que avaliam a genotoxicidade e mutagenicidade de filtros UV, a combinação entre ensaio cometa, teste de alterações morfológicas nucleares e teste de micronúcleo tem se mostrado

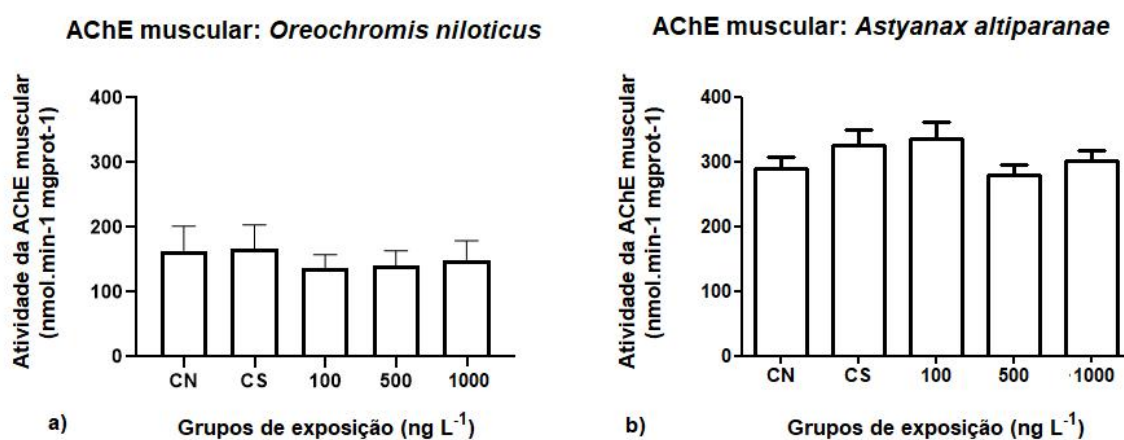
satisfatória para avaliar a toxicidade de outros agentes químicos, como produtos farmacêuticos (NOVAK et al., 2017), agroquímicos (BONY; GAILLARD; DEVAUX., 2010), metais (SHAW et al., 2020), entre outros. Além disso, o método é simples, rápido, exige poucas ferramentas e pouco material biológico para a avaliação.

5.5 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

5.5.1 Neurotoxicidade

A atividade da acetilcolinesterase (AChE) avaliada nos músculos não apresentou diferenças significativas entre os grupos de exposição ao EHMC em relação aos grupos controles nos bioensaios utilizando *O. niloticus* e *A. altiparanae* ($p > 0,05$), como mostra a figura 17.

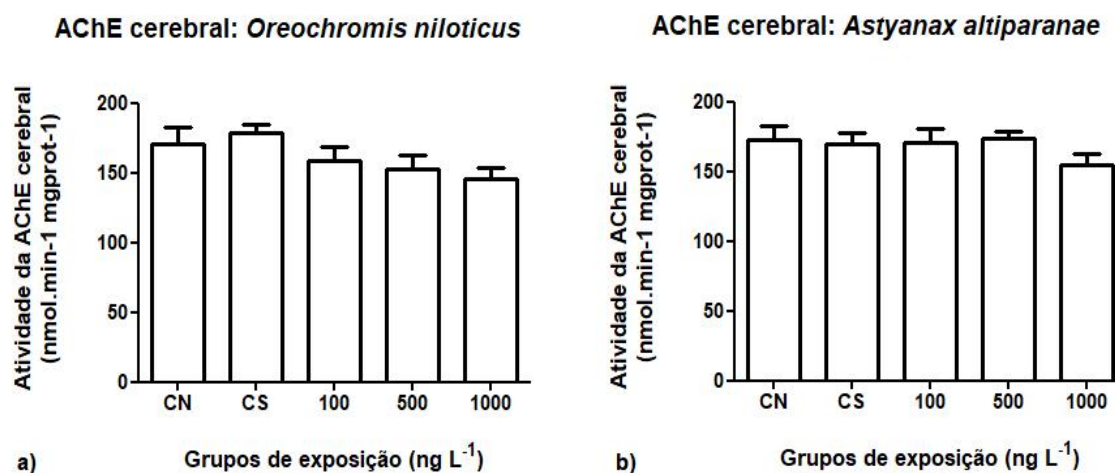
Figura 17 – Análise da atividade da acetilcolinesterase (AChE) dos músculos de *Oreochromis niloticus* (a) e *Astyanax altiparanae* (b) após a exposição subcrônica ao EHMC.



Legenda: (CN) controle negativo (CS) controle solvente e das três concentrações testadas de EHMC em 100, 500 e 1000 ng·L⁻¹. Fonte: A autora (2022).

A atividade da enzima AChE no cérebro (Figura 18) também não foi alterada significativamente, quando comparado os grupos experimentais e os grupos controle negativo e controle do solvente para as espécies estudadas.

Figura 18 - Análise da atividade da acetilcolinesterase (AChE) dos cérebros de *Oreochromis niloticus* (b) e *Astyanax altiparanae* (b) após a exposição subcrônica ao EHMC.



Legenda: (CN) controle negativo (CS) controle solvente e das três concentrações testadas de EHMC em 100, 500 e 1000 ng·L⁻¹. Fonte: A autora (2022).

Os resultados da atividade da AChE têm sido utilizados como um importante biomarcador para detectar a neurotoxicidade de xenobióticos em organismos, uma vez que as alterações na atividade da enzima podem refletir os efeitos do agente tóxico sobre o sistema nervoso e motor. Behra et al. (2002) explicam que a redução da atividade da AChE resultam em acúmulo de acetilcolina (ACh) e da saturação do receptor de acetilcolina (AChR), que gera a ativação contínua do receptor até, finalmente, inativá-lo.

O efeito do agente químico ou físico sob o biomarcador da AChE pode ser diferente de acordo com o tecido avaliado, devido às próprias características da molécula ou pela especificidade do tecido. A diferença de respostas de neurotoxicidade entre os tecidos foi registrada em bioensaios, isto porque no tecido muscular há outra enzima além da AChE, a butirilcolinesterase, que pode atuar preservando a atividade da AChE dos agentes anticolinesterásicos (STURM; DE ASSIS; HANSEN, 1999; KIRBY et al., 2000). Portanto, é interessante a avaliação de mais de um tecido para AChE.

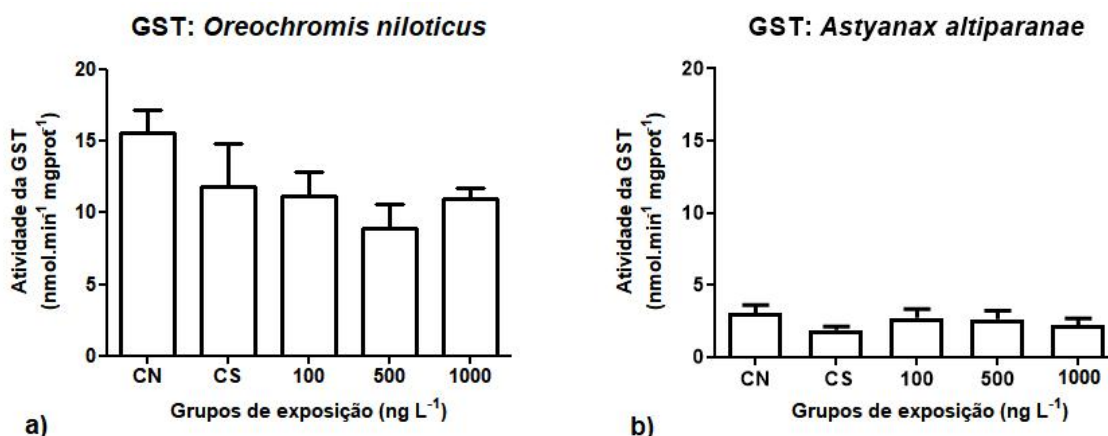
Embora as respostas do biomarcador muscular e cerebral não tenham mostrado efeitos neurotóxicos, em outros estudos que envolveram concentrações mais altas (na faixa de mg·L⁻¹) ou em um período mais longo de exposição, o composto apresentou neurotoxicidade. Nataraj et al. (2020) registraram inibição da

atividade da AChE nos embriões de peixe *Danio rerio* expostos a maior concentração estuda de EHMC ($62 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) após 96 horas.

5.5.2 Biotransformação

O EHMC não foi capaz de alterar significativamente a atividade da enzima glutationa-S-transferase (GST) no fígado das espécies *O. niloticus* e *A. altiparanae* (Figura 19), quando comparado aos grupos controles.

Figura 19 – Análise da atividade da glutationa-S-transferase (GST) em (a) *O. niloticus* e (b) *A. altiparanae* após a exposição ao EHMC.



Legenda: (CN) controle negativo (CS) controle solvente e as concentrações testadas de EHMC em 100, 500 e 1000 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$. Fonte: A autora (2022).

Paula (2019) também não observou alteração na atividade da GST em embriões de *Rhamdia quelen* expostos a 6,1 e 224 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ de EHMC após 96 horas. Sugerindo assim que, em concentrações ambientais, o EHMC não influencia diretamente na via de detoxificação nas condições estudadas.

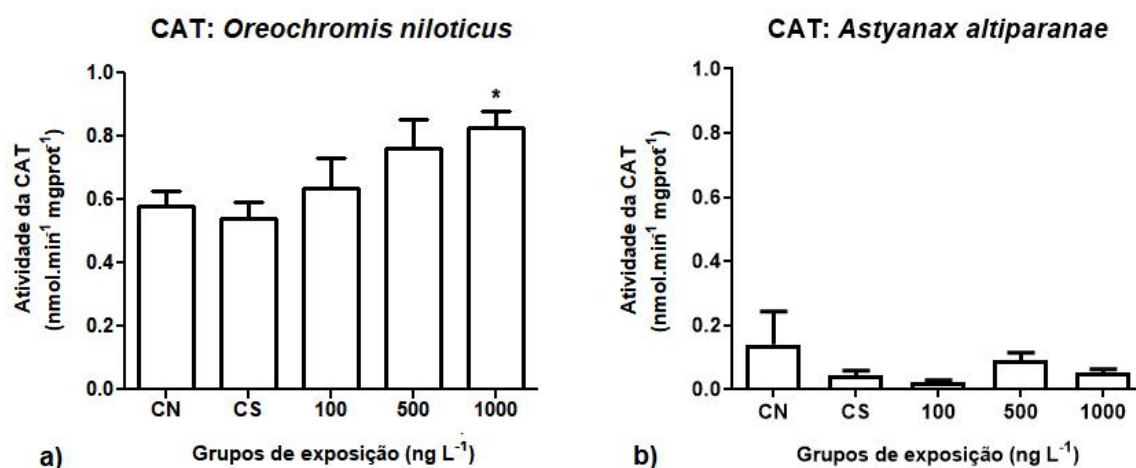
Apesar disso, em outros trabalhos, as exposições a concentrações mais altas do fotoprotetor mostram que ele pode ativar ou inibir a atividade dessa enzima. Nataraj e colaboradores (2020), observaram o aumento da atividade da GST em embriões de *Danio rerio* expostos a $64 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de EHMC em ensaio agudo de 96 horas. Os autores também testaram os efeitos dos fotoprodutos do EHMC, o 2-etilhexanol (2-EH) e o 4-metoxibenzaldeído (4-MBA); que se mostraram mais tóxicos aos embriões, ao reduzir significativamente a atividade da GST em concentrações mais baixas ($0,7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). No estudo, a alteração da GST são respostas dos

diferentes processos de detoxificação e estresse oxidativo causados pelo filtro UV e seus produtos.

5.5.3 Estresse Oxidativo

A atividade da catalase (CAT) medida no fígado aumentou significativamente para o grupo de *O. niloticus* exposto a $1.000 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ de EHMC em relação aos grupos controle negativo e controle solvente. Em relação a atividade da CAT medida na espécie *A. altiparanae*, não foi observada diferença estatística entre os grupos experimentais (Figura 20).

Figura 20 – Análise da atividade da enzima catalase (CAT) em (a) *O. niloticus* e (b) *A. altiparanae* após a exposição ao EHMC.



Legenda: (CN) controle negativo (CS) controle solvente e as concentrações testadas de EHMC em 100, 500 e $1000 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$. Fonte: A autora (2022).

As enzimas CAT são as primeiras a atuar na defesa antioxidante e são excelentes parâmetros de estresse oxidativo (ZHENG et al., 2016). Os filtros UVs tem potencial de induzir o estresse oxidativo por meio da produção de espécies reativas, o que provoca a resposta do sistema antioxidante, a fim de evitar danos oxidativos (LIU et al., 2015).

O EHMC tem sido frequentemente associado ao estresse oxidativo em organismos aquáticos. O aumento da atividade da catalase foi relatado por Paula (2019) após a exposição de embriões de *R. quelen* a $224 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ de EHMC em um ensaio agudo; e por Nataraj et al. (2020) expondo embriões de *Danio rerio* a 6,2 e $12,4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em ensaio agudo; e por Zhou et al. (2019) utilizando *Danio rerio* adulto

para avaliar os efeitos a exposição crônica de 4 meses a 1, 10, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Portanto, é possível indicar que o EHMC é um dos filtros UV que podem induzir a produção de espécies reativas.

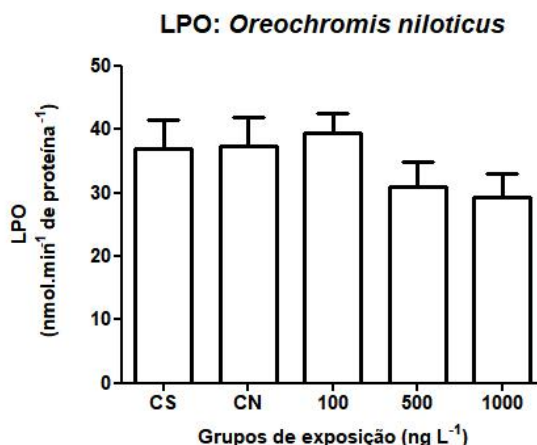
Na estrutura da enzima CAT encontra-se um grupo hematina, que permite a catalisação de peróxido de hidrogênio produzido durante a metabolização, transformando-o em moléculas menos tóxicas (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003, REBARREN-VILLALÓN et al., 2019, SAMANTA et al., 2014; ZHAO et al., 2016). A catalase também pode oxidar agentes tóxicos (álcoois, fenóis, formaldeído e ácido fórmico) quando as concentrações de peróxido de hidrogênio são baixas, por meio da via da peroxidase (SHEN et al., 2020). Apesar disso, a enzima reduz eficientemente apenas o peróxido de hidrogênio, quando comparados a outras peroxidases que conseguem reduzir diferentes peróxidos.

Quando há um aumento das espécies reativas, como o peróxido de hidrogênio, essas tendem a se associar aos ácidos graxos poli-insaturados das membranas, o que modifica as interações lipídicas e causa uma série de reações e lesões na membrana plasmática, a peroxidação lipídica (LPO) (GIROTTI, 2002). Por isso, é importante que a CAT, a primeira enzima de defesa, atue rapidamente contra as espécies reativas.

Considerando que a atividade da enzima CAT foi alterada apenas na espécie *O. niloticus* e não foram observados danos oxidativos, como os danos ao DNA, realizamos um segundo teste para avaliar se o estresse causado pode se propagar em uma série de reações bioquímicas prejudiciais, por meio da análise da peroxidação lipídica (LPO).

A LPO medida no fígado de *O. niloticus* não mostrou diferença significativa entre os grupos controle e grupos de exposição de 100, 500 e 1.000 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ de EHMC (Figura 21). Enquanto para *A. altiparanae*, não foi realizada a análise da peroxidação lipídica devido a quantidade insuficiente de homogenato de fígado.

Figura 21 - Análise da peroxidação lipídica (LPO) em *O. niloticus* após a exposição ao EHMC



Legenda: (CN) controle negativo (CS) controle solvente e as concentrações testadas de EHMC em 100, 500 e 1000 ng·L⁻¹. Fonte: A autora (2022).

O resultado observado da LPO sugere que o fotoprotetor EHMC, nas concentrações estudadas, não foi capaz de promover o aumento de espécies reativas em *O. niloticus* a ponto de desencadear alterações nas membranas. Mostrando que a enzima CAT pode ser necessária para remover o H₂O₂ e manter o equilíbrio nas células.

Apesar disso, em concentrações mais altas que as ambientais, o filtro foi capaz de aumentar a LPO. Nataraj et al. (2020) verificaram o aumento dos níveis de LPO em embriões de *Danio rerio* expostos a 62.000 µg·L⁻¹ de EHMC em ensaio agudo (96 horas), indicando toxicidade induzida por ROS. Cuccaro et al. (2022) também mostraram alterações nos índices de LPO em poliquetas *Ficopomatus enigmaticus* adultos expostos a 10, 100 e 500 µg·L⁻¹ do filtro. Nos bioensaios, o índice de LPO é uma das principais respostas de disfunção celular ou de dano na membrana, que podem permitir danos maiores, como os danos genéticos.

5.6 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE OS BIOENSAIOS

Em estudos ecotoxicológicos o uso de múltiplos biomarcadores permite compreender melhor os processos de toxicidade de xenobióticos (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; MA et al., 2017). Na literatura, os biomarcadores utilizados para avaliar os efeitos da exposição ao fotoprotetor EHMC são mais comuns para organismos de água salgada e para humanos, e principalmente em

concentrações mais altas de exposição. Diferentemente, nesse trabalho foi apresentado os efeitos em espécies de peixes de água doce expostas a concentrações ambientais da molécula.

Dentre as espécies utilizadas, a *O. niloticus* respondeu a exposição de EHMC ($1.000 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$) aumentando a atividade da CAT, mostrando um potencial efeito. Em um estudo de Piancini et al. (2015) utilizando *O. niloticus* e *Geophagus brasiliensis*, a espécie *O. niloticus* também respondeu a concentrações baixas de $1.000 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ de atrazina, indicando ser uma espécie mais sensível quando comparada a *G. brasiliensis*. De modo geral, é interessante comparar as respostas das exposições de agentes químicos utilizando diferentes espécies de peixes, pois o efeito/sensibilidade podem não ser os mesmos (GRAY, 2002; LEWIS; PRYOR; WILKING, 2011). Apesar disso, nota-se que as espécies deste trabalho apresentaram uma resposta basal diferente, a *O. niloticus* apresentou níveis maiores de danos basais genéticos (micronúcleo e alterações nucleares) e bioquímicos (CAT e GST) consideravelmente maiores e em *A. altiparanae* níveis maiores para AChE.

Além disso, baseando-se na experiência com as espécies empregadas nos bioensaios, é possível levantar algumas considerações para trabalhos futuros, pois ambas as espécies ofereceram diferentes vantagens e desvantagens. Dentre as vantagens do bioensaio com *O. niloticus*, podemos citar a fácil aquisição dos peixes ao longo do ano e principalmente, a massa dos órgãos suficiente para a análise de vários biomarcadores bioquímicos ou outros parâmetros; em contrapartida, é uma espécie muito sensível a variações de temperatura, o que pode levar a doenças (SILVA et al., 2019); e a espécie libera muito muco e fezes, logo a frequência de troca de água deve ser maior. Enquanto a *A. altiparanae* vive bem nas diferentes faixas de temperatura; o aquário permanece limpo por mais tempo, pois libera pouco muco; e pode oferecer informações locais por ser uma espécie nativa; entretanto a espécie apresenta desvantagens por possuir órgãos relativamente menores, o que limita a quantidade de análise.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo investigou os efeitos da exposição hídrica subcrônica do fotoprotetor 2-ethylhexyl 4-metoxicinamato nas espécies *Oreochromis niloticus* e *Astyanax altiparanae*, utilizando biomarcadores somático, genéticos e bioquímicos. O perfil toxicológico do filtro foi analisado partindo dos dados dos ensaios de danos diretos e indiretos a molécula de DNA, por meio do ensaio cometa (em eritrócitos e tecido renal), teste do micronúcleo píceo, frequência de alterações morfológicas nucleares, avaliação da catalase (CAT) e da lipoperoxidação (LPO). Além de avaliar as respostas bioquímicas das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e glutathione-S-transferase (GST), e de considerar o fator de condição de Fulton (K) para avaliar a saúde dos indivíduos.

O EHMC em concentrações ambientalmente relevantes não foi tóxico para os parâmetros avaliados nas duas espécies estudadas. Apesar disso, foi observado um potencial efeito genotóxico na espécie *A. altiparanae*, e de estresse oxidativo na espécie *O. niloticus* expostas à maior concentração de EHMC (1.000 ngL^{-1}). Os potenciais efeitos de estresse oxidativo podem estar relacionados às características lipofílicas do filtro. Desta maneira, considerando as características físicas e químicas da molécula e os potenciais efeitos de estresse oxidativo avaliados, é possível que uma exposição de longa duração ou em concentrações mais altas provoque um efeito tóxico diferente.

Por fim, destacamos a necessidade de mais estudos aprofundando mecanismos de ação do filtro em espécies de água doce, uma vez que as pesquisas realizadas focam em concentrações altas da molécula e utilizam comumente espécies marinhas.

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, R. P.; PINHEIRO, J. P. S.; OLIVEIRA L. F.; MARTINEZ C. B. F.; MOREIRA, R. G. Exposure to aluminum, aluminum+ manganese and acid pH triggers different antioxidant responses in gills and liver of *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characiformes: Characidae) males. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 215, p. 33-40, 2019
- ABDELRAHEEM, W. H. M.; HE, X.; DUAN, X.; DIONYSION, D. D. Degradation and mineralization of organic UV absorber compound 2-phenylbenzimidazole-5-sulfonic acid (PBSA) using UV-254 nm/H₂O₂. **Journal of hazardous materials**, v. 282, p. 233-240, 2015.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.
- AFANASIEVA, K.; SIVOLOB, A. Physical principles and new applications of comet assay. **Biophysical chemistry**, v. 238, p. 1-7, 2018.
- AGOSTINHO A. A.; PELICICE F. M.; PETRY A. C.; GOMES L. C.; JÚLIO JR., H. F. Fish diversity in the upper Paraná River basin: habitats, fisheries, management and conservation. **Aquatic Ecosystem Health & Management**, v. 10, n. 2, p. 174-186, 2007.
- ALMEIDA, D. A.; VIEIRA, M. E. L. **Avaliação preliminar da genotoxicidade de filtro solar comercial em *Astyanax sp.*** Trabalho de Conclusão de Curso – Bacharelado em Química. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2013.
- ALMEIDA, R. B. C. ***Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) como modelo biológico de espécie de peixe para exploração zootécnica e biomanipulação.** 119 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.
- ALMEIDA, S. S.; ROCHA, T. L.; QUALHATO, G.; OLIVEIRA, L. A.; AMARAL, L.; CONCEIÇÃO, E. C.; MORAIS, S. M. T.; BAILÃO, E. F. L. C. Acute exposure to environmentally relevant concentrations of benzophenone-3 induced genotoxicity in *Poecilia reticulata*. **Aquatic Toxicology**, v. 216, p. 105293, 2019.
- AL-SABTI, K. Handbook of genotoxic effects and fish chromosomes. **J. Stefan Institute**, P.O.Box 100, Jamova 39. Ljubljana, 1991.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC nº 600**, de 9 de fevereiro de 2022. p. 133, 2022.
- ANDRADE, C. L. R.; C. L.; CARVALHO, D. P.; PIRES, S. F.; PIRES, M. F. Nutrição e alimentação de tilápias do Nilo. **Revista Eletrônica de Nutrição**, v. 12, n. 6, p. 4464-4469, 2015.
- ARMILIATO, N. **Toxicidade Celular e Bioquímica do Glifosato sobre os Ovários do Peixe *Danio rerio*.** 109 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e do Desenvolvimento) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. 1 ed. São Carlos, SP: RiMa, 2004, cap. 5, p. 147 – 152.

BACHELOT, M.; LI, Z.; MUNARON, D.; GALL, P. L.; CASELLAS, C.; FENET, H.; GOMEZ, H. Organic UV filter concentrations in marine mussels from French coastal regions. **Science of the Total Environment**, v. 420, p. 273-279, 2012.

BALLANTYNE, B.; SULLIVAM, J. B. Basic Principles of Toxicology. In: SULLIVAM, J. B.; KRIEGER, G. R. Hazardous material toxicology. **Clinical principles of environmental health**. Baltimore: Willians & Wilkins, p.9-23, 1997

BALMER, M. E.; BUSER, H. R.; MÜLLER, M. D.; POIGER, T. Occurrence of some organic UV filters in wastewater, in surface waters, and in fish from Swiss lakes. **Environmental science & technology**, v. 39, n. 4, p. 953-962, 2005.

BARASSA, B.; CORDEIRO, N. S.; ARANA, S. A new species of Henneguya, a gill parasite of *Astyanax altiparanae* (Pisces: Characidae) from Brazil, with comments on histopathology and seasonality. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 761-765, 2003.

BARŠIENĖ, J.; BJORNSTAD, A.; RYBAKOVAS, A.; ŠYVOKIENĖ, J.; ANDREIKĖNAITĖ, L. Environmental genotoxicity and cytotoxicity studies in mussels and fish inhabiting northern Atlantic zones impacted by aluminum industry. **Ekologija**, v. 56, n. 3, p. 116–123, 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BEEDANAGARI, S.; VULIMIRI, S.; BHATIA, S. V; MAHADEVAN B. Genotoxicity biomarkers: Molecular basis of genetic variability and susceptibility. In: **Biomarkers in toxicology**. Academic Press, 2014. p. 729-742.

BELPAEME, K.; COOREMAN, K.; KIRSCH-VOLDERS, M. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flat fish. **Mutation Research**, v.415, p. 167-184, 1998.

BOLGER, T.; CONNOLLY, P. L. The selection of suitable indices for the measurement and analysis of fish condition. **Journal of Fish Biology**, Southampton, v. 34, n. 2, p.171- 182, 1989.

BOMBAIL, V.; AW, D.; GORDON, E.; BATTY, J. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere**, 44: 383-392, 2001.

BONY, S.; GAILLARD, I.; DEVAUX, A. Genotoxicity assessment of two vineyard pesticides in zebrafish. **International Journal of Environmental and Analytical Chemistry**, v. 90, n. 3-6, p. 421-428, 2010.

BOTELHO, R. G.; MONTEIRO, S. H.; CHRISTOFOLETTI, C. A.; MOURA-ANDRADE, G. C. R.; TORNISIELO, V. L. Environmentally relevant concentrations of atrazine and ametryn induce micronuclei formation and nuclear abnormalities in erythrocytes of fish. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 69, n. 4, p. 577-585, 2015.

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

BRAHAM, R. P.; BLAZER, V. S.; SHAW, C. H.; MAZIK, P. M. Micronuclei and other erythrocyte nuclear abnormalities in fishes from the Great Lakes Basin, USA. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 58, n. 8, p. 570-581, 2017.

BRATKOVICS, S.; WIRTH, E.; SAPOZHNIKOVA, Y.; PENNINGTON, P.; SANGERD, D. Baseline monitoring of organic sunscreen compounds along South Carolina's coastal marine environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 101, n. 1, p. 370-377, 2015.

BRENDLER-SCHWAAB, S.; HARTMANN, A.; PFUHLER, A.; SPEIT, G. The *in vivo* comet assay: use and status in genotoxicity testing. **Mutagenesis**, v. 20, n. 4, p. 245-254, 2005.

BUCHELI, T. B.; FENT, K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. **Critical Reviews in Environmental Sciences and Technology**, 5: 201-268, 1995.

CAHOVA, J.; BLAHOVA, J.; MARSALEK, P.; DOUBKOVA, V.; FRANC, A.; GARAJOVÁ, M.; TICHY, F.; MARES J.; SVOBODOVA, Z. The biological activity of the organic UV filter ethylhexyl methoxycinnamate in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Science of The Total Environment**, v. 774, p. 145570, 2021.

CAMARGO, A. A. Metazoan parasite of lambari *Astyanax altiparanae*, collected from the Peixe river, São Paulo, southeast of Brazil. **Ciência Rural**, v. 46, n. 5, p. 876-880, 2016.

CAMPAGNA, A. F.; FRACÁCIO, R.; RODRIGUES, B. K.; ELER, M. N.; VERANI, N. F.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Analyses of the sediment toxicity of Monjolinho River, São Carlos, São Paulo State, Brazil, using survey, growth and gill morphology of two fish species (*Danio rerio* and *Poecilia reticulata*). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 1, p. 193-201, 2008.

CANEDO, A.; ROCHA, T. L. Zebrafish (*Danio rerio*) using as model for genotoxicity and DNA repair assessments: Historical review, current status and trends. **Science of The Total Environment**, v. 762, p. 144084, 2021.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K.L.; MYERS, M.S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47, n. 11, p. 2123-2136, 1990.

CESTARI, M. M.; LEMOS, P. M. M.; RIBEIRO, C. A. D. O.; COSTA, J. R. M. A.; PELLETIER, E.; FERRARO, M. V.; MANTOVANI, M. S.; FENOCCHIO, A. S. Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, p. 270-274, 2004.

CHRISTEN, V.; ZUCCHI, S.; FENT, K. Effects of the UV-filter 2-ethyl-hexyl-4-trimethoxycinnamate (EHMC) on expression of genes involved in hormonal pathways in fathead minnows (*Pimephales promelas*) and link to vitellogenin induction and histology. **Aquatic Toxicology**, v. 102, n. 3-4, p. 167-176, 2011.

CHU, S.; KWON, R.; LEE, Y. M.; ZOH, K. D.; CHOI, K. Effects of 2-ethylhexyl-4-methoxycinnamate (EHMC) on thyroid hormones and genes associated with thyroid, neurotoxic, and nephrotoxic responses in adult and larval zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 263, p. 128176, 2021.

CIMBALUK, G. V.; RAMSDORF, W. A.; PERUSSOLO, M. C.; SANTOS, H. K. F.; DE ASSIS, H. C. D. S.; SCHNITZLER, M. C.; SCHNITZLER, D. C.; CARNEIRO, P. G.; CESTARI, M. M. Evaluation of multiwalled carbon nanotubes toxicity in two fish species. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 150, p. 215-223, 2018.

CORREIA, T. G.; VIEIRA, V. A. R. O.; DE MORAES NARCIZO, A.; ZAMPIERI, R. A.; FLOETER-WINTER, L. M.; MOREIRA, R. G. Endocrine disruption caused by the aquatic exposure to aluminum and manganese in *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characidae) females during the final ovarian maturation. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 249, p. 109132, 2021.

CRISTA, D. M. A. **Degradação dos filtros UV 4-terc-butil-4 metoxidibenzoilmetano e 2-etilhexil-4-metoxicinamato em águas cloradas**. 2012. 79 f. (Dissertação em Química) Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2012.

Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. Seção I, Resolução Normativa nº 34, de 27 de julho de 2017. Peixes mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica para fins de estudo biológico ou biomédico I - Lambari (*Astyanax*), Tilápia (*Tilapia*, *Sarotherodon* e *Oreochromis*) e Zebrafish (*Danio rerio*)" do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica. 2017.

CONTARDO-JARA, V.; KLINGELMANN, E.; WIEGAND, C. Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes. **Environmental Pollution**, v. 157, p. 57-63, 2009.

CONNELL, D. W.; LAM, P.; RICHARDSON, B.; WU, R. **Introduction to ecotoxicology**. John Wiley & Sons, 2009.

COWARD, K.; BROMAGE, N. R. Reproductive physiology of female tilapia broodstock. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 10, n. 1, p. 1-25, 2000.

CUCCARO, A.; OLIVA, M.; DE MARCHI, L.; SANCHES, M. V.; PITTALUGA, G. B.; MEUCCI, V.; BATTAGLIA, F.; PUPPI, D.; FREITAS, R.; PRETTI, C. Biochemical response of *Ficopomatus enigmaticus* adults after exposure to organic and inorganic UV filters. **Marine Pollution Bulletin**, v. 178, p. 113601, 2022.

DE OLIVEIRA-LIMA, J.; DIAS DA CUNHA, R. L.; DE BRITO-GITIRANA, L. Effect of benzophenone-3 on the blood cells of zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 57, n. 2, p. 81-89, 2022.

DEPLEDGE, M. H. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In: FOSSI, M. C.; LEONZIO C. **Neodestructive Biomarkers in Vertebrates**, Boca Raton, FL: Lewis Publishers, 1994. pp. 271-281.

DESTRO, A. L. F., SILVA, S. B., GREGORIO, K. P., DE OLIVEIRA, J. M., LOZI, A. A., ZUANON, J. A. S.; SALARO, A. L.; DA MATTA, S. L. P; GONÇALVES, R. V. FREITAS, M. B. Effects of subchronic exposure to environmentally relevant concentrations of the herbicide atrazine in the Neotropical fish *Astyanax altiparanae*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 208, p. 111601, 2021.

DÍAZ-CRUZ, M. S.; LLORCA, M.; BARCELÓ, D. Organic UV filters and their photodegradates, metabolites and disinfection by-products in the aquatic environment. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 10, p. 873-887, 2008.

DÍAZ-CRUZ, M. S.; GAGO-FERRERO, P.; LLORCA, M.; BARCELÓ, D. Analysis of UV filters in tap water and other clean waters in Spain. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 402, n. 7, p. 2325-2333, 2012.

DISNER, G. R.; CALADO S. L. M.; ASSIS, H. C. S.; CESTARI, M. M. Toxicity of naphthalene in the neotropical fish *Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae) and *Geophagus brasiliensis* (Perciformes: Cichlidae). **Evidência**, v. 17, n. 1, p. 7-22, 2017.

EDDLESTON, M.; SZINICZ, L.; EYER, P.; BUCKLEY, N. Oximes in acute organophosphorus pesticide poisoning: a systematic review of clinical trials. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 95, n. 5, p. 275-283, 2002.

ELLMAN, G. L.; COUTNEY, K. O.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, 7: 88-95, 1961.

ENCINA, L.; GRANADO-LORENCIO, C. Seasonal changes in condition, nutrition, gonad maturation and energy content in barbel, *Barbus sclateri*, inhabiting a fluctuating river. **Environmental Biology of Fishes**, v. 50, n. 1, p. 75-84, 1997.

ESPINA, N. G.; WEISS, P. DNA repair in fish from polluted estuaries. **Marine Environmental Research**, 39: 309-312, 1995.

FENECH, M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 392, n. 1-2, p. 11-18, 1997.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 455, p. 81-95, 2000.

FENECH, M.; CHANG, W. P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HOLLAND, N.; BONASSI, S.; ZEIGER, E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 534, n. 1-2, p. 65-75, 2003.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 600, n. 1-2, p. 58-66, 2006.

FENECH, M. The micronucleus assay determination of chromosomal level DNA damage. In: **Environmental genomics**. Humana Press, p. 185-216, 2008.

FENECH, M. **Mechanisms by Which and Other Nuclear Anomalies**. p. 8-23. 2019.

FENECH, M. KNASMUELLER, S.; BOLOGNESI, C.; BONASSI, S.; KIRSCH-VOLDERS, M. Micronuclei as biomarkers of DNA damage, aneuploidy, inducers of chromosomal hypermutation and as sources of pro-inflammatory DNA in humans. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 786, p. 108342, 2020.

FENT, K.; KUNZ, P. Y.; ZENKER, A.; RAPP, M. A tentative environmental risk assessment of the UV-filters 3-(4-methylbenzylidene-camphor), 2-ethyl-hexyl-4-trimethoxycinnamate, benzophenone-3, benzophenone-4 and 3-benzylidene camphor. **Marine Environmental Research**, v. 69, p. S4-S6, 2010.

FREIRE, C. A.; SOUZA-BASTOS, L.; CHIESSE, J.; TINCANI, F. H.; PIANCINI, L. D. S.; RANDI, M. A. F.; PRODOCIMO, V.; CESTARI, M. M.; SILVA-DE-ASSIS, H. C.; ABILHOA, V.; VITULE, J. R. S.; BASTOS, L. P.; OLIVEIRA-RIBEIRO, C. A. A multibiomarker evaluation of urban, industrial, and agricultural exposure of small characins in a large freshwater basin in southern Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 13263 -13277, 2015.

FURNUS, G. N. A.; CAFFETTI, J. D.; GARCÍA, E. M.; BENÍTEZ, M. F.; PASTORI, M. C.; FENOCCHIO, A. S. Baseline micronuclei and nuclear abnormalities frequencies in native fishes from the Paraná River (Argentina). **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, p. 217-221, 2014.

FERRARO, M. V. M.; FENOCCHIO, A. S.; MANTOVANI, M. S.; RIBEIRO, C. D. O.; CESTARI, M. M. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, p. 103-107, 2004.

GAETANI, G. F.; GALIANO, S.; CANEPA, L.; FERRARIS, A.M.; KIRKMAN, H.N. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. **Blood**, v.73, p. 334-339, 1989.

GACKOWSKA, A.; PRZYBYŁEK, M.; STUDZIŃSKI, W.; GACA J. Experimental and theoretical studies on the photodegradation of 2-ethylhexyl 4-methoxycinnamate in the presence of reactive oxygen and chlorine species. **Central European Journal of Chemistry**, v. 12, n. 5, p. 612-623, 2014.

GAGO-FERRERO, P.; DÍAZ-CRUZ, M. S.; BARCELÓ, D. UV filters bioaccumulation in fish from Iberian river basins. **Science of the Total Environment**, v. 518, p. 518-525, 2015.

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

GEORGE, S. G. Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes in fish. In: Malins, D.C., Ostrander, G.K. (Eds.), *Aquatic Toxicology; Molecular, Biochemical and Cellular perspectives*. **Lewis Publishers**, CRC press, p. 37 - 85, 1994.

GIROTTI, A. W. Introduction to serial reviews on regulatory and cytoprotective aspects of lipid hydroperoxide metabolism. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 2, p. 153, 2002.

GODOI, F. G.; MUÑOZ-PEÑUELA, M.; GOMES, A. D. O.; TOLUSSI, C. E.; BRAMBILA-SOUZA, G.; BRANCO, G. S.; NOSTRO, F. L.; MOREIRA, R. G. Endocrine disruptive action of diclofenac and caffeine on *Astyanax altiparanae* males (Teleostei: Characiformes: Characidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 231, p. 108720, 2020.

GÓMEZ-REGALADO, M. C; MARTÍN-POZO, L.; CANTARERO-MALAGÓN, S.; HIDALGO, F.; Zafra-Gómez, A. Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of UV filters in marine mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the southern coast of Spain. **Microchemical Journal**, v. 171, p. 106800, 2021.

GONÇALVES, H. L. S. **Diferença na frequência basal de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares em eritrócitos de *Astyanax altiparanae*, *Geophagus brasiliensis*, *Piaractus mesopotamicus*, *Rhamdia quelen*, *Hoplias intermedius* e *Oreochromis niloticus***. 29 f. (Monografia em Biologia) Universidade Federal do Paraná, 2012.

GRACA, W.J.; PAVANELLI, C.S. **Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes**. EDUEM, 2007.

GRAY, J. S. Biomagnification in marine systems: the perspective of an ecologist. **Marine Pollution Bulletin**, v. 45, p. 46-52, 2002.

HAYASHI, Makoto. The micronucleus test—most widely used in vivo genotoxicity test. **Genes and Environment**, v. 38, n. 1, p. 1-6, 2016.

HE, T.; TSUI, M. M. P.; TAN, C. J.; MA, C. Y.; YIU, S. K. F.; WANG, L. H.; CHEN, T. H.; FAN, T. Y.; LAM, P. K. S.; MURPHY, M. B. Toxicological effects of two organic ultraviolet filters and a related commercial sunscreen product in adult corals. **Environmental Pollution**, v. 245, p. 462-471, 2019.

HEDDLE, J. A. A rapid in vivo test for chromosome damage. **Mutation Research**, 18: 187- 192, 1973.

HIGUCHI, Y. Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, n. 8, p. 1527- 1535, 2003.

HOPKINS, Z. R.; BLANEY, L. An aggregate analysis of personal care products in the environment: identifying the distribution of environmentally-relevant concentrations. **Environment international**, v. 92, p. 301-316, 2016.

HUANG, J. N.; WEN, B.; ZHU, J. G.; ZHANG, Y. S.; GAO, J. Z.; CHEN, Z. Z. Exposure to microplastics impairs digestive performance, stimulates immune response and induces microbiota dysbiosis in the gut of juvenile guppy (*Poecilia reticulata*). **Science of the Total Environment**, v. 733, p. 138929, 2020.

HUANG, J. N.; WEN, B.; MENG, L. J.; LI, X. X.; WANG, M. H.; GAO, J. Z.; CHEN, Z. Z. Integrated response of growth, antioxidant defense and isotopic composition to microplastics in juvenile guppy (*Poecilia reticulata*). **Journal of Hazardous Materials**, v. 399, p. 123044, 2020.

HUANG, Y.; LAW, J. C. F.; LAM, T. K.; LEAUNG, K. S. Y. Risks of organic UV filters: A review of environmental and human health concern studies. **Science of The Total Environment**, v. 755, p. 142486, 2021.

JANJUA, N. R.; MOGENSEN, B.; ANDERSSON, A. M.; PETERSEN, J. H.; HENRIKSEN, M.; SKAKKEBÆK, N. E.; WUL, H. C. Systemic absorption of the sunscreens benzophenone-3, octyl-methoxycinnamate, and 3-(4-methyl-benzylidene) camphor after whole-body topical application and reproductive hormone levels in humans. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 123, n. 1, p. 57-61, 2004.

JENTZSCH, F.; OLSSON, O.; WESTPHAL, J.; REICH M.; LEDER C.; KÜMMERER, K.. Photodegradation of the UV filter ethylhexyl methoxycinnamate under ultraviolet light: Identification and in silico assessment of photo-transformation products in the context of grey water reuse. **Science of the Total Environment**, v. 572, p. 1092-1100, 2016.

JIANG, Z. Y.; HUNT, J. V.; WOLFF, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**, v. 202 (2), p. 384-389, 1992.

JUÁREZ-JUÁREZ, V.; ALCÁNTAR-VÁZQUEZ, J. P.; ANTONIO-ESTRADA, C.; MARÍN-RAMÍREZ, J. A.; MORENO-DE LA TORRE, R. Feminization by 17 α -ethinylestradiol of the progeny of XY-female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Effects on growth, condition factor and gonadosomatic index. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 17, n. 3, p. 599-607, 2017.

KAMEDA, Y.; KIMURA, K.; MIYAZAKI M. Occurrence and profiles of organic sun-blocking agents in surface waters and sediments in Japanese rivers and lakes. **Environmental Pollution**, v. 159, n. 6, p. 1570-1576, 2011.

KAHRU, A.; DUBOURGUIER, H. C. From ecotoxicology to nanoecotoxicology. **Toxicology**, v. 269, n. 2-3, p. 105-119, 2010.

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

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities from glutathione S-transferase. **The Journal of Biological Chemistry**, 251: 6183-6188, 1976.

KIRBY, M. F.; MORRIS, S.; HURST, M.; KIRBY, S. J.; NEALL, P.; TYLOR, T.; FAGG, A. The use of acetylcholinesterase activity in flounder (*Platichthys flesus*) muscle tissue as a biomarker of neurotoxic contamination in UK estuarines. **Marine Pollution Bulletin**, v. 40, n. 9, p. 780-791, 2000.

KOBERSTEIN, T.C.R.D. **Alguns aspectos da tilapicultura**. Jaboticabal. 2003. 14p.

KRAUSE, M., KLIT, A., BLOMBERG JENSEN, M., SØEBORG, T., FREDERIKSEN, H., SCHLUMPF, M.; LICHTENSTEIGER, W.; SKAKKEBAEK, N. E.; DRZEWIECKI, K. T. Sunscreens: are they beneficial for health? An overview of endocrine disrupting properties of UV-filters. **International journal of andrology**, v. 35, n. 3, p. 424-436, 2012.

KURELEC, B. The genotoxic disease syndrome. **Marine Environmental Research**, 35: 341- 348, 1993.

LAJCÍKOVÁ, A.; PEKÁREK, L. Ultraviolet Radiation and its Health Impact. **Hygiena**, v. 54, p. 57-61, 2009.

LANGFORD, K. H.; THOMAS, K. V. Inputs of chemicals from recreational activities into the Norwegian coastal zone. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 10, n. 7, p. 894-898, 2008.

LEAO-BUCHIR, J.; FOLLE, N. M. T.; DE SOUZA, T. L.; BRITO, P. M.; DE OLIVEIRA, E. C.; DE ALMEIDA ROQUE, A.; RAMSDORF, W. A.; FÁVARO, L. F.; GARCIA, J. R. E.; NETO, L. E. F. F.; RIBEIRO, C. A. O.; PRODOCIMO, M. M. Effects of trophic 2, 2', 4, 4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) exposure in *Oreochromis niloticus*: A

multiple biomarkers analysis. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 87, p. 103693, 2021.

LEE, E.; OH, E.; LEE, J.; SUL, D.; LEE, J. Use of the tail moment of the lymphocytes to evaluate DNA damage in human biomonitoring studies. **Toxicological Sciences**, v. 81, n. 1, p. 121-132, 2004.

LEE, I.; LEE, J.; JUNG, D.; KIM, S.; CHOI, K. Two-generation exposure to 2-ethylhexyl 4-methoxycinnamate (EHMC) in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and its reproduction and endocrine related effects. **Chemosphere**, v. 228, p. 478-484, 2019.

LEWIS, M.; PRYOR, R.; WILKING, L. Fate and effects of anthropogenic chemicals in mangrove ecosystems: a review. **Environmental Pollution**, v. 159, n. 10, p. 2328-2346, 2011.

LINS, J. A. P. N.; KIRSCHNIK, P. G.; QUEIROZ, V. S.; CIRIO, S. M. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Revista Acadêmica de Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 8, p. 469-484, 2010.

LIU, H.; SUN, P.; LIU, H.; YANG, S.; WANG, L; WANG, Z. Hepatic oxidative stress biomarker responses in freshwater fish *Carassius auratus* exposed to four benzophenone UV filters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 119, p. 116-122, 2015.

LIVINGSTONE, D. R. **Biochemical measurements**. In The effects of stress and pollution on marine animals. Praeger New York. pp. 81-132, 1985.

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, n. 3, p. 687-695, 2006.

LIZAMA, M. A. P.; AMBRÓSIO, A. M. Condition factor in nine species of fish of the Characidae family in the upper Paraná River floodplain. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, p. 113-124, 2002.

MA, B.; LU, G.; LIU, J.; YAN, Z.; YANG, H.; PAN, T. Bioconcentration and multi-biomarkers of organic UV filters (BM-DBM and OD-PABA) in crucian carp. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 141, p. 116-122. 2017.

MACMANUS-SPENCER, L. A.; TSE, M. L.; KLEIN, J. L.; KRACUNAS, A. E. Aqueous photolysis of the organic ultraviolet filter chemical octyl methoxycinnamate. **Environmental science & technology**, v. 45, n. 9, p. 3931-3937, 2011.

MAGALHÃES, D. D. P.; FERRÃO FILHO, A. D. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia brasiliensis**, v. 12, n.3, p. 355-381, 2008.

MAGI, E.; CARRO, M. D.; SCAPOLLA, C.; NGUYEN, K. T. N. Stir bar sorptive extraction and LC MS/MS for trace analysis of UV filters in different water matrices. **Chromatographia**, v. 75, n. 17/18, p. 973-982, 2012.

MAGI, E.; CARRO, M. D.; SCAPOLLA, C.; NGUYEN, K. T. N. Emerging pollutants in aquatic environments: monitoring of UV filters in urban wastewater treatment plants. **Analytical Methods**, v. 5, n. 2, p. 428-433, 2013.

MARINS, A. T.; SEVERO, E. S.; CEREZER, C.; LEITEMPERGER, J. W.; MÜLLER, T. E.; FLORIANO, L. Environmentally relevant pesticides induce biochemical changes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Ecotoxicology**, v. 30, n. 4, pág. 585-598, 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria GM/MS Nº 888, DE 4 de maio de 2021**. p. 127, 2021.

MITCHELMORE, C. L.; CHIPMAN, J. K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 399, n. 2, p. 135-147, 1998.

MØLLER, P. The comet assay: ready for 30 more years. **Mutagenesis**, v. 33, n. 1, p. 1-7, 2018.

MUÑOZ-PEÑUELA, M.; NOSTRO, F. L. L.; GOMES, A. D. O.; TOLUSSI, C. E.; BRANCO, G. S.; PINHEIRO, J. P. S.; DE GODOI, F. G. A.; MOREIRA, R. G. Diclofenac and caffeine inhibit hepatic antioxidant enzymes in the freshwater fish *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characiformes). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 240, p. 108910, 2021.

MURUSSI, C. R.; THORSTENBERG, M. L.; LEITEMPERGER, J.; COSTA, M.; CLASEN, B.; SANTI, A.; LORO, V. L. Toxic effects of penoxsulam herbicide in two fish species reared in Southern Brazil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 92, n. 1, p. 81-84, 2014.

NARLA, S.; LIM, H. W. Sunscreen: FDA regulation, and environmental and health impact. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 19, n. 1, p. 66-70, 2020.

NATARAJ, B.; MAHARAJAN, K.; HEMALATHA, D.; RANGASAMY, B.; RAMESH, N. A. M. Comparative toxicity of UV-filter Octyl methoxycinnamate and its photoproducts on zebrafish development. **Science of the Total Environment**, v. 718, p. 134546, 2020.

NATARAJ, B.; MAHARAJAN, K.; MALAFAIA, G.; HEMALATHA, D.; AHMED, M. A. I.; RAMESH, M. Gene expression profiling in liver of zebrafish exposed to ethylhexyl methoxycinnamate and its photoproducts. **Science of The Total Environment**, v. 826, p. 154046, 2022.

NEČASOVÁ, A; BÁNYIOVÁ, K.; LITERÁK, J.; ČUPR P. New probabilistic risk assessment of ethylhexyl methoxycinnamate: Comparing the genotoxic effects of trans-and cis-EHMC. **Environmental Toxicology**, v. 32, n. 2, p. 569-580, 2017.

NOVAK, ŽEGURA, B.; MODIC, B.; HEATH, E.; FILIPIČ, M. MATJAŽ. Cytotoxicity and genotoxicity of anticancer drug residues and their mixtures in experimental model with zebrafish liver cells. **Science of The Total Environment**, v. 601, p. 293-300, 2017.

OECD. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**. Organization for Economic, 1994.

OGA, S.; CARMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo, 2008.

OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P.; DURAND, R. E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the —cometll assay. **Radiation Research**, 122: 86-94, 1990.

OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P. Sizing highly fragmented DNA in individual apoptotic cells using the comet assay and a DNA crosslinking agent. **Experimental cell research**, v. 221, n. 1, p. 19-26, 1995.

ÖSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 123, p. 291-298, 1985.

PATTANAARGSON, S; LIMPHONG, p. Stability of octyl methoxycinnamate and identification of its photo-degradation product. **International Journal of Cosmetic Science**. Vol. 23, p. 153-160, 2001.

PALM, M. D.; O'DONOGHUE, M. N. Update on photoprotection. **Dermatologic Therapy**, v. 20, n. 5, p. 360-376, 2007.

PARKINSON, A.; OGILVIE, B. W. Biotransformation of xenobiotics. **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons**, v. 7, p. 161-304, 2008.

PATHAK, M. A. Sunscreens and their use in the preventive treatment of sunlight-induced skin damage. **The Journal of dermatologic surgery and oncology**, v. 13, n. 7, p. 739-752, 1987.

PAULA, V. C. S. **Avaliação dos efeitos de fotoprotetores em organismos aquáticos**. 2019. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2019.

PERA, F.; SCHWARZACHER, H. G. Formation and division of binucleated cells in kidney cell cultures of *Microtus agrestis*. **Humangenetik**, v. 6, n. 2, p. 158-162, 1968.

- PIANCINI, L. D. S.; GUILOSKI, I. C.; DE ASSIS, H. S.; CESTARI, M. M. Mesotrione herbicide promotes biochemical changes and DNA damage in two fish species. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 1157-1163, 2015.
- PICO, Y., BELENGUER, V.; CORCELLAS, C.; DÍAZ-CRUZ, M. S.; ELJARRAT, E.; FARRÉ, M.; BARCELO, D. L. Contaminants of emerging concern in freshwater fish from four Spanish Rivers. **Science of the Total Environment**, v. 659, p. 1186-1198, 2019.
- PINHEIRO, J. P. S.; DE ASSIS, C. B.; MUÑOZ-PEÑUELA, M.; JÚNIOR, F. B.; CORREIA, T. G.; MOREIRA, R. G. Water temperature and acid pH influence the cytotoxic and genotoxic effects of aluminum in the freshwater teleost *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characidae). **Chemosphere**, v. 220, p. 266-274, 2019.
- POLLO, F. E.; BIONDA, C. L.; SALINAS, Z. A.; SALAS, N. E.; MARTINO, A. L. Common toad *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) and its importance in assessing environmental health: test of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes. **Environmental monitoring and assessment**, v. 187, n. 9, p. 581, 2015.
- PUNDIR, C. S.; CHAUHAN, N. Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: A review. **Analytical Biochemistry**, v. 429, n. 1, p. 19–31, 2012.
- RAMSDORF, W. A.; DE S. F. GUIMARÃES, F.; FERRARO, M. V.; GABARDO, J.; DA SILVA TRINDADE, E.; CESTARI, M. M. Establishment of experimental conditions for preserving samples of fish blood for analysis with both comet assay and flow cytometry. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 673, n. 1, p. 78-81, 2009a.
- RAMSDORF, W. A.; FERRARO, M. V. M.; OLIVEIRA-RIBEIRO, C. A.; COSTA, J. R. M.; CESTARI, M. M. Genotoxic evaluation of different doses of inorganic lead (PbII) in *Hoplias malabaricus*. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 158, n. 1, p. 77-85, 2009b.
- REICHERT, G. **The potential use of biofilm as a passive sampler of emerging contaminants and antibiotic resistance genes**. 2021. 150 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2021.
- REQUE, R.; CARNEIRO R. D.; YAMAMOTO, F. Y.; RAMSDORF, W. A.; MARTINS, L. R.; GUILOSKIC, I. C.; FREITAS, A. M. Ecotoxicity of losartan potassium in aquatic organisms of different trophic levels. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 87, p. 103727, 2021.
- RITU, R. F.; ISLAM, S. M.; RASHID, H.; HAQUE, S. M.; ZULFAHMI, I.; SUMON, K. A. Application of fenitrothion on *Heteropneustes fossilis* causes alteration in morphology of erythrocytes via modifying hematological parameters. **Toxicology Reports**, v. 9, p. 895-904, 2022.
- ROBERTS, R. J. **Fish pathology**. 3th ed. London: W.B. Saunders, 2001.

RODIL, R.; MOEDER, M. Development of a method for the determination of UV filters in water samples using stir bar sorptive extraction and thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1179, n. 2, p. 81-88, 2008.

RUBIO-VARGAS, D. Á.; RIBEIRO, C. A. O.; NETO, F. F.; CORDEIRO, A. L.; CESTARI, M. M.; SOUZA, A. C.; MARTINS, C. C.; SILVA, C. P.; CAMPOS, S. X.; GARCIA, J. R. E.; PRODOCIMO, M. M. Exposure to pollutants present in Iguazu River Southern Brazil affect the health of *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758): Assessment histological, genotoxic and biochemical. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, p. 103682, 2021.

SÁNCHEZ-QUILES, D.; TOVAR-SÁNCHEZ, A. Are sunscreens a new environmental risk associated with coastal tourism? **Environment international**, v. 83, p. 158-170, 2015.

SANTOS, J. E.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E.; SANTOS, G. B. Reproduction of the catfish *Iheringichthys labrosus* (Lütken) (Pisces, Siluriformes) in Furnas reservoir, Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, p. 193-200, 2004.

SCHLUMPF, M. KYPKE K.; WITTASSEK, M.; ANGERER, J.; MASCHER, H.; MASCHER, D.; VÖKT, C.; BIRCHLER, M.; LICHTENSTEIGER, W. Exposure patterns of UV filters, fragrances, parabens, phthalates, organochlor pesticides, PBDEs, and PCBs in human milk: correlation of UV filters with use of cosmetics. **Chemosphere**, v. 81, n. 10, p. 1171-1183, 2010.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, 31: 9-15, 1975.

SCHLENK, D. Pesticide biotransformation in fish. In: **Biochemistry and molecular biology of fishes**, v. 6, p. 171-190, 2005.

SHARMA, A. BÁNYIOVÁ, K.; VRANA, B.; JUSTAN, I.; ČUPR P. Different DNA damage response of cis and trans isomers of commonly used UV filter after the exposure on adult human liver stem cells and human lymphoblastoid cells. **Science of the Total Environment**, v. 593, p. 18-26, 2017.

SHARMA, R.; JINDAL, R. In vivo genotoxic effects of commercial grade cypermethrin on fish peripheral erythrocytes. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 2022.

SHAW, P.; MONDAL, P.; BANDY A.; CHATTOPADHYAY, A. Environmentally relevant concentration of chromium induces nuclear deformities in erythrocytes and alters the expression of stress-responsive and apoptotic genes in brain of adult zebrafish. **Science of the Total Environment**, v. 703, p. 135622, 2020.

SILVA, B.; DELLA-GIUSTINA, E. G.; MASSAGO H.; MARCHIORI, N. C.; GARCIA, S. Monocultivo de tilápia em viveiros escavados em Santa Catarina. **Sistemas de Produção**, n. 52, p. 126-126, 2019.

SILVA DE ASSIS, H. C. **O uso de biomarcadores para avaliação de poluição aquática**. Tese de doutorado, Universidade Técnica de Berlim, Alemanha, 1998.

SILVA, C. P.; EMÍDIO, E. S.; DE MARCHI, M. R. R. The occurrence of UV filters in natural and drinking water in São Paulo State (Brazil). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 24, p. 19706-19715, 2015.

SINGER, S.; KARRER, S.; BERNEBURG, M. Modern sun protection. **Current opinion in pharmacology**, v. 46, p. 24-28, 2019.

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

SONG, S. B.; XU, Y.; ZHOU, B. S. Effects of hexachlorobenzene on antioxidant status of liver and brain of common carp (*Cyprinus carpio*). **Chemosphere**, v. 65, n. 4, p. 699-706, 2006.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay. In: DNA Repair Protocols. **Human Press**, p. 275-286, 2006.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay (single-cell gel test). In: DNA repair protocols. **Humana Press**, p. 203-212, 1999.

STADNICKA-MICHALAK, J.; SCHIRMER, K.; ASHAUER, R. Toxicology across scales: Cell population growth in vitro predicts reduced fish growth. **Science advances**, v. 1, n. 7, p. 1500302, 2015.

STEIN, H. V.; BERG, C. J.; MAUNG, J. N.; O'CONNOR, L. E.; PAGANO, A. E.; MACMANUS-SPENCER, L. A.; PAULICK, M. G. Photolysis and cellular toxicities of the organic ultraviolet filter chemical octyl methoxycinnamate and its photoproducts. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 19, n. 6, p. 851-860, 2017.

STURM, A.; DE ASSIS, H. C. S.; HANSEN, P. D. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. **Marine Environmental Research**, v. 47, n. 4, p. 389-398, 1999.

SRIVASTAVA, J. P. Pathophysiologic mechanism of erythrocyte morphological alteration in freshwater fish *Channa punctatus* under exposure of nigrosine black (acid black-2 a tanning industry dye). **International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology**, v. 7, p. 1, 2022.

TANG, Z.; HAN, X.; LI, G.; TIAN, S.; YANG, Y.; ZHONG, F.; ZHONG, F.; HAN, Y.; YANG, J. Occurrence, distribution and ecological risk of ultraviolet absorbents in water and sediment from Lake Chaohu and its inflowing rivers, China. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 164, p. 540-547, 2018.

TOCHER, D. R.; MOURENTE, G.; VAN DER ECKEN, A.; EVJEMO, J. O.; DIAZ, E.; BELL, J. G.; OLSEN, Y.. Effects of dietary vitamin E on antioxidant defense mechanisms of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.), halibut (*Hippoglossus*

hippoglossus L.) and sea bream (*Sparus aurata* L.). **Aquaculture Nutrition**, v. 8, n. 3, p. 195-207, 2002.

TRIVEDI, S. P.; RATN, A.; AWASTHI, Y.; GUPTA, N.; KUMAR, M.; TRIVEDI, A. Micronuclei and other nuclear abnormalities in phorate exposed fish, *Channa punctatus*. **Journal of Environmental Biology**, v. 42, n. 5, p. 1221-1231, 2021.

TURRA, E. M.; OLIVEIRA, D. A. A.; TEIXEIRA, E. A.; LUZ, R. K.; PRADO, S. A.; FARIA, P. M. C.; SOUSA, A. B. Controle reprodutivo em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por meio de manipulações sexuais e cromossômicas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 1, p. 21-28, 2010.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57-149, 2003.

VICENTINI, M.; FERNANDES, L. S. P.; MARQUES, A. E. M. L.; OSÓRIO, F. H. T.; BAIKA, L. M.; RISSO, W. E.; MARTINEZ, C. B. R.; GRASSI, M. T.; FÁVARO, L. F.; MELA, M.; CESTARI, M. M.; ASSIS, H. C. S. Effects of cadmium on the female reproductive axis of a Neotropical fish. **Chemosphere**, v. 286, p. 131639, 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. **Environmental Health Criteria**, v. 155, n. 106, p. 82, Geneva, 1993.

WRIGHT, D. A.; WELBOURN, P. **Environmental toxicology**. Cambridge University Press, 2002.

WU, D.; ZHOU, Y.; LU, G.; HU, K.; YAO, J.; SHEN, X.; WEI, L. The occurrence and risks of selected emerging pollutants in drinking water source areas in Henan, China. **International journal of environmental research and public health**, v. 16, n. 21, p. 4109, 2019.

YAZAR, S.; GÖKÇEK, Y. Assessment of in vitro genotoxicity effect of homosalate in cosmetics. **Marmara Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 3, 2018.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. 2 ed. São Carlos: RiMa, 2008.

ZHENG, J. L., YUAN, S. S., WU, C. W., & LV, Z. M. Acute exposure to waterborne cadmium induced oxidative stress and immunotoxicity in the brain, ovary and liver of zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic toxicology**, v. 180, p. 36-44, 2016.

ZHOU, R.; LU, G.; YAN, Z.; JIANG, R.; SHEN, J.; BAO, X. Parental transfer of ethylhexyl methoxy cinnamate and induced biochemical responses in zebrafish. **Aquatic Toxicology**, v. 206, p. 24-32, 2019.

ANEXO 1 – aprovação do projeto pela ceua

IV - CERTIFICADO

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da toxicidade do fotoprotetor 2-elhexil, 4- metoxicinamato em peixes", protocolo nº 35/2019, sob a responsabilidade de WANESSA ALGARTE RAMSDORF NAGATA" que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UTFPR) da UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ, em reunião de 11/02/2020.

CERTIFICATE

The Ethics Commission on Animal Use (CEUA) of Federal University of Technology – Paraná (UTFPR), CERTIFIES that the request herein identified by the protocol number 2019-35, coordinated and under the responsibility of WANESSA ALGARTE RAMSDORF NAGATA" which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, sub-phylum Vertebrata (except human species), for the purposes of scientific research (or teaching), is in accordance with provisions of the Brazilian Law no. 11794 (October 8th, 2008), the Decree nº 6.899 (July 15th, 2009) and with further regulations published by the Brazilian National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA).

Dois Vizinhos, 11 de fevereiro de 2020.

Valter Oshiro Vilela

Presidente da CEUA-UTFPR

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná



Documento assinado eletronicamente por **VALTER OSHIRO VILELA, PRESIDENTE DA COMISSÃO**, em 14/02/2020, às 11:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.utfpr.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1326978** e o código CRC **E3546EA1**.