

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

MYLENA BATHKE ROCHA

**PROSPECÇÃO DA FITOTOXICIDADE E CITOGENOTOXICIDADE DO POLUENTE
EMERGENTE PROPILPARABENO A PLANTAS TERRESTRES: SUBSÍDIOS
PARA DETERMINAÇÃO DO RISCO AMBIENTAL**

CAMPO MOURÃO

2023

MYLENA BATHKE ROCHA

**PROSPECÇÃO DA FITOTOXICIDADE E CITOGENOTOXICIDADE DO POLUENTE
EMERGENTE PROPILPARABENO A PLANTAS TERRESTRES: SUBSÍDIOS
PARA DETERMINAÇÃO DO RISCO AMBIENTAL**

**Prospection of phytotoxicity and cytogenotoxicity of the emerging pollutant
propylparaben to land plants: subsidies for determining environmental risk**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação
apresentado como requisito para obtenção do título
de Bacharel em Engenharia Química da Universidade
Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).
Orientador(a): Ana Paula Peron.

CAMPO MOURÃO

2023



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

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

MYLENA BATHKE ROCHA

**PROSPECÇÃO DA FITOTOXICIDADE E CITOGENOTOXICIDADE DO POLUENTE
EMERGENTE PROPILPARABENO A PLANTAS TERRESTRES: SUBSÍDIOS
PARA DETERMINAÇÃO DO RISCO AMBIENTAL**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação
apresentado como requisito para obtenção do título
de Bacharel em Engenharia Química da Universidade
Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Data de aprovação: 01/dezembro/2023

Ana Paula Peron
Doutorado
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Stephani Caroline Beneti
Doutorado
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Maria Cristina Rodrigues Halmeman
Doutorado
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

CAMPO MOURÃO

2023

RESUMO

O propilparabeno é um éster do ácido 4-hidroxibenzóico na posição C4 com amplo uso pela indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica. Possui função conservante devido às suas propriedades antimicrobianas e antifúngicas. Estudos já demonstraram o potencial carcinogênico do PrP (propilparabeno), porém poucos são os estudos do seu potencial poluidor. Devido à falha das estações de tratamento de água e efluentes em removê-lo, o PrP acumula-se em recursos hídricos e terrestres através da descarga de efluentes e lodos contaminados, tornando-se um contaminante de preocupação emergente. Para verificar se o PrP é tóxico em concentrações ambientalmente relevantes, realizou-se testes de fitotoxicidade em sementes de *Allium cepa* L., *Cucumis sativus* L., *Lycopersicum esculentum* Mill. e *Lactuca sativa* L., além de testes de citogenotoxicidade em raízes de *Allium cepa* L. A diminuição do ICR (Índice de Crescimento Relativo) e IG (Índice de Germinação) em sementes e a diminuição do IM (Índice Mitiótico) em *A. Cepa* conforme o aumento da concentração de PrP demonstraram o potencial fitotóxico e citotóxico desse composto. Além disso, o aumento das alterações celulares como desorganização em prófases e anáfases viscosas em células meristemáticas de *A. Cepa* verificou o seu potencial genotóxico. Tais resultados podem ser usados como ferramentas úteis para a regulamentação do potencial tóxico do propilparabeno em compartimentos ambientais, visto que a legislação atual do país é limitada à quantidade de PrP presente em cosméticos e fármacos, além da sua proibição de uso em alimentos.

Palavras-chave: parabeno; contaminante de preocupação emergente; fitotoxicidade em sementes; citogenotoxicidade em *Allium Cepa* L.

ABSTRACT

Propylparaben is an ester of 4-hydroxybenzoic acid in the C4 position with wide use in the food, cosmetic and pharmaceutical industries. It has a preservative function due to its antimicrobial and antifungal properties. Studies have already demonstrated the carcinogenic potential of PrP (propylparaben), but there are few studies on its polluting potential. Due to the failure of water and wastewater treatment plants to remove it, PrP accumulates in water and land resources through the discharge of contaminated wastewater and sludge, becoming a contaminant of emerging concern. To verify whether PrP is toxic at environmentally relevant concentrations, phytotoxicity tests were carried out on seeds of *Allium cepa* L., *Cucumis sativus* L., *Lycopersicon esculentum* Mill. and *Lactuca sativa* L., in addition to cytogenotoxicity tests on *Allium cepa* L. roots. The decrease in RGI (Relative Growth Index) and IG (Germination Index) in seeds and the decrease in MI (Mitiotic Index) in *A. Cepa* as the concentration of PrP increased, demonstrated the phytotoxic and cytotoxic potential of this compound. Furthermore, the increase in cellular changes such as disorganization in prophases and viscous anaphases in meristematic cells of *A. Cepa* verified its genotoxic potential. Such results can be used as useful tools for regulating the toxic potential of propylparaben in environmental compartments, given that the country's current legislation is limited to the amount of PrP present in cosmetics and pharmaceuticals, in addition to prohibiting its use in food.

Keywords: paraben; contaminant of emerging concern; phytotoxicity in seeds; cytogenotoxicity in *Allium Cepa* L.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	6
2	OBJETIVOS.....	8
2.1	Objetivo geral.....	8
2.2	Objetivos específicos.....	8
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	9
3.1	Propilparabeno.....	9
3.1.1	Estrutura química e propriedades.....	9
3.1.2	Produtos que utilizam propilparabeno.....	12
3.1.3	Legislação de produtos que contêm parabenos.....	12
3.1.4	Legislação de parabenos como poluentes.....	14
3.1.5	Propilparabeno como contaminante de preocupação emergente.....	15
3.2	Testes de toxicidade em <i>Allium cepa</i> L.....	17
3.2.1	Ciclo celular.....	17
3.2.2	Conceitos gerais.....	19
3.2.3	Índice Mitótico.....	21
3.2.4	Aberrações cromossômicas.....	21
3.3	3.3 Testes de fitotoxicidade em sementes.....	23
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1	Materiais.....	25
4.2	Teste de fitotoxicidade com sementes e raízes de <i>A. cepa</i>, <i>C. sativus</i>, <i>L. sculentum</i> e <i>L. sativa</i>.....	25
4.3	Testes de toxicidade em raízes de <i>A. cepa</i>.....	27
4.3.1	Obtenção e enraizamento de bulbos.....	27
4.3.2	Avaliação de citotoxicidade e genotoxicidade.....	28
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1	Análise de fitotoxicidade em sementes.....	30
5.2	Análise de toxicidade em <i>Allium Cepa</i> L.....	31
6	CONCLUSÃO.....	35
	REFERÊNCIAS.....	36

1 INTRODUÇÃO

A adição de aditivos químicos antimicrobianos é muito utilizada por diferentes tipos de indústrias. A sua principal função é inibir o crescimento e germinação de microrganismos como bactérias, fungos e leveduras, impedindo que as características sensoriais e a qualidade do produto sejam afetadas negativamente, resultando em um aumento da vida de prateleira. Na década de 1940, os ésteres do ácido 4-hidroxibenzóico (parabenos) começaram a ser utilizados como conservantes alimentícios em produtos como condimentos, sucos e adoçantes, devido à eficiência em inibir o crescimento de bolores e impedir a proliferação de leveduras (Petrucci *et al.*, 2011). A indústria farmacêutica e de cosméticos também realiza uso frequente dos parabenos como conservantes em diversos produtos sintéticos desde a década de 1920, devido às propriedades antifúngicas e antimicrobianas (Andersen, 2008).

O propilparabeno, derivado do ácido p-hidroxibenzóico na posição C4, classifica-se como um parabeno de cadeia longa e, juntamente com o metilparabeno, encontra-se entre os parabenos mais utilizados pela indústria devido às diversas vantagens que incluem o baixo custo e compatibilidade com diversas matérias primas (Harvey e Everett, 2004). Todavia, estudos evidenciaram que a exposição contínua aos parabenos, mesmo que em baixas concentrações, podem resultar em alterações no sistema endócrino dos vertebrados. Os parabenos também foram encontrados em tumores de mamas e determinados como os responsáveis por alguns casos de infertilidade masculina (Mashile *et al.*, 2019).

A exposição dos parabenos aos humanos ocorre por variadas fontes, desde o consumo de alimentos e fármacos que contenham o composto até a aplicação de produtos como cosméticos diretamente na pele. Também podem-se citar o consumo de água e a exposição pelo contato com água ou ar. Estima-se que a ingestão total de parabenos seja de aproximadamente 76,0 mg/dia para um indivíduo de 60 kg. Considera-se que a exposição pela ingestão de alimentos seja de 1,0 mg/dia; por cosméticos, a 50,0 mg/dia e por fármacos, a 25,0 mg/dia (Soni; Carabin; Burdock, 2005).

O uso generalizado de produtos contendo parabenos resulta no vazamento desse tipo de composto para o ambiente aquático, principalmente através de descargas de tratamento de águas residuais (Molins-Delgado; Díaz-Cruz; Barceló,

2016). O PrP (propilparabeno), ao atingir compartimentos ambientais, classifica-se como um contaminante de preocupação emergente, visto o seu potencial em causar problemas ao ecossistema ao não ser removido totalmente da água por tratamentos convencionais (Gmurek *et al.*, 2015). Wu *et al.* (2017) relataram que o PrP é onipresente na fase aquosa e em lodo de esgoto de estações de tratamentos de água ao redor do mundo. No solo, a contaminação acontece principalmente pela incorporação de lodo de esgoto em solo e pela utilização de águas residuárias para irrigação, bem como pela lixiviação de solos contaminados e pelo despejo de efluentes diretamente no solo. Atualmente, há poucos dados sobre os efeitos adversos desse composto em plantas terrestres (Kim *et al.*, 2020).

Portanto, é necessário verificar se o PrP é tóxico em concentrações ambientalmente relevantes. Os dados fornecidos pela realização dos testes podem ser significativos para a regulamentação do potencial de contaminação do composto estudado. Torna-se relevante a avaliação da toxicidade e do estresse oxidativo do propilparabeno em *Allium cepa* L. (cebola), *Cucumis sativus* L. (pepino), *Lycopersicon esculentum* Mill. (tomate) e *Lactuca sativa* L. (alface) visto que o lodo de estações de tratamento de esgoto destinado à adubação de áreas agrícolas tem em sua composição o propilparabeno e há poucos dados sobre os efeitos adversos de tal composto em plantas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos adversos sistêmicos e celulares causados à *Allium cepa* L., *Cucumis sativus* L., *Lycopersicum esculentum* Mill e *Lactuca sativa* L.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade do propilparabeno em *A. cepa*;
- Avaliar a fitotoxicidade do propilparabeno em sementes de *Allium cepa* L., *Cucumis sativus* L., *Lycopersicum esculentum* Mill e *Lactuca sativa* L.
- Apresentar pesquisas referentes aos efeitos diversos do propilparabeno no meio ambiente.

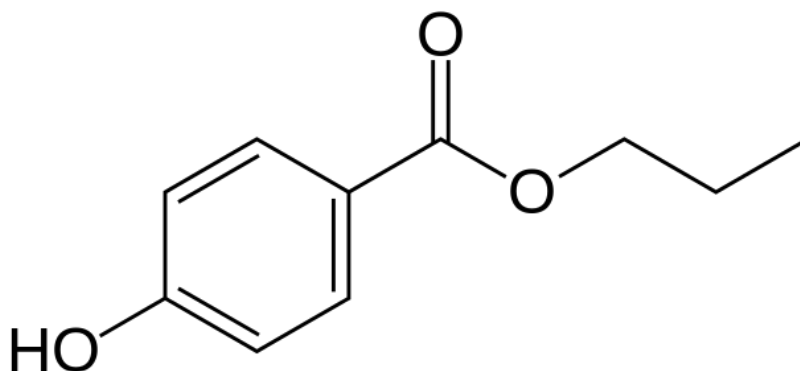
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Propilparabeno

3.1.1 Estrutura química e propriedades

O propilparabeno ($C_{10}H_{12}O_3$) trata-se de um éster do ácido 4-hidroxibenzoico (Figura 1), formado a partir da esterificação do ácido com o n-propanol. Os parabenos ocorrem naturalmente no ambiente, uma vez que certas plantas e bactérias podem sintetizá-los. Porém, o uso comercial de parabenos tem origem sintética. Em sua forma pura, é encontrado na forma de pequenos cristais brancos ou pó cristalino, não tendo odor ou cheiro. Puro ou em mistura com outros parabenos, o propilparabeno é um dos conservantes mais utilizados em produtos alimentícios, cosméticos e fármacos, pois possui alta atividade antimicrobiana, baixo custo, não reage com outros compostos, é estável em uma grande faixa de pH (4,5 a 7,5) e temperatura, solúvel em água, não altera a cor e consistência do produto e seu uso é relativamente seguro (Rastogi *et al.*, 1995; Soni *et al.*, 2005; Guadarrama *et al.*, 2008; Aguilar-Bernier *et al.*, 2012; Terasaki *et al.*, 2012).

Figura 1 - Estrutura molecular do propilparabeno



Fonte: Sigma-Aldrich (2023)

Em soluções aquosas ácidas, os parabenos são estáveis. Em soluções alcalinas, os parabenos são hidrolisados em ácido p-hidroxibenzoico e no álcool correspondente. Geralmente, com o aumento do comprimento da cadeia alquílica, há um aumento da atividade antimicrobiana e uma maior resistência das soluções aquosas de parabenos à hidrólise (Masten, 2005). Assim, as propriedades antimicrobianas do propilparabeno são diretamente proporcionais ao comprimento

da cadeia do grupo éster. Porém, simultaneamente com o aumento do comprimento da cadeia alquílica, o valor do coeficiente de partição octanol-água aumenta, diminuindo a polaridade do composto e tornando-o menos solúvel em água. Ainda que os parabenos de cadeia maior tenham uma maior atividade antimicrobiana, há uma preferência pelo uso de parabenos de cadeia menor (propilparabeno e metilparabeno), por apresentarem maior solubilidade em água, conforme Quadro 1 (Routledge *et al.*, 1998; Jewell *et al.*, 2007).

Quadro 1 - Propriedades do propilparabeno

Propriedades	
Fórmula molecular	C ₁₀ H ₁₂ O ₃
Massa molar (g/mol)	180
P.F. (°C)	97
P.E. (°C)	285,1
Pressão de vapor (Pa)	0,041
Solubilidade em água a 25°C (mg/L)	500
Constante de dissociação (pKa)	8,35
Partição Octanol-Água (Log Pow)	3,04

Fonte: Adaptado de Haman *et al.* (2015)

Na Tabela 1, verifica-se que a propriedade conservante dos parabenos é mais eficiente contra fungos do que bactérias e, em relação às bactérias, é mais eficiente contra bactérias Gram-positivas do que Gram-negativas. Os parabenos possuem pouco efeito sobre os esporos bacterianos e nenhum sobre príons, vírus e micobactérias. A sua eficácia pode ser aumentada quando é feita uma combinação de diferentes parabenos, sendo que a combinação do propilparabeno com o metilparabeno é uma das mais comuns. Além disso, são eficazes em pH neutro e ácido e em soluções alcalinas até pH = 8, ponto em que há uma diminuição de suas funções conservantes (Soni *et al.*, 2002).

Tabela 1 – Concentração mínima inibitória (MIC) do propilparabeno para variados microorganismos

Microorganismo	MIC - % de propilparabeno
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,08
<i>Escherichia coli</i>	0,04
<i>Klebsiella aerogenes</i>	0,04
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,025
Bactéria gram-negativa	
<i>Serratia marcescens</i>	0,04
<i>Proteus vulgaris</i>	0,025
<i>Salmonella enteritidis</i>	0,04
<i>Salmonella typhi</i>	0,06
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,04
<i>Streptococcus haemolyticus</i>	0,04
Bactéria gram-positiva	
<i>Bacillus cereus</i>	0,025
<i>Bacillus subtilis</i>	0,025
<i>Lactobacillus buchneri</i>	0,025
Leveduras	
<i>Candida albicans</i>	0,013
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,013
Fungos	
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	0,02
<i>Penicillium digitatum</i>	0,006
<i>Rhizopus nigricans</i>	0,013

Fonte: Adaptado de Ataman Chemicals (2020)

A ação antimicrobiana do propilparabeno diminui de forma significativa na presença de surfactantes não iônicos devido à micelização. Observou-se a absorção de propilparabeno por plásticos, com a quantidade absorvida dependente do tipo de plástico e do veículo. Substâncias como silicato de alumínio e magnésio, trissilicato de magnésio, óxido de ferro amarelo e azul ultramarino também foram responsáveis pela absorção do propilparabeno, reduzindo a sua eficácia. Além disso, o propilparabeno descolore na presença de ferro e está sujeito à hidrólise por álcalis fracos e ácidos fortes (Aoki *et al.*, 1956; Kakemi *et al.*, 1971; Allwood, 1982; Sakamoto *et al.*, 1987).

3.1.2 Produtos que utilizam propilparabeno

Os parabenos, devido às suas propriedades antimicrobianas, foram primeiramente utilizados em meados da década de 1920 em medicamentos (Liebert, 1984). Atualmente, são conservantes amplamente utilizados, principalmente em cosméticos e produtos farmacêuticos, mas também em alimentos (cerveja, molhos, geléias, sobremesas, lácteos, etc.) e produtos industriais (removedor de manchas, por exemplo). Depois da água, os parabenos são considerados o ingrediente mais comum em cosméticos (Cashman e Warshaw, 2005; Janjua *et al.*, 2007).

Em 2006, a indústria dos Estados Unidos reportou ao FDA (Food and Drug Administration) que o propilparabeno foi utilizado em 7118 produtos de diferentes categorias de cosméticos, um aumento considerável dos 5868 produtos com propilparabeno reportados ao FDA em 1981 (Elder, 1984). Os produtos mais citados foram: produtos destinados a bebês; produtos de banho e higiene pessoal; maquiagens; perfumes; protetores solares; produtos de cabelo; produtos de skincare; produtos de barbear e entre outros (FDA, 2006). Uma estimativa mostrou que o propilparabeno e/ou metilparabeno estão presentes em 48% dos cosméticos e produtos de cuidado pessoal (Masten, 2005).

Um estudo avaliou 35 medicamentos comumente comercializados no Brasil. Nele, verificou-se que os conservantes mais encontrados foram metilparabeno (43%) e propilparabeno (35,6%) (Balbani; Stelzer; Montovani, 2006). Nos anos 2000, vários estudos foram publicados sugerindo atividade estrogênica do propilparabeno (Routledge *et al.*, 1998; Oishi, 2001) e potencial carcinogênico (Darbre *et al.*, 2004). Dessa forma, alguns fabricantes alteraram a composição dos seus produtos cosméticos, substituindo os parabenos por outros conservantes e introduzindo as chamadas fórmulas “sem parabenos” ou “paraben free”, frases comumente vistas em rótulos (Fransway *et al.*, 2019).

3.1.3 Legislação de produtos que contêm parabenos

Embora os parabenos sejam conservantes autorizados, a legislação restringe a sua concentração em alguns casos. A legislação da União Européia e dos Estados Unidos permite o uso do ácido 4-hidroxibenzóico (incluindo seus sais e ésteres) até 0,4% (como ácido) para um único parabeno e 0,8% (como ácido) para misturas de parabenos em cosméticos. A legislação da Dinamarca é a mais

restritiva, com o propilparabeno e o butilparabeno banidos em cosméticos destinados a crianças de até três anos de idade. No Japão, a concentração máxima total de parabenos permitida é de 1,0%. Já o Canadá não apresenta restrição do uso de parabenos em cosméticos (Kirchhof e de Gannes, 2013; Cabaleiro *et al.*, 2014).

O Comitê Científico de Segurança do Consumidor da Comissão Europeia (SCCS) analisou diversas vezes a segurança do uso do propilparabeno. Em março de 2021, o SCCS concluiu que o propilparabeno é seguro ao ser utilizado como conservante em produtos cosméticos em uma concentração máxima de 0,14%. Mesmo que os dados disponíveis sobre o propilparabeno demonstrem potenciais efeitos endócrinos, o SCCS relata que não é o suficiente para classificá-lo como uma substância que possua propriedades desreguladoras do sistema endócrino no corpo humano (SCCS, 2021).

Seguindo a recomendação do SCCS, o Brasil redigiu a RDC nº 528, de 4 de agosto de 2021, responsável por listar as substâncias conservantes permitidas para produtos de higiene, cosméticos e perfumes. Nela, dispõe-se que o propilparabeno (expresso como ácido) deve estar em uma concentração individual máxima de 0,14%. Ao ser misturado com outros parabenos e seus sais, a soma das concentrações individuais não deve ultrapassar 0,8%. A única restrição de uso é para produtos sem enxágüe destinados a crianças menores de três anos, que devem possuir um aviso para não serem aplicados na área da fralda (Brasil, 2021).

Nos Estados Unidos, a FDA (Food and Drug Administration) limitou a utilização do propilparabeno em produtos alimentícios para uma concentração de 0,1% e o classifica como GRAS/FS, significando que o propilparabeno é geralmente reconhecido como seguro para uso em alimentos, todavia, possui limitações em produtos como geléias (0,025%) e proibição de uso para lácteos (FDA, 2023). Em 2006, a EFSA (The European Food Safety Authority) proibiu o propilparabeno como conservante alimentício, com base em um estudo realizado em 2002 que demonstrou a substância como responsável por diminuir a contagem de espermatozoides em ratos jovens (Morrison, 2023). À vista disso, o Brasil emitiu a resolução nº 8, de 20 de fevereiro de 2008, que proíbe o uso do propilparabeno e do propilparabeno de sódio em alimentos (Brasil, 2008).

Um “documento de reflexão” da Agência Europeia de Medicamentos (EMA) de 2015 verificou que as concentrações de propilparabeno em formulações orais de produtos farmacêuticos variam de 0,02% a 0,06%. Conforme à posologia atual de

medicamentos contendo propilparabeno, concentrações de 0,2% e 0,06% equivaleriam à ingestão máxima de 140 mg/dia e 50 mg/dia, respectivamente. Nota-se que a avaliação de risco e a avaliação das propriedades desreguladoras endócrinas para parabenos em produtos farmacêuticos pela EMA baseou-se em todos dados *in vivo* disponíveis que foram gerados para o propilparabeno. Foi concluído que não existiam requisitos de rotulagem para parabenos em fármacos devido à ausência de evidências clínicas suficientes de efeitos relacionados aos parabenos em humanos. Definiu-se um nível de exposição diária permitido de 2 mg/kg/dia a adultos e crianças (EMA, 2015).

3.1.4 Legislação de parabenos como poluentes

A Suíça é o único país do mundo com legislação específica para a liberação de contaminantes de preocupação emergente. A União Europeia (UE) não apresenta legislação especial para descargas desses contaminantes, apesar das diretivas referentes à qualidade da água. A diretiva nº 76/464 do Conselho das Comunidades Europeias (ECC) determina regras para as descargas de substâncias perigosas e para a poluição de matrizes aquáticas, abrangendo alguns grupos de compostos. A diretiva (ECC) nº 80/68 regula as políticas para substâncias perigosas relacionadas com as águas subterrâneas. Em ambas, os parabenos não estão diretamente envolvidos, todavia, podem ser incluídos no grupo das “substâncias cancerígenas” (ECC, 1976; ECC; 1979; Rizzo *et al.*, 2019).

A diretiva (UE) nº 75/2010 estabelece diretrizes para emissões industriais e apresenta os compostos que são considerados poluentes do ar e da água. Os parabenos não são considerados poluentes diretos, mas podem estar indiretamente no grupo dos poluentes classificados como substâncias cancerígenas e substâncias que alteram a demanda química de oxigênio (DQO) e a demanda bioquímica de oxigênio (DBO). A mesma diretiva indica que as substâncias presentes na diretiva nº 60/2000 da Comunidade Europeia (CE) são considerados poluentes hídricos, porém, sem a inclusão dos parabenos (UE, 2010; EC, 2000).

A diretiva (ECC) nº 271/91 apresenta parâmetros de descarga para estações de tratamento de águas residuais urbanas, além dos critérios de identificação de “zonas sensíveis”, onde as regras de descarga são mais restritas, e algumas indicações de amostragem. A UE possui uma lista de compostos a monitorizar desde 2015. Em 2018, a lista foi atualizada pela Decisão n.º 840/2018, incluindo

atualmente 15 compostos, mas os parabenos não fazem parte dela. Apesar das considerações da União Europeia, a Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA) considera os parabenos como um contaminante de preocupação emergente (EEC, 1991; Frontistis *et al.*, 2017; UE, 2018; Souza *et al.*, 2019)

No Brasil, há uma classificação realizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) juntamente com o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) que visa classificar diferentes compostos em relação ao seu potencial de periculosidade ambiental: altamente perigoso (classe I); muito perigoso (classe II); perigoso (classe III) e pouco perigoso (classe IV). Os critérios utilizados para análise são: características físico-químicas, toxicidade, bioacumulação, persistência e potencial de deslocamento no meio ambiente. À vista disso, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) classificou o propilparabeno como Classe IV, ou seja, de pouca preocupação aos riscos ambientais (Brasil, 2013).

3.1.5 Propilparabeno como contaminante de preocupação emergente

Os denominados contaminantes de preocupação emergente vêm recebendo grande enfoque por diversos pesquisadores ao redor do mundo, podendo sua origem ser antrópica ou por ocorrências naturais. Tais compostos podem ser prejudiciais ao ecossistema e não há uma legislação específica que regule a monitoração de seus potenciais riscos. Dessa forma, torna-se necessário a realização de estudos e testes para a análise de diversos fatores: toxicidade do composto no meio ambiente, potencial risco à saúde da população, potencial de bioacumulação, transporte e destino nos variados compartimentos ambientais. Além disso, a determinação da quantidade lançada e presente do composto no meio ambiente também deve ser objeto de pesquisa. Dependendo dos resultados obtidos, haverá a possibilidade de uma legislação vigente para o contaminante de preocupação emergente em estudo (Montagner; Vidal; Acayaba, 2017).

O propilparabeno classifica-se como um contaminante de preocupação emergente ao atingir o meio ambiente. De forma geral, os parabenos são parcialmente excretados ao não serem metabolizados pelo corpo humano e, em seguida, liberados nas águas residuárias. Outras origens incluem banho, lavanderia e descarte de produtos que contenham parabenos (Wang e Kannan, 2016; Nowak *et al.*, 2018; Shin *et al.*, 2019). A descarga direta de resíduos não tratados, vazamentos

de redes municipais de resíduos e aterros sanitários também são responsáveis pela liberação de parabenos (Haman *et al.*, 2015).

As taxas de remoção de parabenos de estações de tratamento de esgoto, especialmente em sistemas aeróbicos, são geralmente elevadas. A degradação está associada ao comprimento da cadeia de carbono dos parabenos. Compostos com a cadeia mais curta, como metilparabeno e etilparabeno, podem atingir até 99% de degradação em 2,1 dias. Entretanto, compostos de cadeia mais longa como propilparabeno e butilparabeno podem levar cerca de 3,7 e 4,5 dias para atingir o mesmo nível de degradação (Gonzalez-Marino *et al.*, 2011). Apesar dos avanços tecnológicos, as estações de tratamento convencionais não são apropriadas para a remoção de compostos como os parabenos, gerando resíduos contendo altas concentrações de contaminantes persistentes ou produtos quimicamente instáveis. Assim, os parabenos são omnipresentes nas ETE's (Matamoros; Rodríguez; Albaigés, 2016; Vale *et al.*, 2022).

Em estudos referentes à quantificação de parabenos, as concentrações de propilparabeno observadas variaram de 40,4 a 399,9 µg/L em lodo de esgoto e solo (Nieto *et al.*, 2009; Viglino *et al.*, 2011; Albero *et al.*, 2012; Gorga *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2017; Karthikraj *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2020) e de 0,108 a 4,29 µg/L em águas residuárias não brutas (Nunez *et al.*, 2010). Estudos realizados nas últimas décadas demonstraram os impactos do propilparabeno aos organismos aquáticos, como efeito letal a microalgas, redução na taxa de reprodução e ação estrogênica em copépodos marinhos (Kang *et al.*, 2019), desregulação endócrina em peixes (Gonzalez-Doncel *et al.*, 2014), e imobilidade em microcrustáceos (Terasaki; Makino; Tatarazako, 2008). Todavia, ao contrário de organismos aquáticos, os dados de efeitos adversos do propilparabeno aos organismos do solo são limitados, especialmente para plantas (Haman *et al.* 2015; Kim *et al.* 2020).

No Brasil, o propilparabeno é encontrado em águas superficiais em uma concentração entre 500 a 52100 ng/L (Galinaro; Pereira; Viena, 2015; Derisso *et al.*, 2020). Um estudo nos Estados Unidos indicou a maior concentração de propilparabeno em águas de rios (78,4 ng/L) e uma concentração de 2,1 a 8,5 ng/L em amostras de efluentes de ETE's e industriais (Benijts; Lambert; De Leenheer, 2004). Nas águas superficiais do Reino Unido, o propilparabeno foi detectado em 24 µL/L (Kasprzyk-Hordern; Dinsdale; Guwy, 2008).

Albero *et al.* (2012), em estudo na Espanha, indicou que além da degradação pode estar ocorrendo absorção de parabenos no lodo. O propilparabeno foi encontrado em 74% dos efluentes de diferentes estações de tratamento, em níveis de até 44 ng/g de lodo seco. Nos Estados Unidos, foram coletadas amostras de lodo de nove ETE's, onde a concentração de propilparabeno variou de 0,5 a 7,7 ng/g de lodo seco (Chen *et al.*, 2017). Portanto, além das matrizes aquáticas, o propilparabeno é encontrado em solos devido à prática de irrigação com o efluente da água tratada e à fertilização com lodos ativados contaminados (Kirchoff e de Gannes, 2013).

3.2 Testes de toxicidade em *Allium cepa* L.

3.2.1 Ciclo celular

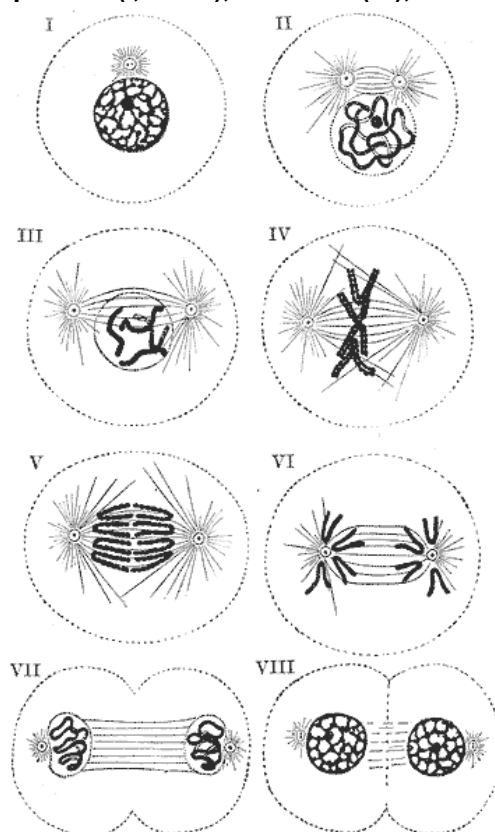
Para entendimento dos bioensaios, é importante entender o processo de divisão celular. O ciclo de divisão celular (ciclo celular) compreende o conjunto de fases responsáveis pela duplicação da célula eucarionte. O ciclo inicia-se com o crescimento da célula, por meio de um aumento quantitativo das moléculas, incluindo o material genético, resultando na divisão do núcleo e do citoplasma em duas células-filhas. O ciclo celular divide-se em duas etapas: interfase, onde a célula cresce e prepara-se para a divisão e a mitose, em que ocorre a divisão da célula-mãe que resultará em duas células-filhas idênticas geneticamente. A mitose é dividida em: prófase, metáfase, anáfase e telófase, sendo que geralmente durante as duas últimas etapas ocorre a divisão do citoplasma (citocinese) (Junqueira e Carneiro, 2012).

A interfase engloba as fases S, G1 e G2. O DNA é sintetizado e duplicado na fase S (S = síntese), sendo que as fases G1 e G2 (G = gap = intervalo) são os intervalos que ocorrem antes e após a fase S. No primeiro intervalo (G1), aumenta-se o tamanho da célula e ocorre a síntese de RNA e produção de proteínas. Durante o segundo intervalo (G2), após a duplicação do DNA, há a retomada do crescimento da célula e da produção de proteínas, além do armazenamento da energia necessária para a duplicação da célula. Tanto G1 quanto G2 possuem pontos que determinam se a célula irá prosseguir para as próximas fases ou se o processo será interrompido pelo tempo necessário (Alberts, 2013).

Na mitose (Figura 2 e Figura 3), o núcleo passa por mudanças que incluem o rompimento do envoltório nuclear e condensação das fibras de cromatina, que são convertidas em cromossomos detectáveis. No início da prófase os cromossomos aparecem como um filamento muito fino. Ao final da prófase, há a conversão dos cromossomos em um bastão curto e compacto, devido ao enovelamento das suas duas fibras. Na metáfase, os cromossomos alinham-se no centro da célula (placa metafásica). Durante a anáfase, as cromátides separam-se e cada cromátide-filha desloca-se a um dos pólos da célula. Na telófase, há a formação de dois núcleos por meio dos dois conjuntos de cromossomos separados (De Robertis e Hib, 2014).

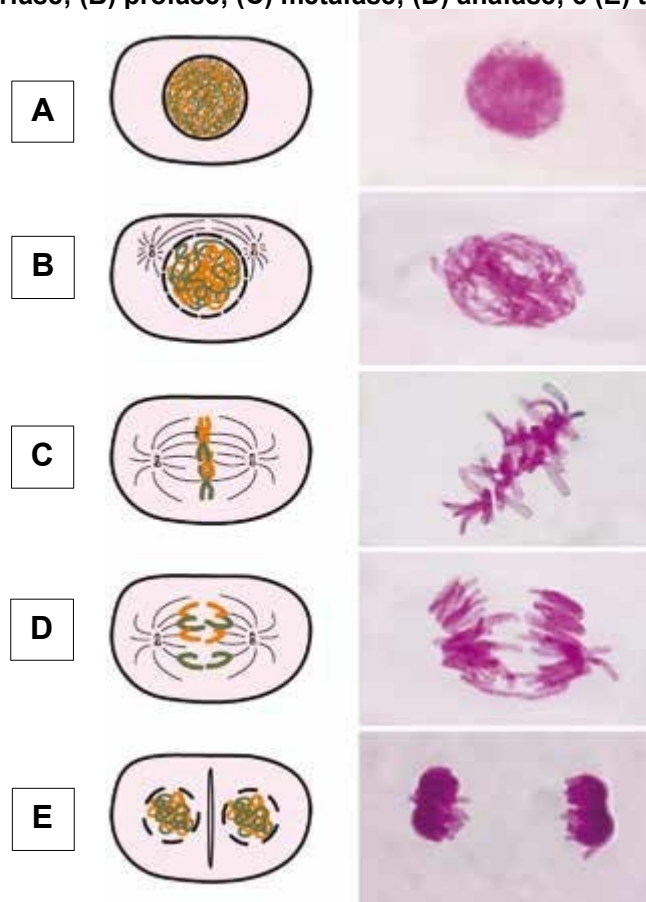
Diversos são os agentes que podem causar modificações químicas de nível celular e molecular, alterando processos de duplicação e transcrição gênica que podem resultar no aumento e/ou aceleração aparecimento de mutações (Carvalho, 2004; Stelato *et al.*, 2007). Dessa forma, os agentes mutagênicos podem ser detectados citologicamente através da inibição do ciclo celular, surgimento de pontes e micronúcleos, interrupção em metáfases, indução de alterações cromossômicas numéricas e estruturais, entre outros (Sá *et al.*, 2005).

Figura 2 - Etapas da mitose: prófase (I, II e III), metáfase (IV), anáfase (V, VI e VII) e telófase (VIII)



Fonte: Moreira (2015)

Figura 3 - (A) intérfase; (B) prófase; (C) metáfase; (D) anáfase; e (E) telófase em *Allium Cepa* L.



Fonte: Brasileiro-Vidal *et al.* (2017, p. 106)

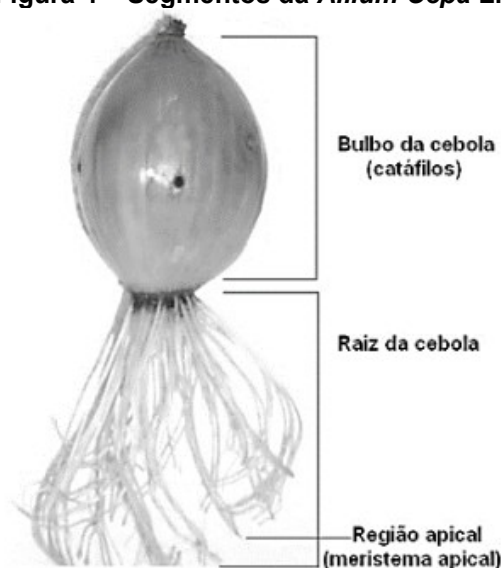
3.2.2 Conceitos gerais

Em 1938, Levan A. introduziu o bioensaio em *A. cepa* ao evidenciar distúrbios no fuso mitótico pela colchicina (Levan, 1938). Em 1945, o mesmo cientista demonstrou que diferentes sais orgânicos causavam múltiplas alterações cromossômicas nas células das raízes meristemáticas da *A. cepa* (Levan, 1945). Desde então, diferentes autores aprimoraram os testes de modo a obter uma avaliação mais ampla de produtos químicos, como as misturas complexas, que respondem pela maioria das amostras ambientais, e as substâncias puras (Grant, 1982; Fiskejö, 1985; Rank *et al.*, 1993; Ma *et al.*, 1995; Rank *et al.*, 2003).

Entre as vantagens apresentadas pelo bioensaio, a principal é a possibilidade de extensão para outros organismos que incluem seres humanos e animais. O teste apresenta um ótimo custo benefício, visto que não é necessário o uso de equipamentos sofisticados, é de fácil manipulação e pode ser correlacionado com outros sistemas de testes. As raízes da *A. cepa* (Figura 4) crescem em contato

direto com o composto estudado, averiguando-se os danos ao DNA de forma eficaz e confiável. Ademais, o número reduzido ($2n = 16$) e o tamanho dos cromossomos facilitam as análises (Fiskejö, 1985). Fiskejö (1993, 1994), salientou a relevância de bioensaios vegetais na avaliação de riscos de genotoxicidade e ressaltou que existem similaridades entre os metabolismos de animais e plantas. Ademais, a avaliação de pró-mutagênicos em plantas é de extrema importância devido ao consumo de plantas tratadas com agentes químicos, gerando um risco para a saúde de seres humanos.

Figura 4 – Segmentos da *Allium Cepa* L.



Fonte: Rossi-Rodrigues *et al.* (2011)

O bioensaio em *A. cepa* é responsável pela análise de parâmetros macroscópicos que incluem o índice de germinação de sementes; crescimento de raízes em bulbos; tumores nas radículas; alterações na coloração e inibição ou crescimento exagerado das raízes. Os parâmetros microscópicos englobam o índice mitótico (IM), verificação de possíveis alterações celulares (IAC). Tal avaliação é capaz de demonstrar o potencial genotóxico, citotóxico e mutagênico de um composto, considerando que valores estatisticamente significativos em comparação aos controles podem ter correlação com alterações advindas da exposição ao agente estudado (Vidakocic-Cifrek; Papes; Tomic, 2002; Matsumoto e Marin-Morales, 2004). Os meristemas de raízes de *A. cepa* são mundialmente utilizados para análise de citotoxicidade, genotoxicidade e estresse oxidativo de xenobióticos,

comumente utilizadas para prospecção de impacto ambiental (Herrero *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2022; Frâncica *et al.*, 2022).

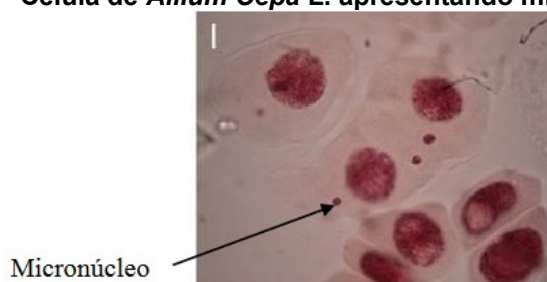
3.2.3 Índice Mitiótico

O índice mitótico (IM) avalia a citotoxicidade de um composto a partir do número total de células em divisão no ciclo celular, sendo que os níveis de citotoxicidade podem ser determinados pela diminuição ou aumento do IM. Caso o IM seja significativamente inferior ao controle negativo, há a possibilidade de alterações advindas da ação química no crescimento e desenvolvimento do organismo exposto. Em contrapartida, IM superiores ao controle negativo ocorrem devido ao aumento da divisão celular. Tal aumento pode ser prejudicial pois leva a uma proliferação celular desequilibrada e à formação de tecidos tumorais, em alguns casos (Hoshina, 2002; Fernandes; Mazzeo; Marin-Morales, 2007).

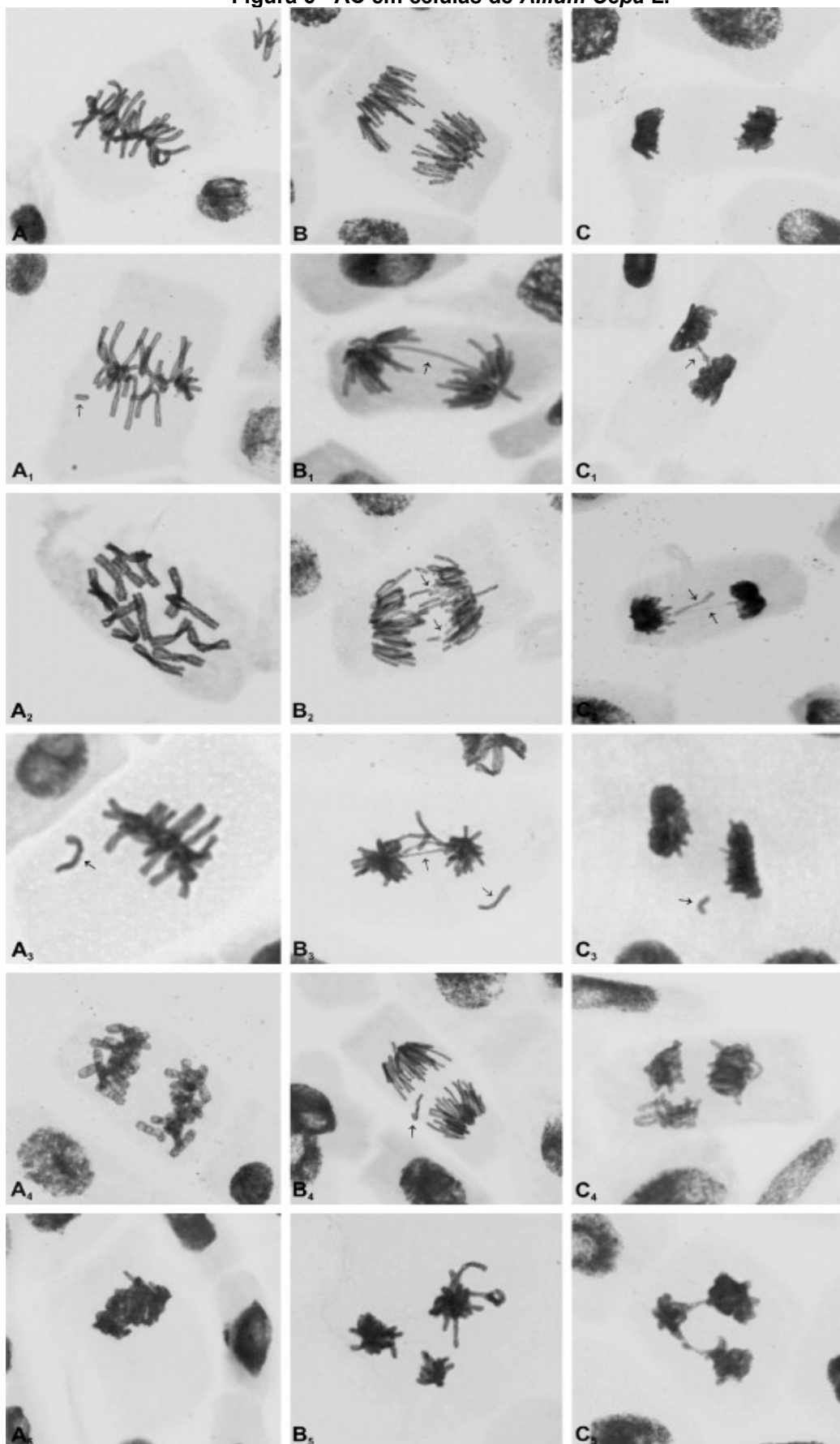
3.2.4 Aberrações cromossômicas

As aberrações cromossômicas (Figura 6) determinam o potencial genotóxico de um composto, indicando mutações celulares. Entre elas, estão anáfases e telófases anormais, metáfase com desagregação cromossômica, aderências cromossômicas, pontes, fusos multipolares, micronúcleos, fragmentações e perdas cromossômicas (Christofoletti, 2008). Sabe-se que as fragmentações e perdas cromossômicas são responsáveis pela formação de micronúcleos (Figura 5), visto que os fragmentos e os cromossomos inteiros não são incorporados ao núcleo principal durante o processo de mitose (Fenench, 2002). A formação dos micronúcleos ocorre devido a alterações estruturais cromossômicas espontâneas ou advindas de fatores ambientais. Além disso, podem originar de falhas no fuso mitótico ao serem eliminados do novo núcleo formado na telófase (Carrard *et al.*, 2007).

Figura 5 – Célula de *Allium Cepa* L. apresentando micronúcleo



Fonte: Gomes *et al.* (2015, p. 52)

Figura 6 - AC em células de *Allium Cepa* L.

Fonte: Leme e Marins-Morales (2009, p. 74)

(A) Metáfase normal; (A1) Metáfase com quebra cromossômica; (A2) C-metáfases; (A3) Metáfase com perda cromossômica; (A4) Célula binucleada em metáfase; (A5) Metáfase com aderência cromossômica; (B) Anáfase normal; (B1) Anáfase com ponte cromossômica; (B2) Anáfase com quebras cromossômicas; (B3) Anáfase com ponte e perda cromossômica; (B4) Anáfase com perda cromossômica; (B5) Anáfase multipolar; (C) Telófase normal; (C1) Telófase com ponte cromossômica; (C2) Telófase com ponte e perda cromossômica; (C3) Telófase com quebra cromossômica; (C4) Telófase multipolar; (C5) Telófase multipolar com ponte cromossômica (Leme e Marins-Morales, 2009).

3.3 3.3 Testes de fitotoxicidade em sementes

O teste de fitotoxicidade em sementes busca avaliar os efeitos de agentes ambientais potencialmente tóxicos presentes no meio de cultivo de plantas, detectando águas e solos contaminados através do índice de germinação (IG). Para a realização dos testes, emprega-se o controle que é uma solução que causa resultados esperados aos vegetais indicadores (Devesa-Rey *et al.*, 2008). Atualmente, essa análise também está sendo visada para a verificação dos poluentes presentes no meio ambiente, assim como a toxicidade dos compostos, de modo a anteceder a sua emissão para evitar efeitos negativos ao meio ambiente (Barral e Paradelo, 2011; Dias *et al.*, 2016; Bragança *et al.*, 2018; Guevara *et al.*, 2019).

Os testes fitotoxicológicos são capazes de avaliar os níveis de toxicidade existentes em um composto, mas não identificam o elemento que confere essa característica tóxica. Todavia, permitem a comparação dos níveis de toxicidade entre os compostos estudados por meio do índice de germinação (IG). Tal índice é inversamente proporcional ao nível de toxicidade das amostras testadas, ou seja, quanto menor o IG maior a toxicidade do composto analisado, pois inibe de forma parcial ou total o crescimento das raízes das sementes utilizadas como organismos teste (Charles *et al.*, 2011; Young *et al.*, 2012; Mendes *et al.*, 2016).

Os testes utilizando organismos vegetais possuem diversas vantagens, tais como: metodologia simples, custo baixo, pouca manutenção, sensibilidade na indicação qualitativa da presença de substâncias tóxicas ou inibidores biológicos, método de fácil reprodução, não há necessidade de grandes equipamentos, ausência de sazonalidade, facilidade de adquirir as sementes no comércio, pouca quantidade de amostra e rápida germinação (Pelegri *et al.*, 2006; Rubinger, 2009; Freccia, 2011; Rocha, 2017). Torna-se evidente que qualquer que seja o método empregado, a resposta atingida é significativa devido à comparação com o controle (água destilada), de forma que a maior parte dos possíveis interferentes, incluindo

os diferentes métodos, seriam teoricamente absorvidos pelo cálculo do IG (Mendes *et al.*, 2021).

As espécies *Allium cepa* L. (cebola), *Cucumis sativus* L. (pepino), *Lycopersicon esculentum* Mill. (tomate) e *Lactuca sativa* L. (alface) há várias décadas são recomendadas pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 1996) e pela Organização para a Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OCDE, 2003) como exímios modelos para análise de fitotoxicidade de poluentes, determinando a potencial poluidor do composto estudado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Campo Mourão, no laboratório de ecologia.

4.1 Materiais

- Propilparabeno, CAS N° 94-13-3, adquirido da Sigma-Aldrich em grau analítico, assim como os outros reagentes utilizados nos experimentos.
- Ácido acético;
- Ácido clorídrico;
- Água destilada;
- Lâminas e lamínulas para microscopia.
- Metanol;
- Orceína acética;
- *Allium cepa* L. (horta orgânica);
- Sementes de *Allium cepa* L.;
- Sementes de *Cucumis sativus* L.;
- Sementes de *Lycopersicum esculentum* Mill.;
- Sementes de *Lactuca sativa* L.;
- Placas de Petri;
- Filtro de café.

4.2 Teste de fitotoxicidade com sementes e raízes de *A. cepa*, *C. sativus*, *L. esculentum* e *L. sativa*

A fitotoxicidade foi avaliada segundo OCDE (2006), Santo *et al.* (2023) e Nascimento *et al.* (2023). Os parâmetros considerados foram germinação de sementes e alongamento de raízes.

As sementes de *Allium cepa* L., *Cucumis sativus* L., *Lycopersicum esculentum* Mill. e *Lactuca sativa* L., marca Isla®, foram obtidas em loja de insumos agrícolas e estavam isentas de agrotóxicos. Durante todo o tempo de análise foram utilizadas sementes do mesmo lote para as quatro espécies. A taxa de germinação informada nas embalagens de sementes foi superior a 96%. Para cada espécie de planta, sementes de tamanhos semelhantes foram selecionadas sob lupa

estereoscópica e esterilizadas com HgCl_2 0,1% por 2 minutos. Após a esterilização, as sementes foram lavadas cinco vezes com água destilada. Cada prato recebeu 20 sementes, distribuídas em distâncias semelhantes. Para cada tratamento (controle e concentrações) foram utilizadas cinco repetições (cinco placas), totalizando 100 sementes para o controle e para cada concentração analisada, conforme Figura 7. Água destilada foi usada como controle.

Figura 7 – Sementes nas placas de Petri



Fonte: Autoria Própria (2023)

Cada placa de Petri recebeu 2 mL do seu respectivo tratamento, que umedeceu o papel filtro sem encharcá-lo. As placas de cada tratamento foram envoltas em parafilme e colocadas em incubadora de DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) a 25°C, sem presença de luz, por cinco dias (120 horas). Uma semente foi considerada germinada quando a radícula emergiu. A porcentagem de germinação (G) foi calculada através da Equação 1:

$$G (\%) = \frac{\text{Número de sementes germinadas}}{\text{Número de sementes avaliadas}} (1)$$

Após 120 horas de incubação, 10 sementes germinadas foram selecionadas aleatoriamente em cada placa para medição de raízes. Quando não havia 10 sementes com radículas, foram medidas todas as sementes enraizadas. As raízes foram medidas com paquímetro digital e calculados o Índice de Crescimento

Relativo (ICR) e o Índice de Germinação (IG%). Tais índices foram calculados segundo Biruk *et al.* (2017), utilizando as Equações 2 e 3:

$$\text{ICR: } \frac{RLI}{RLC} \text{ (2)}$$

$$\text{IG (\%): } \frac{RLI \times GSI}{RLC \times GSC} \times 100 \text{ (3)}$$

RLI é o comprimento médio da radícula obtido após exposição às concentrações testadas e RLC é o comprimento médio da radícula obtido para o controle. Portanto, GSI é o número de sementes germinadas após exposição às concentrações testadas, e GSC é o número de sementes germinadas no controle. O RGI foi classificado conforme Tabela 4:

Tabela 2 - Classificação dos efeitos fitotóxicos

Classificação	ICR
Inibição no alongamento de raiz	< 0,8
Sem efeito	≥ 0,8 ou ≤ 1,2
Estimulação no alongamento de raiz	> 1,2
Classificação	IG (%)
Não fitotóxico	> 80%
Fitotoxicidade moderada	≥ 50% ou ≤ 80%
Altamente fitotóxico	> 50%

Fonte: Adaptado de Zucconi *et al.* (1985); Adaptado de Young *et al.* (2014)

Outros sinais de toxicidade também foram considerados, como alterações na espessura e na cor das raízes, bem como a presença de raízes em forma de gancho e retorcidas.

4.3 Testes de toxicidade em raízes de *A. cepa*

4.3.1 Obtenção e enraizamento de bulbos

Os testes de toxicidade a seguir foram realizados conforme Santo *et al.* (2022). Bulbos de *A. cepa* (cebola), da variedade baia periforme, foram obtidos em horta orgânica e estavam livres de inibidores de crescimento e pesticidas. Para toda concentração e para o controle com água destilada (tratamentos), foram utilizados 3 bulbos de cebolas previamente escarificados para retirada de catáfilos mortos e lavados em água destilada. Após a limpeza, os bulbos foram postos em seus

respectivos tratamentos onde permaneceram por 120 horas (cinco dias) para enraizamento. Considerou-se para todos os experimentos com *A. cepa* o mesmo número de repetição de bulbos, como mostra a Figura 8.

As concentrações do propilparabeno foram preparadas e trocadas diariamente. As avaliações de toxicidade em *A. cepa* foram feitas conforme Fiskesjö (1985), com alterações.

Figura 8 - Bulbos de *A. cepa* em seus tratamentos



Fonte: Autoria Própria (2023)

4.3.2 Avaliação de citotoxicidade e genotoxicidade

Para a avaliação de citotoxicidade e genotoxicidade, as raízes foram coletadas e fixadas em Carnoy 3: 1 (metanol: ácido acético) durante 24 horas. Após a fixação, as raízes foram hidrolisadas em HCl 1N, e suas regiões meristemáticas excisadas para confecção de lâminas por meio da técnica de esmagamento, de acordo com Herrero *et al.* (2012). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico com um aumento de 400x.

A citotoxicidade é estabelecida por meio da proliferação celular dos meristemas, com base na contabilização de células em interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase, posteriormente calculando-se o Índice Mitótico (IM) (Equação 4). De cada bulbo foram contadas 2000 células, totalizando 10000 células analisadas por tratamento.

$$\text{IM: } \frac{\text{Número total de células em divisão}}{\text{Número total de células analisadas}} \times 100 \quad (4)$$

Além disso, o índice de prófase (IP) foi calculado considerando o número de prófases observadas nos meristemas radiculares expostos aos tratamentos, (Equação 5).

$$\text{IP: } \frac{\text{Número de células em prófase}}{\text{Número total de células em divisão}} \times 100 \text{ (5)}$$

A genotoxicidade é definida com base no Índice de Alterações Celulares (IAC) calculado a partir do número de alterações celulares observado nos meristemas (Equação 6). De cada bulbo foram observadas 200 células, resultando em 1000 células analisadas por tratamento. Os conjuntos de células aberrantes avaliadas foram micronúcleo, viscosidade, metáfase com desagregação cromossômica e ana/telófases anormais, que incluem pontes, cromossomos vagantes, desagregação cromossômica e fusos multipolares.

$$\text{IAC: } \frac{\text{Número de alterações celulares}}{\text{Número total de células analisadas}} \times 100 \text{ (6)}$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise de fitotoxicidade em sementes

Como visto na Tabela 3, PrP nas concentrações de 4, 40 e 400 µg/L não causou prejuízos à germinação de sementes de *A. cepa*, *C. sativus*, *L. esculentum* e *L. sativa*. Entretanto, houve redução significativa no alongamento radicular das quatro espécies, obtendo-se ICR menor que 0,8. Um ICR (índice de crescimento radicular) menor que 0,8 demonstra que o composto estudado inibiu o alongamento das raízes das sementes. Na concentração de 400 µg/L, o PrP ainda resultou em um IG menor que 50%. Um índice de germinação (IG) menor que 50% determina alta periculosidade do composto avaliado com potencial letal a planta. Ademais, nessa concentração, as raízes mostraram-se com uma menor espessura em relação às concentrações menores. (Zucconi *et al.*, 1985; Young *et al.*, 2014). Portanto, o PrP demonstrou ser fitotóxico à *A. cepa*, *C. sativus*, *L. esculentum* e *L. sativa*.

Tabela 3 - Fitotoxicidade do propilparabeno em diferentes concentrações, em *Allium cepa* L., *Cucumis sativus* L., *Lycopersicum esculentum* Mill. e *Lactuca sativa* L. com base nos parâmetros germinação de sementes, alongamento de raízes e índice de germinação

PrP			
<i>Allium cepa</i> L.			
TR	G/DP (%)	ICR/DP (%)	IG/DP (%)
Co	100	1	100
4 µg/L	100	0,61*	61,3
40 µg/L	100	0,64*	63,6
400 µg/L	100	0,45*	45,4*
<i>Cucumis sativus</i> L.			
TR	G/DP (%)	ICR/DP (%)	IG/DP (%)
Co	100	1	100
4 µg/L	100	0,76*	76
40 µg/L	100	0,74*	74
400 µg/L	100	0,45*	45,4*
<i>Lycopersicum esculentum</i> Mill.			
TR	G/DP (%)	ICR/DP (%)	IG/DP (%)
Co	100	1	100
4 µg/L	100	0,63*	63,7
40 µg/L	100	0,66*	66,1
400 µg/L	100	0,44*	44,1*
<i>Lactuca sativa</i> L.			
TR	G/DP (%)	ICR/DP (%)	IG/DP (%)
Co	100	1	100
4 µg/L	75 ± 0.5	0,75*	56
40 µg/L	80 ± 0.7	0,71*	55,4
400 µg/L	75 ± 0.5	0,38*	26,7*

PrP: Propilparabeno; TR: Tratamento; G: Germinação; DP: Desvio Padrão; ICR: Índice de Crescimento Radicular; Co: Controle. Asteriscos indicam diferenças significativas entre o controle, segundo teste H de Kruskal-Wallis seguido de teste post-hoc de Dunn ($p \leq 0,05$).

Fonte: Autoria Própria (2023)

5.2 Análise de toxicidade em *Allium Cepa* L.

O índice mitótico (IM) refere-se à relação do número de células em divisão e o total de células observadas, em porcentagem. Na Tabela 4, o propilparabeno nas concentrações de 4 e 40 µg/L não causou redução da divisão celular em pontas de raízes de bulbos de *A. cepa*, apresentando IM iguais ao controle. Todavia, os meristemas radiculares expostos a essas concentrações apresentaram porcentagem significativa de células em prófase. Índices elevados de prófases em tecidos meristemáticos caracterizam distúrbios de fuso mitótico decorrentes de uma cinética cromossômica anormal que retarda a evolução da mitose e, conseqüentemente, a produção de novas células (Dias *et al.*, 2019; Santo *et al.*, 2023). Essa condição em raízes de bulbos de *A. cepa* explica a significativa inibição do alongamento radicular em sementes de *A. cepa*, *C. sativus*, *L. esculentum* e *L. sativa* expostas ao propilparabeno nas concentrações de 4 e 40 µg/L, que resultou em ICR menor que 0,8 (Tabela 3).

Tabela 4 - Índices mitóticos e índices de prófases em meristemas de raízes de bulbos de *Allium cepa* L. expostos por 120 horas a diferentes concentrações de propilparabeno

Composto	TR	IP/DP	IM/DP
	Co	35,1 ± 0.7	100.00 ± 0.9
PrP	4 µg/L	60,1 ± 1,5*	95,2 ± 1,3
	40 µg/L	63,5 ± 1,1*	89,1 ± 0,9
	400 µg/L	67,9 ± 1,4*	60,0 ± 1,0*

PrP: propilparabeno; TR: Tratamento; IP: Índice de Prófase; IM: Índice Mitótico; DP: Desvio Padrão; Co: Controle (água destilada). Para o IM, os dados são expressos como porcentagem dos valores de controle. Asteriscos indicam diferenças significativas entre o controle, segundo teste H de Kruskal-Wallis seguido de teste post-hoc de Dunn ($p \leq 0,05$).

Fonte: Autoria Própria (2023)

Propilparabeno na concentração de 400 µg/L causou significativa redução de IM, mostrando-se citotóxico aos meristemas radiculares de bulbos de *A. cepa* (Tabela 4). A redução significativa de IM, em geral, se dá pela inibição na síntese de DNA ou bloqueio nas fases G1 ou G2 da interfase, impedindo que as células entrem em mitose (Dias *et al.*, 2019; Ferreira *et al.*, 2022). Ademais, PrP na mesma concentração também foi responsável por distúrbios de fuso mitótico em razão do elevado índice de prófases observado (Tabela 4), e mostrou-se genotóxico por gerar

um elevado número de desordens cromossômicas em prófase e de anáfases viscosas em raízes de cebola (Tabela 5, Figura 9).

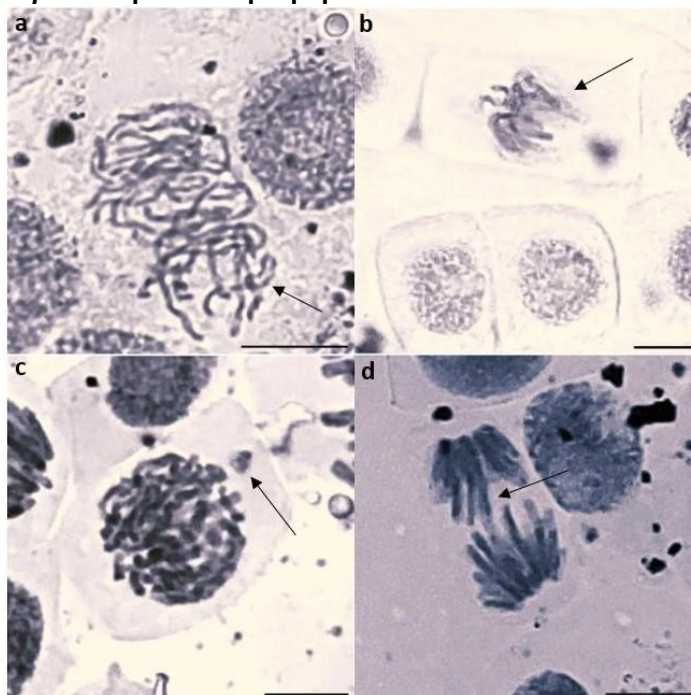
Tabela 5 - Número, tipos e índices de alterações celulares de meristemas de raízes de bulbos de *Allium cepa* L. expostos por 120 horas a diferentes concentrações de propilparabeno

TR	Conc. (ug/L)	Número e tipos de alterações celulares				IAC±DP (%)
		Micronúcleo	Desorganização em prófase	Anáfase Viscosas	Ponte/perda cromossômica em anáfase	
Co	-	02	n.d.	n.d.	01	0,3 ± 0,9
	4	00	02	02	01	0,5 ± 1,0
PrP	40	01	00	02	00	0,3 ± 1,0
	400	00	42	32	00	7,4 ± 1,5*

PrP: propilparabeno; TR: Tratamento; Co: Controle negativo; Conc: Concentração; IAC: Índice de Alterações Celulares; DP: Desvio Padrão; n.d.: não detectado. *Diferente ao valor de Índice de Alterações Celulares observado para o Co, conforme o teste Kruskal-Wallis seguido de teste post-hoc de Dunn ($p \leq 0.05$).

Fonte: Aatoria Própria (2023)

Figura 9 - Alterações celulares observadas em células meristemáticas de raízes de bulbos de *Allium cepa* L. expostas a propilparabeno em 120 horas de exposição



a) desarranjo cromossômico em prófase, b) anáfase viscosa, c) micronúcleo e d) ponte anafásica. Células a, b e d observadas em microscópio óptico com objetiva 40x. Célula c observada em microscópio óptico com objetiva 100x. Barra: 10 μ m.

Fonte: Aatoria Própria (2023)

As desordens cromossômicas em prófase observadas (Figura 9a) sugerem distúrbios na condensação da cromatina devido à desorganização de nucleoproteínas e têm potencial de causar desequilíbrios na cinética cromossômica durante a mitose inviabilizando a formação de novas células (Kurás *et al.* 2006).

Cromossomos viscosos, como os observados em anáfase no presente estudo, (Figura 9b), são frutos do dobramento incorreto da cromatina devido à desnaturação de nucleoproteínas e são letais a célula (Fiskejo, 1985; Ping *et al.*, 2012; Khana e Sharma, 2013).

Não ocorreram alterações significativas na média do comprimento das raízes de *A. Cepa*, mesmo com a redução significativa nos valores do índice mitótico, presumindo-se que as raízes possivelmente continuaram a crescer devido ao alongamento de raízes pré-existentes. De modo a sustentar essa suposição, evidenciou-se que mesmo a supressão completa da divisão celular pode não interferir no alongamento celular (Ivanov, 1994; Herrero *et al.*, 2012).

Portanto, a inibição da divisão celular, os distúrbios de fuso mitótico e o elevado número de alterações celulares observados nos meristemas de raízes de bulbos de *A. cepa* expostos a PrP em 400 µg/L (Tabelas 4 e 5) corroboram a fitotoxicidade observada em sementes de *A. cepa*, *C. sativus*, *L. esculentum* e *L. sativa* submetidas a esta concentração, as quais tiveram ICR menor que 0,8 e IG menor que 50% (Tabela 3).

Herrero *et al.* (2012) avaliaram PrP em células meristemáticas de raízes de *A. cepa* em concentrações na escala de mg/L e observaram inibição drástica da divisão celular, resultando em alterações no índice mitótico (IM). Esses autores não constataram alterações celulares em número significativo para nenhuma das concentrações. Sugere-se que a não genotoxicidade deveu-se às elevadas concentrações de PrP, que por serem altamente tóxicas causaram a morte das células e/ou perturbações significativas na interfase impedindo a formação de novas células.

Martín *et al.* (2010) avaliaram PrP em concentrações maiores que 500 µg/L em células de macaco em teste *in vitro* e verificaram que este composto causou a parada do ciclo celular na fase G1 da interfase inibindo drasticamente a divisão celular, além de que induziu alterações celulares em número expressivo. Os resultados de Herrero *et al.* (2012) e Martín *et al.* (2010) corroboram com a toxicidade celular observada no presente estudo para PrP em 400 µg/L. Bayulken *et al.* (2019) verificaram que concentrações de 10 a 100 µg/L de PrP induziram distúrbios de fuso mitótico em linfócitos periféricos humanos em teste *in vitro* inibindo a proliferação celular e corroborando os resultados para PrP em 4 e 40 µg/L em meristemas radiculares.

Dessa forma, os resultados de fitotoxicidade (Tabela 3), citotoxicidade e genotoxicidade (Tabelas 4 e 5, Figura 9) obtidos indicam que PrP tem ação direta sobre o ciclo celular em plantas. A utilização de marcadores bioquímicos é uma ferramenta indispensável para a explicação de como os poluentes desencadeiam toxicidade celular, monitorando a qualidade ambiental a partir da observação de distúrbios celulares (Herrero *et al.*, 2012; Nascimento *et al.* 2023).

6 CONCLUSÃO

O propilparabeno é encontrado no meio ambiente devido ao seu alto uso pelas indústrias e à ineficiência das estações de tratamento de água e efluentes na eliminação dos parabenos. O seu descarte incorreto leva à acumulação de parabenos em diversos compartimentos ambientais, tanto aquáticos quanto terrestres, devido à descarga de efluentes e lodos contaminados. Isso gera um visível problema de poluição ambiental, com diferentes consequências para os ecossistemas e para as suas espécies vivas que necessitam ser objeto de estudo.

Novas ou atuais tecnologias devem ser implantadas para a remoção eficiente desses compostos persistentes em efluentes e lodos, antes do seu descarte no meio-ambiente. As legislações devem ser atualizadas de forma a monitorar a quantidade de parabenos presente em recursos hídricos e terrestres, além de indicar a melhor forma de tratamento para as ETE's, visto o potencial poluidor do PrP. Em todo o mundo, apenas a Suíça possui uma regulamentação específica para os contaminantes de preocupação emergente, sendo que o Brasil considera o PrP de pouca preocupação aos riscos ambientais.

Os bioensaios em *Allium cepa* L., *Cucumis sativus* L., *Lycopersicum esculentum* Mill. e *Lactuca sativa* L. forneceram informações ecotoxicológicas adicionais e relevantes que contribuem significativamente à avaliação dos riscos ambientais do PrP. A diminuição do ICR e IG em sementes e a diminuição do IM em *A. Cepa* conforme o aumento da concentração de PrP demonstrou o potencial fitotóxico e citotóxico desse composto. Além disso, o aumento das alterações celulares como desorganização em prófases e anáfases viscosas em células meristemáticas de *A. Cepa* verificou o seu potencial genotóxico. Tais resultados podem ser usados como ferramentas úteis para a regulamentação do potencial tóxico do propilparabeno em compartimentos ambientais, visto que a legislação atual do país é limitada à quantidade de PrP presente em cosméticos e fármacos, além da sua proibição de uso em alimentos.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR-VERNIER, M. *et al.* Contact sensitization to allergens in the Spanish standard series at Hospital Costa del Sol in Marbella, Spain: a retrospective study (2005–2010). **Actas Dermosifiliogr**, v. 103, n. 3, p. 223-228, out. 2012. Disponível em: [10.1016/j.ad.2011.07.010](https://doi.org/10.1016/j.ad.2011.07.010). Acesso em: 10 jul. 2023.
- ALBERO, B. *et al.* Occurrence and analysis of parabens in municipal sewage sludge from wastewater treatment plants in Madrid (Spain). **Journal of Hazardous Materials**, v. 239, p. 48-55, nov. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.05.017>. Acesso em: 7 jul. 2023.
- ALBERTS, B. **Fundamentos da biologia celular**. Porto Alegre: Grupo A, 2017. *E-book*. ISBN 9788582714065. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788582714065/>. Acesso em: 24 jul. 2023.
- ALLWOOD, M. C. The adsorption of esters of p-hydroxybenzoic acid by magnesium trisilicate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 11, p. 101 - 107, 1982.
- ANDERSEN, F. A. Final amended report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben, isopropylparaben, butylparaben, isobutylparaben, and benzylparaben as used in cosmetic products. **International Journal of Toxicology**. v. 27, suppl.4, p. 1-82, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19101832/>. Acesso em: 07 set. 2022.
- AOKI, M. *et al.* Application of surface active agents to pharmaceutical preparations I: effect of Tween 20 upon the antifungal activities of p-hydroxybenzoic acid esters in solubilized preparations. **The Pharmaceutical Society of Japan**, v. 76, p. 939 - 943, 1956.
- ATAMAN CHEMICALS. Propylparaben. **Ataman Chemicals**, 2020. Disponível em: https://www.atamanchemicals.com/propyl-paraben_u24500/. Acesso em: 11 jul. 2023.
- BAYÜLKEN, G. D. *et al.* Investigation of genotoxic effects of paraben in cultured human lymphocytes. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 4, p. 349-356, 2019.
- BALBANI, A. P. S. B.; STELZER, L. B.; MONTOVANI, J. C. Excipientes de medicamentos e as informações da bula. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 72, n. 3, p. 400-406. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0034-72992006000300018>. Acesso em: 13 jul. 2023.
- BARRAL, M.T.; PARADELO, R. A review on the use of phytotoxicity as a compost quality indicator. **Dynamic Soil, Dynamic Plant**, v. 5, p. 36-44, 2011.
- BENIJTS, T.; LAMBERT, W.; DE LEENHEER, A. 2004. Analysis of multiple endocrine disruptors in environmental waters via wide-spectrum solid-phase extraction and

dual-polarity ionization LC-ion trap MS/MS. **Analytical Chemistry**, v. 76, p. 704-711. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac035062x>. Acesso em: 17 jul. 2023.

BIRUK, L. N. *et al.* Toxicity and genotoxicity assessment in sediments from the Matanza-Riachuelo river basin (Argentina) under the influence of heavy metals and organic contaminants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 135, p. 302-311. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.09.024>. Acesso em: 18 de jun. de 2023.

BRAGANÇA, I. *et al.* Phytotoxicity of pyrethroid and its metabolite towards *Cucumis sativus*. **Science of the Total Environment**, v. 619-620, p. 685-691, 2018. Disponível em: [10.1016/j.scitotenv.2017.11.164](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.164). Acesso em: 27 jul. 2023.

BRASILEIRO-VIDAL *et al.* **Citogenética: da teoria cromossômica da hereditariedade à citogenética molecular**. In: ARAGÃO, F. J. L.; MOREIRA, J. R. (org). Mendel: das leis da hereditariedade à engenharia genética. Embrapa, p.101-137, 2017.

BRASIL. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil. **Instrução normativa Conjunta MAPA, Anvisa e IBAMA sobre alteração de formulação de agrotóxicos e afins, nº 1, de 18 de abril de 2013**. Brasília: MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil, 2013. Disponível em: http://www.ibama.gov.br/phocadownload/agrotoxicos/avaliacao/2017/2017-07-26-Instrucao-Normativa-Conjunta-1_2013-Alteracao-de-formulacao.pdf. Acesso em: 07 set. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução RDC nº 528, de 4 de agosto de 2021**. Dispõe sobre a lista de substâncias de ação conservante permitidas para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes e internaliza a Resolução GMC MERCOSUL nº 35/20. Brasília: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2021. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2020/rdc0528_4_08_2021.pdf. Acesso em: 12 jul. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução nº 8, de 20 de fevereiro de 2008**. Proíbe o uso dos aditivos Propilparabeno e Propilparabeno de Sódio em alimentos. Brasília: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2008. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2008/res0008_20_02_2008.html. Acesso em: 12 jul. 2023.

CABALEIRO, N. *et al.* An overview of sample preparation for the determination of parabens in cosmetics. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 57, p. 34-36, mai. 2014. Acesso em: 6 de jul. de 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.02.003>. Acesso em: 6 jul. 2023.

CARVALHO, J. E. **Toxicidade pré-clínica: fitoterápicos e alimentos com propriedades funcionais ou de saúde**. 2004.

CARRARD, V. C. *et al.* Teste dos Micronúcleos - Um biomarcador de dano genotóxico em células descamadas da mucosa bucal. **Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre**, v. 35
Porto Alegre, v. 48, n. 1/3, p. 77-81, jan. 2007.

CASHMAN, A.L.; WARSHAW, E.M. Parabens: a review of epidemiology, structure, allergenicity, and hormonal properties. **Dermatitis**, v. 16, p. 57-66, 2005.

CHARLES, J. *et al.* Evaluation of the phytotoxicity of polycontaminated industrial effluents using the lettuce plant (*Lactuca sativa*) as a bioindicator. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 2057-2064, 2011. Disponível em: [10.1016/j.ecoenv.2011.07.025](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.07.025). Acesso em: 28 jul. 2023.

CHEN, J., *et al.* Occurrence, temporal variation, and estrogenic burden of five parabens in sewage sludge collected across the United States. **Science of the Total Environment**, v. 593-594, p. 368-374, set. 2017. Disponível em: [10.1016/j.scitotenv.2017.03.162](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.162). Acesso em: 6 jul. 2023.

CHRISTOFOLETTI, C. A. **Avaliação dos potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas de um ambiente lântico, por meio dos sistemas-teste de Allium cepa e Oreochromis niloticus**. 2008. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, São Paulo, 2008.

DARBRE, P.D. *et al.* Concentrations of parabens in human breast tumours. **Journal of Applied Toxicology**, v. 24, p. 5 - 13, 2004.

DERISSO, C.R. *et al.* Occurrence of parabens in surface water, wastewater treatment plant in Southeast of Brazil and assessment of their environmental risk, water. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 231 2020. Disponível em: [10.1007/s11270-020-04835-0](https://doi.org/10.1007/s11270-020-04835-0). Acesso em: 16 jul. 2023.

DE ROBERTIS, E. M.; HIB, J. **De Robertis Biologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Grupo GEN, 2014. *E-book*. ISBN 978-85-277-2386-2. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/978-85-277-2386-2/>. Acesso em: 25 jul. 2023.

DEVESA-REY, R. *et al.* Toxicity of Anllóns River Sediment Extracts Using Microtox and the Zucconi Phytotoxicity Test. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 80, p. 225–230, 2008.

DIAS, M.C. *et al.* Physiological mechanisms to cope with Cr (VI) toxicity in lettuce: can lettuce be used in Crphyto remediation? **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, p. 15627-15637, 2016. Disponível em: [10.1016/j.plaphy.2012.01.013](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.01.013). Acesso em: 27 jul. 2023.

DIAS, W. L. F. *et al.* Cytogenotoxic effect, phytochemical screening and antioxidant potential of *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill leaves. **South African Journal of Botany**, v. 123, p. 30-35, 2019.

EEC. **Diretiva nº 74/464 de 4 de maio de 1976 em poluição causada por certas substâncias perigosas descarregadas no ambiente aquático da comunidade.** European Communities Council (EEC), 1976.

EEC. **Diretiva nº 80/68 de 17 de dezembro de 1979 sobre a proteção de água subterrânea contra poluição causada por certas substâncias perigosas.** European Communities Council (EEC), 1979.

EEC. **Diretiva nº 271/91 de 21 de maio de 1991 relativo à descarga de efluentes urbanos.** European Communities Council (EEC), 1991.

EEC. **Diretiva 2000/60 de 23 de outubro de 2000 do Parlamento Europeu e do Conselho estabelecendo um framework para a ação da comunidade no campo da política da água.** European Communities Council (EEC), 2000.

ELDER, R. L. Final report on the safety assessment of Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, and Butylparaben. **Journal of the American College of Toxicology**, v. 3, n. 5, p. 147-209, 1984.

EMA - European Medicines Agency. **Reflection paper on the use of methyl- and propylparaben as excipients in human medicinal products for oral use.** EMA, 2015. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-use-methyl-propylparaben-excipients-human-medicinal-products-oral-use_en.pdf. Acesso em: 14 jul. 2023.

FDA - Food and Drug Administration. **Food Additive Status List.** FDA database. Washington, DC: FDA, 2023. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/food-additives-petitions/food-additive-status-list>. Acesso em: 13 jul. 2023.

FDA - Food and Drug Administration. **Frequency of use of cosmetic ingredients.** FDA database. Washington, DC: FDA, 2006.

FENENCH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81-95, 2002.

FERREIRA, P. M. P. *et al.* Antimitotic and toxicogenetic action of *Stevia urticifolia* aerial parts on proliferating vegetal and mammalian cells: *in vitro* and *in vivo* traditional and replacement methods. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 85, n. 18, p. 750-766, jun. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15287394.2022.2081640>. Acesso em: 9 de jul. 2023.

FISKEJO, G. The *Allium* test. *In*: wastewater monitoring. **Environmental Toxicology and Water Quality**, v. 8, p. 291-298, 1993.

FISKEJO, G. The *Allium* Test II: Assesmente of chemical's genotoxic potential by recording aberrations in chromosomes and cell divisions in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Toxicology and Water Quality**, v. 9, p. 234-241, 1994.

FRÂNCICA, L. S. *et al.* Antiproliferative, genotoxic and mutagenic potential of synthetic chocolate flavor for food. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.243628>. Acesso em: 7 jul. 2023.

FRANSWAY, A.F. *et al.* Reeder, Parabens. **Dermatitis**, p. 3-31, 2019, Disponível em: [10.1097/DER.0000000000000429](https://doi.org/10.1097/DER.0000000000000429). Acesso em: 16 jul. 2019.

FRECCIA, B. **Avaliação da toxicidade e fitotoxicidade das águas do Rio Urussanga antes e após o tratamento com sedimento gerados em estação de tratamento de efluente de mineração de carvão**. Criciúma: Universidade Extremo Sul Catarinense-UNESC, 2011.

FRONTISTIS, Z. *et al.* D. Photodegradation of ethylparaben using simulated solar radiation and Ag₃PO₄ photocatalyst. **Journal of Hazardous Materials**, v. 323, p. 478-488, 2017.

GALINARO, C.A.; PEREIRA, F. M., VIEIRA, E.M. Determination of parabens in surface water from Mogi Guaçu River (São paulo, Brazil) using dispersive liquid-liquid microextraction based on low density solvent and LC-DAD J. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, p. 2205-2213, 2015. Disponível em: [10.5935/0103-5053.20150206](https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150206). Acesso em: 16 jul. 2023.

GMUREK, M. *et al.* Photodegradation of single and mixture of parabens – kinetic, by-products identification and cost-efficiency analysis. **Chemical Engineering Journal**, v. 276, p. 303-314, set. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.04.093>. Acesso em: 07. set. 2022.

GOMES, J. V. *et al.* Induction of cytotoxic and genotoxic effects of Guandu River waters in the *Allium cepa* system. **Revista Ambiente & Água**, v. 10, 2015.

GONZALEZ-DONCEL, M. *et al.* Embryonic exposure of medaka (*Oryziaslatipes*) to propylparaben: Effects on early development and post-hatching growth. **Environmental Pollution**, v. 184, p. 360-369, jan. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.09.022>. Acesso em: 8 jul. 2023.

GONZALEZ-MARINO, I. *et al.* Fully automated determination of parabens, triclosan and methyl triclosan in wastewater by microextraction by packed sorbents and gas chromatography–mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 684, n. 1, p. 59-66, 2011.

GOMES, J. V. *et al.* Induction of cytotoxic and genotoxic effects of Guandu River waters in the *Allium cepa* system. **Revista Ambiente & Água**, v. 10, 2015.

GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in *Allium*. **Mutation Research**, v. 99, p. 273-291, 1982.

GUADARRAMA, P. *et al.* Construction of simplified models to simulate estrogenic disruptions by esters of 4-hydroxy benzoic acid (parabens) **Biophys Chemistry**, v. 137, p. 1-6, set. 2008. Disponível em: [10.1016/j.bpc.2008.06.001](https://doi.org/10.1016/j.bpc.2008.06.001). Acesso em: 10 jul. 2023.

GUEVARA, M.D.F. et al. Fitotoxicidade em águas residuárias domésticas utilizando sementes como bioindicadores. **Revista DAE**, v. 67, p. 44-51, 2019. Disponível em: [10.4322/dae.2019.014](https://doi.org/10.4322/dae.2019.014). Acesso em: 27 jul. 2023.

HAMAN, C. et al. Occurrence, fate and behavior of parabens in aquatic environments: a review. **Water Research**, v. 68, p. 1-11, jan. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.09.030>. Acesso em: 7 de jul. de 2023.

HARVEY, W., P.; EVERETT, J., D. Significance of the Detection of Esters of p-Hydroxybenzoic Acid (Parabens) in Human Breast Tumours. *J Appl Toxicol*, v. 24, n. 1, p. 1-4, jan-fev. 2004. Disponível em: [10.1002/jat.957](https://doi.org/10.1002/jat.957). Acesso em: 05 jul. 2023.

HERRERO, O. et al. Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 743, n. 1, p. 20-24, mar. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.12.028>. Acesso em: 7 jul. 2023.

IVANOV, V. Root growth responses to chemicals. Soviet scientific reviews. **Section D, Physicochemical biology review**, v. 13, p. 1-70, 1994.

JANJUA, N.R. et al. Systemic uptake of diethyl phthalate, dibutyl phthalate, and butyl paraben following whole-body topical application and reproductive and thyroid hormone levels in humans. **Environmental Science & Technology**, v. 41, p. 5564-5570, 2007.

JEWELL, C. et al. Hydrolysis of a series of parabens by skin microsomes and cytosol from human and minipigs and in whole skin in short-term culture. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 225, n. 2, p. 221-228, dez. 2007. Disponível em: [10.1016/j.taap.2007.08.002](https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.08.002). Acesso em: 10 jul. 2023.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2012.

KAKEMI, K. et al. Interactions of parabens and other pharmaceutical adjuvants with plastic containers. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 19, p. 2523-2529, 1971.

KASPRZYK-HORDERN, B.; DINSDALE, R. M.; GUWY, A. J. The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. **Water Research**, v. 42, p. 3498-3518, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.04.026>. Acesso em: 17 jul. 2023.

KANG, H. M. et al. Effects of methylparaben, ethylparaben, and propylparaben on life parameters and sex ratio in the marine copepod *Tigriopus japonicus*. **Chemosphere**, v. 226, p. 388-394, jul. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.151>. Acesso em: 7 jul. 2023.

KARTHIKRAJ, R. et al. Occurrence and fate of parabens and their metabolites in five sewage treatment plants in India. **Science of the Total Environment**, v. 593, p. 592-

598, set. 2017. Disponível em: [10.1016/j.scitotenv.2017.03.173](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.173). Acesso em: 6 jul. 2023.

KHANNA, N.; SHARMA, S. Allium Cepa Root Chromosomal Aberration Assay: A Review. **Indian Journal of Pharmaceutical and Biological Research**, v. 1, p. 105-119.

KIM, D. *et al.* Multispecies bioassay of propylparaben to derive protective concentrations for soil ecosystems using a species sensitivity distribution approach. **Environmental Pollution**, v. 265, n. 114891, out. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114891>. Acesso em: 8 jul. 2023.

KIRCHHOF, M.G.; DE GANNES, G.C. The health controversies of parabens. **Skin Therapy Lett**, v. 18, n. 2, p. 5-7, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23508773/>. Acesso em: 12 jul. 2023.

KUMAR, M. *et al.* Onion (*Allium cepa* L.) peels: A review on bioactive compounds and biomedical activities. **Biomed Pharmacother**, v. 146, fev. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112498>. Acesso em: 7 jul. 2023.

KURÁS, M. *et al.* Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium* test induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 211-221, 2006.

LEE, J. *et al.* Toxicities of Four Parabens and Their Mixtures to *Daphnia magna* and *Aliivibrio fischeri*. **Toxicology and Environmental Health Sciences**, v. 33, n.4, dez. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.5620/eh.t.e2018018>. Acesso em: 05 jul. 2023.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71-81, jul-aug. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.06.002>. Acesso em: 8 jul. 2023.

LEVAN, A. Cytological reactions induced by inorganic salt solutions. **Nature**, v. 156, p. 751-752, 1945.

LEVAN, A. The effect of colchicines in root mitosis in *Allium*. **Hereditas**, v. 24, p. 471-486, 1938.

LIEBERT, N. A. Final report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben and butylparaben. **Journal of the American College of Toxicology**, v. 3, p. 147-209, 1984.

MA, T. H. *et al.* The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, v. 334, p. 185-195, 1995.

MARTIN, J. M. P. *et al.* Oxidative DNA damage contributes to the toxic activity of propylparaben in mammalian cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 702, p. 86-91, 2010.

MASHILE, G. P. *et al.* Recyclable magnetic waste tyre activated carbon-chitosan composite as an effective adsorbent rapid and simultaneous removal of methylparaben and propylparaben from aqueous solution and wastewater. **Journal of Water Process Engineering**, v. 33, fev. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.02.003>. Acesso em: 7 jul. 2023.

MASTEN, S. A. Butylparaben review of toxicological literature butylparaben [CAS no. 94-26-8]. **Review of Toxicological Literature**, p. 1-64, jan. 2005.

MATAMOROS, V.; RODRÍGUEZ, Y.; ALBAIGÉS, J. A comparative assessment of intensive and extensive wastewater treatment technologies for removing emerging contaminants in small communities. **Water Research**, v, 88, p. 777-785, 2016.

MATSUMOTO, S.T.; MARIN-MORALES, M.A. Mutagenic potential of the water of a river that receives tannery effluent using the *Allium cepa* test system. **Cytologia**, v. 69, p. 399-408, 2004.

MENDES, P.M. *et al.* Phytotoxicity as an indicator of stability of broiler production residues. **Journal of Environmental Management**, v. 167, p. 156-159, 2016. Disponível em: [10.1016/j.jenvman.2015.11.031](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.11.031). Acesso em: 28 jul. 2023.

MENDES, P. M. *et al.* Phytotoxicity test in check: Proposition of methodology for comparison of different method adaptations usually used worldwide. **Journal of Environmental Management**, v. 291, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112698>. Acesso em: 28 jul. 2023.

MOLINS-DELGADO, D.; DÍAZ-CRUZ, M.S.; BARCELÓ, D. Ecological risk assessment associated to the removal of endocrine-disrupting parabens and benzophenone-4 in wastewater treatment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 310, p. 143-151, 2016.

MONTAGNER, C. C., VIDAL, C.; ACAYABA, R. D. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. **Química Nova**, v. 40, n. 9, p. 1094-1110, jul. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170091>. Acesso em: 07 set. 2022.

MOREIRA, C. Mitose. **Revista de Ciência Elementar**, v. 3, n. 3, p. 170, 2015. Disponível em: <http://doi.org/10.24927/rce2015.170>. Acesso em: 26 jul. 2023.

MORRISON, C. 10 hazardous food additives that are banned in Europe but completely legal in the US — including suspected carcinogens and chemicals linked to low sperm counts. **Daily Mail**, 2023. Disponível em: <https://www.dailymail.co.uk/health/article-11777037/The-risky-food-additives-banned-Europe-legal-US.html>. Acesso em: 13 jul. 2023.

NASCIMENTO, G. C. S. G. *et al.* Toxicity of methylparaben and its chlorinated derivatives to *Allium cepa* L. and *Eisenia fetida* Sav. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, p. 8257–8268, mar. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-023-26539-8>. Acesso em: 9 jul. 2023.

NIETO, A. *et al.* Determination of personal care products in sewage sludge by pressurized liquid extraction and ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 30, p. 5619-5625, jul. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.05.061>. Acesso em: 5 jul. 2023.

NOWAK, K. *et al.* Parabens and their effects on the endocrine system. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 474, p. 238-251, 2018. Disponível em: [10.1016/j.mce.2018.03.014](https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.03.014). Acesso em: 16 jul. 2023.

NUNEZ, L. *et al.* Molecularly imprinted polymer for the extraction of paraben from environmental solid samples prior to their determination by high performance liquid chromatography–ultraviolet detection. **Talanta**, v. 80, n. 5, p. 1782-1788, mar. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.10.023>. Acesso em: 6 jul. 2023.

OECD - Organização de Cooperação Econômica e Desenvolvimento. **Organization for Economic Cooperation and Development: OECD guideline 208. Terrestrial plant test: 208; Seedling emergence and seedling growth test**. OECD, 2003. Disponível em: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/33653757.pdf>. Acesso em: 2 jul. 2023.

OISHI, S. Effects of butylparaben on the male reproductive system in rats. **Toxicology and Industrial Health**, v. 17, p. 31-39, 2001.

PELEGRINI, N.N.B. *et al.* Estudo da sensibilidade de sementes de Eruca Sativa (Rúcula) utilizando substâncias tóxicas para agricultura. *In*: XXXV CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA (CONBEA). 2006, João Pessoa.

PETRUCI, J. F. S., CARDOSO, A. A.; PEREIRA, E. A. Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de benzoato, sorbato, metil e propilparabenos em produtos alimentícios utilizando a eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1177-1181, abr. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000700014>. Acesso em: 07 set. 2022.

PING, K. Y. *et al.* Genotoxicity of Euphorbia hirta: an Allium cepa assay. **Molecules**, v. 17, p. 7782-7791, 2012.

RANK, J. *et al.* Genotoxicity testing of the herbicide Roundup and its active ingredient glyphosate isopropylamine using the mouse bone marrow micronucleus test, *Salmonella* mutagenicity test, and *Allium* anaphase-telophase test. **Mutation Research**, v. 300, p. 29-36, 1993.

RANK, J. The method of *Allium* anaphase-telophase chromosome aberration assay. **Ekologija**, p. 38-42, 2003.

RASTOGI, S.C. *et al.* Contents of methyl-, ethyl-, propyl-, butyl- and benzylparaben in cosmetic products. **Contact Dermatitis**, v. 32, n. 1, p. 28-30, jan. 1995. Disponível em: [10.1111/j.1600-0536.1995.tb00836.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.1995.tb00836.x). Acesso em: 10 jul. 2023.

RIZZO, L. *et al.* Consolidated vs new advanced treatment methods for the removal of contaminants of emerging concern from urban wastewater. **Science of the Total Environment**, v. 655, p. 986-1008, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.265>. Acesso em: 30 de jul. de 2023.

ROCHA, B.S. **Fitotoxicidade do corante laranja reativo 64 como efluente têxtil tratado por oxidação avançada (US/H₂O₂)**. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, 2017.

ROSSI-RODRIGUES, B. C. *et al.* **Preparo de lâmina para observação de mitose de célula vegetal ao microscópio óptico**. Campinas: Projeto EMBRIÃO, 2011. Disponível em: <https://www.bdc.ib.unicamp.br/embriao2/visualizarMaterial.php?idMaterial=1104>. Acesso em: 23 jul. 2023.

ROUTLEDGE, E. J. *et al.* Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic. **Toxicology of Applied Pharmacology**, v. 153, p. 12-19, 1998. Disponível em: [10.1006/taap.1998.8544](https://doi.org/10.1006/taap.1998.8544). Acesso em: 10 jul. 2023.

RUBINGER, C.F. **Seleção de métodos biológicos para avaliação toxicológica de efluentes industriais**. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2009.

SÁ, U. M. de. *et al.* **Avaliação da água do canal São Gonçalo através do teste de *Allium cepa***. In: XIV Congresso de Iniciação Científica, Pelotas, 2005.

SANTO, D.E. *et al.* Prospecting toxicity of octocrylene in *Allium cepa* L. and *Eisenia fetida* Sav. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, p. 8257-8268, set. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-022-22795-2>. Acesso em: 9 jul. 2023.

SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety). **Opinion on Propylparaben (CAS No 94-13-3, EC No 202-307-7) (SCCS/1623/20)**, mar. 2021. Disponível em: https://health.ec.europa.eu/system/files/2022-08/sccs_o_243.pdf. Acesso em: 11 jul. 2023.

SHIN, M.Y. *et al.* Pharmacokinetic profile of propyl paraben in humans after oral administration. **Environment International**, v. 130, 2019. Disponível em: [10.1016/j.envint.2019.104917](https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.104917). Acesso em: 15 jul. 2023.

SONI, M.G. *et al.* Evaluation of the health aspects of methyl paraben: A review of the published literature. **Food and Chemical Toxicology**. v. 40, n.1, p. 1335–1373, out. 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00107-2](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00107-2). Acesso em: 11 jul. 2023.

SONI, M. G.; CARABIN, I. G.; BURDOCK, G. A. Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). **Food and Chemical Toxicology**. v. 43, n. 7, p. 985-1015, jul. 2005. Disponível em: [10.1016/j.fct.2005.01.020](https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.01.020). Acesso em: 7 jul. 2023.

SOUZA, J.C.G. *et al.* Monitoring of the 17 EU Watch List contaminants of emerging concern in the Ave at the Sousa Rivers. **Science of the Total Environment**, v. 649, 1083-1095, 2019.

STELATO, L. M. N. *et al.* **Avaliação do potencial mutagênico de resíduos processados da farinha de mandioca (manihot esculenta), em ratos wistar**. In: I Congresso de Farmácia de Maringá: Inovações científicas e tecnológicas no âmbito farmacêutico, II Encontro Científico do Lepac e XIX Semana de Integração de Farmácia, Maringá, 2006.

TERASAKI, M.; MAKINO, M.; TATARAZAKO, N. Acute toxicity of parabens and their chlorinated by-products with *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri* bioassays. **Journal of Applied Toxicology**, v. 29, n. 3, p. 242-247, abr. 2009. Disponível em: [10.1002/jat.1402](https://doi.org/10.1002/jat.1402). Acesso em: 8 jul. 2023.

UE. **Decisão de Implantação da Comissão nº 840/2018 de 5 de junho de 2018 estabelecendo uma lista de substâncias para a monitoração da União no campo de política da água conforme à diretiva 2008/105/EC do Parlamento Europeu e do Conselho e revogando a Decisão de Implantação da Comissão 2015/495**. União Européia (UE), 2018.

UE. **Diretiva nº 75/2010 de 24 de novembro de 2010 em Emissões Industriais (Integrado Prevenção e Controle de Poluição)**. União Européia (UE), 2010.

USEPA (US Environmental Protection Agency). **Ecological Effects Test Guidelines**. 850.4200: Seed germination/root elongation toxicity test. Oppts Eco-Effect Guide, 1996. Disponível em: https://cfpub.epa.gov/si/si_public_record_Report.cfm?Lab=ORD&dirEntryID=47927. Acesso em: 7 jul. 2023.

VALE, F. *et al.* Parabens as emerging contaminants: Environmental persistence, current practices and treatment processes. **Journal of Cleaner Production**, v. 347, mai. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.131244>. Acesso em: 15 jul. 2023.

VIDAKOVIC, Z.; PAPES, D.; TOMIC, M. Toxicity of waste drilling fluids in modified Allium test. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 69, p. 413-423, 1993.

WANG, W.; KANNAN, K. Fate of parabens and their metabolites in two wastewater treatment plants in New York state, United States. **Environmental Science & Technology**, v. 50, p. 1174-1181, 2016. Disponível em: [10.1021/acs.est.5b05516](https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05516). Acesso em: 16 jul. 2023.

WU, Y. *et al.* Comparative studies of aerobic and anaerobic biodegradation of methylparaben and propylparaben in activated sludge. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 138, p. 25, 31, out. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.12.017>. Acesso em: 14 jul. 2023.

YOUNG, B.J. et al. Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76, p. 182-186, 2012. Disponível em: [10.1016/j.ecoenv.2011.09.019](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.09.019). Acesso em: 28 jul. 2023.

ZUCCONI, F. et al. Phytotoxins during the stabilization of organic matter. *In*: Gasser JKR (ed) Composting of agricultural and other wastes. **Elsevier Applied Science**, Londres, p. 73-85, 1985.