



UNIVERSIDADE FEDERAL DO NORTE DO TOCANTINS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE ANIMAL E SAÚDE
PÚBLICA NOS TRÓPICOS

ROSA MARA DE SOUSA SANTOS ROMANO

**EFEITOS INDIVIDUAIS E COMBINADOS DOS FÁRMACOS
IBUPROFENO E LOSARTANA NO TELEÓSTEO
AMAZÔNICO *Collossoma macropomum***

Araguaína – TO
2023

ROSA MARA DE SOUSA SANTOS ROMANO

**EFEITOS INDIVIDUAIS E COMBINADOS DOS FÁRMACOS
IBUPROFENO E LOSARTANA NO TELEÓSTEO
AMAZÔNICO *Collossoma macropomum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos da Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), como requisito à obtenção do grau de Mestre (a) em Sanidade Animal e Saúde Pública.

Orientador (a): Doutor Marcelo Gustavo Paulino

Araguaína – TO
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

R759e Romano, Rosa Mara de Sousa Santos.
EFEITOS INDIVIDUAIS E COMBINADOS DOS FÁRMACOS
IBUPROFENO E LOSARTANA NO TELEÓSTEO AMAZÔNICO *Colossoma*
macropomum. / Rosa Mara de Sousa Santos Romano. – Araguaína, TO, 2023.
65 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins
– Câmpus Universitário de Araguaína - Curso de Pós-Graduação (Mestrado)
em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos, 2023.

Orientador: Marcelo Gustavo Paulino

1. Ecotoxicidade. 2. Contaminantes Emergentes. 3. Teleósteo. 4.
Hepatotoxicidade. I. Título

CDD 636.089

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer
forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte.
A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184
do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da
UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

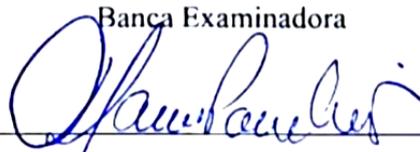
Rosa Mara de Sousa Santos Romano

**EFEITOS INDIVIDUAIS E COMBINADOS DOS FÁRMACOS IBUPROFENO E
LOSARTANA NO TELEÓSTEO AMAZÔNICO *Colossoma macropomum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos. Foi avaliado para a obtenção do título de Mestre (a) em Sanidade Animal e Saúde Pública e aprovada (o) em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Data de aprovação: 11 /10 /2023

Banca Examinadora



Prof. Dr. Marcelo Gustavo Paulino, UFNT

Orientador/Presidente



Prof. Dr. Sandro Estevam Moron, UFNT

Membro Interno



Prof. Dra. Domenica Polamaris Mariano de Souza, UFNT

Membro Externo

“Suba o primeiro degrau com fé, não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo.
Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

Sobretudo a Deus, autor e consumidor da minha fé. Aquele que me sustenta e me permitiu chegar a este momento.

Ao meu digníssimo esposo André Romano, obrigado por ser o maior investidor da minha vida, por estar sempre ao meu lado torcendo e me incentivando, mesmo quando tinha meus momentos de desânimo, seu carinho e confiança em mim me animavam a continuar prosseguindo. Obrigado por fazer parte de cada etapa desse processo, que foi árduo, mas ao seu lado a caminhada tornou-se mais leve. Que juntos, eu você e nosso bebê (que estamos esperando), possamos desfrutar de novas conquistas, e que nosso futuro seja ainda mais brilhante, amo você.

Aos meus pais, meus irmãos Mayara e Paulo, que mesmo a 2.013 km de distância, sempre me incentivaram, torceram por mim e acreditaram na minha capacidade, obrigado por serem à base da minha vida e estarem sempre ao meu lado.

Ao respeitável Dr. Marcelo Paulino, meu orientador, uma pessoa incrível de coração bondoso. Sou grata a Deus por poder percorrer essa jornada com seu auxílio. Nós sabemos que não foi nada fácil, mas através da sua vida pude viver novos desafios e ter experiências incríveis. Obrigado por me mostrar novos horizontes, por ser mais que um professor, ser um amigo, espero que ainda possamos compartilhar novos capítulos.

A banca examinadora, professora Dra. Domenica, e Dr. Sandro, que aceitaram o convite para fazer parte desse momento tão marcante em minha vida com contribuições relevantes para o meu trabalho. Todo meu carinho e admiração por vocês.

A professora Dra. Diana Amaral Monteiro, por me receber na Universidade Federal de São Carlos - SP, e permitir que eu realizasse parte importante das minhas análises. Obrigado por todo profissionalismo, por compartilhar seu conhecimento e pelo auxílio mesmo após meu retorno ao Tocantins.

Ao professor Dr. Sandro Estevam Moron, por permitir acesso ao laboratório e ceder materiais para a realização dessa pesquisa. As técnicas do Laboratório Liana e Gilzelle, que sempre estiveram dispostas a compartilhar seus conhecimentos e nunca mediram esforço para me ajudar no que fosse necessário.

Aos meus queridos companheiros da Ecotoxicologia, Ducey, Danilo e em especial a Silvana, que foi meu braço direito nessa empreitada, menina de fibra, que com chuva ou sol sempre esteve comigo, muito obrigado por cada período que passamos juntas, torço muito por você.

A minha amiga e parceira Malba. Quanto perrengue passamos na viagem para São Carlos, tudo por análises para a pesquisa, mas também, quanto aprendizado obtivemos naquele lugar, e o quanto a companhia uma da outra tornou até os perrengues divertidos. Obrigado por ser uma amiga maravilhosa, que se importa de verdade comigo, eu espero que você tenha um futuro de muito sucesso, e que seu coração seja sempre generoso.

Ao meu amigo Adson Junior, por prontamente me ajudar na aquisição dos fármacos. Enfim, a todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para que esse trabalho pudesse ser realizado, muito obrigado.

A caminhada acadêmica é individual, mas nunca solitária.

RESUMO

Fármacos em ecossistemas aquáticos é uma classe de contaminantes emergentes das quais são advindas de diversas fontes de emissão, não sendo removidos por tratamentos convencionais de águas residuais. Dessa forma, permanecem nos corpos d'água e podem apresentar riscos à biota aquática, como aos peixes. Dentre os produtos farmacêuticos mais encontrados no meio aquático, estão os anti-inflamatórios e os anti-hipertensivos. Estes poluentes normalmente não são encontrados de forma isolada e poucos estudos abordam os perigos da associação desses contaminantes, que permitam conhecer os impactos ecotoxicológico dessas misturas complexas em organismos aquáticos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade subletal aguda do anti-inflamatório Ibuprofeno (IBU), do anti-hipertensivo Losartana (LS) individualmente e em mistura no fígado de tambaqui (*Colossoma macropomum*), através de biomarcadores fisiológicos, bioquímicos e histopatológicos. Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos (n=10) contendo os fármacos individualmente e em mistura binária, sendo um grupo livre de contaminantes (controle), um grupo exposto a 25µg de IBU, um grupo exposto a 2µg de LS, e um último grupo exposto a associação dos dois fármacos (25µg de IBU + 2µg de LS), de modo agudo por 96 horas em sistema estático. Após o período de exposição foram coletados sangue para as análises hematológicas e fígado para as análises bioquímicas e histopatológicas. De acordo com os resultados, observou-se que não houve alterações significativas nos parâmetros hematológicos eritrocitários entre os grupos, no entanto, nos parâmetros leucocitários os animais expostos ao IBU apresentaram uma diminuição no número de linfócitos e o aumento no número de neutrófilos e LG-PAS. Os demais grupos também apresentaram aumentos de células leucocitárias. No grupo LS, uma alteração circulatória do tipo hiperemia foi observada, enquanto, no grupo mistura, as alterações visíveis foram nos hepatócitos, demonstrando hipertrofia celular e alterações nucleares. As patologias individuais são de caráter progressivo e podem comprometer a morfofisiologia hepática, como demonstrado no Índice de Lesão do órgão (I_{org}) para LS e Mistura. A concentração de glutathiona reduzida (GSH) foi diminuída em todos os grupos amostrais, entretanto, apenas no grupo mistura foi observado um aumento da atividade da glutathiona S-transferase (GST).

Palavras-chave: Ecotoxicidade; contaminantes emergentes; teleósteos; hepatotoxicidade.

ABSTRACT

Pharmaceuticals in aquatic ecosystems are a class of emerging contaminants that originate from various emission sources and are not removed by conventional wastewater treatments. Therefore, they remain in water bodies and can pose risks to aquatic biota, such as fish. Among the pharmaceutical products most commonly found in aquatic environments are anti-inflammatory and antihypertensive drugs. These pollutants are usually not found in isolation, and few studies address the dangers of the combination of these contaminants, which would allow an understanding of the ecotoxicological impacts of these complex mixtures on aquatic organisms. Therefore, the objective of this study was to evaluate the acute sublethal toxicity of the anti-inflammatory Ibuprofen (IBU), the antihypertensive Losartan (LS) individually and in mixture in the liver of tambaqui (*Colossoma macropomum*), through physiological, biochemical, and histopathological biomarkers. The animals were randomly divided into four groups (n=10) containing the drugs individually and in binary mixture, with one group free of contaminants (control), one group exposed to 25µg of IBU, one group exposed to 2µg of LS, and a last group exposed to the combination of the two drugs (25µg of IBU + 2µg of LS), acutely for 96 hours in a static system. After the exposure period, blood was collected for hematological analyses and liver for biochemical and histopathological analyses. According to the results, there were no significant alterations in erythrocyte hematological parameters among the groups; however, in leukocyte parameters, animals exposed to IBU showed a decrease in lymphocyte count and an increase in neutrophil and LG-PAS counts. The other groups also showed increases in leukocyte cells. In the LS group, a circulatory alteration of hyperemia type was observed, while in the mixture group, visible alterations were observed in hepatocytes, demonstrating cellular hypertrophy and nuclear alterations. Individual pathologies are progressive in nature and may compromise hepatic morphophysiology, as demonstrated in the Organ Injury Index (Iorg) for LS and Mixture. Reduced glutathione (GSH) concentration was decreased in all sample groups; however, only in the mixture group was an increase in glutathione S-transferase (GST) activity observed.

Keywords: Ecotoxicity; emerging contaminants; teleosts; hepatotoxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

Figura 1- Possíveis rotas dos fármacos na água.....	19
Figura 2- Estrutura química do Ibuprofeno.....	22
Figura 3- Mecanismo de ação do Ibuprofeno.....	23
Figura 4- Estrutura química do Losartana.....	24
Figura 5 Mecanismo de ação do Losartana.....	25
Figura 6- Peixe amazônico <i>Colossoma macropomum</i>	27

CAPÍTULO II

Figura 1- Fotomicrografia das alterações identificadas no tecido hepático de <i>Colossoma macropomum</i> após exposição aguda por 96 horas aos fármacos Ibuprofeno, Losartana e associação de ambos (mistura).....	51
Gráfico 1- Índice de lesão histopatológica do órgão do tecido hepático de <i>Colossoma macropomum</i> após exposição aguda por 96 horas aos fármacos Ibuprofeno, Losartana e associação de ambos (mistura).....	52
Gráfico 2- Gráfico dos biomarcadores de estresse oxidativo em fígado de <i>Colossoma macropomum</i> após de fígado após exposição aguda por 96 horas aos fármacos Ibuprofeno, Losartana e associação de ambos (mistura).....	53

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela1- Concentração de Ibuprofeno ao redor do mundo em diferentes matrizes aquáticas.....21

Tabela 2 Concentração de Losartana ao redor do mundo em diferentes matrizes aquáticas.....21

CAPÍTULO II

Tabela1- Parâmetros hematológicos de *Colossoma macropomum* após exposição aguda por 96 horas aos fármacos Ibuprofeno, Losartana e associação de ambos (mistura).....49

Tabela 2 – índice de alterações histopatológicas individual (I_{alt}) identificadas no tecido hepático de *Colossoma macropomum* após exposição aguda por 96 horas aos fármacos Ibuprofeno, Losartana e associação de ambos (mistura).....50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINES - Anti-inflamatório não esteroide

CAT - Catalase

CEUA– Comitê de Ética de Uso de Animais

cm - Centímetros

EMVZ - Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia de Araguaína

Fi – Fator de importância patológica

g L⁻¹ – grama por litro

GSH - Glutathiona Reduzida

GST - Glutathiona S-Transferase

HE – Hematoxilina/ Eosina

I_{alt} – índice de alteração individual do órgão

IBU - Ibuprofeno

I_{org} – índice de lesão no órgão

Kg - Quilogramas

LaMAC - Laboratório de Morfofisiologia Animal Comparada

LPO - Lipoperoxidação Lipídica

LS - Losartana

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

mg L⁻¹ – miligrama por litro

pH- Potencial Hidrogeniônico

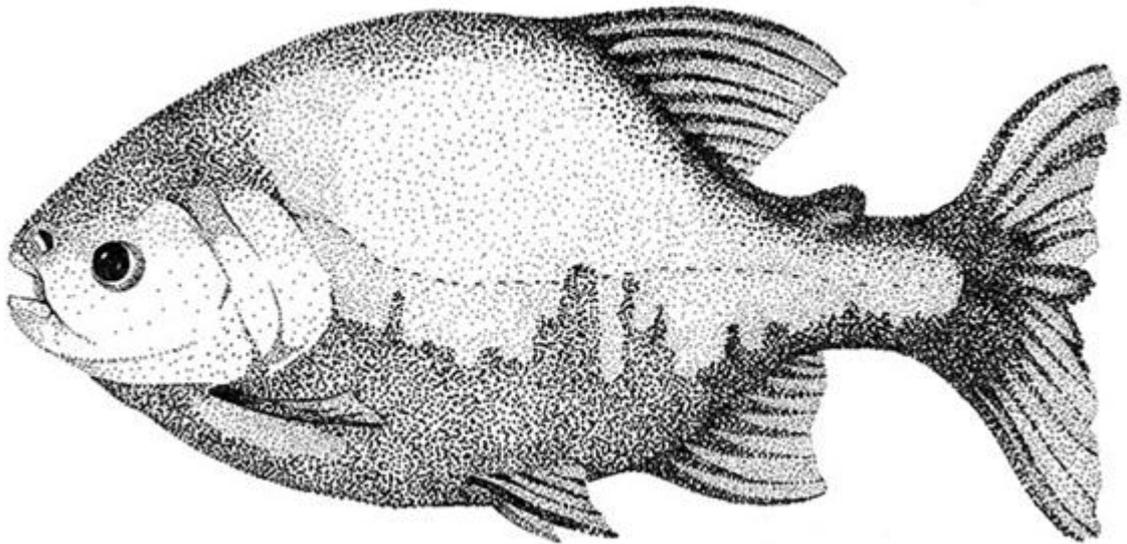
Sc – Escore

SUMÁRIO

CAPÍTULO I:	15
1. CONTAMINANTES EMERGENTES	16
2. CONTAMINAÇÃO NO AMBIENTE AQUÁTICO POR FÁRMACOS	18
2.1 Fármacos em Corpos Hídricos	18
2.1.1 Ibuprofeno.....	22
2.1.2 Losartana.....	24
3. PEIXES COMO BIOINDICADORES	26
3.1 <i>Colossoma macropomum</i> (Tambaqui)	26
4. BIOMARCADORES DE TOXICIDADE	28
4.1 Biomarcadores Hematológicos	28
4.2 Biomarcadores Bioquímicos	29
4.3 Biomarcadores Histopatológicos	30
4. JUSTIFICATIVA	31
5. OBJETIVOS	32
5.1 Objetivo Geral	32
5.2 Objetivos Específicos	32
REFERÊNCIAS	33
CAPÍTULO II: Efeitos dos Fármacos Ibuprofeno e Losartana Individualmente e em Mistura Binária em Fígado de Peixe Amazônico Tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>)	41
1. INTRODUÇÃO	42
2. MATERIAIS E MÉTODO	45
2.1 Animais	45
2.2 Fármacos	45
2.3 Delineamento Experimental e Coleta de Amostras	45
2.4 Biomarcadores Hematológicos	46
2.5 Biomarcadores Bioquímicos	46
2.6 Biomarcadores Histopatológicos	47
2.7 Análise Estatística	48
3. RESULTADOS	49
3.1 Biomarcadores Hematológicos	49

3.2 Biomarcadores Histopatológicos.....	50
3.3 Biomarcadores Bioquímicos.....	52
4. DISCUSSÃO.....	54
5. CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS.....	59

CAPÍTULO I



Colossoma macropomum
(SUÁREZ, 2015)

1. CONTAMINANTES EMERGENTES

Os Contaminantes Emergentes (CE) são substâncias químicas tóxicas frequentemente detectadas no meio ambiente que não são amplamente monitoradas e regulamentadas (CAMPANHA et al., 2015). Esses compostos são considerados emergentes pois estão sendo constantemente inseridos no ambiente. e seus impactos a saúde humana e ao meio ambiente ainda não são totalmente compreendidos (TIJANI et al., 2016).

A lista de compostos e produtos químicos é extensa e continua crescendo à medida que novos produtos químicos comerciais são introduzidos (RODRIGUEZ-NARVAEZ et al., 2017). São considerados contaminantes emergentes os fármacos, hormônios, cafeína, drogas ilícitas, pesticidas, compostos antibacterianos, microplástico e produtos de higiene pessoal e perfumaria (MACHADO et al., 2016).

Os CE têm sido inseridos no ambiente constantemente por um longo período através de várias fontes (GEISSEN et al., 2015). Atividades antrópica, como excesso no uso de fertilizantes e pesticidas, descarte inadequado de resíduos sólidos, e despejo de efluentes industriais em corpos aquáticos são responsáveis por danos aos recursos hídricos tanto superficiais quanto subterrâneos (MONTAGNER; VIDAL; ACAYBA, 2017; MAGRO et al., 2020). Muitos desses poluentes não são totalmente eliminados por processos tradicionais de tratamento de esgoto, por essa razão, até mesmo em países que possuem tratamento de saneamento adequado são identificados a presença de contaminantes emergentes em diferentes matrizes de água, incluindo água potável (KASPRZYK-HORDERN et al., 2008). Os corpos de água naturais estão gradualmente se transformando em uma mistura tóxica complexa de poluentes liberados continuamente e de forma não tratada ou parcialmente tratada (DEY, 2020).

No Brasil a problemática dos contaminantes emergentes pode ser ainda maior dado a ineficiência e em muitos casos a falta de saneamento básico. Dados do Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS) relatam que cerca de 35 milhões de pessoas no Brasil não têm acesso à água tratada e aproximadamente 100 milhões não possuem coleta de esgoto. Estima-se ainda que 34,1 milhões de domicílios não contam com serviço de esgotamento sanitário no Brasil, o que representa 49,2% da população. Somente no Nordeste são 13,6 milhões de domicílios que não possuem o serviço, representando 74,6% do total da região (IBGE, 2021).

A Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico (ANA) relata que no Brasil são produzidas diariamente cerca de 9.098 toneladas de carga orgânica, desse total 5.516 toneladas chegam aos rios e reservatórios mesmo após o tratamento dos esgotos.

Diversos estudos mostram a presença de diferentes contaminantes emergentes e em variadas concentrações nas águas de diferentes regiões do Brasil (SODRÉ; LOCATELLI; JARDIM, 2010; MACHADO et al., 2016; MONTAGNER; VIDAL; ACAYBA, 2017).

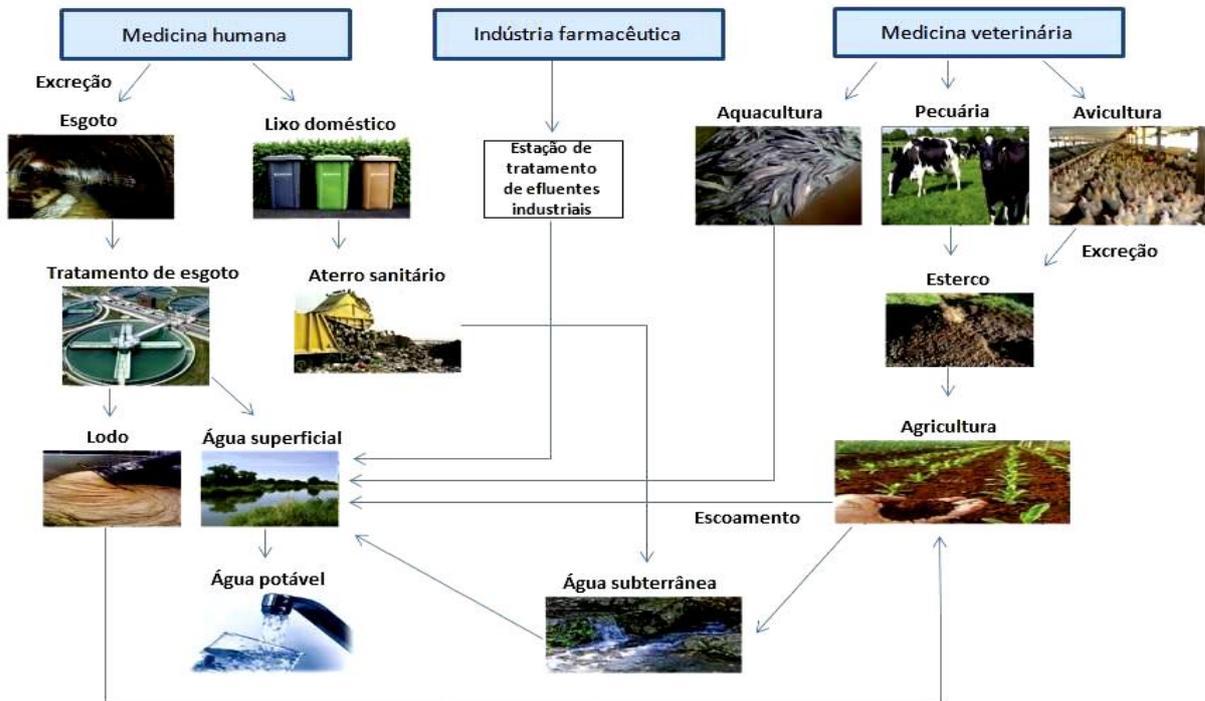
2. CONTAMINAÇÃO DO AMBIENTE AQUÁTICO POR FÁRMACOS

2.1 Fármacos em Corpos Hídricos

Segundo Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), fármaco é o princípio ativo da formulação de um medicamento que é responsável pelo fim terapêutico e capaz de modificar as funções fisiológicas de um organismo.

O uso de medicamentos vem aumentando ao longo do tempo, somente entre 2010 a 2015 houve um crescimento de 40% nos gastos com medicação pelo Sistema Único de Saúde (SUS), onde os gastos passaram de R\$14,3 bilhões em 2010 para quase R\$20 bilhões em 2015 (IPEA, 2018). Estes números crescentes são relatados em todo o mundo devido ao crescimento populacional e ao simultâneo aumento da expectativa de vida aliados ao alto consumo desses produtos (REIS, et al., 2019). O aumento no consumo aliado à ineficiência dos tratamentos para retirada destes resíduos permite o aumento na ocorrência dessas substâncias nos recursos hídricos, o que tem sido motivo de preocupação em relação aos impactos ambientais (SANTOS et al., 2010), fazendo com que estes compostos se tornaram uma grande preocupação aos ambientes aquáticos (GINEBRADA et al., 2010).

Diferentes classes desses produtos são inseridas diariamente nos corpos aquáticos em quantidades que variam de concentrações que tange ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$ (SODRÉ et al., 2009; CAMPANHA et al., 2014; COLLADO et al., 2014; KRAMER et al., 2015; PAI et al., 2020). A toxicidade dos produtos farmacêuticos e seus metabólitos no meio ambiente têm ganhado cada vez mais atenção, com um foco significativo nos medicamentos encontrados em esgotos ou efluentes de estações de tratamento de esgoto (KUMMERER et al., 2009). Atualmente, os fármacos que são encontrados em quase todos os corpos d'água são das classes dos anti-inflamatórios e anti-hipertensivos (SANTOS et al., 2010; SOUSA et al., 2018), e apesar de serem encontrados em baixas concentrações são introduzidos no ambiente constantemente e podem causar efeitos indesejáveis (OLIVEIRA et al., 2013; EMBRAPA, 2019). Estes compostos adentram ao ambiente através dos efluentes domésticos, industriais, hospitalares, descarte inadequado de medicamentos vencidos ou não utilizados, e também através excreção dos usuários (TAYLOR; SENAC, 2014) (Figura 1).

Figura 1. Possíveis Rotas de Fármacos na Biota Aquática

Fonte. Adaptado de (Mathias, 2018)

Pesquisas evidenciam que diversas dessas substâncias parecem persistir no meio ambiente (BILLA e DEZOTTI, 2003). Esses compostos posteriormente podem ser encontrados em diferentes matrizes aquáticas, como em águas de superfícies, águas de estações (ETAR) de tratamento de efluente e influente aquáticos e até mesmo em águas subterrâneas e água potável (MARGOT et al., 2013; ESLAMI et al., 2015; KRAMER et al., 2015; PEREIRA et al., 2016; MADIKIZELA e CHIMUKA, 2017).

No Brasil a presença de fármacos nos corpos d'água pode ser ainda mais problemática, devido ineficiência ou ausência de saneamento básico. Em diferentes regiões do país, o esgoto é lançado diretamente nos corpos aquáticos (SNIS, 2017). A Resolução nº 306 da ANVISA (BRASIL, 2004) e a Resolução nº 358 do CONAMA (BRASIL, 2005) são responsáveis pelas regulamentações da destinação de resíduos de saúde. Em 2020 o Governo Federal Brasileiro através Decreto nº 10.388 implantou a logística reversa para os medicamentos domiciliares vencidos ou em desuso, de consumo humano, industrializados e manipulados, e de suas embalagens após o descarte pelos consumidores (BRASIL, 2020).

A presença de resíduos de medicamentos no esgoto doméstico e em corpos d'água naturais é um tema internacional de grande importância. Cerca de 50% a 90% do fármaco

excretado pelos humanos permanece inalterado e é persistente no ambiente. Há uma ampla presença dos fármacos e seus metabólitos em ambientes aquáticos ao redor do mundo (BILAL et al, 2019). Estudos demonstram a presença de diferentes contaminantes emergentes e em variadas concentrações nas águas de diferentes regiões do Brasil (SODRÉ; LOCATELLI; JARDIM, 2010; MACHADO et al., 2016; MONTAGNER; VIDAL; ACAYBA, 2017).

Seja na forma inalterada ou metabólitos, os fármacos podem alcançar longas distâncias nos corpos hídricos, dependendo do tipo de composto, características do ambiente e suas propriedades físico-químicas (EBELE; ABOU-ELWAFI ABDALLAH; HARRAD, 2017). Suas concentrações também podem se tornar mais ou menos frequente dependendo do tipo de matriz aquática. Maiores concentrações estão especialmente em águas de efluentes tratados e não tratados e regiões jusante de rios. A estação seca também pode ser um fator que contribua para maiores concentrações (CAMPANHA et al., 2014).

A presença desses fármacos é evidenciada em corpos aquáticos e diversas regiões do mundo. A presença de Ibuprofeno (IBU) é encontrada em corpos aquáticos nos Estados Unidos, África do Sul, China, Ira, México e Suécia (Tabela 1), ao passo que, a presença de losartana (LS) está presente em matrizes aquáticas da Espanha, Holanda, Portugal, Índia e no Brasil (Tabela 2). O IBU um fármaco que tem sido detectado em diferentes matrizes aquáticas, e apesar da baixa concentração sua ocorrência tem sido frequentemente (TEWARI et al 2013; CAMPANHA et al., 2014). O LS é um fármaco anti-hipertensivo que também tem apresentado uma frequência em análises de água de diferentes regiões do mundo. Seja em águas de estação de tratamento efluente e influente, como também em águas superficiais e até mesmo águas de região costeira e suas maiores concentrações foram identificadas em efluente de ETAR.

Tabela 1. Concentração de Ibuprofeno ao redor do mundo em diferentes matrizes aquáticas.

CONCENTRAÇÃO DE IBUPROFENO NA ÁGUA ($\mu\text{g L}^{-1}$)			
País	Matriz Aquática	Quantificação	Referencias
África do Sul	Água de Superfície	153–312	MADIKIZELA e CHIMUKA, 2017
Brasil	Água de Superfície	102- 370	KRAMER et al. 2015
Brasil	ETAR Influyente	122000-1075000	COLLADO et al. 2014
Brasil	Águas Superficiais	<0,002- 0,743	CAMPANHA et al., 2014
China	Água Subterrânea	19–58	PENG et al., 2014
Espanha	Água de Superfície	160–9890	GINEBREDA et al., 2010
Estados Unidos	Água Potável	5,85	LORAINE e PETTIGROVE, 2006
Estados Unidos	ETAR Influyente	19.5–25.8	LORAINE e PETTIGROVE, 2006
Estados Unidos	ETAR Efluente	3.23–11.7	LORAINE e PETTIGROVE, 2006
Estados Unidos	Água de Superfície	0,02- 18	KOLPIN et al., 2002
Irã	Água Potável	22– 47	ESLAMI et al., 2015
Irã	Água de Superfície	0.022– 0.037	ESLAMI et al., 2015
Irã	ETAR Influyente	200–1050	ESLAMI et al., 2015
Irã	ETAR Efluente	30-40	ESLAMI et al., 2015
México	Água de Superfície	37.8–51.2	MARTINEZ-VIEYRA et al., 2017
Noruega	Água de Superfície	1–9.2	REINHOLDS et al., 2017
República Checa	Água de Superfície	32000	MARSIK et al., 2017
Suécia	ETAR Influyente	156.700–228.200	MARSIK et al., 2017
Suécia	ETAR Efluente	520	MARSIK et al., 2017
Tailândia	Afluente de ETE	0.385–1.260	TEWARI et al., 2013
Tailândia	Efluente ETE	0.025–0.182	TEWARI et al., 2013
Tailândia	Águas Superficiais	0.06- 0.369	TEWARI et al., 2013

Fonte: Autora

Tabela 2. Concentração de Losartana ao redor do mundo em diferentes matrizes aquáticas.

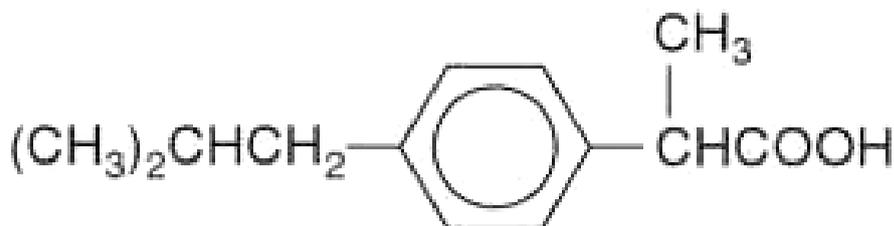
CONCENTRAÇÃO DE LOSARTANA NA ÁGUA ($\mu\text{g L}^{-1}$)			
País	Matriz Aquática	Quantificação	Referencias
Brasil	Água do Mar (Região Costeira)	0,0118- 0,032	PEREIRA et al., 2016
Espanha	ETAR Efluente	0,51	MARGOT et al., 2013
Espanha	Água do Mar	0,004	GROS, RODRÍGUEZ-MOZAZ e BARCELÓ, 2012
Espanha	ETAR Influyente	0,143	HUERTA-FONTELA et al., 2011
França	Água de Superfície	0,011	BOUISSOU-SCHURTZ et al., 2014
Holanda	ETAR Efluente	0,09	OOSTERHUIS, SACHER e LAAK 2013
Holanda	ETAR Influyente	0,79	OOSTERHUIS, SACHER e ter LAAK 2013
Índia	ETAR Efluente (Industria Farmacêutica)	2500	LARSSON, PEDRO e PAXEUS 2007
Portugal	ETAR Efluente	0,143	SANTOS et al., 2013
Portugal	ETAR Influyente	0,237	SANTOS et al., 2013
Portugal	ETAR Efluente (Hospital Universitário)	0,91	SANTOS et al., 2013

Fonte: Autora

2.1.1 Ibuprofeno

O Ácido Isobutilpropanoicofénolico, mais conhecido como IBU (Figura 2) é um anti-inflamatório não-esteroides (AINES), ou seja, não pertence à classe dos esteroides, como por exemplo, a cortisona. (OSSWALD, 2001; ALMEIDA et al., 2009). É um fármaco reconhecido mundialmente com altas taxas de consumo humano, pois é frequentemente prescrito como antitérmico, analgésico e anti-inflamatório para reduzir febre, dor de cabeça, dores musculares, desconforto menstrual, dor neurológica e dor pós-cirúrgica (ANVISA, 2022).

Figura 2. Estrutura química do Ibuprofeno

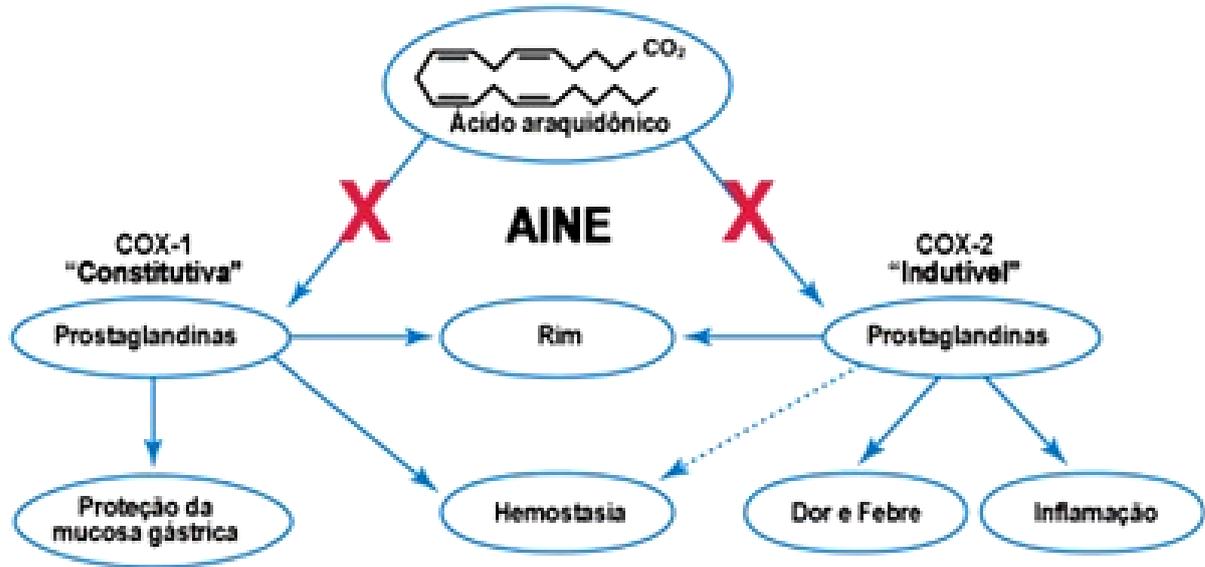


Fonte. GROSSER; SMYTH; FITZGERALD (2012).

O IBU começou a ser comercializado em 1969 no Reino Unido para o tratamento da artrite reumatoide. Todavia a utilização deste fármaco só disparou a partir de 1983 quando começou a ser vendido sem receita nas farmácias no Reino Unido (ALMEIDA, et al., 2009). Seu controle médico geralmente não é regulamentado. Atualmente pertence à lista nacional de medicamentos essenciais (RENAME, 2022) e a lista de medicamentos essenciais da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2023).

O mecanismo de ação é promover uma inibição seletiva de ciclooxidasas 1 e 2, por meio da conversão do ácido araquidônico em endoperóxido cíclico formando os mediadores pró-inflamatórios prostaglandinas e tromboxano, reduzindo a produção de mediadores de inflamação e impedindo a ativação de nociceptores (GRAVEL et al., 2009; JAN-ROBLERO; CRUZ- MAYA, 2023).

Figura 3. Mecanismo de ação do Ibuprofeno



Fonte: COSTA (2017)

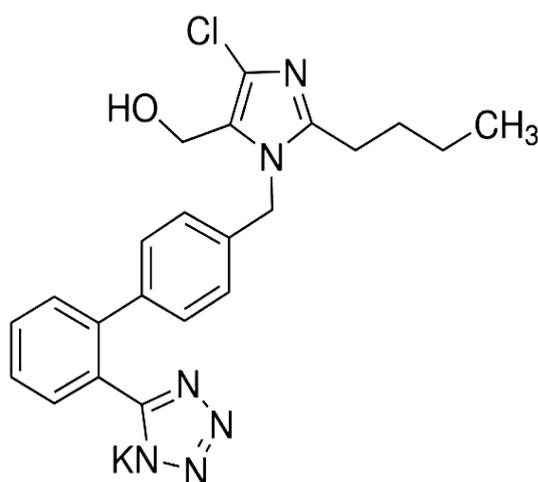
O IBU é rapidamente absorvido no trato gastrointestinal, sendo absorvida cerca de 80% da dose ingerida. O início de ação ocorre de 15 a 30 minutos após sua administração oral. A taxa de ligação protéica é alta (99%) e a concentração plasmática máxima é atingida em 1,2 tendo duração de 4 a 6 horas no organismo. Sua meia-vida de eliminação dura de 1,8 a 2 horas. A biotransformação é hepática e a excreção praticamente completa em 24 horas após a última dose (ANVISA, 2018). O fármaco possui baixa solubilidade em água (EMA, 2006). Sua meia-vida no ambiente é de 20 dias, portanto, não é considerado persistente (BOUISSOU-SCHURTZ et al., 2016).

O IBU é metabolizado no fígado por meio de um processo de oxidação, que é realizado pela enzima CYP2C9. Cerca de 40% são metabolizado em carboxi-ibuprofeno e 26% em 2-hidroxiibuprofeno. Embora o carboxi-ibuprofeno seja a forma mais excretada, ele é mais facilmente biodegradado, tornando o 2-hidroxi-ibuprofeno mais persistente no ambiente. É classificado como "perigoso para o ambiente aquático" (BOUISSOU-SCHURTZ et al., 2016) e encontrado no ambiente em uma faixa que varia de 0,9 a 27,25 $\mu\text{g L}^{-1}$ (WHO, 2012) mas geralmente ele é encontrado em concentração médias de 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (BILA; DEZOTTI, 2003).

2.1.2 Losartana

A LS é um medicamento anti-hipertensivo pertencente à classe dos antagonistas de angiotensina (ARAs) (Figura 4), indicado para o tratamento da hipertensão arterial sistêmica e controle de doenças cardiovasculares (YAMAMOTO, 2014). Foi descoberta por um grupo de jovens pesquisadores da Estação Experimental DuPont nos Estados Unidos no ano de 1986 (FIORAVANT, 2011), hoje é o fármaco anti-hipertensivo e um dos medicamentos para insuficiência cardíaca mais consumido no Brasil (ANVISA, 2022). Pertence à lista de Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME, 2022), e à lista mundial de medicamentos essenciais (OMS, 2023).

Figura 4. Estrutura química do Losartana



Fonte. MERCK (2015)

A LS é classificada como um bloqueador dos receptores AT1 da angiotensina II. A angiotensina II é um importante peptídeo do sistema renina-angiotensina-aldosterona e tem um papel importante na regulação da pressão sanguínea (TRAP et al., 2009). Para antagonizar os efeitos da angiotensina II, a LS relaxa a musculatura lisa e com isso promove a vasodilatação, aumenta a excreção renal de sódio e água, reduz o volume plasmático (KATZUNG; TREVOR, 2015). A ligação da LS potássica é seletiva ao AT1 e, portanto, não interage ou bloqueia outros receptores ou canais iônicos atuantes na regulação cardiovascular (MERCK, 2015).

Figura 5. Mecanismo de Ação do Losartana



Fonte: Adaptado de HAMEL et al., (2016)

3. PEIXES COMO BIOINDICADORES

Os bioindicadores são organismos utilizados para avaliação da qualidade ambiental, capazes de apontar efeitos toxicológicos, pois, possibilitam a identificação de alterações e efeitos subletais nos organismos frente à exposição de contaminantes (ARIAIS et al., 2007).

Considerando que os peixes são organismos que podem acumular substâncias em concentrações com níveis superiores aos encontrados nos ambientes onde vivem (NIMMO,1985; TOMITA; BEYRUTH, 2002). Por meio da análise de tecidos do peixe, como fígado, músculos e brânquias, é possível avaliar a presença e o nível de poluentes químicos e compostos orgânicos na água.

O fígado é um órgão volumoso anexo ao sistema digestivo e é composto por um parênquima celular e fibras de suporte. Suas células, conhecidas como hepatócitos, têm um formato poligonal e são uninucleadas, desempenhando diversas funções metabólicas (LINS, et al., 2010). Entre as principais funções hepáticas, destacam-se a formação de proteínas plasmáticas, a disseminação de proteínas, síntese de certos aminoácidos a formação de ureia para eliminação de amônia (HONORATO et al. 2013). Além disso, o fígado possui capacidade de biotransformar, bioativar e excretar xenobióticos (BERNET et al., 1999; ZENI, 2016).

3.1 *Colossoma macropomum* (Tambaqui)

O *Colossoma macropomum* (Figura 6) é uma espécie de peixe teleósteo de água doce, conhecido popularmente por tambaqui. Pertencente à ordem Characiformes e família Serrassalmidae, são uma das principais espécies encontradas na região da bacia amazônica, possuindo alto valor comercial e importância culinária e esportiva (VIEIRA et al., 2011).

A importância ecotoxicológica do *C. macropomum* como bioindicador ambiental reside no fato de que esse peixe pode acumular substâncias tóxicas presentes no ambiente, em concentrações com níveis superiores aos encontrados nos ambientes onde vivem (NIMMO,1985; TOMITA; BEYRUTH, 2002), refletindo as condições de contaminação de uma determinada área.

Figura 6. Peixe amazônico *Colossoma macropomum*. Escala = 1cm.



Fonte: Autora

O *C. macropomum* tem sido usado em bioensaios de toxicidade, se apresentando como um excelente bioindicador do sistema aquático (GROFF, 2008). Essa capacidade de acumulação de substâncias tóxicas no *C. macropomum* o torna um indicador útil para avaliar a qualidade ambiental de rios, lagos e ecossistemas aquáticos em geral. Além disso, sua ampla distribuição geográfica e hábitos alimentares variados contribuem para sua relevância como bioindicador.

4. BIOMARCADORES DE TOXICIDADE

Biomarcadores são respostas biológicas que podem ser identificadas e medidas através de alterações moleculares, celulares, fisiológicas e comportamentais em um indivíduo ou parte dele. Essas respostas podem ser associadas e identificadas como resultado da exposição a um agente estressor ou de seus efeitos no organismo (PEAKALL, 1999).

Em peixes são ferramentas de grande importância quando se pretende compreender o comportamento fisiológico dos organismos expostos ao agente tóxico, e quais os efeitos deletérios que os xenobióticos podem causar a estes organismos (LI et al., 2012). Os biomarcadores bioquímicos, genéticos, hematológicos e imunológicos utilizados como ferramenta de monitoramento são os primeiros a indicar alterações demonstrando boa sensibilidade e relativa especificidade. Podem ser considerados indicadores precoces de contaminação do ambiente, evitando que danos mais sérios afetem os organismos e, possivelmente, o ecossistema em que estão inseridos (HINTON et al., 1988; NUNES et al., 2008).

4.1 Biomarcadores Hematológicos

Os biomarcadores hematológicos desempenham um papel fundamental na análise de qualidade ambiental, pois os parâmetros hematológicos são capazes de refletir o estado fisiológico de saúde dos peixes, fornecendo informações valiosas para o diagnóstico em populações de peixes. Quando expostos a substâncias tóxicas, alguns parâmetros hematológicos nos peixes podem ser alterados, revelando o impacto da contaminação no organismo dos peixes (ADHIKARI et al. de 2004; FRANÇA et al. de 2007; BARKHORDAR, et al, 2013).

Diversos parâmetros hematológicos podem ser empregados como biomarcadores em peixes através da análise das alterações causadas por xenobióticos nas séries vermelha e branca (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Os valores hematológicos podem variar de acordo com crescimento e também pelas condições ecofisiológicas dos peixes (TAVARES DIAS; MORAES, 2004).

As células mais numerosas são os eritrócitos, que tem por função transportar oxigênio através da hemoglobina, um pigmento respiratório (RANZANI-PAIVA; SILVA-SOUZA, 2004). Outra célula presente nos peixes são os trombócitos, que participam ativamente da homeostasia e do mecanismo de defesa, através dos processos de coagulação,

inflamação e atividade fagocitária nos processos de infecções (MARTINS et al., 2004; TAVARES DIAS; MORAES, 2004).

Os leucócitos são células conhecidas por atuarem ativamente no sistema de defesa do organismo, participando da resposta imunológica com seus principais componentes: linfócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos (FERNANDEZ et al., 2002). Os linfócitos são responsáveis pela resposta imune humoral e celular específica, participando da produção de anticorpos e de sua atividade citotóxica (TIZARD, 2002). Os neutrófilos são células envolvidas nos estágios iniciais de um processo de inflamação em peixes, com capacidade de fagocitar e gerar radicais livres (FERNANDEZ et al., 2002; FALCON, 2007). Os monócitos são desempenham papel na resposta imune, como na produção de citocinas e apresentação de antígenos em teleósteos (FALCON, 2007).

4.2 Biomarcadores Bioquímicos

Os biomarcadores bioquímicos detectam alterações causadas por poluentes que promovem a geração de radicais livres e os sistemas antioxidantes (KERAMBRUN et al., 2011). O estresse oxidativo ocorre quando a geração de radicais livres causados por substâncias poluentes, ou xenobióticos excede a capacidade antioxidante da célula, promovendo a oxidação dos componentes celulares, como os lipídios das membranas, as proteínas e o DNA (AVCI; KAMAZ; DURAKA, 2005).

Os principais biomarcadores de avaliação do estresse oxidativo são as atividades enzimáticas da catalase (CAT), da superóxido dismutase (SOD), e da glutathione S-transferase (GST) (KEEN; HABIG; JAKOBY, 1976). A biotransformação de xenobióticos é realizada por sistemas enzimáticos denominados fase I e fase II, nos quais os compostos se tornam mais solúveis em água, auxiliando sua excreção. A fase I é responsável principalmente por reações de oxidação, redução, hidrólise e acetilação. As enzimas do citocromo P450 são as principais envolvidas nessa fase (RIBALTA; SANCHEZ-HERNANDEZ; SOLE, 2015).

As reações de fase II são caracterizadas pela adição de compostos polares endógenos (por exemplo, glutathione) a metabólitos formados durante as reações de fase I ou diretamente ao xenobiótico original. Enzimas como a GST têm um papel fundamental nessas reações de conjugação (REYNAUD; RAVETON; RAVANEL, 2008; RIBALTA; SANCHEZ-HERNANDEZ; SOLE, 2015).

A CAT é uma enzima responsável por catalisar a decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), produzindo água e oxigênio molecular como produtos. Elas também são

utilizadas como biomarcadores, embora estejam presentes nos peroxissomos de várias células e desempenhem um papel no metabolismo de ácidos graxos, tornando a interpretação de mudanças em sua atividade um desafio (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

A GSH pertence aos sistemas oxidantes não enzimáticos sendo responsável por sequestrar espécies reativas de oxigênio e proteger as membranas do estresse oxidativo (ORUC; SEVGILER; UNER, 2004). São fundamentais na proteção celular contra danos causados por oxidantes, na homeostase tiólica, manutenção do balanço redox e defesa contra xenobióticos (SEVCIKOVA et al., 2011; PEIXOTO et al., 2013;).

As GST são uma superfamília de enzimas diméricas, multifuncionais, solúveis que catalisam a conjugação de compostos eletrofílicos (ou metabólitos de fase I), com a GSH. Papel principal das GST é a defesa do DNA e lipídios contra o dano oxidativo e produtos peroxidativos (LIVINGSTONE, 2001; NUNES et al., 2008; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

A Lipoperoxidação (LPO) tem como característica danos à integridade da membrana celular, podendo levar a um ambiente propício ao ataque do DNA e potencialmente alterar todo o processo de transporte, a transdução de sinais mediada por receptores, bem como o gradiente iônico e metabólico. O processo de LPO, ou oxidação de lipídios tem grande potencial como biomarcador de estresse oxidativo (HIGUCHI, 2003).

4.3 Biomarcadores Histopatológicos

As análises histológicas são um importante ferramentas para identificar efeitos agudos e crônicos causados por agentes químicos em peixes (AKAISHI et al., 2004). Os biomarcadores histológicos permitem a visualização de danos ocasionados da exposição dos peixes a vários agentes xenobióticos (VAN DER OOST et al., 1996). A utilização das análises histológicas para o diagnóstico de impactos ambientais se deve ao fato de estar em uma posição intermediária dentro do espectro de complexidade biológica (ADAMS et al., 1989; HEATH, 1995)

A histopatologia também permite inferir possíveis condições de saúde dos peixes em face de grandes alterações ambientais, apresentando baixo custo e possibilitando a obtenção de resultados em curtos períodos de tempo (JOHNSON et al., 2007).

5. JUSTIFICATIVA

A presença crescente dos contaminantes emergentes nos ambientes aquáticos é uma questão ambiental preocupante, considerando o aumento no consumo dessas substâncias aliados à ineficiência no tratamento para sua eliminação na água. Embora existam estudos que comprovem a presença desses contaminantes, como fármacos, nos corpos hídricos, pouco se conhece sobre seus efeitos tóxicos em organismos não-alvo como os peixes.

Os peixes são animais que estão constantemente expostos a uma variedade de substâncias presentes na água, e muitas pesquisas concentram-se apenas nos efeitos isolados desses contaminantes. Os fármacos IBU e LS, ambos podem estar presentes no ambiente aquático simultaneamente. Alguns estudos indicam que tais substâncias são tóxicas para espécies aquáticas, no entanto poucos são os estudos que fornecem informações sobre a toxicidade dessas substâncias em associações no ambiente aquático sugerindo que essa mistura possa resultar em efeitos ainda mais indesejáveis a estes organismos.

Além disso, é importante determinar se os fármacos emergentes presentes nos ecossistemas aquáticos são tóxicos para a espécie *Collossoma macropomum* e se há uma relação associado à combinação binária entre esses fármacos, que potencializaria seus efeitos tóxicos nesses organismos tão importantes para a fauna amazônica e populações consumidoras de pescados. A meta é fornecer uma compreensão mais completa dos impactos desses poluentes emergentes no ecossistema do Brasil, especialmente em relação à sua influência na biota aquática, de maneira que fomente a formação de mais recursos humanos, fornecendo uma base para os órgãos competentes atualizarem as regulamentações existentes para esses compostos.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial de toxicidade subletal aguda do anti-inflamatório Ibuprofeno, do anti-hipertensivo Losartana e os efeitos combinados dos fármacos em fígado de tambaqui (*Colossoma macropomum*).

6.2 Objetivos Específicos

- Verificar as alterações fisiológicas dos efeitos dos contaminantes emergentes em *C. macropomum* via biomarcadores hematológicos;
- Avaliar se os fármacos IBU e LS individualmente e combinados, interferem nas atividades enzimáticas de biotransformação e defesas antioxidantes do fígado de *C. macropomum* após exposição aguda;
- Avaliar o comprometimento morfofuncional do tecido hepático do peixe *Colossoma macropomum* via biomarcador histopatológico, após 96 horas de exposição.

REFERENCIAS

ADAMS, S. M; SHEPARD, K. L; GREELEY JR, M. S; JIMENEZ, B. D; RYON, M. G; SHUGART, L. R; MCCARTHY, J. F. The use of biondicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. **Marine Environmental Research**, 28 (4): 459-464, 1989

ADHIKARI, S.; SARKAR, B.; CHATTERJEE, A.; MAHAPATRA, C.T; AYYAPPAN, S. Effects of cypermethrin and carbofuran on certain hematological parameters and prediction of their recovery in a freshwater teleost; *Labeo rohita* (Hamilton). **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v.58, p.220 -226, 2004.

AKAISHI, F.M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; JAKOBI C.G.; EIRAS-STOFFELA, D.R.; ST-JEAN, S.D.; COURTENAY, S.C.; LIMA, E.F.; WAGENER, A.L.R; SCOFIELD, A.L; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Neurotoxicological and morphological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after acute exposure to water based and water soluble fraction (WSF) of crude oil. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** v. 46, p. 244-253, 2004.

ALMEIDA, H. E. P. P. J. Preparação e caracterização de dispersões sólidas e micropartículas lipídicas contendo Ibuprofeno. (Dissertação), Porto: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, 2009

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária **Bula Ibuprofeno Medicamento Genérico-** Prati-Donaduzzi Comprimido revestido (600 mg). Lei nº 9.787 de 1999, 2022

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC Nº 306, de 7 de dezembro de 2004-** Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde, **2004**

ARIAIS, A. R.L; et al. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Fiocruz**. Rio de Janeiro, 2007.

AVCI, A.; KAMAZ, M.; DURAKA, I. Peroxidation in muscle and liver tissues from fish in a contaminated river due to a petroleum refinery industry. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 60, p. 101-105, 2005.

BERNET, D; SCHMIDT, H; MEIER, W; BURKHARDT-HOLM, P; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Dis.*, 22, 25-34, 1999.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Farmacos no meio ambiente. **Química Nova**, v. 26, p. 523-530, 2003.

BILAL, M; ADEEL M; RASHEED T; ZHAO Y; IQBAL, H.M.N. Emerging contaminants of high concern and their enzyme-assisted biodegradation- A review. **Environment International**, v124 p. 336–353, 2019

BOUISSOU-SCHURTZ, C. et al. Ecological risk assessment of the presence of pharmaceutical residues in a French national water survey. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 69, p. 296–303, 2014.

BARKHORDAR, M.; VALIZADEH, R.; BAGHERI, T.; TAHERIMIRGHAED, A.; HEDAYATI, A. Detection of heavy metal biomarkers for study of fishes. **Journal of Novel Applied Sciences**. Vol. 2, p. 180-187, 2013.

BRASIL, **Decreto nº 10.338, de 5 de junho de 2020**. Regulamenta sobre o § 1º do caput art. 33 da Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010, e institui o sistema de logística reversa de medicamentos domiciliares vencidos ou em desuso, de uso humano, industrializados e manipulados, e de suas embalagens após o descarte pelos consumidores, 2020.

CAMPANHA, M. B; AWAN, A. T; SOUSA, D. N.R. D; GROSSELI, G. M; MOZETO, A. A; FADINI, P. S. A 3-year study on occurrence of emerging contaminants in an urban stream of São Paulo State of Southeast Brazil. **Environ Sci Pollut Res** 22:7936–7947, 2014

CAMPANHA, M. B; AWAN, A. T; SOUSA, D. N. R; GROSSELI, G. M; MOZETO, A. A; FADINI, P.S. A 3 years study on occurrence of emergency contaminants in an urban stream of São Paulo State of Southeast Brazil. **Environmental Science Pollutant Research**, v. 22, p. 7936- 7947, 2015

COLLADO, N; RODRIGUEZ-MOZAZ, S; GROS, M; RUBIROLA, A; BARCELÓ, D; COMAS, J; RODRIGUEZ-RODA, I; BUTTIGLIERI, G. Pharmaceuticals occurrence in a WWTP with significant industrial contribution and its input into the river system. **Environmental Pollution** v185, p 202- 212, 2014

CONAMA, Resolução nº358, de 29 de abril de 2005. Dispõe sobre o tratamento e a disposição final dos resíduos dos serviços de saúde e dá outras providências, 2005

DEY, S; BANO, F; MALIK, A. Pharmaceuticals and personal care product (PPCP) contamination-a global discharge inventory. **Pharmaceuticals and Personal Care Products: Waste Management and Treatment Technology-** Emerging Contaminants and Micro Pollutants. p.1-26, 2019

EBELE, A. J, ABDALLAH, M. A, HARRAD, S. Produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PPCPs) no ambiente aquático de água doce. **Emerg. Contam**, 2017

EMA. European medicine agency guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use. 2006

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Contaminantes emergentes podem ser uma ameaça na água para consumo humano**, 2018

ESLAMI, A., AMINI, M.M., YAZDANBAKHS, A.R., RASTKARI, N., MOHSENI-BANDPEI, A., NASSERI, S., PIROTI, E., ASADI, A. Occurrence of non-steroidal anti-inflammatory drugs in Tehran source water, municipal and hospital wastewaters, and their ecotoxicological risk assessment. **Environ. Monit. Assess.** v.187, p.1–15, 2015

FALCON, D. R. **Nível de suplementação de 1,3-B-glucano e vitamina C em dietas para tilápia do Nilo: desempenho produtivo e parâmetros fisiopatológicos**. 146f. Tese – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2007

FRANÇA, J. G; RANZANI-PAIVA, M. J. T; LOMBARDI, J. V; CARVALHO, S; SERIANI, R. Toxicidade crônica do cloreto de mercúrio (HgCl₂) associado ao selênio, através do estudo hematológico em tilápia *Oreochromis niloticus*. **Bioikos**, Vol. 21, p. 11-19, 2007

FERNANDEZ, A. B.; DE BLAS, I.; RUIZ, I. El sistema inmune de los teleosteos (I): Celulas y organos. **Revista AcquaTic**, v.16, 2002.

FIORAVANT, C. Pressão contra o câncer- Anti-hipertensivo detém crescimento de tumores e indica novos alvos para medicamentos. **Pesquisa FAPESP**. 183, 2011

GEISSEN, V., et al. Emerging pollutants in the environment: a challenge for water resource management. **Int. Soil Water Conserv. Res.** 3 (1), 57_65, 2015

GINEBRED, A; MUÑOZ I, LO´PEZ DE ALDA, M; BRIX, R; LO´PEZ-DOVAL J; BARCELO, D. Environmental risk assessment of pharmaceuticals in rivers: relationships between hazard indexes in the Llobregat River (NE Spain). **Environ Int** 36:153–162, 2010

GRAVEL, A., WILSON, J.M., PEDRO, D.F.N., VIJAYAN, M.M. Non-steroidal anti-inflammatory drugs disturb the osmoregulatory, metabolic and cortisol responses associated with seawater exposure in rainbow trout. **Comp. Biochem. Physiol. – C Toxicol. Pharmacol.** 149, 481–490, 2009

GROFF, A. A. O **Tambaqui (*Colossoma macropomum*) e o Pirarucu (*Arapaima gigas*) como organismos bioindicadores dos efeitos genotoxicos da radiação ultravioleta (UVA e UVB)**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS, para obtenção do grau de mestre em Biologia Celular e Molecular, 2008

GROS M, RODRÍGUEZ-MOZAZ S, BARCELÓ D. Fast and comprehensive multi-residue analysis of a broad range of human and veterinary pharmaceuticals and some of their metabolites in surface and treated waters by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. **Chromatogr A**. 27;1248:104-21, 2012

GROSSER, T; SMYTH, E; FITZGERALD, G. A. Agentes anti-inflamatorios, antipireticos e analgesicos; farmacoterapia da gota. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 12 ed. Sao Paulo: McGraw Hill Brasil, p. 982, 986, 988, 2012

HEATH, A. G. **Water Pollution and Fish Physiology**. 2nd Ed. **Lewis Publishers**, 1995.

HIGUCHI, Y. Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. **Biochemistry pharmacology**, v. 66, p. 1527-1535, 2003.

HINTON, D. E; LAUREN, D. J; HOLLIDAY, T. L; GIAM, C. S. Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes: Potential biomarkers of exposure. United States: N, 1988.

HONORATO, C. A; ALMEIDA, L. C. D; GILBERTO MORAES, G. Processamento de dieta – seus efeitos no aproveitamento de carboidrato para peixes. Centro Universitário da Grande

Dourados (UNIGRAN), Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, Hospital Veterinário, São Carlos- SP, 2013.

HUERTA-FONTELA, M; GALCERAN, M.T; VENTURA, F. Occurrence and removal of pharmaceuticals and hormones through drinking water treatment. **Water re Search**. 1432-1442, 2011

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Quatro em cada dez municípios não têm serviço de esgoto no país**, 2021

IPEA. Instituto de Pesquisa **Econômica Aplicada**. **Evolução do gasto com medicamentos do sistema único de saúde no período de 2010 a 2016**. Governo Federal, 2018

JAN-ROBLERO, J; CRUZ-MAYA, J. A. Ibuprofen: Toxicology and Biodegradation of an Emerging Contaminant. **Molecules**, 2023

JOHNSON, C. H. et al. NMR spectroscopic studies on the in vitro glucuronide migration kinetics of ibuprofen (R, S) 2 (4 sobutylphenyl) propanoic acid), its metabolites and analogues. **Anal Chem**, 79, p. 8720- 8727, 2007

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 Res.**, v. 42, n. 13, p. 3498-3518, 2008

KATZUNG, B. G; TREVOR, A. J. Basic and Clinical Pharmacology. McGraw-Hill Education, **New York**, p. 619–620, 2015

KRAMER, R. D; MIZUKAWA, A; IDE, A. H; MARCANTE, L.O; DOS SANTOS M. M; AZEVEDO, J. C. D. Determinação de anti-inflamatórios na água e sedimento e suas relações com a qualidade da água na bacia do Alto Iguaçu, Curitiba-PR. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos- RBRH** vol. 20 n.3. p. 657 - 667, 2015

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

KERAMBRUN, E; SANCHEZ, W; HENRY, F; AMARA, R. Are biochemical biomarker responses related to physiological performance of juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) caged in a polluted harbour? **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 154, n. 3, p. 187–195, 2011

KOLPIN, D. W; FURLONG, E. T; MEYE R, M. T; THURMAN, E. M; ZAUGG, E. D; BARBER, L. B; BUXTON, H. T. Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance. **Environ. Sci. Technol.** 36, 1202-1211, 2002

KUMMERER, K. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges. **Journal of Environmental Management**, v.90, p. 2354-2366, 2009

LARSSON, J.; PEDRO, C.; PAXEUS, N. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. **Journal of Hazardous Materials**, v. 148, p.751 - 755, 2007.

LI, Z; LU, G; YANG, X; WANG, C. Single end Combined effect of select pharmaceuticals at sublethal concentration on multiple biomarker in *Carassius auratus*. *Ecotoxicology*, v.21, 353- 361, 2012

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: Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 8, n. 4, p. 469-484, 2010.

LIVINGSTONE, D. R. Contaminant-stimulates reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Marine Pollution Bulletin**, v. 42, n. 8, p. 656- 666, 2001.

LORAINE, G. A; PETTIGROVE, M. E. Seasonal variations in concentrations of pharmaceutical and personal care products in drinking water and reclaimed wastewater in Southern California. **Environment. Technological science**. 40, 687–695, 2006

MACHADO, K. C; GRASSI, M. T; VIDAL, C; PESCARA, I. C; JARDIM, W. F; FERNANDES, A. N; SODRÉ, F. F; ALMEIDA, F. V; SANTANA, J. S; CANELA, M. C; NUNES, C. R. O; BICHINHO, K. M; SEVERO, F. J. R. A preliminary nationwide survey of the presence of emerging contaminants in drinking and source waters in Brazil. *Science of the Total Environment*, v. 57, p.138–146, 2016

MADIKIZELA, L.M., CHIMUKA, L. Occurrence of naproxen, ibuprofen, and diclofenac residues in wastewater and river water of KwaZulu-Natal Province in South Africa. **Environ. Monit**, 2017

MAGRO, C; MATEUS, E. P; PAZ-GARCIA, J. M; RIBEIRO, A. B. Emerging organic contaminants in wastewater: Understanding electrochemical reactors for triclosan and its by-products degradation. **Chemosphere**, 2020

MARGOT, J; KIENLE, C; MAGNET, A; WEIL, M; ROSSI, L; ALENCASTRO, L.F.D; ABEGGLEN, C; THONNEY, D; CHÈVRE, N; SCHÄRER, M; BARRY, D.A. Treatment of micropollutants in municipal wastewater: Ozone or powdered activated carbon? **Science of the Total Environment** 461–462., 480–498, 2013

MARSIK, P., REZEK, J., ZIDKOV A, M., KRAMULOVA, B., TAUCHEN, J., VANÝEK, T. Non-steroidal anti-inflammatories in the watercourses of the Elbe basin in the Czech Republic. **Chemosphere** 171, 97–105, 2017

MARTINS M. L; PILARSKY F; ONAKA E. M; NOMURA D. T; FENERICK J; RIBEIRO K; MYIAZAKI D. M. Y; CASTRO M. P; MALHEIROS E. B. Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.30, p.71-80, 2004.

MARTÍNEZ-VIEYRA, C; GALAR-MARTÍNEZ, M. Chemosphere DNA damage and cytotoxicity induced on common carp by pollutants in water from an urban reservoir. In: Madín Reservoir , a Case Study, **Chemosphere**. 185, 2017

MERCK, Molecular Fórmula of Losartan Potassium. Sigma Aldrich, 2005

MONTAGNER, C.C. VIDAL, C. ACAYABA, R.D. Matrizes Aquáticas do Brasil: Cenário Atual e Aspectos Analíticos, Ecotoxicológicos e Regulatórios. **Quim. Nova**, v. 40, n. 9, 1094-1110, 2017

NIMMO, D.R; RAND, G.M; PETROCELLI, S.R. Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications, New York: **Hemisphere**, p. 335-373, 1985.

NUNES, B. et al. Behaviour and biomarkers of oxidative stress in *Gambusia holbrooki* after acute exposure to widely used pharmaceuticals and a detergent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, p. 341-354, 2008.

OLIVEIRA, V. et al. Efeitos do FeCl₂ e CuCl₂ na atividade da acetilcolinesterase cerebral de *Oreochromis niloticus*. **Natural Resources**, v. 2, n. 2, p. 27 - 36, 2013.

OMS. Organização Mundial da Saude. Lista de Medicamentos Essenciais, 2023

OOSTERHUIS, M; SACHER, F; LAAK, T.L. Prediction of concentration levels of metformin and other high consumption pharmaceuticals in wastewater and regional surface water based on sales data. **Sci. Total Environ**. 442, 380–388, 2013

ORUC, E. O; SEVGILER, Y; UNER, N. Tissue-specific oxidative stress response in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. **Comparative Biochemistry and Physiology - part C Toxicology Pharmacology**, v. 137, p. 43-51, 2004

OSSWALD, W. **Terapêutica Medicamentosa e suas Bases Farmacológicas**, Manual de Farmacologia e Farmacoterapia. Porto: Porto Editora, 2001

PAI, C. W; LEONG, D; CHEN, C. Y; WANG, G. S. Occurrences of pharmaceuticals and personal care products in the drinking water of Taiwan and their removal in conventional water treatment processes. **Chemosphere**. v.256, 2020

PEAKALL, D. B. The use of biomarkers in hazard assessment. In: **Biomarkers: A Pragmatic Basis for Remediation of Severe Pollution in Eastern Europe**. 1ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, v. 1; p. 123-133, 1999.

PEIXOTO, F. P; CARROLA, J; COIMBRA, A. M; FERNANDES, C; TEIXEIRA, P; COELHO, L; CONCEICAO, I; OLIVEIRA, M. M; FONTAINHAS-FERNANDES, A. Oxidative stress responses and histological hepatic alterations in Barbel (*Barbus bocagei*), from Vizela River, Portugal. **Revista Internacional de contaminacion ambiental**, v. 29, p. 29-38, 2013

PEREIRA, C. D. et al. Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone. **Science of the Total Environment**. p. 148 -154, 2016.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; SILVA-SOUZA, A. T. Hematologia de peixes brasileiros. In: RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TAKEMOTO, R. M.; PEREZ LIZAMA, M. de los. (Org.). **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Editora Varela, 2004.

REINHOLDS, I; PUGAJEVA, I; ZACS, D; LUNDANES, E; RUSKO, J; PERKONS, I; BARTKEVICS, V. Determination of acidic non-steroidal anti-inflammatory drugs in aquatic samples by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry combined with carbon nanotubes-based solid-phase extraction. **Environ. Monit. Assess.** 189, 2017

REIS, E. O; FOUREAUX, A. F. S; RODRIGUES, J. S; MOREIRA, V. R; LEBRON, Y. A. R; SANTOS, L. V.S; AMARAL, M. C. S; LANGE, L. C. Occurrence, removal and seasonal variation of pharmaceuticals in Brazilian drinking water treatment plants. **Environmental Pollution** 250, 773-781, 2019

RENAME. Relação Nacional dos Medicamentos dos Medicamentos Essenciais **Ministerio da Saude**, Brasilia- DF, 2022

REYNAUD, S; RAVETON, M; RAVANEL, P. Interactions between immune and biotransformation systems in fish: A review. **Aquatic Toxicology**, v. 87, n. 3, p. 139–145, 2008.

RIBALTA, C; SANCHEZ-HERNANDEZ, J. C; SOLE, M. Hepatic biotransformation and antioxidant enzyme activities in Mediterranean fish from different habitat depths. **Science of**, 2015

RODRIGUEZ-NARVAEZ, O. M; PERALTA-HERNANDEZ, J. M; GOONETILLEKE, A; BANDALA, E. R. Treatment technologies for emerging contaminants in water: a review. **Chem. Eng.** 323, 361–380, 2017

SANTOS, L. H. et al. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 175, p. 45 - 95, 2010.

SANTOS, L. H.M.L.M., GROS, M; RODRIGUEZ-MOZAZ, S; DELERUE-MATOS C; PENA, A; BARCELÓ, D; MONTENEGRO, M. C. B.S.M. Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals. **Science of the Total Environment**. 462, 302–316, 2013

SEVCIKOVA, M.; MODRA, H.; SLANINOVA, A.; SYOBODOVA, Z. Metals as a cause of oxidative stress in fish: a review. **Veterinarni Medicine**, v.56, p. 537-546, 2011.

SODRÉ, F.F; LOCATELLI, M.A.F; JARDIM, W.F. Occurrence of Emerging Contaminants in Brazilian Drinking Waters: A Sewage-To-Tap Issue. **Water Air Soil Pollut**, v. 206, p.57–67, 2010

SOUSA, J. C. G; RIBEIRO, A. R; BARBOSA, M. O; PEREIRA, M. F. R; SILVA, A. M. T. A review on environmental monitoring of water organic pollutants identified by EU guidelines. **J. Hazard. Mater.** 344, 146–162, 2018

TAVARES-DIAS, M., TENANI, R.A., GIOLI, L.D., FAUSTINO, C.D. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. II. Parâmetros sanguíneos do *Piaractus*

mesopotamicus Holmberg (*Osteichthyes, Characidae*) em policultivo intensivo. **Rev. Bras. Zool.**, 2004

TAYLOR, D; SENAC, T. Human pharmaceutical products in the environment – “The problem” in perspective. **Chemosphere**, v. 115, p. 95 - 99, 2014

TEWARI, S., JINDAL, R., KHO, Y.L., EO, S., CHOI, K. Major pharmaceutical residues in wastewater treatment plants and receiving waters in Bangkok, Thailand, and associated ecological risks. **Chemosphere**, 2013

TIJANI, J. O; FATOBA, O. O; BABAJIDE, O. O; PETRIK, L. F. Pharmaceuticals, endocrine disruptors, personal care products, nanomaterials and perfluorinated pollutants: a review. **Environ. Chem.** 14, 27–49, 2016

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. Sao Paulo: Roca, 532p. 2002.

TOMITA, R.Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático, **Biológico**, 64, 135–142, 2002.

TRAP, S.M., VAILATTI, M.C.F, MATSUBARA, B.B., SCHWARTZ, D.S. Effects of angiotensin II in the vascular system. **Archives of Veterinary**, v.14, n.4, p.233-243, 2009.

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, p. 57-149, 2003.

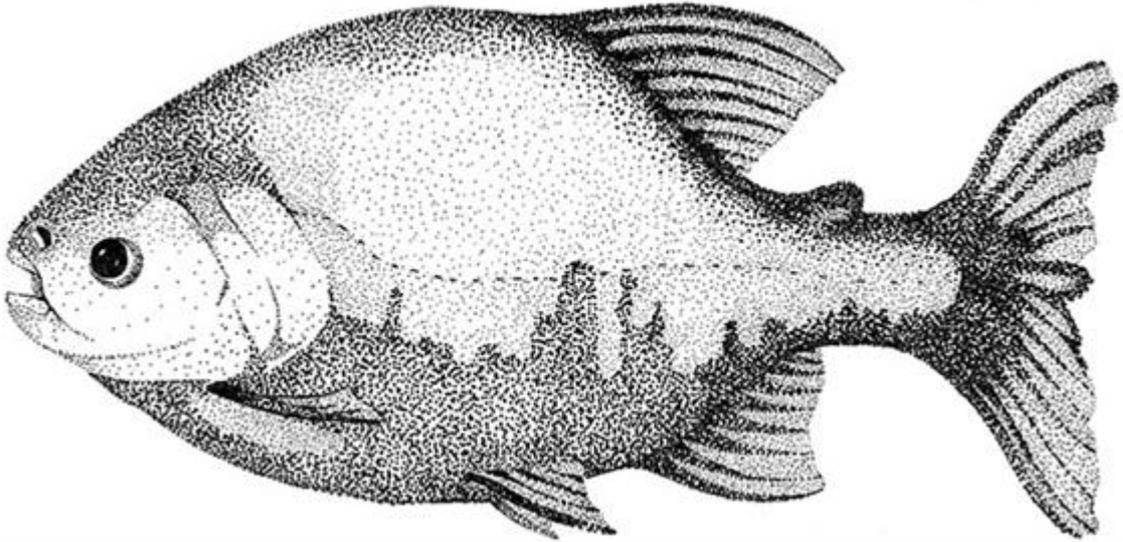
VIEIRA, M. J. A. F; CARVALHO, M. A. M; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B; SALGUEIRO, C. C. D. M; VIVEIROS, A. T. M; MOURA, A. A. A. N; NUNES, J. F. Características do Sêmen de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) em Latitude Equatorial. **Arch. Zootec.**, v.60, n.232, p.1263-1270, 2011

WHO, World Health Organization, **Pharmaceuticals in drinking-water**. WHO, France, 2012.

YAMAMOTO, N. S; PEREIRA, C.D.S; CORTEZ, F.S; PUSCEDDU, F.H; SANTOS, A.R; TOMA, W; GUIMARÃES, L. L. Assessment of adverse biological effects of antihypertensive drugs Losartan and Valsartan on urchin *Lytechinus variegatus* (ECHINODERMATA, ECHINOIDEA). **Unisanta BioSci.** 3 (1), 27–32, 2014

ZENI, T. D. O. **O uso da histopatologia por microscopia de luz em estudos com peixes dulcícolas em condições ambientais controlada**. Tese apresentada ao Programa de PósGraduação em Ciências Biológicas - Zoologia da Universidade Federal do Paraná, 2016.

CAPÍTULO II: Efeitos dos Fármacos Ibuprofeno e Losartana, Individualmente e em Mistura Binária em Fígado de Peixe Amazônico Tambaqui (*Colossoma macropomum*).



Colossoma macropomum
(SUÁREZ, 2015)

1. INTRODUÇÃO

As fontes de água potável estão cada vez mais contaminadas por produtos farmacêuticos e de higiene pessoal devido à descarga de esgoto tratado e não tratado em águas superficiais, bem como de escoamentos (EBELE et al., 2017). Além disso, à ineficiência dos tratamentos para retirada destes resíduos permite o aumento na ocorrência dessas substâncias nos recursos hídricos, o que tem sido motivo de preocupação em relação aos impactos ambientais (SANTOS et al., 2010; GORITO et al., 2017).

Estudos demonstram a presença de diferentes contaminantes emergentes e em variadas concentrações nas águas de diferentes regiões do Brasil (SODRÉ; LOCATELLI; JARDIM, 2010; MACHADO et al., 2016; MONTAGNER; VIDAL; ACAYBA, 2017). Essa realidade também se repete em diferentes países como Espanha, Tailândia, França, China e África do Sul (GINEBREDA et al., 2010; et al., 2013; TEWARI et al., 2013; BOUISSOU-SCHURTZ et al., 2014; PENG et al., 201; MADIKIZELA e CHIMUKA, 2017). Atualmente, os fármacos que são encontrados em quase todos os corpos d'água são das classes dos anti-inflamatórios e anti-hipertensivos (SANTOS et al., 2010; SOUSA et al., 2018). Apesar de serem encontrados em baixas concentrações são introduzidos no ambiente constantemente (OLIVEIRA, 2013).

O ibuprofeno (IBU) (ácido 2-(4-isobutilfenil) propiônico; $C_{13}H_{18}O_2$) é um anti-inflamatório não-esteroides (AINEs) que possui ação analgésica, antipirética e anti-inflamatória (WANG et al., 2010; DONNACHIE; JOHNSON; SUMPTER, 2016; JIA et al., 2020), amplamente utilizado no Brasil e em todo o mundo. Atua inibindo seletivamente as ciclooxidasas 1 e 2, formando mediadores pró-inflamatórios por meio da cascata do ácido araquidônico (GRAVEL et al., 2009). O IBU seus produtos de transformação têm sido frequentemente detectados em águas naturais e potáveis, bem como em amostras de águas residuais, em níveis que chegam a $mg L^{-1}$ (GONZÁLEZ-ALONSO et al., 2017; MADIKIZELA e CHIMUKA, 2017).

Diversos estudos mostraram que o IBU é capaz de induzir variações em biomarcadores bioquímicos, alterações comportamentais e alterações morfológicas em várias espécies aquáticas (HAN et al., 2010; JEFFRIES et al., 2015; XIA et al., 2017; GRZESIUK et al., 2020). Alguns estudos realizados com espécies aquáticas relatam alguns dos efeitos tóxicos ocasionados por anti-inflamatórios e anti-hipertensivos. Jeffries et al., (2015), observou que em peixe neotropical *Menidia beryllina* exposto a baixas concentrações do anti-inflamatório Ibuprofeno, sofreu alterações nas expressões dos genes envolvidos com o

desenvolvimento do esqueleto, respiração aeróbica, função imunológica, em exposição de maior concentração foi detectado o aumento da expressão de genes reguladores na via de metabolismo do ácido araquidônico e vários genes imunes envolvidos em uma resposta inflamatória.

A Losartana (Sal de potássio de 2-butil-4-cloro-1-[[2'-(2Htetrazol-5-il) [1,1'-bifenil]-4-il]metil]-1Himidazol-5-metanol; $C_{22}H_{23}ClN_6O$. K), é um medicamento anti-hipertensivo pertencente à classe dos bloqueadores dos receptores de angiotensina faz parte da lista de medicamentos essenciais da Organização Mundial da Saúde (OMS) para o tratamento da hipertensão. No Brasil, a Losartana (LS) é uma das medicações mais prescrita, sendo o anti-hipertensivo consumido (PEREIRA et al., 2016). Carneiro (2017) demonstrou que ocorreram danos no DNA das espécies de pulgas de água (*Daphnia magna*) e microalgas (*Desmodesmus subspicatus*), após exposição crônica ao anti-hipertensivo LS.

A ampla ocorrência de insumos farmacêuticos no ambiente aquático é resultado do alto consumo de medicamentos de uso humano e veterinário, relativa persistência no ambiente, biodisponibilidade e excreção metabólica, bem como a ineficiência na remoção desses fármacos e seus metabolitos pelas estações de tratamento (KHETAN e COLLINS, 2007; VASQUEZ et al., 2014).

Diferentes relatos têm sido feitos sobre a toxicidade de IBU e LS em animais aquáticos, porém os poluentes nunca ocorrem sozinhos, eles fazem parte de misturas complexas que podem afetar organismos não-alvo (QUIROGA-SANTOS et al., 2021). A Avaliação de risco ecotoxicológico requer a análise das interações entre compostos que podem ser encontrados concomitantemente em diferentes matrizes aquáticas (LAQUAZ et al., 2018). As interações podem ocasionar efeitos combinados de produtos químico mais forte, como efeitos sinérgicos ou potencialização, ou mais fracos como de inibição e resposta antagônica, com base na adição ou resposta de dose/concentração do aditivo (SECOLI, 2001). Desta forma, as interações podem variar de acordo com as características físico-químicas, a frequência, nível de dosagem, o tempo de exposição e o organismo biológico (KORTENKAMP et al., 2019).

Considerando o grande número de diferentes misturas de substâncias às quais os seres humanos e outras espécies estão expostas, é importante conhecer os efeitos de misturas potencialmente nocivas à biota aquática. A esse respeito, vários estudos apontam os efeitos nocivos do IBU e LS isoladamente, porém pouco se conhece sobre os potenciais interações específicas induzidas pelas misturas binárias, embora tenham sido detectadas em combinação em amostras ambientais (GONZÁLEZ-GONZÁLEZ et al., 2014).

O *C. macropomum* é uma espécie de peixe amazônico teleósteo de água doce, conhecido popularmente por tambaqui. Pertencente à ordem *Characiformes* e família *Serrassalmidae*, são encontrados em várias regiões da América do Sul uma das principais espécies da região da bacia amazônica, possuindo alto valor comercial e importância culinária e esportiva (VIEIRA et al., 2011).

O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial de toxicidade subletal aguda do anti-inflamatório IBU, do anti-hipertensivo LS e os efeitos combinados dos fármacos em fígado de tambaqui (*C. macropomum*) através de diferentes biomarcadores.

2. MATERIAL E METODO

2.1 Animais

Juvenis da espécie *C. macropomum* (n=40; massa corpórea $41,87 \pm 17,98$ g e $15,00 \pm 11,50$ cm de comprimento) foram obtidos comercialmente em piscicultura “viveiro ecológico” da cidade de Araguaína, TO. Em seguida, os animais foram transportados para o Laboratório de Morfofisiologia Animal Comparada (LaMAC), da Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT). Os animais foram aclimatados por um período de 30 dias em tanques de 500L, expostos ao fotoperíodo natural e aeração artificial constante, temperatura controlada de $\pm 26^\circ\text{C}$ e $\text{pH}6,5 \pm 0,5$. Os animais foram alimentados diariamente com ração comercial (40% proteína).

2.2 Fármacos

Os fármacos Losartana potássica CAS 124750-99-8 (Organic Compounding- Índia). Pó branco, fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{ClKN}_6\text{O}$, peso molecular 461.01 e pureza $\geq 99\%$, e o Ibuprofeno CAS 15687-27-1 (SM Empreendimentos Farmacêuticos LTDA- Índia). Pó branco cristalino, fórmula molecular $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_2$, peso molecular 206.28 e pureza $\geq 98\%$. Adquiridos em farmácia de manipulação da cidade de Araguaína- TO.

As concentrações dos fármacos utilizadas no bioensaio foram estipuladas em $2 \mu\text{g L}^{-1}$ para o fármaco Losartana e $25 \mu\text{g L}^{-1}$ para o fármaco Ibuprofeno. As concentrações são consideradas ambientalmente relevantes, uma vez que são concentrações encontradas em diferentes corpos aquáticos (LARSSON; PEDRO; PAXEUS, 2007; CORCORAN et al., 2010; TEWARI et al., 2013; CAMPANHA et al., 2014; KRAMER et al. 2015).

2.3 Delineamento Experimental e Coleta de Amostras

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos (n=10), sendo um grupo livre dos contaminantes (controle), um grupo exposto ao IBU ($25 \mu\text{g L}^{-1}$), outro grupo exposto ao LS ($2 \mu\text{g L}^{-1}$) e grupo exposto a associação dos dois contaminantes (IBU $25 \mu\text{g L}^{-1}$ + LS $2 \mu\text{g L}^{-1}$). A exposição foi em sistema estático de modo agudo por 96 h. As propriedades físico-químicas da água foram monitoradas e controladas da mesma forma que o período de aclimação.

Após o período de exposição, os animais foram anestesiados (benzocaína 0,1 g L⁻¹) para ser coletadas amostras de sangue via punção caudal com seringas heparinizadas, para análise dos parâmetros hematológicos. Em seguida, os peixes foram mortos por secção medular para coletado do fígado para posterior análise dos biomarcadores bioquímicos e morfológicos.

Este estudo foi autorizado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Tocantins sob o processo nº 23.101. 001. 289/01-37.

2.4 Biomarcadores Hematológicos

Para a determinação do hematócrito (Hct) foram utilizados micro capilares de sangue centrifugados em centrífuga de micro-hematócrito. A leitura foi realizada com o uso do cartão padrão de leitura específico e os valores determinados expressos em porcentagem (GOLDENFA et al., 1971). A determinação do número total de eritrócitos (RBC) foi estabelecida a partir da contagem em câmara de Neubauer e microscópio de luz no aumento de 400x e os valores foram expressos em 10⁶ células mm³.

O valor da hemoglobina (Hb) foi determinado a partir de sangue diluído em solução de Drabkin, e a densidade estimada em espectrofotômetro a 540nm (COLLIER, 1994). Os indices hematimétricos, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), foram determinados a partir das variáveis hematológicas. Foram confeccionadas extensões sanguíneas coradas com coloração panótico para a contagem de leucócitos e trombócitos totais e análise diferencial leucócitos em 5.000 células, utilizando microscópio óptico em 1000x, seguindo a metodologia de Sadauskas-Henrique et al. (2011).

2.5 Biomarcadores Bioquímicos

Amostras de fígado foram homogeneizadas em solução tampão de fosfato de potássio (0,2 M, pH 7,8) e centrifugadas a 10000 g, 4°C por 10 minutos, para obtenção do sobrenadante que serão utilizados como fonte enzimática para os biomarcadores de desintoxicação, antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos.

A atividade da Catalase (CAT) foi mensurada de acordo com a metodologia descrita por Beutler (1975), medidas através do decréscimo contínuo da concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em $\lambda = 240$ nm. A atividade da Glutathione S-Transferase (GST) será

determinada utilizando-se 1-cloro-2-4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato. As leituras foram realizadas em $\lambda = 340$ nm, durante 4 minutos com intervalos de 30 segundos segundo método descrito por Habig e Jakobi (1981).

A concentração de Glutathiona Reduzida (GSH) foi determinada de acordo com a metodologia de White et al. (2003), na qual será medida pela conjugação de 2,3 naftalenedicarboxialdeído (NDA) 10 mM ao GSH do sobrenadante da amostra formando um composto fluorescente. As leituras de fluorescência serão realizadas em espectrofotômetro em $\lambda = 472$ nm de excitação e $\lambda = 528$ nm de emissão contra uma curva padrão de GSH (40 nM).

A Lipoperoxidase (LPO) foi determinada pelo método de TBARS (*thiobarbituric acid-reactive substances*) que se baseia na reação do malondialdeído (MDA), um composto formado pela oxidação de lipídios, com ácido tiobarbitúrico (TBA) e é dada em equivalentes de MDA (SATO, 1978; WILHELM FILHO et al., 2005).

A proteína total foi determinada a partir do método de Bradford (1976), com o uso de Coomassie brilliant blue G-250, com adaptação para leitura em microplaca (Dynex Technologies Ltd., MRXTC, UK) descrito por Kruger (1994), e albumina bovina como padrão. A absorbância foi medida em $\lambda = 595$ nm, e os valores de utilizados de proteína foram para expressar a atividade enzimáticas.

2.6 Biomarcadores Histopatológicos

Para análises histopatológicas amostras de fígado foram previamente fixadas em Bouin e sequencialmente submetidas a uma bateria de desidratação em álcool (70-100%), e incluídas em parafina. Em seguida, foram confeccionadas secções histológicas (5 μ m) em micrótomo Leica RM 2125RT. As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina, e finalizadas com Entellan®.

As análises histopatológicas foram realizadas em microscopia de luz sob magnificação de 400x, seguindo metodologia proposta por Paulino et al., (2020), onde foram observados 05 campos aleatórios em 05 secções diferentes do tecido hepático, totalizando 25 campos de amostragem para cada animal. As histopatologias receberam atribuições de escore numérico (Sc) em relação à frequência que as patologias eram observadas nos campos amostrais analisados e um fator de importância (Fi) indicando como a lesão afetaria a função do órgão e a sobrevivência do peixe. O índice de alteração individual do órgão (I_{alt}) foi determinado multiplicando os valores de Sc e Fi ($I_{alt} = Fi \times Sc$). A somatória dos valores de I_{alt} (ΣI_{alt}) de

cada indivíduo determinou o comprometimento morfofisiológico do tecido do animal através do Índice de lesão do órgão (I_{org}).

2.7 Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como média e erro padrão da média (\pm E.P.M), foram submetidos ao teste de distribuição normal (D'agostino & Pearson). As diferenças entre o grupo controle e os grupos expostos foram detectadas por análise de variância (ANOVA) one-way seguido por pós-teste de Bonferroni para análises paramétricas e Kruskal- Wallis seguido de pós-teste de Dunnis para as não paramétricas. Todos os testes serão realizados utilizando software GraphPad Prism 5.0, considerando significância de $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

3. RESULTADOS

Após a exposição ao anti-inflamatório IBU e o anti-hipertensivo LS e a mistura dos dois fármacos, não houve mortalidade entre os animais, nem quaisquer alterações comportamentais perceptíveis.

3.1 Biomarcadores Hematológicos

Não houve alterações significativas nos parâmetros hematológicos eritrocitários entre os grupos experimentais. As alterações dos parâmetros leucocitários estão descritas na Tabela 1. No grupo IBU, em relação ao grupo controle, houve uma redução de 27 % de linfócitos e um aumento de neutrófilos (84%) e LG-PAS (525%). Em relação ao grupo mistura, o IBU reduziu os linfócitos em 25% e aumentou em 98% o número de neutrófilos. O grupo LS apresentou aumento dos leucócitos totais em relação ao controle, entretanto, não foi significativo os valores médios dos leucócitos diferenciais. Em relação ao grupo mistura, as células LG/PAS aumentaram 675% em relação ao controle.

Tabela 1. Parâmetros hematológicos de *Colossoma macropomum* após exposição aguda de 96 horas aos fármacos Ibuprofeno, Losartana e associação de ambos (mistura). Dados apresentados como Média \pm erro-padrão ($P < 0,05$). (*) significa diferença entre o grupo tratado em relação ao grupo controle. (#) Significa diferença entre os grupos tratados em relação ao grupo mistura.

Parâmetros Hematológicos de <i>Colossoma macropomum</i>				
	C	IBU	LS	M
Parâmetros eritrocitários				
HCT (%)	30,7 \pm 1,3	25,7 \pm 2,0	33,3 \pm 1,7	27,8 \pm 1,8
Hb (g dL ⁻¹)	0,31 \pm 0,01	0,26 \pm 0,02	0,30 \pm 0,01	0,27 \pm 0,02
RBC (10 ⁴ células mm ³)	214,7 \pm 17,1	196,1 \pm 8,7	189,1 \pm 23,4	198,4 \pm 10,4
VCM (μ m ³)	137,8 \pm 9,6	135,4 \pm 8,4	147,2 \pm 16,1	129,8 \pm 10,5
HCM (pg célula ⁻¹)	49,1 \pm 2,8	42,6 \pm 2,9	42,2 \pm 2,8	41,5 \pm 2,6
CHCM (g dL ⁻¹)	33,4 \pm 2,4	30,9 \pm 1,7	32,9 \pm 1,7	29,8 \pm 2,4
Parâmetros leucocitários				
Leucócitos totais (10 ³)	1,7 \pm 0,09	1,7 \pm 0,14	2,3 \pm 0,23*	1,8 \pm 0,17
Trombócitos totais (10 ³)	5,5 \pm 0,42	5,2 \pm 0,29	5,9 \pm 0,32	5,5 \pm 0,50
Linfócitos (%)	71,9 \pm 1,6	52,2 \pm 1,4*#	70,9 \pm 4,2	69,8 \pm 1,6
Monócitos (%)	11,9 \pm 0,4	13,7 \pm 1,4	10,0 \pm 1,5	9,5 \pm 0,3
Neutrófilos (%)	15,8 \pm 1,3	29,2 \pm 2,1*#	15,5 \pm 3,7	14,7 \pm 1,3
LG-PAS (%)	0,4 \pm 0,13	2,5 \pm 0,13*	2,0 \pm 0,62	3,1 \pm 0,93*
Eosinófilos (%)	0,10 \pm 0,1	0,15 \pm 0,1	0,30 \pm 1,1	0,8 \pm 0,3
Basófilos (%)	0	0	0	0

C = Grupo Controle; IBU = Grupo Ibuprofeno; LS = Grupo Losartana; M = Grupo Mistura.

Fonte: Autora

3.2 Biomarcadores Histopatológicos

O índice de alteração individual (I_{alt}) do tecido hepático estão descritas conforme demonstrado na Tabela 2 e Figura 1. Foi identificado o aumento de 200% de alterações nucleares no grupo mistura comparado ao grupo controle. Das alterações nucleares destacavam-se a degeneração nuclear. Ainda, houve um aumento de 50% de hipertrofia dos hepatócitos neste grupo quando comparado ao grupo controle. O grupo IBU não apresentou diferenças nos I_{alt} hepático, entretanto, de modo isolado, a LS induziu um aumento (200%) de alterações circulatórias do tipo hiperemia em relação ao controle.

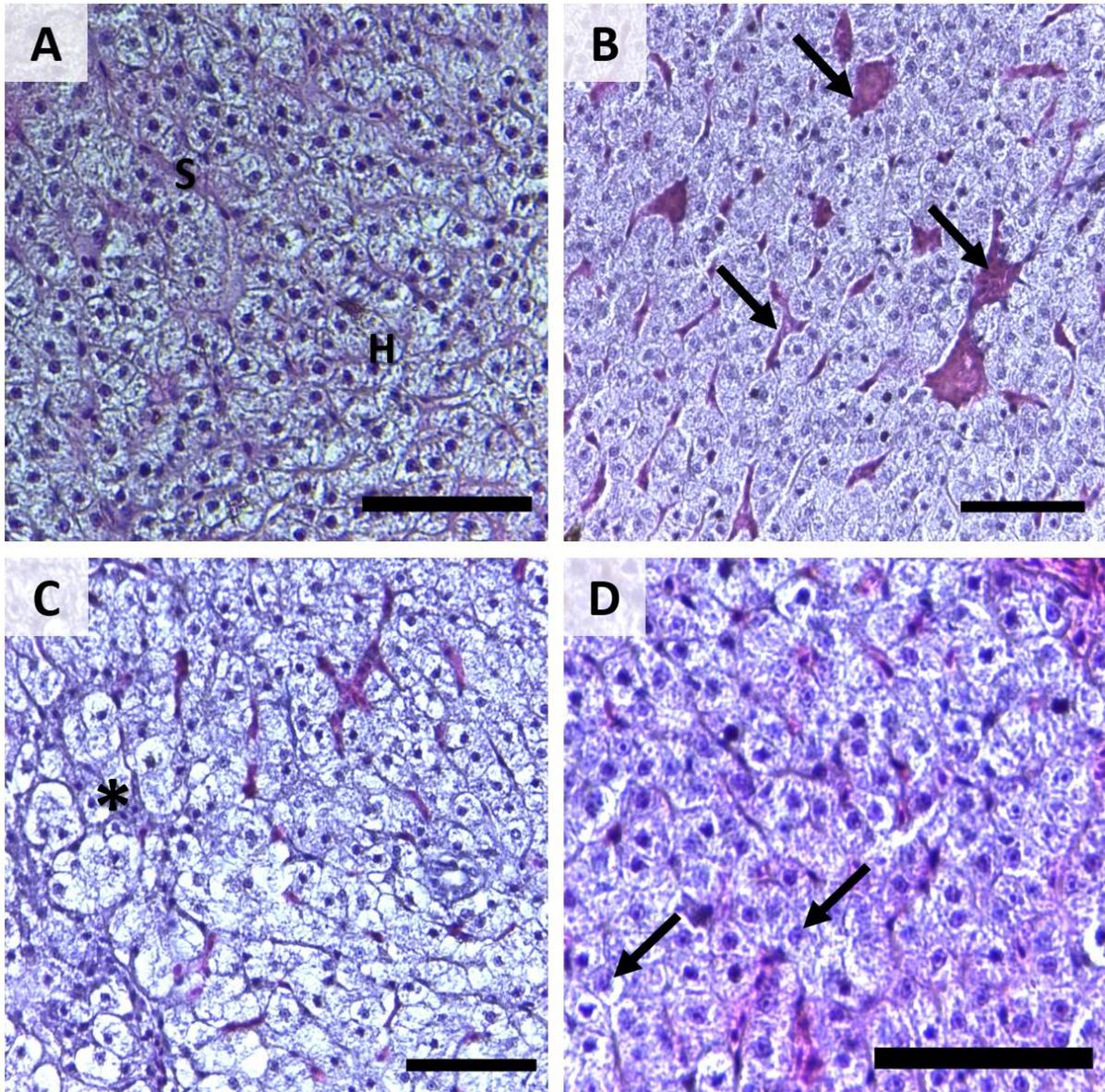
Tabela 2 – Índice de alterações histopatológicas individual (I_{alt}) identificadas no tecido hepático de *Colossoma macropomum* após exposição aguda de 96 horas aos fármacos Ibuprofeno, Losartana e associação de ambos (mistura). Dados apresentados como Média \pm erro-padrão ($P < 0,05$). (*) significa diferença entre os grupos tratados em relação ao grupo controle. (#) Significa diferença entre os grupos tratados em relação ao grupo mistura.

Índice de Alteração Individual do Fígado de <i>Colossoma macropomum</i> - I_{alt}				
	C	IBU	LS	M
Alterações circulatórias	0,0 \pm 0,0	0,3 \pm 0,2	0,8 \pm 0,2 ^{*#}	0,0 \pm 0,0
Alteração da arquitetura hepática e estrutura celular	0,4 \pm 1,1	0,7 \pm 0,2	0,7 \pm 1,4	0,9 \pm 0,2
Alterações nucleares	0,6 \pm 0,3	0,6 \pm 0,3	0,9 \pm 0,3	1,8 \pm 0,4 [*]
Aneurisma	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
Atrofia celular	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,2 \pm 0,2	0,4 \pm 0,3
Centros de melano- macrófagos	0,0 \pm 0,0	0,1 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1	0,2 \pm 0,2
Degeneração citoplasmática	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
Fibrose	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
Hemorragia intra-hepática	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
Hipertrofia dos hepatócitos	1,0 \pm 0,0	1,3 \pm 0,1	1,3 \pm 0,2	1,5 \pm 0,8 [*]
Necrose celular	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0

C = Grupo Controle; IBU = Grupo Ibuprofeno; LS = Grupo Losartana; M= Grupo Mistura.

Fonte: Autora

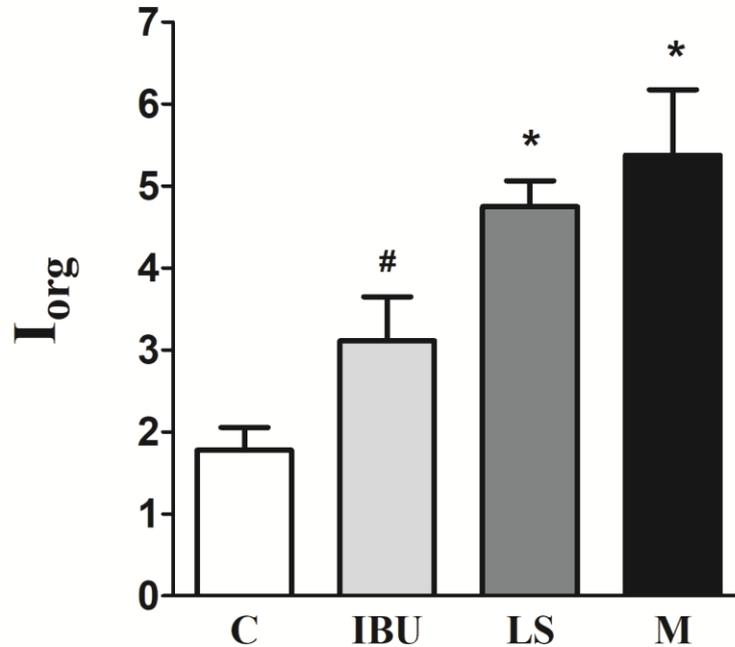
Figura 1 – Fotomicrografia das alterações histopatológicas identificadas no tecido hepático de *Colossoma macropomum* após exposição aguda de 96 horas aos fármacos Ibuprofeno, Losartana e associação de ambos (mistura). (A) Fígado sem alterações histológicas (S= Sinusoides; H= Hepatócitos); (B) hiperemia (seta preta); (C) hipertrofia de hepatócitos (asterisco), (D) Degeneração nuclear (seta preta). Coloração HE. Barra de escala = 20 µm. Objetiva de 40x.



Fonte: autora

Segundo o I_{org} , as alterações de Fi 1 e 2 apresentadas demonstram um comprometimento morfofuncional do tecido hepático após a exposição ao LS e a mistura (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Índice de lesão histopatológicas do órgão (I_{org}) do tecido hepático de *Colossoma macropomum* após exposição aguda de 96 horas aos fármacos Ibuprofeno, Losartana e associação de ambos (mistura). Dados apresentados como Média \pm erro-padrão ($P < 0,05$). (*) significa diferença entre os grupos tratados em relação ao grupo controle. (#) Significa diferença entre os grupos tratados em relação ao grupo mistura.



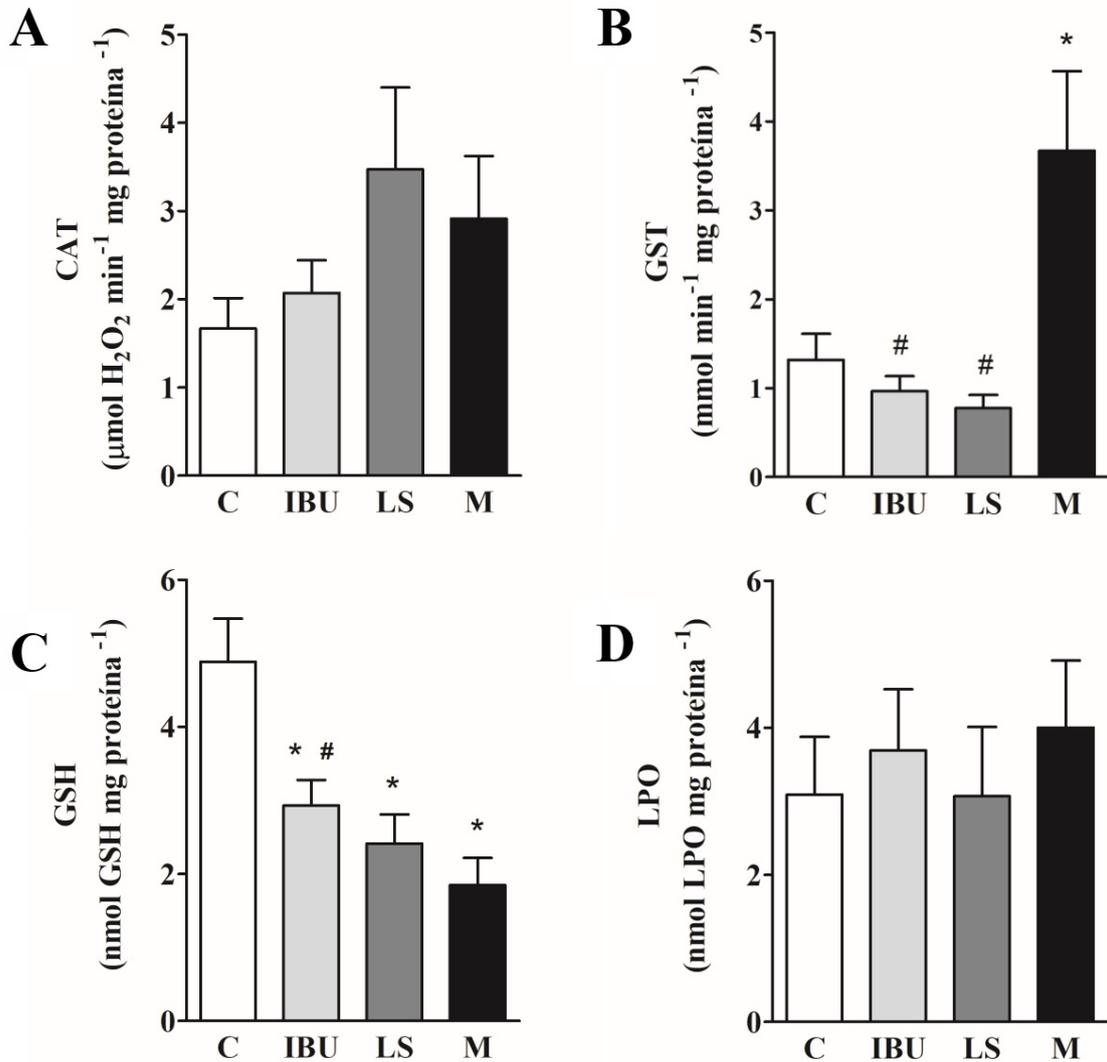
Fonte: autora

3.3 Biomarcadores bioquímicos

Os biomarcadores de estresse oxidativo estão representados no Gráfico 2. Não houve alteração da atividade da CAT ou da concentração de LPO em todos os grupos tratados.

A atividade da GST foi aumentada em 189% quando comparado ao controle, de modo que, esse aumento também foi significativo quando comparado com os contaminantes isoladamente. A concentração de GSH, em relação ao controle foi diminuída em 40% no grupo IBU, 40% no grupo LS e 46% no grupo mistura.

Gráfico 2 – Gráficos dos biomarcadores de Estresse Oxidativo em fígado de *Colossoma macropomum* após exposição aguda de 96 horas aos fármacos Ibuprofeno, Losartana e associação de ambos. Média \pm erro-padrão ($P < 0,05$). (*) significa diferença entre os grupos tratados em relação ao grupo controle. (#) Significa diferença entre os grupos tratados em relação ao grupo mistura. (*) significa diferença entre os grupos tratados em relação ao grupo controle. (#) Significa diferença entre os grupos tratados em relação ao grupo mistura.



Fonte: Autora

4. DISCUSSÃO

A exposição aguda a estes compostos, alterou os parâmetros hematológicos, processos de desintoxicação e mudanças na morfologia do tecido hepático.

Múltiplos contaminantes em água pode resultar em efeitos adversos nas variáveis hematológicas ou de outros tecidos (KOPRUCU et al., 2006). Os leucócitos são as células que possuem papel fisiológicos e são responsáveis pela defesa do organismo (TAVARES– DIAS e MORAES, 2004). De acordo com Vosyliené (1999), as alterações em células da série branca dos peixes podem ser atribuídas a uma resposta generalizada do sistema imune, acionado pelo estresse fisiológico e consequente estado de saúde afetado. Neste estudo foi observado a indução leucocitose no grupo LS, do qual, pode ser observado no início de um estresse na maioria das espécies de peixes, sendo considerado como uma tentativa de recuperar a homeostase em desequilíbrio (OLIVEIRA, 2017).

Em *C. macropomum* a toxicodinâmica do IBU causou imunossupressão, com a baixas de linfócitos e possivelmente efeitos deletérios em outros tecidos, o que sugere o aumento de neutrófilos e LG/PAS circulante. Uma das ações características do uso de AINES, no sistema hematopoiético incluem leucopenia, anemia hemolítica e aplasia (TEIXEIRA, 2001), o que poderia também explicar a diminuição no número de linfócitos no grupo exposto ao IBU. Em estudos realizados com peixes *Rhamdia quelen* (peixe Jundia), expostos ao IBU, os animais apresentaram uma diminuição de leucócitos em grupos expostos a 0,1 e 1,0 µg/L, indicando que o ibuprofeno é capaz de promover nefrotoxicidade e efeito imunossupressor (MATHIAS et al., 2018).

Em todos os grupos expostos neste estudo, foi evidente o aumento de leucócitos LG/PAS no sangue, sendo pronunciado quando os fármacos estão em misturas. Na maioria dos estudos hematológicos com peixes, as células LG/PAS não são lembradas ou analisadas, entretanto, há evidências que não estão presentes em alguns peixes como tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (RANZANIPAIVA; SILVA-SOUZA, 2004). Por outro lado, é comum em diversas espécies de peixes, como em *Pimelodus maculatus* (Bagre- pintado) (SADAUSKAS-HENRIQUE et al., 2011).

As células LG/PAS são células que não possuem um papel tão bem definido, mas são consideradas um tipo de neutrófilo envolvido em processos fagocitários e inflamatórios (SADAUSKAS-HENRIQUE et al., 2011). Não ausente, mas considerando a baixa frequência desse grupo celular no grupo controle em *C. macropomum*, a resposta desse aumento em

todos os grupos deve-se em resposta do aumento de estresse fisiológico como ocorre em exposições crônicas de contaminantes (MARTINS et al., 2002).

As células hepáticas, chamadas de hepatócitos são caracterizadas pelo formato poligonal arredondada e uninucleada, possuindo diversas funções metabólicas, (LINS, et al., 2010), capacidade de biotransformação, bioativação e excreção de xenobióticos (BERNET et al., 1999; ZENI et al., 2016). O órgão mais utilizado em estudos com peixe para mensurar estresse oxidativo é o fígado, pois é o tecido mais metabolicamente ativo e o local onde ocorre a maioria das alterações relacionadas à biotransformação (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

As respostas de defesa antioxidantes do fígado, incluindo a superóxido dismutase (SOD), CAT e glutathiona peroxidase (GPX) mantem o funcionamento e integridade das células na maioria dos animais e são ativadas em respostas a poluentes (LOPEZ- CRUZ, 2003; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; AVCI; KAMAZ; DURAKA, 2005).

A atividade normalizada da CAT e inalteração das concentrações de LPO evidenciam que não houve indução de estresse oxidativo no fígado de *C. macropomum* expostos ao IBU, LS ou mistura. Por outro lado, foi bem pronunciado a diminuição da concentração de GSH em todos os animais em contato com os fármacos.

A GSH desempenha diversas funções biológicas importantes, destacando-se a sua atuação como antioxidante e detoxificante de xenobióticos. (HUBER; ALMEIDA, 2008; VIEIRA et al., 2014). No processo de desintoxicação, a GSH pode se ligar diretamente com o composto tóxico, formando conjugados de glutathiona, a fim de promover a sua excreção e prevenir danos à célula. Como resultado desta conjugação, GSH é consumida e sua concentração na célula é reduzida (GHELFI, 2014). Com isso, sugere-se que o aumento da atividade de GST no grupo mistura deste estudo, possa estar envolvido neste processo de biotransformação, do qual, não foi observado nos grupos com fármacos isolados. Além da função antioxidante, a GST é uma enzima importante para a conjugação e posterior metabolismo de compostos endógenos (QUINN et al., 2011) e vários autores demonstraram o seu aumento após diferentes exposições de concentração de ibuprofeno (BARTOSKOVA et al., 2013; CONTARDO-JARA et al., 2011; MILÃO et al., 2013; PAROLINI et al., 2011). Nos estudos de Mathias et al., (2018) o aumento na concentração das enzimas GST e na concentração de GSH pela exposição ao ibuprofeno demonstram a ação de uma defesa antioxidante para eliminação de EROs, indicando que esse aumento possivelmente é responsável por nenhuma alteração no LPO.

A atividade enzimática pode ter modulações de acordo com o contaminante. O IBU tem sido associado à alteração do estresse oxidativo em diferentes espécies (GONZALEZ-REY E BEBIANNO, 2011; ISLA—FLORES et al., 2014), ocasionado por um desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (EROs) e o sistema de defesa antioxidante (PREISER, 2012). Apesar dos efeitos do anti-hipertensivo LS sobre a GSH ainda não serem bem compreendido (BAYORH et al., 2003), Polizio e Peña (2005) também constataram a redução de GSH no rim de roedores após ingestão de losartana por um período de 14 dias. Em contrapartida, Kim et al. (2011) em seus estudos constataram que roedores expostos à losartana durante seis meses obtiveram valores de GSH renal aumentados em relação aos não expostos.

Reque, (2017) identificou em lambari (*Astyanax altiparanae*) expostos à uma concentração fixa de losartana ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$) em tempos de exposição diferentes (6, 12, 24 e 48 h), que GSH e GST respectivamente, tiveram aumento da concentração e inibição da atividade enzimática em tempos diferentes da exposição. A concentração elevada de GSH pode estar relacionada à ativação de um mecanismo de adaptação ao aumento da atividade de desintoxicação (MARTINEZ, 2006). Isla-Flores e colaboradores (2014) observaram que em fígado, sangue e brânquias de carpa (*Cyprinus carpio*) o IBU induziu estresse oxidativo.

Os peixes estão sujeitos a exposição de agentes biológicos e químicos, podendo resultar em diferentes graus e tipos de lesões (CAMPOS et al., 2008). Contudo, alterações histológicas desencadeadas pelo contato com um agente estressor podem representar um evento adverso para os peixes (TAKASHIMA & HIBYIA, 1995). No entanto, o fígado dos peixes expostos ao LS e mistura apresentaram algumas histopatologias, no qual, foi de maior importância patológica no grupo mistura. As alterações morfológicas, de modo geral, foram resultadas de ações diretas e indiretas dos fármacos. Apesar de não ser observado lesões nos peixes expostos ao IBU, Oliveira (2017) observou que os peixes expostos a diferentes concentrações de IBU apresentaram as lesões consideradas moderadas a severas e foram mais expressivas na concentração muito elevada (50 mg L^{-1}), levando a compreender que um ambiente com maior concentração desse fármaco, torna-se potencialmente mais prejudicial ao fígado de peixes.

Os efeitos indiretos são induzidos pelas mudanças fisiológicas e bioquímicas (MYERS; FOURNIE, 2002). A hiperemia é uma alteração histopatológica do tipo circulatória que em peixes é utilizada para avaliar o aumento do fluxo sanguíneo no tecido (SILVA, 2004). Após a exposição, neste estudo, o grupo LS demonstrou hiperemia associado ao

aumento de leucócitos circulantes, o que se sugere que o fármaco tenha alterado outros tecidos no organismo.

Oliveira (2017), ao expor juvenis de *Rhamdia quelen* a variadas concentrações de IBU, observou alterações morfológicas no tecido hepático como a hipertrofia, degenerações nucleares e hiperemia. Essas modificações podem levar à degeneração inicial dos processos intracelulares dos hepatócitos, uma vez que o fígado desempenha funções cruciais no processo de desintoxicação do organismo (DUTTA et al., 1993; HASCHEK & ROUSSEAU, 1996). Apesar de não pronunciado no grupo IBU neste estudo, patologias como as descritas foram presentes quando os fármacos estão associados. As maiores mudanças que ocorrem no núcleo são de ações não específicas, uma vez que a hipertrofia celular pode indicar uma hiper estimulação da atividade celular e conseqüente alterações e degenerações (TAKASHIMA; HIBIYA, 1995).

5. CONCLUSÃO

As concentrações subletais de IBU, LS isolados ou em mistura apresentam potencial tóxico para *C. macropomum* em 96h de exposição. As alterações leucocitárias foram um indicativo de ações diretas e indiretas aos fármacos no organismo, principalmente pela hiperprodução de LG/PAS circulante e nas alterações histopatológicas, com maiores efeitos quando os fármacos estão associados. O sistema de defesa celular GSH-GST foi efetivo em biotransformar os fármacos em mistura e evitar o estresse oxidativo no tecido hepático. A integração destes biomarcadores são ferramentas que permitem avaliar os impactos dos fármacos nos organismos dos peixes e entender a complexidade de toxicidade de misturas.

REFERENCIAS

- BARTOSKOVA, M., DOBSIKOVA, R., STANCOVA, V., ZIVNA, D., BLAHOVA, J., MARSALEK, P., ZELNICKOVA, L., BARTOS, M., DI TOCCO, F.C., FAGGIO, C. Evaluation of ibuprofen toxicity for zebrafish (*Danio rerio*) targeting on selected biomarkers of oxidative stress. **Neuroendocrinol.**, 2013
- BAYORH, M. A. et al. Effect of Losartan on Oxidative Stress-Induced Hypertension in Sprague-Dawley Rats. **American Journal of Hypertension**, v. 16, n. 5, p. 387 - 392, 2003.
- BERNET, D; SCHMIDT, H; MEIER, W; BURKHARDT-HOLM, P; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Dis.*, 22, 25-34, 1999.
- BOUISSOU-SCHURTZ, C. et al. Ecological risk assessment of the presence of pharmaceutical residues in a French national water survey. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 69, p. 296–303, 2014.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254, 1976.
- CAMPANHA, M. B; AWAN, A. T; SOUSA, D. N.R. D; GROSSELI, G. M; MOZETO, A. A; FADINI, P. S. A 3-year study on occurrence of emerging contaminants in an urban stream of São Paulo State of Southeast Brazil. **Environ Sci Pollut Res** 22:7936–7947, 2014
- CAMPOS, C. M.; MORAES, J. R. E.; MORAES F. R. Histopatologia de fígado, rim e baço de *Piaractus mesopotamicus*, *Prochilodus lineatus* e *Pseudoplatystoma fasciatum* parasitados por myxosporídios, capturados no rio Aquidauana, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 17, n. 4, p. 200-205, 2008
- CARNEIRO, R. D. **Avaliação da Ecotoxicidade da Losartana Potássica em *Daphnia Magna* e *Desmodesmus Subspicatus***. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Química do Departamento Acadêmico de Química e Biologia – DAQBI, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR como requisito de obtenção do grau de Bacharel em Química, 2017
- COLLIER, H.B. The standardization of blood hemoglobin determinations. **Can. Med. Assoc. J.**, v.50, p.550-552, 1944.
- CONTARDO-JARA, V., LORENZ, C; PFLUGMACHER, S; NÜTZMANN, G; KLOAS, W; WIEGAND, C. Exposure to human pharmaceuticals Carbamazepine, Ibuprofen and Bezafibrate causes molecular effects in *Dreissena polymorpha*. **Aquat. Toxicol.** 105, 2011.
- COSTA, G. D. M; ORTIS, R. C; LIMA, M. G. D; CASALS, J. B; LIMA, A. R. D; KFOURY JR, J. R. Estrutura morfológica do fígado de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). **Pesq. Vet. Bras.** 32(9):947-950, 2012
- CORCORAN, J; WINTER, M. J; TYLER, C. R. Pharmaceuticals in the aquatic environment: a critical review of the evidence for health effects in fish. *Crit. Rev. Toxicol.* 40, 2010

DONNACHIE, R. L.; JOHNSON, A. C.; SUMPTER, J. P. A rational approach to selecting and ranking some pharmaceuticals of concern for the aquatic environment and their relative importance compared with other chemicals. **Environ. Toxicol. Chem**, v. 35, p. 1021–1027, 2016

DUTTA, H.M.; ADHIKARI, S.; SINGH, N. K.; ROY, P. K.; MUNSHI, J. S. D. Histopathological changes induced by Malathion in the liver of freshwater catfish *heteropneustes fossilis* (Bloch). **B. Environ. Contam. Tox.**, New York, 1993, v. 51, p. 895900, 1993

EBELE, A. J., ABDALLAH, M. A., HARRAD, S. Produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PPCPs) no ambiente aquático de água doce. **Emerg. Contam**, 2017

GINEBREDA, A.; MUÑOZ I, LOPEZ DE ALDA, M.; BRIX, R.; LOPEZ-DOVAL J; BARCELO, D. Environmental risk assessment of pharmaceuticals in rivers: relationships between hazard indexes in the Llobregat River (NE Spain). **Environ Int** 36:153–162, 2010

GINGERICH, W.H. Hepatic toxicology of fishes. In: WEBER, L.F. (ed.) **Aquatic toxicology**, New York: Plenum Press. p. 55-105, 1982.

GHELFI, A. Efeitos toxicológicos do diclofenaco em peixes *Rhamdia quelen*. 2014. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

GORITO, A.M., RIBEIRO, A.R., ALMEIDA, C.M.R., SILVA, A.M.T. A review on the application of constructed wetlands for the removal of priority substances and contaminants of emerging concern listed in recently launched EU legislation. **Environ. Pollut.** 227, 428–443, 2017

GRAVEL, A., WILSON, J.M., PEDRO, D.F.N., VIJAYAN, M.M. Non-steroidal anti-inflammatory drugs disturb the osmoregulatory, metabolic and cortisol responses associated with seawater exposure in rainbow trout. **Comp. Biochem. Physiol. – C Toxicol. Pharmacol.** 149, 481–490, 2009

GONZALEZ-ALONSO, S.; MERINO, L. M., ESTEBAN, S.; LOPEZ DE ALDA, M., BARCELO, D., DURAN, J. J.; LOPEZ-MARTÍNEZ, J., ACEÑA, J., PÉREZ, S., MASTROIANNI, N.; SILVA, A., CATALÁ, M.; VALCÁRCEL, Y. Occurrence of pharmaceutical, recreational and psychotropic drug residues in surface water on the northern Antarctic Peninsula region. **Environ. Pollut.** 229, 241–254, 2017

GONZALEZ-REY, M., BEBIANNO, M. J. Nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID), ibuprofen, impairs the neuroendocrine and inflammatory disorders observed in marine molluscs *Ruditapes philippinarum*. Stunning. Antioxidant defense system in the gills of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Aquat. Toxic.** 105 (3-4), 264–269, 2011.

GRZESIUK, M., PIJANOWSKA, J., MARKOWSKA, M., BEDNARSKA, A. Morphological deformation of *Daphnia magna* embryos caused by prolonged exposure to ibuprofen. **Environ. Pollut.** 261, 114135, 2020

GONZALEZ-GONZALEZ, E. D., GOMEZ-OLIVAN, L. M., GALAR-MARTÍNEZ, M., VIEYRA-REYES, P., ISLAS-FLORES, H., GARCÍA-MEDINA, S., JIMÉNEZ-VARGAS, J.M., RAZO-ESTRADA, C., PÉREZ-PASTÉN, R. Metals and nonsteroidal anti-inflammatory pharmaceuticals drugs present in water from Madín Reservoir (Mexico) induce oxidative stress in gill, blood, and muscle of common carp (*Cyprinus carpio*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 67, 281–295, 2014

GROFF, A. A. O **Tambaqui (*Colossoma macropomum*) e o Pirarucu (*Arapaima gigas*) como organismos bioindicadores dos efeitos genotóxicos da radiação ultravioleta (UVA e UVB)**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS, para obtenção do grau de mestre em Biologia Celular e Molecular, 2008

HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. Assays for differentiation of glutathione Stransferases. *Methods Enzymol.* v.77, p.398–405, 1981.

HAN, S., CHOI, K., KIM, J., JI, K., KIM, S., AHN, B., YUN, J., CHOI, K., KHIM, J.S., ZHANG, X., GIESY, J.P. Endocrine disruption and consequences of chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*. *Aquat. Toxicol.* 98, 256–264, 2010

HASCHEK, W.M.; ROUSSEAU, C.G. Handbook of toxicology pathology. London: Academic Press, 1996

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, A. Glutathione e Enzimas Relacionadas: Papel Biológico e Importância em Processos Patológicos. *Revista Química Nova*, v.31, n. 05, p. 1170-1179, 2008.

ISLAS-FLORES, H., GÓMEZ-OLIVÁN, L.M., GALAR-MARTÍNEZ, M., GARCÍA-MEDINA, S., NERI-CRUZ, N., DUBLÁN-GARCÍA, O. Effect of ibuprofen exposure on blood, gill, liver, and brain on common carp (*Cyprinus carpio*) using oxidative stress biomarkers. *Environ. Sci. Pollut*, 2014

JEFFRIES, K.M., BRANDER, S.M., BRITTON, M.T., FANGUE, N.A., CONNON, R.E. Chronic exposures to low and high concentrations of ibuprofen elicit different gene response patterns in a euryhaline fish. *Environ. Sci. Pollut*, 2015

JIA, Y., YIN, L., KHANAL, S.K., ZHANG, H., OBEROI, A.S., LU, H. Biotransformation of ibuprofen in biological sludge systems: investigation of performance and mechanisms. *Water Res*, 2020

KHETAN, S.K., COLLINS, T.J. Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a challenge to green chemistry. *Chem. Rev.* 107, 2319–2364, 2007

KIM, J. M. et al. Inhibition of NF- κ B-induced inflammatory responses by angiotensin II antagonists in aged rat kidney. *Experimental Gerontology*, v. 46, p. 542 -548, 2011.

KOPRUCU, S. S., KOPRUCU, K., URAL, M. S., Ispir, U; PALA, M. Acute toxicity of organophosphorous pesticide diazinon and its effects on behavior and some hematological

parameters of fingerling European catfish (*Silurus glanis* L.). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 86, 99–105, 2006

KORTENKAMP, A., FAUST, M., BACKHAUS, T., ALTENBURGER, R., SCHOLZE, M., MÜLLER, C., ERMLER, S., POSTHUMA, L., BRACK, W. Mixture risks threaten water quality: the European Collaborative Project SOLUTIONS recommends changes to the WFD and better coordination across all pieces of European chemicals legislation to improve protection from exposure of the aquatic environment to. **Environ**, 2019

KRAMER, R. D; MIZUKAWA, A; IDE, A. H; MARCANTE, L.O; DOS SANTOS M. M; AZEVEDO, J. C. D. Determinação de anti-inflamatórios na água e sedimento e suas relações com a qualidade da água na bacia do Alto Iguaçu, Curitiba-PR. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos- RBRH** vol. 20 n.3. p. 657 - 667, 2015

KRUGER, N.J. The Bradford method for protein quantification. *Methods Mol Biol.*, 32, 9–15, 1994.

LAQUAZ, M., DAGOT, C., BAZIN, C., BASTIDE, T., GASCHET, M., PLOY, M.C., PERRODIN, Y. Ecotoxicity and antibiotic resistance of a mixture of hospital and urban sewage in a wastewater treatment plant. **Environ. Sci. Pollut. Res.** 25, 9243–9253, 2018

LARSSON, J.; PEDRO, C.; PAXEUS, N. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. **Journal of Hazardous Materials**, v. 148, p.751 - 755, 2007.

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: Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 8, n. 4, p. 469-484, 2010.

MACHADO, K. C; GRASSI, M. T; VIDAL, C; PESCARA, I. C; JARDIM, W. F; FERNANDES, A. N; SODRÉ, F. F; ALMEIDA, F. V; SANTANA, J. S; CANELA, M. C; NUNES, C. R. O; BICHINHO, K. M; SEVERO, F. J. R. A preliminary nationwide survey of the presence of emerging contaminants in drinking and source waters in Brazil. *Science of the Total Environment*, v. 57, p.138–146, 2016

MADIKIZELA, L.M., CHIMUKA, L. Occurrence of naproxen, ibuprofen, and diclofenac residues in wastewater and river water of KwaZulu-Natal Province in South Africa. **Environ. Monit**, 2017

MADUENHO, L.P.; MARTINEZ, C.B.R. Acute Effects of Diflubenzuron on the Neotropical Freshwater Fish *Prochilodus lineatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol. 148, p 265–272, 2008

MARTINEZ, C. B. R. Parâmetros bioquímicos de peixes para avaliação da qualidade da água. In: Ângela Teresa Silva-Souza. (Org.). Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil. Maringá. Anais. ABRAPOA, 2006

MATHIAS, F. T; FOCKINKB, D. H, DISNERC, G. R; PRODOCIMO, D. V; RIBAS, J. L. C; RAMOS, L. P; CESTARIC, M. M; ASSIS, H. C. S. Effects of low concentrations of

ibuprofen on freshwater fish *Rhamdia quelen*. **Environmental Toxicology and Pharmacology** 59. 105–113, 2018

MARTINS, M. L., MORAES, F. R., FUJIMOTO, R. Y., NOMURA, D. T; FENERICK, J. Respostas do híbrido tambacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 macho x *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 fêmea) a estímulos simples ou consecutivos de captura. **Boletim do Instituto de Pesca**, 28, 195–204, 2002

MILAN, M., PAULETTO, M., PATARNELLO, T., BARGELLONI, L., MARIN, M.G., MATOZZO, V. Gene transcription and biomarker responses in the clam *Ruditapes philippinarum* after exposure to ibuprofen. **Aquat. Toxicol.** 126, 17–29, 2013

MORTHORST, J.E., LISTER, A., BJERREGAARD, P., DER KRAAK, G., VAN. Ibuprofen reduces zebrafish PGE2 levels but steroid hormone levels and reproductive parameters are not affected. **Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol**, 2013.

MONTAGNER, C.C. VIDAL, C. ACAYABA, R.D. Matrizes Aquáticas do Brasil: Cenário Atual e Aspectos Analíticos, Ecotoxicológicos e Regulatórios. **Quim. Nova**, v. 40, n. 9, 1094–1110, 2017

MYERS, M.S., FOURNIE, J.W. Histological Biomarkers as integrators of anthropogenic and environmental stressors. In: Adams, S.M. (Ed.), **Biological Indicators of Aquatic Ecosystem Stress**. Am. Fish. Soc., Bethesda, pp. 221e287, 2002.

OLIVEIRA, V. P. Estudo histopatológico em juvenis de *Rhamdia quelen* submetidos a ensaio toxicológico com ibuprofeno. (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca- Universidade Estadual Do Oeste do Paraná, 2017

OLIVEIRA, V. et al. Efeitos do FeCl₂ e CuCl₂ na atividade da acetilcolinesterase cerebral de *Oreochromis niloticus*. **Natural Resources**, v. 2, n. 2, p. 27 - 36, 2013.

PAROLINI, M., BINELLI, A., PROVINI, A. Chronic effects induced by ibuprofen on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. **Ecotoxicol. Environ.**, 2011

PAULINO, M.G.; TAVARES, D.; TEREZAN, A.P.; SAKURAGUI, M.M.; PESENTI, E.; GIANI, A.; CESTARI, M.M.; FERNANDES, J.B.; FERNANDES, M.N. Biotransformations, Antioxidant System Responses, and Histopathological Indexes in the Liver of Fish Exposed to Cyanobacterial Extract. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v.39, n.5, p. 1041–1051, 2020

PENG, X., OU, W., WANG, C., WANG, Z., HUANG, Q., JIN, J., TAN, J., 2014. Occurrence and ecological potential of pharmaceuticals and personal care products in groundwater and reservoirs in the vicinity of municipal landfills in China. **Sci. Total Environ.** 490, 2019

PEREIRA, L. S; RIBAS, J. L.C; VICARI, T; SILVA, S. B; STIVAL, J; BALDAN, A. P; DOMINGOS, F. X. .V; GRASSI, M. T; CESTARI, M. M; SILVA DE ASSIS, H. C. Effects of ecologically relevant concentrations of cadmium in a freshwater fish. **Ecotoxicol. Environ. Saf**, v.130, p. 29–36, 2016

POLIZIO, A.; PEÑA, C. Effects of angiotensin II type 1 receptor blockade on the oxidative stress in spontaneously hypertensive rat tissues. **Regulatory Peptides**, v. 128, p. 1 - 5, 2005.

QUIROGA-SANTOS, E.H., GALAR-MARTÍNEZ, M., GARCÍA-MEDINA, S., GASCA-PÉREZ, E., CANO VIVEROS, S., RUÍZ-LARA, K., GÓMEZ-OLIVÁN, L.M., ISLAS-FLORES, H. Genocytotoxicity and congenital malformations produced by relevant environmental concentrations of aluminum, diclofenac and their mixture on *Cyprinus carpio*. Na interactions study. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** 82, 2021.

QUINN, B., SCHMIDT, W., ROURKE, K.O., HERNAN, R. Effects of the pharmaceuticals gemfibrozil and diclofenac on biomarker expression in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and their comparison with standardised toxicity tests. **Chemosphere** 84, 2011

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; SILVA-SOUZA, A. T. Hematologia de peixes brasileiros. In: RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TAKEMOTO, R. M.; PEREZ LIZAMA, M. de los. (Org.). **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Editora Varela, 2004.

REQUE, R. – Avaliação da ecotoxicidade de losartana potássica EM *Astyanax altiparanae* (lambari) através de ensaio cometa e biomarcadores bioquímicos. (Dissertação de mestrado) Programa De Pós-Graduação Em Ciência E Tecnologia Ambiental- Universidade Tecnológica Federal Do Paraná, 2017

SADAUSKAS-HENRIQUE, H., SAKURAGUI, M.M., PAULINO, M.G., FERNANDES, M.N. Using condition factor and blood variable biomarkers in fish to assess water quality. **Environ. Monitor and Assess.** v.181, p.29-42, 2011

SANTOS, L. H. et al. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 175, p. 45 - 95, 2010.

SECOLI, S. R. Interações medicamentosas: fundamentos para a prática clínica da enfermagem. **Rev Esc Enf USP**, v.35, n. 1, p. 28-34, 2001

SILVA, A. G. Alterações histopatológicas de peixes como biomarcadores da contaminação aquática. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Área de Concentração Zoologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 2004

SODRÉ, F.F; LOCATELLI, M.A.F; JARDIM, W.F. Occurrence of Emerging Contaminants in Brazilian Drinking Waters: A Sewage-To-Tap Issue. **Water Air Soil Pollut**, v. 206, p.57–67, 2010

SOUSA, J. C. G; RIBEIRO, A. R; BARBOSA, M. O; PEREIRA, M. F. R; SILVA, A. M. T. A review on environmental monitoring of water organic pollutants identified by EU guidelines. **J. Hazard. Mater.** 344, 146–162, 2018

TAVARES-DIAS, M., TENANI, R.A., GIOLI, L.D., FAUSTINO, C.D. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. II. Parâmetros sanguíneos do *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (*Osteichthyes, Characidae*) em policultivo intensivo. **Rev. Bras. Zool**, 2004

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. An atlas of fish histology normal and pathological features. 2.ed. Kodansha: Gustav Fischer Verlag. 1995

TEIXEIRA, M. J. ; BIELA, L.; TEIXEIRA, W. G. J., Andrade, D. C. A. Tratamento farmacológico da dor musculoesquelética. **Revista de Medicina**, v. 80, n. spe1, p. 179- 244, 2001.

TEWARI, S., JINDAL, R., KHO, Y.L., EO, S., CHOI, K. Major pharmaceutical residues in wastewater treatment plants and receiving waters in Bangkok, Thailand, and associated ecological risks. **Chemosphere**, 2013

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, p. 57-149, 2003.

VASQUEZ, MI, LAMBRIANIDES, A., SCHNEIDER, M., KÜMMERER, K., FATTA-KASSINOS, D. Efeitos colaterais ambientais de coquetéis farmacêuticos: o que sabemos e o que deveríamos saber. J. Perigo. **Matéria**, 2014

VIEIRA, M. J. A. F; CARVALHO, M. A. M; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B; SALGUEIRO, C. C. D. M; VIVEIROS, A. T. M; MOURA, A. A. A. N; NUNES, J. F. Características do Sêmen de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) em Latitude Equatorial. **Arch. Zootec.**, v.60, n.232, p.1263-1270, 2011

VIEIRA, C.E.D., ALMEIDA, MDA S., GALINDO, B.A., PEREIRA, L., MARTINEZ, C.B. DOS R. Integrated biomarker response index using a Neotropical fish to assess the water quality in agricultural areas. **Neotrop. Ichthyol**, 2014

VOSYLIENĖ, M.Z., The effects of heavy metals on haematological indices of fish (Survey). **Acta Zoologica Lituanica**. vol. 9, p.76-82, 1999.

WANG, W.d, YANG, H., WANG, X., JIANG, J., ZHU, W. Effects of fulvic acid and humic acid on aluminum speciation in drinking water. J. Environ. Science, 2010

WHITE, C.C. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate–cysteine ligase activity. Anal. **Biochem.**, v.318, p.175–180, 2003.

XIA, L., ZHENG, L., ZHOU, J.L. Effects of ibuprofen, diclofenac and paracetamol on hatch and motor behavior in developing zebra fish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, 2017