

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SOROCABA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E MONITORAMENTO
AMBIENTAL

Marina Tauche Ferreira

EFEITOS DA CLOROQUINA SOBRE BIOMARCADORES DE PEIXE-ZEBRA
(Danio rerio)

Sorocaba

2024

Marina Tauche Ferreira

EFEITOS DA CLOROQUINA SOBRE BIOMARCADORES DE PEIXE-ZEBRA
(Danio rerio)

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental.

Orientadora: Cleoni dos Santos Carvalho

Coorientadora: Renata Fracácio Francisco

Sorocaba

2024

Tauche Ferreira, Marina

**EFEITOS DA CLOROQUINA SOBRE BIOMARCADORES
DE PEIXE-ZEBRA (Danio rerio) / Marina Tauche Ferreira
-- 2024.**

141f.

Tese de Doutorado - Universidade Federal de São Carlos,
campus Sorocaba, Sorocaba

Orientador (a): Cleoni dos Santos Carvalho

Banca Examinadora: Elaine Cristina Mathias da Silva,
Raquel Fernanda Salla Jacob, Silvia Pierre Irazusta,
Suzelei Rodgher

Bibliografia

1. Ecotoxicologia aquática. 2. Biomarcadores. 3. Peixes.

I. Tauche Ferreira, Marina. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano -
CRB/8 6979



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências e Tecnologias Para a Sustentabilidade
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Marina Tauche Ferreira, realizada em 15/07/2024.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho (UFSCar)

Profa. Dra. Sílvia Pierre Irazusta (CEETEPS)

Profa. Dra. Elaine Cristina Mathias da Silva (UFSCar)

Profa. Dra. Raquel Fernanda Salla Jacob (UFSCar)

Profa. Dra. Suzelei Rodgher (UNESP)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental.

DEDICATÓRIA

À minha mãe Marcia, ao meu pai Josemar, a minha irmã Barbara e a minha vó Tereza, que me apoiaram em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma forma contribuíram para esta Tese, em especial:

As minhas orientadoras Dra. Cleoni dos Santos Carvalho e Dra. Renata Fracácio Francisco, por aceitarem a me orientar neste projeto, compartilhando comigo seus conhecimentos e experiência, ajudando em todos os momentos durante o Doutorado.

A UFSCar pela oportunidade de cursar o Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental (PPGBMA), aos professores que contribuíram com disciplinas que enriqueceram meus conhecimentos e me qualificaram para este título. Ao Laboratório de Biomarcadores (LABIOM) pela disponibilização dos recursos indispensáveis para a realização deste projeto e a toda equipe pela ajuda nas análises. Ao Laboratório de Dinâmica de Populações de Peixes e Histologia do Departamento de Hidrobiologia, Professora Dra. Evelise Nunes Fragoso de Moura e ao técnico Claudinei por toda a assistência e ensinamentos. E as minhas companheiras de curso Michele, Liliane e Amanda pelos momentos compartilhados.

A UNESP *Campus* Sorocaba por ceder o espaço e os recursos necessários para a realização da pesquisa, a contribuição do Laboratório de Toxicologia de Contaminantes Ambientais e Histopatologias (LATHIS), aos parceiros Leslie, Pedro e Janete e as técnicas Sandra e Suzan por toda ajuda e amizade.

Ao Laboratório de Fisiologia de Plantas sob Estresse (LFPE) da UFPR e ao Professor Dr. Marcelo Pedrosa Gomes, pela ajuda com a análise de água e recursos utilizados.

As professoras que participaram como banca examinadora da Tese, Dra. Elaine Cristina Mathias da Silva, Dra. Raquel Fernanda Salla Jacob, Dra. Silvia Pierre Irazusta e Dra. Suzelei Rodgher, por aceitarem o convite e pelas valiosas considerações realizadas.

Ao suporte financeiro para a realização dessa pesquisa pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) N° de processo 88887.659078/2021-00 na concessão de bolsa de doutorado, a FAPESP processos 2017/23781-9 e 2019/08491-0 e ao CNPq processo 407199/2018-7.

A minha família, meus pais Josemar e Marcia, minha irmã Barbara e minha avó Tereza por toda ajuda e incentivo na minha jornada científica, celebrando minhas vitórias. A Tânia por todo suporte emocional e a Natália pela ajuda nos processos criativos.

E, principalmente, a Deus e a Nossa Senhora que me guiam e iluminam por toda a caminhada.

Tempo de uiaúa:
o rio onde os peixes nascem
é o mesmo que os mata.

Aníbal Beça

RESUMO

A Cloroquina é utilizada no tratamento da malária e em doenças autoimunes como lúpus e artrite reumatoide, devido às suas propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras, mas seu uso aumentou significativamente durante a pandemia de COVID-19 devido a sua recomendação como tratamento profilático. Este aumento no consumo, associado ao descarte inadequado, resultou na presença do fármaco em águas residuais e superficiais de diversos países. Neste contexto, este estudo teve como objetivo compilar dados ambientais e ecotoxicológicos sobre a Cloroquina e a Hidroxicloroquina no ambiente aquático e reproduzir em laboratório um teste de toxicidade crônica do Difosfato de Cloroquina (DCQ), com duração de 21 dias, em sistema semi-estático, utilizando a espécie modelo peixe-zebra (*Danio rerio*), expostos a concentrações ambientalmente relevantes detectadas antes da pandemia (0,6 µg/L) e durante a pandemia (1,8; 5,4; 16,2 e 48,6 µg/L), para avaliar as alterações provocadas pelo fármaco. Os biomarcadores foram analisados em funções bioquímicas, incluindo alterações na concentração de proteínas totais, glicose, triglicerídeos e imunoglobulinas (Ig); atividades enzimáticas de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (ALP), lactato desidrogenase (LDH) e glutathione S-transferase (GST); e estresse oxidativo avaliado por proteínas carboniladas (PCO) e substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARs). As análises histológicas avaliaram alterações branquiais, hepáticas e renais. Os dados foram comparados estatisticamente entre o controle e os grupos expostos, utilizando o teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, por meio do software PAST[®]. Os resultados mostraram distúrbios metabólicos, enzimáticos e histopatológicos nos órgãos a partir das concentrações registradas em águas superficiais (0,6 µg/L e 1,8 µg/L). Além disso, a concentração 1,8 µg/L foi a mais responsiva para biomarcadores de estresse oxidativo. Na análise de componentes principais (ACP), como biomarcadores mais responsivos as exposições de DCQ, destacaram-se a atividade da enzima AST, o TBARs no cérebro, a dilatação do seio venoso central nas brânquias, hepatócitos com núcleos picnóticos no fígado e a redução do espaço de Bowman no rim. O aspecto inovador desta pesquisa reside na compreensão da toxicidade crônica de concentrações ambientais de DCQ sobre biomarcadores de *D. rerio* e sublinha a importância da conscientização sobre o uso e descarte responsável de medicamentos, reforçando a necessidade de políticas de monitoramento e remediação para proteger os recursos hídricos e a vida aquática.

Palavras-chave: Poluente emergente, ecotoxicologia, fármaco, organismos aquáticos, COVID-19.

ABSTRACT

Chloroquine is used to treat malaria and autoimmune diseases such as lupus and rheumatoid arthritis due to its anti-inflammatory and immunomodulatory properties, but its use increased significantly during the COVID-19 pandemic due to its recommendation as a prophylactic treatment. This increase in consumption, associated with inadequate disposal, resulted in the presence of the drug in wastewater and surface waters in several countries. In this context, this study aimed to compile environmental and ecotoxicological data on Chloroquine and Hydroxychloroquine in the aquatic environment and to reproduce in the laboratory a chronic toxicity test of Chloroquine Diphosphate (CQD), lasting 21 days, in a semi-static system, using the model species zebrafish (*Danio rerio*), exposed to environmentally relevant concentrations detected before the pandemic (0.6 µg/L) and during the pandemic (1.8; 5.4; 16.2 and 48.6 µg/L), to evaluate the changes caused by the drug. Biomarkers were analyzed in biochemical functions, including changes in the concentration of total proteins, glucose, triglycerides and immunoglobulins (Ig); enzymatic activities of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), lactate dehydrogenase (LDH) and glutathione S-transferase (GST); and oxidative stress measured by protein carbonyls (PCO) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARs). Histological analyses evaluated gill, liver and kidney changes. Data were statistically compared between the control and exposed groups, using the nonparametric Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test, through the PAST® software. The results showed metabolic, enzymatic and histopathological disturbances in the organs from the concentrations recorded in surface waters (0.6 µg/L and 1.8 µg/L). In addition, the concentration of 1.8 µg/L was the most responsive to biomarkers of oxidative stress. In the principal component analysis (PCA), the most responsive biomarkers to DCQ exposures were AST enzyme activity, TBARs in the brain, dilation of the central venous sinus in the gills, hepatocytes with pyknotic nuclei in the liver and reduction of Bowman's space in the kidney. The innovative aspect of this research lies in the understanding of the chronic toxicity of environmental concentrations of DCQ on biomarkers of *D. rerio* and underscores the importance of greater awareness about the responsible use and disposal of drugs, reinforcing the need for monitoring and remediation policies to protect water resources and aquatic life.

Keywords: Emerging pollutant, ecotoxicology, drug, aquatic organisms, COVID-19.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figura 1. Classificação dos biomarcadores que foram selecionados para essa pesquisa.	50
Figura 2. Aclimação do lote de peixes utilizado nos testes no LATHIS.....	54
Figura 3. Desenho experimental da exposição da espécie <i>Danio rerio</i> as diferentes concentrações de Difosfato de Cloroquina para as análises bioquímicas.....	55
Figura 4. Etapas para a realização das análises bioquímicas.	57
Figura 5. Efeitos da exposição a concentrações de Difosfato de Cloroquina (DCQ) sobre as proteínas totais (A), glicose (B) e triglicérides (C) do corpo e do cérebro de <i>Danio rerio</i> após 21 dias de exposição.....	62
Figura 6. Efeitos da exposição ao Difosfato de Cloroquina (DCQ) sobre as imunoglobulinas (Ig) e proteínas totais do muco de <i>Danio rerio</i> após 21 dias de exposição.....	63
Figura 7. Efeitos da exposição a concentrações de Difosfato de Cloroquina (DCQ) sobre a atividade da Alanina aminotransferase (ALT) e da Aspartato aminotransferase (AST) (A), Fosfatase alcalina (ALP) (B), e Lactato desidrogenase (LDH) (C) no corpo de <i>Danio rerio</i> após 21 dias de exposição.....	64
Figura 8. Efeitos da exposição a concentrações de Difosfato de Cloroquina (DCQ) sobre a produção de Proteínas carboniladas (PCO) (A), produção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) (B), e atividade da glutathione S-transferase (GST) (C) no cérebro e no corpo de <i>Danio rerio</i> após 21 dias de exposição.	65
Figura 9. Análise de Componentes Principais (ACP) de biomarcadores no cérebro de <i>Danio rerio</i> expostos ao Difosfato de Cloroquina (DCQ).	67
Figura 10. Análise de Componentes Principais (ACP) de biomarcadores no corpo de <i>Danio rerio</i> expostos ao Difosfato de Cloroquina (DCQ).	68

CAPÍTULO 3

Figura 1. Brânquias de <i>Danio rerio</i>	91
Figura 2. Fígado de <i>Danio rerio</i>	91
Figura 3. Rim de <i>Danio rerio</i>	92
Figura 4. Desenho experimental da exposição da espécie <i>Danio rerio</i> as diferentes concentrações de Difosfato de Cloroquina para as análises histológicas.	94
Figura 5. Etapas do processamento histológico.	95

Figura 6. Brânquias de <i>Danio rerio</i> , grupo controle.	99
Figura 7. Brânquias de <i>Danio rerio</i> , exposto a 0,6 µg/L de Difosfato de Cloroquina.	99
Figura 8. Brânquias de <i>Danio rerio</i> , exposto a 1,8 µg/L de Difosfato de Cloroquina.	100
Figura 9. Brânquias de <i>Danio rerio</i> , exposto a 5,4 µg/L de Difosfato de Cloroquina.	100
Figura 10. Brânquias de <i>Danio rerio</i> , exposto a 16,2 µg/L de Difosfato de Cloroquina.	101
Figura 11. Brânquias de <i>Danio rerio</i> , exposto a 48,6 µg/L de Difosfato de Cloroquina.	101
Figura 12. Fígado de <i>Danio rerio</i> , grupo controle.	102
Figura 13. Fígado de <i>Danio rerio</i> , exposto a 0,6 µg/L de Difosfato de Cloroquina.	102
Figura 14. Fígado de <i>Danio rerio</i> , exposto a 1,8 µg/L de Difosfato de Cloroquina.	103
Figura 15. Fígado de <i>Danio rerio</i> , exposto a 5,4 µg/L de Difosfato de Cloroquina.	103
Figura 16. Fígado de <i>Danio rerio</i> , exposto a 16,2 µg/L de Difosfato de Cloroquina.	104
Figura 17. Fígado de <i>Danio rerio</i> , exposto a 48,6 µg/L de Difosfato de Cloroquina.	104
Figura 18. Rim de <i>Danio rerio</i> , grupo controle.	105
Figura 19. Rim de <i>Danio rerio</i> , exposto a 0,6 µg/L de Difosfato de Cloroquina.	105
Figura 20. Rim de <i>Danio rerio</i> , exposto a 1,8 µg/L de Difosfato de Cloroquina.	106
Figura 21. Rim de <i>Danio rerio</i> , exposto a 5,4 µg/L de Difosfato de Cloroquina.	106
Figura 22. Rim de <i>Danio rerio</i> , exposto a 16,2 µg/L de Difosfato de Cloroquina.	107
Figura 23. Rim de <i>Danio rerio</i> , exposto a 48,6 µg/L de Difosfato de Cloroquina.	107
Figura 24. Análise de Componentes Principais (ACP) de biomarcadores histológicos das brânquias de <i>Danio rerio</i>	113
Figura 25. Análise de Componentes Principais (ACP) de biomarcadores histológicos do fígado de <i>Danio rerio</i>	114
Figura 26. Análise de Componentes Principais (ACP) de biomarcadores histológicos do rim de <i>Danio rerio</i>	115

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Table 1. Chemical formulas and predicted properties of compounds and their major metabolites.	29
Table 2. Predicted Environmental Concentrations (PECs) during the COVID-19 pandemic in wastewater and environmental waters.....	30
Table 3. Chloroquine and hydroxychloroquine concentrations in studies that had significant marker changes compared to drug-free controls.	33

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Concentrações de Difosfato de Cloroquina (DCQ) obtidos por Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS/MS) na água de exposição dos diferentes grupos.	61
---	----

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Alterações branquiais e estágio da lesão correspondente segundo Polecsik; Mitrovic- Tutundizc (1994) e adaptado por Fracácio (2006).	96
Tabela 2. Alterações hepáticas e estágio da lesão correspondente segundo Rigolin-Sá (1998). 97	
Tabela 3. Alterações renais e estágio da lesão correspondente segundo Rigolin-Sá (1998).....	97
Tabela 4. Índices de Alteração Histológica (IAH), com os valores de alterações correspondentes ao efeito no órgão formulados por Polecsik e Mitrovic-Tutundizc (1994).....	98
Tabela 5. Análise Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn da ocorrência de alterações nas brânquias de <i>Danio rerio</i> grupos controle e expostos ao Difosfato de Cloroquina (DCQ).....	109
Tabela 6. Análise Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn da ocorrência de alterações no fígado de <i>Danio rerio</i> grupos controle e expostos ao Difosfato de Cloroquina (DCQ).	110
Tabela 7. Análise Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn da ocorrência de alterações nos rins de <i>Danio rerio</i> grupos controle e expostos ao Difosfato de Cloroquina (DCQ).	111
Tabela 8. Índices de Alteração Histológica (IAH) nos órgãos de <i>Danio rerio</i> grupo controle e expostos em diferentes concentrações de Difosfato de Cloroquina (DCQ) durante 21 dias. ...	112

LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT Associação Brasileira de Normas Técnicas
ALP Fosfatase alcalina
ALT Alanina aminotransferase
AST Aspartato aminotransferase
CEUA Comissão de Ética no Uso de Animais
CL₅₀ Concentração letal média
COVID-19 Doença causada pelo coronavírus SARS-CoV-2
CQ Cloroquina
DCQ Difosfato de Cloroquina
EROs Espécies reativas ao oxigênio
ETA Estação de tratamento de água
ETE Estação de tratamento de esgoto
GC Glicose
GST Glutathione S-transferase
HCQ Hidroxicloroquina
Ig Imunoglobulina
Kow Coeficiente de partição octanol-água
LDH Lactato desidrogenase
NaCl Cloreto de sódio
NaOH Hidróxido de sódio
O₂ Oxigênio
OECD Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
PBS Solução salina tamponada com fosfato
PCO Proteínas carboniladas
PEC Concentrações Ambientais Previstas
PNEC Concentração sem previsão de efeito
PPGBMA Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental
PT Proteínas totais
TBARs espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TG Tríglicerídeos
UFSCar Universidade Federal de São Carlos
UNESP Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

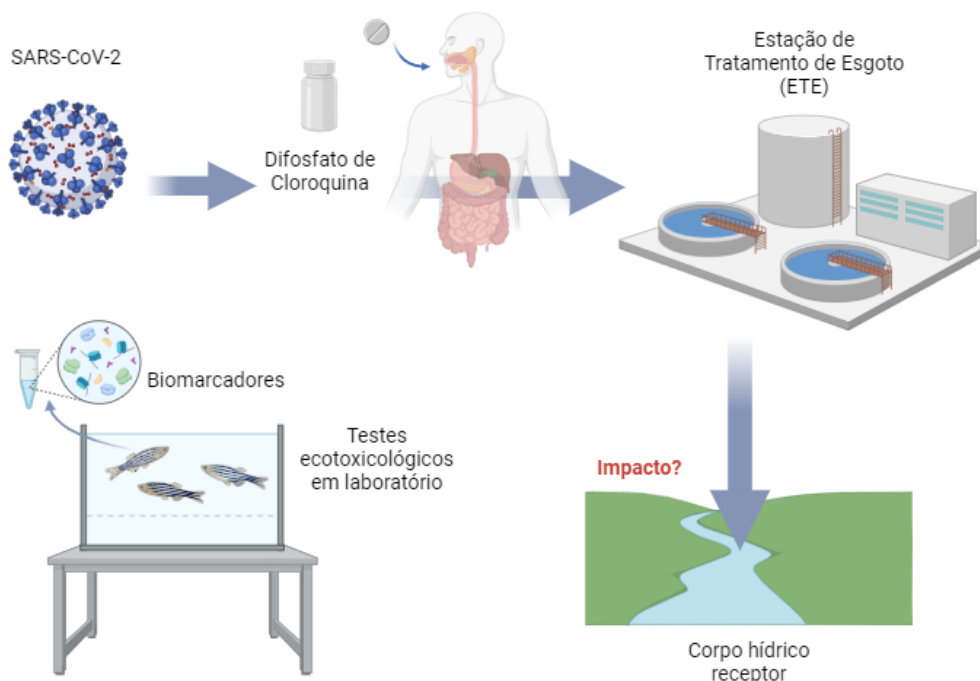
SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	17
Capítulo 1. Cloroquina e Hidroxicloroquina no ambiente e organismos aquáticos.....	24
ABSTRACT	24
1. INTRODUCTION.....	25
2. MATERIALS AND METHODS.....	26
3. RESULTS AND DISCUSSION	27
3.1. Contamination of water by aminoquinolines and detection	27
3.2. Concentrations in the aquatic environment	29
3.3. Estimates of Predicted Environmental Concentrations (PECs).....	30
3.4. Removal of aqueous matrices.....	31
3.5. Chloroquine ecotoxicity in aquatic organisms	32
3.6. Perspectives	35
4. CONCLUSION	36
5. ACKNOWLEDGEMENTS.....	36
6. REFERENCES.....	36
Capítulo 2. Utilização de biomarcadores bioquímicos para avaliar a toxicidade de Difosfato de Cloroquina em <i>Danio rerio</i>.....	47
RESUMO	48
1. INTRODUÇÃO.....	50
2. OBJETIVOS.....	53
3. MATERIAIS E MÉTODOS	53
3.1 Área de estudo	53
3.2 Obtenção e utilização do fármaco	54
3.3 Manutenção do peixe-zebra (<i>Danio rerio</i>)	54
3.4. Análise da água de exposição LC-MS/MS.....	56
3.5 Coleta de amostras biológicas	56
3.6 Determinação de proteínas	57

3.7 Determinação de carboidratos	57
3.8 Determinação de triglicerídeos.....	58
3.9 Análises metabólicas enzimáticas	58
3.10. Análise imunológica	59
3.11. Análise de estresse oxidativo e desintoxicação	59
3.12. Análises estatísticas	60
4. RESULTADOS.....	61
4.1. Concentrações de Difosfato de Cloroquina na água de exposição.....	61
4.2. Alterações nos biomarcadores bioquímicos	61
4.3. Análise de Componentes Principais (ACP).....	66
5. DISCUSSÃO.....	69
6. CONCLUSÃO.....	75
7. REFERÊNCIAS	76
Capítulo 3. Histopatologia das brânquias, fígado e rim de <i>Danio rerio</i> expostos a diferentes concentrações de Difosfato de Cloroquina.....	87
RESUMO	88
1. INTRODUÇÃO.....	90
2. OBJETIVOS.....	93
3. MATERIAIS E MÉTODOS	94
3.1. Desenho experimental	94
3.2. Processamento de tecidos para análise histologica	94
3.3. Análises qualitativas e semiquantitativas	96
3.4. Análises estatísticas quantitativas.....	98
4. RESULTADOS.....	99
4.1. Análises histológicas qualitativas.....	99
4.2. Análises histológicas semiquantitativas e quantitativas	108
4.3. Análise de Componentes Principais (ACP).....	112

5. DISCUSSÃO.....	116
6. CONCLUSÃO.....	121
7. REFERÊNCIAS	122
Capítulo 4. Considerações finais e perspectivas	129
ANEXOS.....	131

RESUMO GRÁFICO



Fonte: Autora (criado com BioRender.com)

APRESENTAÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou em 11 de março de 2020, a doença COVID-19, causada pelo novo coronavírus (Sars-Cov-2), como uma pandemia e indicou a necessidade de adoção de medidas específicas como detecção precoce, quarentena e tratamento rápido (OMS, 2020; Buss, 2020). O agente etiológico da pandemia de COVID-19 é o vírus SARS-CoV-2 que causa a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) Coronavírus 2, um novo membro de uma família conhecida como Coronavírus (CoVs), responsável por doenças respiratórias patológicas de alto risco (Burki 2020; Facciola *et al.*, 2021).

Os impactos da COVID-19 têm causado mais debate globalmente do que as SARs (2002-2003), gripe aviária (2003-2009), gripe suína (2009-2010) e Ebola (2014-2016) (Espejo *et al.*, 2020; Senhoras 2020). O que mais preocupou a população, além da rápida propagação, foi a falta de um medicamento para tratar ou prevenir o novo coronavírus (Oliveira, 2020). As vacinas tiveram um efeito na redução da transmissão, hospitalizações e mortalidade da COVID-19, mas é possível que esta se torne uma doença endêmica na população, como a gripe comum, com picos sazonais (Silva *et al.*, 2020), necessitando, paralelamente à vacinação, opções terapêuticas que ainda estão em avaliação (Hodgson, 2020).

Desta forma, foram estudadas diversas intervenções farmacêuticas para o tratamento da COVID-19 no mundo, e entre elas podemos citar a terapia com as aminoquinolinas: Cloroquina

(CQ) e Hidroxicloroquina (HCQ), que já eram estudadas no tratamento de outros vírus da família do coronavírus (Rosa; Santos, 2020). Porém, o seu uso não garante que sejam eficazes ao novo vírus e não existem estudos que comprovem sua profilaxia contra a doença, além de poder agravar o quadro clínico dos pacientes (Sanders *et al.*, 2020, Rosenberg *et al.*, 2020, Geleris *et al.*, 2020).

Entre os efeitos colaterais relatados da CQ estão a inibição da despolarização diastólica com retardo na condução e alteração no transporte iônico intracelular, inibição da atividade de enzimas como a glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH), enzimas envolvidas na síntese dos ácidos nucleicos e da via do AMP cíclico, além de causar estresse oxidativo (Stanton 2012, Shen *et al.*, 2017). Em nota, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) reforça que o uso destes fármacos não é recomendado para o tratamento da COVID-19 sendo necessário conduzir estudos clínicos demonstrando a segurança e a eficácia para o uso pretendido (ANVISA, 2020).

O Difosfato de Cloroquina formulação de CQ mais comercializado no Brasil para uso oral no tratamento de doenças parasitárias, reumáticas, malária, lúpus e outras condições, tem massa molecular de 515,9 g/mol e é solúvel em água (PUBCHEM, 2021). No organismo liga-se moderadamente (60%), às proteínas plasmáticas e passa por biotransformação por ação das enzimas de desintoxicação, como a glutathione S-Transferase, para que possa ser eliminada (Santana *et al.*, 2018).

No Brasil, a Nota Informativa nº 17/2020 - SE/GAB/SE/MS, publicada pelo Ministério da Saúde, orientava a prescrição de Difosfato de Cloroquina (500 mg) ou sulfato de Hidroxicloroquina (400 mg) aos pacientes que apresentavam sintomas leves, moderados e críticos causados pela infecção do vírus Sars-CoV-2 (Brasil, 2020). A CQ excretada nas fezes e urina dos usuários corresponde uma grande parte da dose ingerida, na forma original ou metabólito, podendo ser detectados na urina meses após uma única dose (Ducharme; Farinotti, 1996; Singh *et al.*, 2020).

Isso é altamente relevante em um contexto ambiental e ecotoxicológico, pois se sabe que os sistemas de tratamento de efluentes não possuem processos adequados para a remoção desses medicamentos que entrarão nos ecossistemas de água doce (Ashfaq *et al.*, 2017). Marques *et al.* (2023) registraram a ocorrência das seguintes concentrações de HCQ em três rios urbanos brasileiros no ano de 2020: $1,45 \pm 0,74$, $1,84 \pm 0,53$ e $2,10 \pm 0,87$ $\mu\text{g/L}$, as quais apresentaram efeitos sobre o crescimento, fotossíntese e bioquímica dos bioindicadores de qualidade de água *Synechococcus elongatus* (cianobactéria) e *Chlorella vulgaris* (microalga).

Recentemente, uma das questões relativas à qualidade da água potável diz respeito à presença de fármacos em águas superficiais que podem ser utilizadas por uma estação de

tratamento de água (ETAs) para a produção de água destinada ao consumo humano (Gaffney *et al.*, 2015). A CQ e seus resíduos podem alcançar os corpos d'água superficiais por diferentes fontes, como efluentes de hospitais e indústrias farmacêuticas, descarte incorreto e por meio da excreção humana (Quadra *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2020). Uma vez dentro do organismo, a toxicocinética é semelhante para os vertebrados, com altas concentrações no fígado e no rim, onde será metabolizada e filtrada (Singh *et al.*, 2020), além das brânquias em peixes (Ramesh *et al.*, 2018).

Neste sentido, a lesão hepática induzida por medicamentos foi reconhecida pela indústria farmacêutica como um importante problema toxicológico e ecotoxicológico, sendo os testes enzimáticos séricos e as análises histológica algumas das mais indicadas na avaliação (McGrath; Li, 2008). Da mesma forma, os testes padrão em estudos de toxicidade renais incluem exame histopatológico, microscopia eletrônica de transmissão, colorações histoquímicas e imunohistoquímicas, análise morfométrica, urinálise, além de biomarcadores bioquímicos de função renal (Frazier *et al.*, 2019).

As brânquias e cérebro, são outros órgãos de interesse para investigações toxicológicas em peixes, isso porque as brânquias são o primeiro órgão de contato com o poluente e na tentativa de impedir a absorção, as estruturas se moldam de forma que é possível observar lesões que podem eventualmente prejudicar a respiração do animal (Wolf *et al.*, 2015), enquanto o cérebro apresenta modulações enzimáticas mais sensíveis ao estresse e alterações nos componentes celulares e moleculares (Fernandes *et al.*, 2008; Iftikhar *et al.*, 2022).

O peixe-zebra, espécie *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822), possui tecidos e órgãos comparáveis aos de humanos, apresentando mais de 70% de homologia genômica, incluindo genes associados a doenças (Goldsmith; Jobin, 2012; Howe *et al.*, 2013; Miyawaki, 2020). Essa espécie é pequena, de fácil criação em aquário, possui ciclo de vida curto, permitindo o monitoramento de doenças por gerações, e absorve compostos pela boca, brânquias e pele, tornando-se um modelo ideal para estudos ecotoxicológicos (Delvecchio *et al.*, 2011; Chakravarthy *et al.*, 2014). Estudos demonstraram a toxicidade da CQ na mortalidade e má formações de embriões e larvas de peixe-zebra (Silva *et al.*, 2023), além de alterações bioquímicas e morfológicas após a exposição de peixe-zebra adultos a HCQ (Mendonça-Gomes *et al.*, 2022).

Para compreender melhor sobre as implicações do uso extensivo das aminoquinolinas durante o cenário pandêmico sobre os organismos aquáticos, a Tese encontra-se estruturada nos seguintes capítulos:

➤ **Capítulo 1: Cloroquina e Hidroxicloroquina no meio ambiente e organismos aquáticos**

Este capítulo abordou uma revisão bibliográfica, submetida e publicada na revista *Ambiente & Água*, que aborda as consequências das aminoquinolinas no ambiente aquático quanto a contaminação da água e sua detecção; concentrações ambientais anteriores e durante a pandemia; estimativas de concentrações ambientais previstas (PECs); alternativas para a remoção dos compostos em matrizes aquosas; ecotoxicidade em organismos aquáticos não-alvo e perspectivas de estudos.

➤ **Capítulo 2: Utilização de biomarcadores bioquímicos para avaliar a toxicidade de Difosfato de Cloroquina em *Danio rerio***

Neste capítulo foram explorados os efeitos da exposição crônica ao Difosfato de Cloroquina em cinco concentrações ambientalmente relevantes em peixes, *D. rerio*, por meio de biomarcadores bioquímicos, observando alterações metabólicas, enzimáticas e de estresse oxidativo. As análises compreenderam a porção do cérebro, o conjunto de órgãos do corpo e do muco dos animais. Foram realizados testes estatísticos para observar as diferenças significativas entre os animais expostos e o controle.

➤ **Capítulo 3: Histopatologia das brânquias, fígado e rim de *Danio rerio* expostos a diferentes concentrações de Difosfato de Cloroquina**

O capítulo abordou alterações histopatológicas em brânquias, fígado e rim de *D. rerio* expostos 21 dias ao Difosfato de Cloroquina. O estudo envolveu análises qualitativas, quantitativas e Índices de Alteração Histológica (IAH), para cada órgão e em cada uma das cinco concentrações estudadas.

➤ **Capítulo 4: Considerações finais e perspectivas**

Neste tópico foi apresentada a correlação entre os biomarcadores bioquímicos e histológicos, bem como foram apontadas perspectivas futuras de estudos que envolvam o Difosfato de Cloroquina no ambiente aquático.

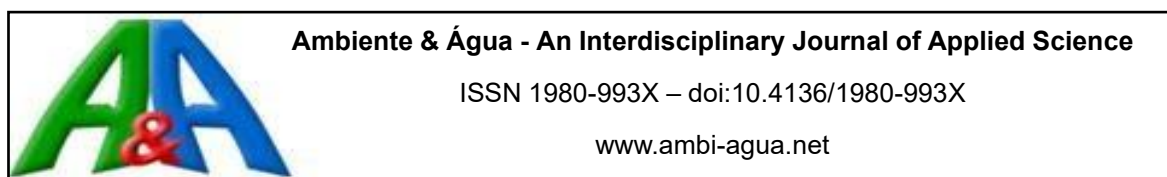
REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Esclarecimentos sobre Hidroxicloroquina e Cloroquina**. Disponível em http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/covid-19-esclarecimentos-sobreHidroxicloroquina-e-Cloroquina/219201. Acesso em 05 de setembro de 2020.
- ASHFAQ, M. *et al.* Ecological risk assessment of pharmaceuticals in the receiving environment of pharmaceutical wastewater in Pakistan. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 136, p. 31-39, 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Nota informativa nº 17/2020 - SE/GAB/SE/MS. Orientações do Ministério da Saúde para manuseio medicamentoso precoce de pacientes com diagnóstico da COVID-19**. 2020. Disponível em: <https://coronavirus.saude.gov.br/manejo-clinico-e-tratamento>. Acesso em: 20 jan. 2021.
- BURKI, T.K. Cancer guidelines during the COVID-19 pandemic. **The Lancet Oncology**, v. 21, n. 5, p. 629-630, 2020.
- BUSS, P. M. De pandemias, desenvolvimento e multilateralismo. **Fiocruz/Agência Fiocruz de Notícias**, Rio de Janeiro, 2020. Seção Opinião, p. 7.
- CHAKRAVARTHY, S. *et al.* Zebrafish as an *in vivo* high-throughput model for genotoxicity. **Zebrafish**, v. 11, n. 2, p. 154-166, 2014.
- DELVECCHIO, C.; TIEFENBACH, J.; KRAUSE, H. M. The zebrafish: a powerful platform for *in vivo*, HTS drug discovery. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 9, n. 4, p. 354-361, 2011.
- DUCHARME, J.; FARINOTTI, R. Clinical pharmacokinetics and metabolism of chloroquine. **Clinical pharmacokinetics**, v. 31, n. 4, p. 257-274, 1996.
- ESPEJO, W.; CELIS, J. E.; CHIANG, G.; BAHAMONDE, P. Environment and COVID-19: Pollutants, impacts, dissemination, management and recommendations for facing future epidemic threats. **Science of the Total Environment**, v. 747, p. 141314, 2020.
- FACCIOLÀ, A.; LAGANÀ, P.; CARUSO, G. The COVID-19 pandemic and its implications on the environment. **Environmental Research**, p. 111648, 2021.
- FERNANDES, A. L. *et al.* Assessment of the effects of graphene exposure in *Danio rerio*: a molecular, biochemical and histological approach to investigating mechanisms of toxicity. **Chemosphere**, v. 210, p. 458-466, 2018.
- FRAZIER, K. S. *et al.* Kidney pathology and investigative nephrotoxicology strategies across species. *In: Seminars in Nephrology*. WB Saunders, 2019. p. 190-201.

- GAFFNEY, V.; ALMEIDA, C. M.; RODRIGUES, A.; FERREIRA, E.; BENOLIEL, M. J.; CARDOSO, V.V. Occurrence of pharmaceuticals in a water supply system and related human health risk assessment. **Water Research**, v. 72, p. 199-208, 2015.
- GELERIS, J. *et al.* Observational study of hydroxychloroquine in hospitalized patients with Covid-19. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 25, p. 2411- 2418, 2020.
- GOLDSMITH, J.R.; JOBIN, C. Think small: zebrafish as a model system of human pathology. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 2012.
- HODGSON, J. The pandemic pipeline. **Nature Biotechnology**, v. 38, p. 523-532, 2020.
- HOWE, K. *et al.* The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498-503, 2013.
- IFTIKHAR, N.; ZAFAR, R.; HASHMI, I. Multi-biomarkers approach to determine the toxicological impacts of sulfamethoxazole antibiotic on freshwater fish *Cyprinus carpio*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 233, p. 113331, 2022.
- MARQUES, R. Z. *et al.* COVID-19 pharmaceuticals in aquatic matrices: The threatening effects over cyanobacteria and microalgae. **Science of the Total Environment**, v. 892, p. 164309, 2023.
- MCGRATH, P.; LI, C.Q. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 9-10, p. 394-401, 2008.
- MENDONÇA-GOMES, J. M. *et al.* Environmental impacts of COVID-19 treatment: Toxicological evaluation of azithromycin and hydroxychloroquine in adult zebrafish. **Science of The Total Environment**, v. 790, p. 148129, 2021.
- MIYAWAKI, I. Application of zebrafish to safety evaluation in drug discovery. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 33, n. 4, p. 197-210, 2020.
- OLIVEIRA, E. H. A. Coronavírus: prospecção científica e tecnológica dos fármacos em estudo para tratamento da Covid-19. **Cadernos de Prospecção**, v. 13, n. 2 COVID-19, p. 412, 2020.
- OMS – Organização Mundial da Saúde. 2020. Disponível em <https://www.who.int/news/item/27-04-2020-who-timeline---covid-19> Acessado em 8 de junho de 2021.
- PUBCHEM - National Center for Biotechnology Information. **PubChem Compound Summary for CID 64927, Chloroquine phosphate.** 2001. 45 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chloroquine-phosphate> Acessado em 8 de junho de 2021.
- QUADRA, G. R.; SOUZA, H. O.; SANTOS-COSTA, R.; SANTOS-FERNANDEZ, M. A. Do pharmaceuticals reach and affect the aquatic ecosystems in Brazil? A critical review of current

- studies in a developing country. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 2, p. 1200-1218, 2017.
- ROSA, S. G. V.; SANTOS, W. C. Clinical trials on drug repositioning for COVID-19 treatment. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 44, p. 40, 2020.
- ROSENBERG, E. S. *et al.* Association of treatment with hydroxychloroquine or azithromycin with in-hospital mortality in patients with COVID-19 in New York state. **Journal of the American Medical Association**, v. 323, n. 24, p. 2493–2502. 2020
- SANDERS, J. M.; MONOGUE, M. L.; JODLOWSKI, T. Z.; CUTRELL, J. B. Pharmacologic treatments for coronavirus disease 2019 (COVID-19): a review. **Journal of the American Medical Association**, v. 323, n. 18, p. 1824-1836, 2020.
- SANTANA, M. S. *et al.* Biomarker responses in fish exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): Systematic review and meta-analysis. **Environmental Pollution**, v. 242, p. 449-461, 2018.
- SANTOS, A. V. *et al.* Occurrence and risk assessment of pharmaceutically active compounds in water supply systems in Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 746, p. 141011, 2020.
- SENHORAS, E. M. Coronavírus e o papel das pandemias na história humana. **Boletim de Conjuntura (BOCA)**, v. 1, n. 1, p. 31-34, 2020.
- SHEN, H.; WU, N.; WANG, Y.; ZHAO, H.; ZHANG, L.; LI, T.; ZHAO, M. Chloroquine attenuates paraquat-induced lung injury in mice by altering inflammation, oxidative stress and fibrosis. **International Immunopharmacology**, v. 46, p. 16-22, 2017.
- SILVA, A.P.S.C.; MAIA, L.T.S; SOUZA, W.V. Síndrome Respiratória Aguda Grave em Pernambuco: comparativo dos padrões antes e durante a pandemia de COVID-19. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 25, p. 4141-4150, 2020.
- SILVA, I. F. *et al.* Toxicological effects of hydroxychloroquine sulfate and chloroquine diphosphate substances on the early-life stages of fish in the COVID-19 pandemic context. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 58, n. 10, p. 825-830, 2023.
- SINGH, T. U. *et al.* Drug repurposing approach to fight COVID-19. **Pharmacological Reports**, v. 72, p. 1479-1508, 2020.
- STANTON, R.C. Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival. **IUBMB Life**, v. 64, n. 5, p. 362-369, 2012.
- WOLF, J. C. *et al.* Nonlesions, misdiagnoses, missed diagnoses, and other interpretive challenges in fish histopathology studies: a guide for investigators, authors, reviewers, and readers. **Toxicologic Pathology**, v. 43, n. 3, p. 297-325, 2015.

Capítulo 1. Cloroquina e Hidroxicloroquina no ambiente e organismos aquáticos



Chloroquine and hydroxychloroquine in the environment and aquatic organisms: a review

ARTICLES [doi:10.4136/ambi-agua.2880](https://doi.org/10.4136/ambi-agua.2880)

Received: 10 Aug. 2022; Accepted: 20 Dec. 2022

Marina Tauche Ferreira^{1,2*} ; Cleoni dos Santos Carvalho^{1,2} 

¹Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental. Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), *Campus* Sorocaba, Rodovia João Leme dos Santos, Km 110, SP-264, CEP: 18052-780, Sorocaba, SP, Brazil. E-mail: san-cleo@ufscar.br

²Laboratório de Bioquímica e Microbiologia. Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), *Campus* Sorocaba, Rodovia João Leme dos Santos, Km 110, SP-264, CEP: 18052-780, Sorocaba, SP, Brazil.

*Corresponding author. E-mail: marina.tauche@estudante.ufscar.br

ABSTRACT

Chloroquine and hydroxychloroquine are aminoquinolines used in the treatment of endemic diseases in Latin America such as malaria and non-endemic with wide prevalence such as rheumatoid arthritis and lupus erythematosus. Described as persistent, bioaccumulative, and dangerous for aquatic biota, chloroquine and hydroxychloroquine are considered emerging pollutants intensified by the COVID-19 pandemic, occurring in low concentrations that are not totally removed in wastewater treatment plants and are not covered by legislation. This article presents a theoretical approach based on literature review following a semi-systematic methodology covering detection strategies of the chloroquine and hydroxychloroquine drugs in effluent and receiving water bodies; estimates of environmental concentrations during the pandemic; methods that use degradation and removal of compounds from water; and toxic effects on aquatic biota. Concentrations previously detected and estimated in the aquatic environment can lead to significant changes in animal physiology analyzed from biomarker changes, behavior and mortality in studies with native and non-native species. Studies are necessary to reproduce and understand possible environmental scenarios adopting the indiscriminate use of drugs to serve as standards for environmentally safe concentrations when there is no specific legislation.

Keywords: COVID-19, emerging pollutants, toxicity.

Cloroquina e Hidroxicloroquina no ambiente e organismos aquáticos: uma revisão

RESUMO

A Cloroquina e a Hidroxicloroquina são aminoquinolinas utilizadas no tratamento de doenças endêmicas da América Latina como a malária e não endêmicas com ampla prevalência como a artrite reumatoide e o lúpus eritematoso. Descritas como persistentes, bioacumulativas e perigosas para a biota aquática são consideradas poluentes emergentes intensificados pela pandemia de COVID-19, ocorrendo em baixas concentrações que não são totalmente removidas em estações de tratamento de efluentes e não são contempladas pela legislação. Este artigo tem como objetivo apresentar uma abordagem teórica baseada em revisão de literatura semi-sistemática abrangendo estratégias de detecção dos fármacos Cloroquina e Hidroxicloroquina em efluentes e corpos d'água receptores; estimativas de concentrações ambientais durante a pandemia; métodos que utilizam a degradação e remoção dos compostos na água; e os efeitos tóxicos sobre a biota aquática. Concentrações previamente detectadas e estimadas para o ambiente aquático podem levar a alterações significativas na fisiologia animal, analisadas a partir de alterações de biomarcadores, comportamento e mortalidade em estudos com espécies nativas e não nativas. Se faz necessário pesquisas que busquem reproduzir e compreender possíveis cenários ambientais com o uso indiscriminado dos medicamentos para servir como padrões de concentrações ambientalmente seguras na ausência de uma legislação específica.

Palavras-chave: COVID-19, poluentes emergentes, toxicidade.

1. INTRODUCTION

Chloroquine (CQ) belongs to the quinoline group, known for its bactericidal, antiseptic, and antipyretic actions (Ramesh *et al.*, 2018). The drug has been used to treat malaria endemic in eighteen countries in Latin America and the Caribbean and has seen an increase in estimated case incidence since 2015, where Brazil represents 20% of cases (WHO, 2020). Chloroquine has also been used for rheumatoid arthritis and lupus erythematosus (Rainsford *et al.*, 2015), non-endemic diseases that have also registered an increase in this region (Hernández-Negrín and Padilla-Cueto, 2020; Papadimitropoulos *et al.*, 2022). In recent decades its action has been explored as a broad-spectrum antiviral agent in inhibiting the replication of other respiratory viruses, such as influenza A/H5N1, SARS-CoV, and human coronavirus 229E (Savarino *et al.*, 2003; Vincent *et al.*, 2005; Kono *et al.*, 2008; Murray *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2013).

A derivative of chloroquine, hydroxychloroquine (HCQ), with similar action, was first synthesized in 1946 when a hydroxyl group was introduced to reduce toxicity to organisms (McChesney, 1983). However, at high concentrations or prolonged use, both can cause acute intoxication and death (Weniger, 1979; Wichmann *et al.*, 2007). This is due to the fact that both are water soluble and have good oral bioavailability, reaching high plasma levels in patients, which, added to the extremely long elimination half-life (weeks to months) and large volumes of distribution, indicates significant partitioning into tissues and organs (Davis *et al.*, 2020; Drugbank, 2022a; 2022b).

At the beginning of the COVID-19 pandemic, published in vitro studies demonstrated the effectiveness of chloroquine (Wang *et al.*, 2020) and hydroxychloroquine (Liu *et al.*, 2020; Gautret *et al.*, 2020) as drugs to be administered to combat the SARS-CoV-2 virus. Motivated by these data, the use of these drugs increased considerably, and the drugs were adopted as a treatment protocol, becoming one of the drugs for which there was the highest sales growth rate in 2020, in contrast to the same period in 2019 (Yazdany and Kim, 2020; Malik *et al.*, 2020;

Nasir *et al.*, 2020; Agarwal *et al.*, 2021; Romano *et al.*, 2021), although its efficacy against SARs-CoV-2 and high toxicity to patients was questioned by several studies (Shukla *et al.*, 2020; Ghazy *et al.*, 2020; Jameleddine *et al.*, 2020; Sanders *et al.*, 2020; Rosenberg *et al.*, 2020; Geleris *et al.*, 2020; Luz *et al.*, 2021). Thus, places with a high incidence of COVID-19, together with a high rate of eliminating aminoquinolines in patients' excretion, incorrect disposal and low removal in Wastewater Treatment Plants (WWTPs), or even in the absence of these, resulted in residual concentrations of pharmaceuticals in water bodies, causing ecotoxicological risks (Kuroda *et al.*, 2021).

Described as persistent, bioaccumulative and dangerous to aquatic biota, this can lead to adverse effects on aquatic and human life (Bila and Dezotti, 2003; Ramesh *et al.*, 2018; Luz *et al.*, 2021; Mendonça-Gomes *et al.*, 2021; Kumari and Kumar, 2021). These drugs and their metabolites are included in emerging pollutants because they are not covered by regulations and their concentration and effects on the environment are still poorly understood due to long exposure to residual levels (Corcoll *et al.*, 2014; Daughton, 2014), as they are designed to be biologically active, even at trace levels, and may exhibit unwanted effects on target and non-target organisms (Zhou *et al.*, 2016).

In this context, Brazilian legislation is not very restrictive for effluents contaminated with drugs and their limits for disposal in water bodies, without criteria with maximum values allowed for the concentration of these pollutants in water. The potability of drinking water for human consumption, stipulated by Consolidation Ordinance No. 5, of September 28, 2017 (Brasil, 2017), does not refer to the permitted limits for the presence of pharmaceuticals in supply water. Resolution 357/2005 related to the quality of water resources, defined by the Ministry of the Environment through the National Council for the Environment (CONAMA) and in CONAMA Resolution 430/2011 (CONAMA, 2011) responsible for establishing conditions and standards for the release of effluents for organic substances and inorganic substances, also do not address threshold standards for these pollutants.

There may be diverse consequences of this type of pollution on aquatic organisms ranging from small biochemical changes, damage at the cellular level, or even death, according to the mechanism of action and severity of the toxicological effect (Bernet *et al.*, 1999; Ramesh *et al.*, 2018; Mendonça-Gomes *et al.*, 2021). Indirectly, it can also increase the susceptibility of organisms to pathogens, promote the prevalence of diseases in the aquatic ecosystem and cause changes at the population level (Ellis *et al.*, 2011; Silvestre, 2020; Ali *et al.*, 2021).

Thus, considering that the presence and increase of chloroquine and hydroxychloroquine in aquatic environment can affect these animals' health, this article presents a theoretical approach based on a literature review discussing detection and removal strategies, estimates of Predicted Environmental Concentrations (PECs) and the ecotoxicological effects for aquatic biota attributed to drugs.

2. MATERIALS AND METHODS

A literature review was conducted following a semi-systematic methodology, where the search strategy may or may not be systematic, with qualitative analysis and evaluation, contributing to the state-of-the-art knowledge and related subjects in the literature (Snyder, 2019). The review process was carried out using the Web of Science[®] (www.webofknowledge.com) and Scopus[®] (<https://www-scopus.ez31.periodicos.capes.gov.br/>) databases. While for extracting the pharmacokinetic and physicochemical values of the drugs, the PUBCHEM[®] and DRUGBANK[®] databases were used (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>; <https://www.drugbank.ca/>). Our investigation included a combination of the following terms: "chloroquine" or "hydroxychloroquine" and "water", "sewage", "determination", "toxicology" "COVID-19". Eligibility criteria were applied to each publication, which consisted of the scope and availability of data without any date.

Then, studies were selected and grouped into key themes, as follows: (a) water contamination by aminoquinolines (detection and environmental concentrations); (b) estimates of predicted environmental concentrations during the pandemic; (c) removal methods and (d) ecotoxicity to aquatic organisms.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Contamination of water by aminoquinolines and detection

Aminoquinolines and their metabolites can reach surface water bodies through different sources, such as inadequate disposal, effluents from hospitals and pharmaceutical industries, and mainly through human excretion (Araújo *et al.*, 2021). Having a high oral dose absorption, these drugs are metabolized by Cytochrome P450 and eliminated in patients' feces and urine corresponding to 50% of the ingested dose in the original form or metabolites such as desethyl chloroquine (chloroquine N-dealkylated by CYP2C8 and CYP3A4) or desethyl hydroxychloroquine (hydroxychloroquine N-dealkylated by CYP3A4), and can be detected in biological fluids months after a single dose (Ducharme and Farinotti, 1996; DRUGBANK, 2022a; 2022b).

Depending on the hydrology of the system and the physicochemical characteristics of the drugs, their residues can accumulate in sediments, infiltrate into groundwater, or become persistent available in the surface water of lakes, rivers and reservoirs, used as drinking water and for agricultural irrigation (Quadra *et al.*, 2017). The aquatic bioavailability of these compounds can be explained by the molecular size, water solubility, n-octanol-water partition coefficient (K_{ow}) which favors passage of drugs through membranes and bioaccumulation, ionization constant (pK_a) favoring absorption at alkaline pH, non-volatile under normal temperature conditions and chemically stable, although this information is poorly standardized in the literature, values such as $0.0175 \text{ mg mL}^{-1}$ to 100 mg mL^{-1} are cited for solubility of chloroquine compounds and $0.0261 \text{ mg mL}^{-1}$ to 100 mg mL^{-1} for hydroxychloroquine compounds (Table 1).

Its environmental detection can be a problem due to low concentrations identifying it as non-existent when methods are not refined to identify them. Among the detection and quantitative determinations, methods for drugs and their metabolites are liquid chromatography, capillary electrophoresis, electroanalytical, spectrophotometric, and ELISA-based methods (Saka, 2020).

Chromatography was the method most used by the articles in the detection of CQ and HCQ due to the lower detection limit contemplating environmental concentrations in the range of ng L^{-1} to $\mu\text{g L}^{-1}$ levels (Roberts and Bersuder, 2006; Tegegne *et al.*, 2021). The High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Ultra High-Performance Liquid Chromatography (UPLC) techniques can be mentioned with the selection of detectors such as Ultraviolet, Fluorescence, Diode-Array and Mass Spectrometry which, when integrated, presented a high degree of sensitivity, selectivity and specificity for the compounds. In the papers, these methods were used primarily for the diagnosis of drugs in biological fluids (e.g., blood, plasma, and urine) (Tett *et al.*, 1985; Sanghi *et al.*, 1990; Chaulet *et al.*, 1994; Walker and Ademowo, 1996; Füzéry *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2012; Harahap *et al.*, 2021), biomarkers (Ducharme and Farinotti, 1997), pharmaceutical samples (Dongre *et al.*, 2009) and in water (Roberts and Bersuder, 2006; Olaitan *et al.*, 2014; Nason *et al.*, 2021).

The capillary electrophoresis method was more used for quantification (ng mL^{-1}) in biological fluids (Müller and Blaschke, 2000; Oliveira and Bonato, 2007) while spectrophotometric methods were more used for pharmaceutical samples ($\mu\text{g mL}^{-1}$) (Reddy *et al.*, 2004; Nelson *et al.*, 2010). The Elisa method has been considered both for the determination

and quantification (ng mL^{-1}) of drugs in biological systems (using antibodies) and also in pharmaceutical formulations (Khalil, *et al.*, 2011; Shenton *et al.*, 1988). These methods were more limited for drug molecule analysis and their metabolites in water.

Electrochemical methods are another promising alternative because they are modern, low cost, accurate, selective, fast and have a wide range of linear concentration (μM and nM) (Saka, 2020). Cork-graphite sensors (Araújo *et al.*, 2021; 2022) for hydroxychloroquine and glassy carbon modified with graphene oxide (Srivastava *et al.*, 2019), carbon pulp modified with nanowire $\text{Cu}(\text{OH})_2$ (Mashhadizadeh *et al.*, 2009) for chloroquine were some examples applied in the voltammetry technique, which refers to the examination of the density potential curves of an electrochemical system, detecting concentrations of standard aqueous solutions of CQ and HCQ, which can be tools for monitoring of drug in effluents with higher concentration.

Table 1. Chemical formulas and predicted properties of compounds and their major metabolites.

Compounds and metabolites	Molecular Formula	Molecular Weight (g mol ⁻¹)	pKa	Kow	Solubility (mg mL ⁻¹)	Reference
Chloroquine	C ₁₈ H ₂₆ ClN ₃	319.9	10.1	4.6	0.0175	DRUGBANK (2022a)
Chloroquine phosphate	C ₁₈ H ₃₂ ClN ₃ O ₈ P ₂	515.9	10.3	3.9	0.0175 100	DRUGBANK (2022c); British Pharmacopoeia (2013)
Desethyl chloroquine	C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃	291.82	-	3.8	-	PUBCHEM (2022c)
Hydroxychloroquine	C ₁₈ H ₂₆ ClN ₃ O	335.9	9.6	3.6	0.0261	DRUGBANK (2022b);
Hydroxychloroquine sulfate	C ₁₈ H ₂₈ ClN ₃ O ₅ S	434.0	9.7	2.8	0.0261 100	DRUGBANK (2022d); British Pharmacopoeia, (2013)
Desethyl hydroxychloroquine	C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O	307.82	-	2.7	-	PUBCHEM (2022d)

3.2. Concentrations in the aquatic environment

Published studies on the concentrations of chloroquine and hydroxychloroquine in the environment are extremely limited but reveal the presence of aminoquinolines in surface and wastewater, having increased in recent years and especially during the pandemic. Chen *et al.* (2013) detected, through high performance liquid chromatography/mass spectrometry, the compounds in surface sediments near rivers in southeastern China. Although this study did not confirm the structural identities, each was reported in the sediments of at least one of the analyzed rivers at levels sufficient to provide signal-to-noise relationships.

Olaitan *et al.* (2014) detected residual concentrations of chloroquine in Nigeria through high performance liquid chromatography, which was 5.014 µg L⁻¹ in groundwater and 0.11 µg L⁻¹ in surface water. Also in Nigeria, studies were carried out by Hu *et al.* (2021) with data collected in 2017, chloroquine appeared among the pharmaceutical compounds identified with the highest relative abundance (1×10⁵) in effluents, surface waters, wastewater and in tap water identified through high-resolution mass spectrometry. This may be related to being one of the countries with the highest incidence of malaria (WHO, 2020) and suggests that this compound was mainly from inefficient treatment processes in Wastewater Treatment Plants (WWTP).

Nason *et al.* (2021) monitored during the first wave of COVID, through liquid chromatography - high resolution mass spectrometry, elevated concentrations of hydroxychloroquine close to 50 µg L⁻¹ in the primary sludge of a WWTP in the third week after implementing the United States Emergency Use Authorization, demonstrating its intense occurrence during the pandemic. That could be explained by 483,425 excess fills of hydroxychloroquine/chloroquine during the ten-week period in 2020 compared with 2019 (+848.4% increase) (Vaduganathan *et al.*, 2020).

In Europe, studies have reported a notable increase in hydroxychloroquine consumption in Athens, Greece, from 12 g day^{-1} to 57 g day^{-1} according to data published in the first months of the pandemic revealed by wastewater-based epidemiology (Galani *et al.*, 2021). In the same way, the region of Lombardy, Italy, reached levels of up to $1.7 \mu\text{g L}^{-1}$ (Cappelli *et al.*, 2022) while in Vit3ria-Gasteiz, Spain, reached $0.071 \mu\text{g L}^{-1}$ in wastewater (Domingo-Echaburu *et al.*, 2022).

These data demonstrate that some regions where the use of aminoquinolines was not frequent before the pandemic as an anti-inflammatory or antimalarial, had a rapid and significant growth during 2020, which given their chemical characteristics may be concentrated in water bodies. Similar to Nigeria, the chronic concentration of aminoquinolines in Brazilian waters may have increased dramatically during the pandemic since sales of hydroxychloroquine grew by 113%, from 963,000 in 2019 to 2 million units in 2020, according to the Federal Pharmacy Council (CFF, 2001) (Ruiz *et al.*, 2021), but no data were found to compare the concentration in water before and during the pandemic. In this context, the estimates of predicted environmental concentrations (PECs) come as a practical approach to estimate the level of drug concentration in an aquatic environment (Franquet-Griell *et al.*, 2015; Kumari and Kumar, 2021) when data on concentrations detected in water are unfeasible.

3.3. Estimates of Predicted Environmental Concentrations (PECs)

The aminoquinolines have a long half-life, the environmental emission is spread over several days, and, consequently, the PEC calculation depends on the use regime (dose, interval and duration of treatment) and removal rate in the wastewater treatment units to obtain a predicted concentration in the receiving water body (Tarazona *et al.*, 2021).

Thus, estimates of PECs during the pandemic were revised (Table 2) for the worst realistic scenario with the whole population of a metropolitan area of Spain, assuming that 25% of the excreted drug was retained in the WWTP (Tarazona *et al.*, 2021). There was an estimate assuming 100% of the population treated and considering an effective drug removal rate in the WWTP of 63% (Kuroda *et al.*, 2021). There was also an estimate with the elderly population (over 65 years old) in the United States affected by COVID-19, considering the removal rate at the WWTP as a standard value of 50% due to lack of data in the literature (Kumari and Kumar, 2021).

Table 2. Predicted Environmental Concentrations (PECs) during the COVID-19 pandemic in wastewater and environmental waters.

Drug	PEC Raw Wastewater (mg L^{-1})	PEC Secondary Effluent (mg L^{-1})	PEC Surface water (mg L^{-1})	Reference
Chloroquine	1.20	$\frac{0.6}{4}$	0.06	Tarazona <i>et al.</i> (2021)
	857×10^{-6}	32×10^{-6}	3.2×10^{-5}	Kuroda <i>et al.</i> (2021)
	-	-	3.78×10^{-6}	Kumari and Kumar(2021)
Hydroxychloroquine	1.50	$\frac{1.1}{2}$	0.12	Tarazona <i>et al.</i> (2021)
	833×10^{-6}	783×10^{-6}	78.3×10^{-5}	Kuroda <i>et al.</i> (2021)

Even though the consumption level of hydroxychloroquine observed in surface water by

Nason *et al.* (2021), Galani *et al.* (2021) Cappelli *et al.* (2022) and Domingo-Echaburu *et al.* (2022) was increased during 2020, it remained lower than the PECS in raw wastewater. However, it is not yet known whether these PECs concentrations can be obtained considering areas without sanitation coverage as a realistic worst-case, while the drug removal value after passing through the WWTP may vary depending on the system adopted by it.

Data from 2018 indicate that almost half of the Brazilian population does not have access to sewage collection, only 46% of collected sewage is treated (Farias *et al.*, 2020), and in many municipalities, it is common to see raw sewage discharges directly into water resources (Montagner and Jardim, 2011). Moreover, the conventional processes used in WWTPs were not designed to eliminate drug residues, which has already been corroborated by occurrence data obtained in Brazilian research (Sodré *et al.*, 2010; Reis *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2020) explained by both the higher consumption and the intense release of sewage into water bodies.

Furthermore, the metabolite desethyl chloroquine generated by the degradation of chloroquine can reach an environmental concentration of $13 \times 10^{-6} \text{ mg L}^{-1}$ (Kuroda *et al.*, 2021) and desethyl hydroxychloroquine, the main metabolite of hydroxychloroquine, does not appear in any studies. Both also do not have known aquatic toxicology, showing a gap regarding drugs.

3.4. Removal of aqueous matrices

As chloroquine and hydroxychloroquine have a very stable structure and occur at extremely low concentrations, their removal is challenging (Archer *et al.*, 2017). Thus, several promising proposals for the degradation of these drugs with concentrations similar to those in the environment were tested, mainly taking into account the pandemic. Treatment of different aqueous matrices (synthetic or real) containing CQ and HCQ has been carried out by adsorption, photolysis, photocatalysis and oxidation. Many of these studies pointed out that the molecule of drugs can be affected by pH, with the rate of degradation by the tested methodology and is directly proportional to the increase in pH.

Batch adsorption of CQ by combining babassu coconut-activated carbon and graphene oxide (GAC-GO) through the effect of ionic strength, simulating a real effluent, demonstrated that the synthesized adsorbent has potential application for the treatment of effluents (Januário *et al.*, 2022). The adsorption of HCQ on *Cystoseira barbata* activated by H_3PO_4 , the Agardh biochar derived from algae biodiesel industry residues (Gümüş and Gümüş, 2021) and by Algerian kaolin (Bendjeffal *et al.*, 2021) proved to be stable, spontaneous sources and efficient.

Oxidation of CQ has been investigated by the reaction with Fe (VI) ferrate, it has been shown to be rapidly responsive especially in the basic pH range and with increasing temperature (Dong *et al.*, 2022). Electro-Fenton oxidation from electrolyte oxidation on boron-doped diamond (BDD) anode surface (Midassi *et al.*, 2020) and photo-Fenton process on micro-sized Fe-MOF sheet (Wang *et al.*, 2022) were efficient approaches to promote the generation of hydroxyl radicals from the catalytic decomposition of H_2O_2 by $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ in solution resulting in a high efficiency of degradation and CQ removal. Electrochemical oxidation also efficiently removed HCQ from the actual river water sample using BDD electrodes in studies carried out by Araújo *et al.* (2022), and Bensalah *et al.* (2020) with the potential to be an excellent alternative method to treat effluents contaminated with HCQ and its derivatives.

A peroxymonosulfate (PMS) activation system was also demonstrated using single cobalt atoms (SA Co-NC₍₃₀₎) as high-efficiency catalysts, which can efficiently degrade chloroquine phosphate through a nonradical electron transfer pathway (Peng *et al.*, 2022). The photocatalytic activity of zinc oxide catalysts supported natural zeolite clinoptilolite, and the synthesis heterogeneous structure of beta bismuth oxide by titanium oxide for HCQ degradation also promoted the degradation of the drug (Silva *et al.*, 2021; Kargar *et al.*, 2021). The photolysis of HCQ at high pH can be increased with the presence of humic acids, nitrate and iron (III) due to the formation of hydroxyl radicals and their attack on the HCQ molecule, but in the presence of chloride, sulfate and bromide the photodegradation is inhibited (Dabić *et al.*,

2019).

Biological systems were also analyzed in degradation. Examples were the use of melanin-encapsulated *Escherichia coli* for continuous removal of the pharmaceutical model chloroquine in a membrane bioreactor-based process (Lindroos *et al.*, 2019) and microbial degradation by *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, and *Proteobacteria p*, along with functional genes related to pathways such as degradation and denitrification of phenylethylamine in salt water (Hu *et al.*, 2022).

Thus, the revised techniques promise to be more efficient to contain these micropollutants than the systems adopted by Waste Water Treatment Plants (WWTP), such as activated sludge and biological sewage purification, the most used processes in Brazil. The revised techniques are more cost-effective and promote total destruction (mineralization) or produce less toxic molecules, unlike methods such as activated carbon and ozonation (Margot *et al.*, 2013; Lindroos *et al.*, 2019).

3.5. Chloroquine ecotoxicity in aquatic organisms

Thus, the aquatic ecotoxicological information available to date on chloroquine is limited to a few studies on acute oral toxicity in fish, cladocerans, plants, algae and bacteria, and sublethal effects on fish and mussels (Zurita *et al.*, 2005; Moore *et al.*, 2007; Rendal *et al.*, 2011; Ramesh *et al.*, 2018; Davis *et al.*, 2020). While for hydroxychloroquine there are reports of ecotoxicological effects on nematodes, fish, and amphibians (Table 3). Chloroquine and hydroxychloroquine are persistent at maintaining their active properties until the desired effects are achieved (Mezzelani *et al.*, 2016). Thus, they can assume high concentrations in organs such as kidneys and liver, as well as having an impact on neurological symptoms (PIM, 1994; PUBCHEM, 2022b) as demonstrated by biomarker changes.

The bioassay review using biomarkers demonstrated how these can be considered early warning signs in the field of environmental risk assessment revealing the health status of an organism, population and ecosystem (Gavrilescu, 2015). This can help to reproduce and understand possible environmental scenarios related to the indiscriminate use of drugs in 2020. A reflection of that was the concentration observed in surface water by Nason *et al.* (2021), Cappelli *et al.* (2022) and Domingo-Echaburu *et al.* (2022), which promotes changes in biomarkers of oxidative stress, neurotoxicity (acetylcholinesterase and neuromasts), decreased levels of total proteins and death in vertebrates (MacPhee and Ruelle, 1969; Luz *et al.*, 2021; Mendonça-Gomes *et al.*, 2021).

Considering the revised effective concentrations, the sensitivity of the test systems decreased as follows for chloroquine molluscs > plants > cladocerans > algae > fish > bacteria. This relationship was similar to other drug sensitivity tests with the highest sensitivity for freshwater arthropods and lowest sensitivity for proteobacteria (Calleja *et al.*, 1994; Lilius *et al.*, 1994). However, conflicting results on toxicity in different fish species have been published, with mortality at 0.0063 mg L⁻¹ CQ for salmon (MacPhee and Ruelle, 1969) and only behavioral changes in rainbow trout with 0.12 mg L⁻¹ CQ in 24-h (Tojo *et al.*, 1993).

When compared to hydroxychloroquine, this was more toxic to fish at the same concentration as chloroquine in the morphological modification of lateral ciliate cells (Davis *et al.*, 2020). A Brazilian study with an environmentally relevant concentration of hydroxychloroquine and, especially, when combined with azithromycin (administered together in COVID-19 treatment), demonstrating that the combination of these drug classes may also lead to a greater expression of toxicity in fish and amphibians (Mendonça-Gomes *et al.*, 2021; Luz *et al.*, 2021). Studies with native species, such as the *Physalaemus cuvieri* (Brazil) is an example emphasize the importance of knowing the sensitivity of species with wide occurrence in the national territory and that may have suffered from the still unknown environmental exposures of the drugs that was used indiscriminately during the pandemic.

Table 3. Chloroquine and hydroxychloroquine concentrations in studies that had significant marker changes compared to drug-free controls.

Drug	Organism	Duration	Concentration	Toxic effect	Reference
Chloroquine	<i>Chlorella vulgaris</i>	48-h	27 mg L ⁻¹	Growth inhibition	Zurita <i>et al.</i> (2005)
	<i>Cyprinus carpio</i>	96-h	31.32 mg mL ⁻¹	Increased alanine and aspartate aminotransferase; decreased lactate dehydrogenase; histopathological changes; death	Ramesh <i>et al.</i> (2018)
	<i>Danio rerio</i>	24-h	31.9 mg L ⁻¹	Cell loss lateral line ciliates	Davis <i>et al.</i> (2020)
	<i>Daphnia. magna</i>	48-h	4 - 30 mg L ⁻¹ (pH 7 - 9)	Immobilization	Rendal <i>et al.</i> (2011)
	<i>Daphnia. magna</i>	48-h	9 mg L ⁻¹	Immobilization	Zurita <i>et al.</i> (2005)
	<i>Mytilus edulis</i>	120-h	2 mg L ⁻¹	Decreased lysosomal function	Moore <i>et al.</i> (2007)
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	24-h	0.12 mg L ⁻¹	Behavioral changes	Tojo <i>et al.</i> (1993)
	<i>Oncorhynchus kzsutch</i>	24-h	0.0063 mg L ⁻¹	Loss of balance and death	MacPhee and Ruelle (1969)
	<i>Poeciliopsis lucida</i>	48-h	43 mg L ⁻¹	Decreased lysosomal function	Zurita <i>et al.</i> (2005)
	<i>Salix viminalis</i>	67-h	3 - 34 mg L ⁻¹ (pH 6 - 9)	Transpiration inhibition	Rendal <i>et al.</i> (2011)
	<i>Vibrio fischeri</i>	48-h	126 mg L ⁻¹	Luminescence inhibition	Zurita <i>et al.</i> (2005)
Hydroxychloroquine	<i>Danio rerio</i>	72-h	0.0125 mg L ⁻¹	Decreased levels of total proteins and neuromasts of the head; oxidative stress; increased acetylcholinesterase (AChE)	Mendonça-Gomes <i>et al.</i> (2021)
	<i>Danio rerio</i>	24-h	35.5 mg L ⁻¹	Cell loss lateral line ciliates	Davis <i>et al.</i> (2020)
	Marine nematodes		3.162 mg L ⁻¹	Decline in the diversity of abundance and richness of sensitive species and favoring of tolerant species	Ali <i>et al.</i> (2021)
	<i>Physalaemus cuvieri</i>	72-h	0.0125 mg L ⁻¹	Oxidative stress; decreased acetylcholinesterase (AChE)	Luz <i>et al.</i> (2021)

Another important factor that increases the toxicity of chloroquine highlighted in the studies by Rendal *et al.* (2011) is the influence of pH in alkaline medium (pH 9) compared to acidic (pH 6) or neutral (pH 7) medium. Due to the pKa (10), pH can have a great influence on the absorption and expression of its toxicity in alkaline aquatic environments, which must be between 6.5 to 8.5 (USEPA, 1996), or 6 to 9 in Brazil, to protect aquatic life (CONAMA, 2005). According to Esteves (2011), the pH in Brazilian rivers is quite wide, tending to be slightly alkaline due to the presence of carbonates and bicarbonates, representing an environmental risk by the toxicity of chloroquine.

Sublethal effects were demonstrated after thirty-five days of exposure with changes in aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and lactate dehydrogenase enzymes that are usually present in the heart, liver, kidney, aminoquinoline accumulation sites (Ramesh *et al.*, 2018) in which there are effective markers to analyze chemical toxicity for their rapid response and for being involved in the metabolism of proteins and carbohydrates, in addition to serving as stress indicators (Abhijith *et al.*, 2016; Gora *et al.*, 2018). In the study by Ramesh *et al.* (2018), the increase in changes in gill, liver and kidney tissue of carp by chloroquine was correlated over time. The reduction in lysosomal function was also a biomarker responsive to acute exposure at higher concentrations and, mainly, to chronic exposure, directly affecting the health of the organism due to the characteristic lysosomotropic agent of chloroquine (Meshnick, 1990).

The most responsive biomarkers in acute exposure were changes in acetylcholinesterase (AChE) activity in the mediation of the neurotransmitter acetylcholine and the reduction in fish head neuromasts, impacting the neurotoxic effect together with other metabolic dysfunctions such as the reduction of total protein levels and oxidative stress after three days of exposure to hydroxychloroquine at concentrations from 0.0125 mg L⁻¹ (Mendonça-Gomes *et al.*, 2021). Other metabolic dysfunctions were reduced total protein levels and oxidative stress seen in hydrogen peroxide (H₂O₂) production, reactive oxygen species (ROS), nitrite (NO₂-), thiobarbituric acid reactive substances (TBARs), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). Thus, hepatic Cytochrome P450 activity (CYP450), responsible for the biotransformation of aminoquinolines, is a crucial marker of susceptibility to be evaluated as it determines the abilities of antioxidants for the detoxification of organisms (Burkina *et al.*, 2015; Mendonça-Gomes *et al.*, 2021) and should be tested after exposure of the animals over time to understand under which conditions it becomes unresponsive, leaving the organisms susceptible to diseases.

Concerning the environmental assessment for water pollution monitoring, the Predicted No-Effect Concentration (PNEC) is estimated using the limit concentration in surface waters in which adverse health effects are not expected over time divided by a factor of assessment for intraspecific or interspecific extrapolation (Schwab *et al.*, 2005). For chloroquine, studies show that even at low residual concentrations it can result in toxic effects on biota health. Tarazona *et al.* (2021) estimated a PNEC value of 0.12 mg L⁻¹ for aquatic organisms, considering data from the taxonomic groups of algae, cladocerans, mussels and fish, while Kuroda *et al.* (2021) estimated an even lower value of 3.7×10⁻⁴ mg L⁻¹. For hydroxychloroquine, the concentration was estimated to 7×10⁻⁵ mg L⁻¹ from 8.5 ×10⁻² mg L⁻¹ (Cappelli *et al.*, 2022; Domingo-Echaburu *et al.*, 2022). This difference in the assessments can be explained by the variation in the input parameters used in the PNECs for risk estimates; however, they do not change the ecotoxicological risks (Kumari and Kumar, 2021).

Although there is no specific study on the xenobiotic incorporated in the trophic chain, it is interesting to note that the repercussion of toxicity extends from primary producers, consumers, and decomposers, affecting the entire aquatic ecosystem and eventually the animals that feed on it. Fish and other seafood sources can be easily contaminated by aminoquinolines due to their bioaccumulative potential, as can be seen by Ali *et al.* (2021) for the nematode

community, which may be a route to human exposure to residues, concomitant with the consumption of contaminated water (Kumari and Kumar, 2021). Other concern is water stress caused by aminoquinoline residues present in untreated wastewater or without adequate treatment to remove the drugs, which are commonly used by developing countries in irrigation for crop cultivation (Yasmeen *et al.*, 2014), despite being a practice that poses risks to health and the environment, as seen for *Vigna Radiata*, which can lead to the production of oxidative factors, impacting productivity (Al-Mentafji, 2021).

It is also highlighted that pharmaceutical pollution in water during the pandemic can generate resistance to a number of diseases (Horn *et al.*, 2020). In the case of chloroquine, some strains of *Plasmodium*, the etiological agent of malaria, already show chloroquine resistance in the treatment of the disease in which the drug has a proven therapeutic potential (Benelli and Mehlhorn, 2016) and its availability in water can further aggravate this situation. It also presents toxicity to predators of its *Anopheles stephensi* vector, in the aquatic phase of its life cycle, disfavoring biological control (Murugan *et al.*, 2016).

Considering that aquatic organisms are often exposed to contaminants in their natural environment, this can lead to changes in their physiology and homeostasis by a complex set of adaptive responses that involve biochemical, metabolic and tissue changes. The main scientific or technological contributions that can be made in question are the possibility of knowing better the response of these organisms by interacting with the emerging contaminant with a bioaccumulative tendency in the aquatic environment, aiming to establish proposals for conservation and animal protection considering safe levels regarding contamination environment and aquatic biota preservation, mainly in South America where its use has been increasing in recent years.

3.6. Perspectives

There are still gaps to be understood regarding acute ecotoxicity with lethal (LC_{50}) and effective (EC_{50}) concentrations for different taxa and species and, regarding sublethal ecotoxicity, pathological changes that can be visualized through biomarkers. The desethyl chloroquine and desethylhydroxychloroquine metabolites, together with the chloroquine diphosphate and hydroxychloroquine sulfate (best selling formulation) with a molar mass higher than original compounds, have little or unexplored ecotoxicity. It is often unclear in the article which formulation of chloroquine the authors used so that they do not yet support discussions comparing chloroquine compounds, although phosphate salt is categorized as more toxic due to the phosphoric acid groups in its molecule (PUBCHEM, 2022a). In addition, morphological and behavioral changes of the animals can also be observed during the experiment as they can be one of the first signs of change that can be identified in an environment, which demonstrated a pathological condition in the individuals (OECD, 2019; Ramesh *et al.*, 2018; Tojo, 1993).

The results can be extrapolated to the environment as vertebrates used in toxicological tests, such as some fish species already standardized for these studies, can have up to 70% homology with the human genome and including genes associated with human diseases (Howe *et al.*, 2013). Therefore, it is essential to understand how the characteristics, including morphology, physiology, behavior and life habits of an organism, mediate susceptibility to wide-ranging environmental change.

Despite limited data on toxicity to aquatic wildlife, Zurita *et al.* (2005) were able to classify chloroquine as “R52/53 Harmful to aquatic organisms and may cause long-term adverse effects in the aquatic environment”. Thus, chloroquine currently belongs to the hazardous substances database (N° 3029), as it has toxicity to human and animal health proven in studies (PUBCHEM, 2022b). As alternatives, it is important for the use of effluent treatment technologies that are economical and with less risk of generating long-term

repercussions (Pacheco *et al.*, 2021), such models should receive more attention and planning for implementation considering the urgency of mitigating pharmaceutical residues in water, especially in epidemiological scenarios and without effluent treatment.

4. CONCLUSION

Chloroquine and hydroxychloroquine may be available in water bodies to aquatic biota and their concentration may have increased during the pandemic period due to extensive use and low removal in WWTPs. Once the aquatic biota is available, even at low residual concentrations, it can reach non-target organisms, generating an ecotoxicological risk that can have toxic effects such as morphological, physiological, behavioral and population changes leading to the death of individuals. Factors such as the more alkaline pH of the rivers and the association with other drugs such as indiscriminate use of azithromycin were attributed to the greater expression of drug toxicity.

More studies are needed to detect drugs and metabolites in water and refine quantification on an environmental scale, as well as to investigate biota hazards based on environmentally relevant concentrations, taking into account locations without access to wastewater treatment as worst-case scenarios. Ecotoxicity tests with native species and with high sensitivity to the pollutant can help to understand and extrapolate the toxic effects to the local aquatic ecosystem. Long-term toxicity effects, exploring effect biomarkers, exposure and susceptibility, morphological and behavioral changes, including drug derivatives, will provide important data for the discussion and these are the proposals raised by this study.

Thus, it is urgent to adopt efficient methods to contain pharmaceutical micropollutants in wastewater and surface water, as these will not only be available to aquatic biota, but to the human population, which may cause public health problems that are still uncertain.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 88887.659078/2021-00. Postgraduate Program in Biotechnology and Environmental Monitoring, Federal University of São Carlos, UFSCar.

6. REFERENCES

- ABHIJITH, B. D.; RAMESH, M.; POOPAL, R. K. Responses of metabolic and antioxidant enzymatic activities in gill, liver and plasma of *Catla catla* during methyl parathion exposure. **The Journal of Basic and Applied Zoology**, v. 77, p. 31-40, 2016. doi.org/10.1016/j.jobaz.2015.11.002
- AGARWAL, M.; RANJAN, P.; MITTAL, A.; BAITHA, U. Use of hydroxychloroquine for pre-exposure prophylaxis in COVID 19: debate and suggested future course. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 19, n. 4, p. 413-417, 2021. doi.org/10.1080/14787210.2021.1828062
- AL-MENTAFJI, H. N. H. Effect of Chloroquine on antioxidant enzymes and oxidative system on (*Vigna radiata*) plant tissues exposed to water stress. **Journal of Physics: Conference Series**, p. 022030, 2021. doi.org/10.1088/1742-6596/1879/2/022030.
- ALI, M. B.; HEDFI, A.; ALMALKI, M.; KARACHLE, P. K.; BOUFAMA, F. Toxicity of hydroxychloroquine, a potential treatment for COVID-19, on free-living marine nematodes. **Marine Pollution Bulletin**, v. 167, p. 112361, 2021. doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112361
- ARAÚJO, D. M.; PAIVA, S. D. S. M.; HENRIQUE, J. M. M.; MARTÍNEZ-HUITLE, C. A.; SANTOS, E. V. Green composite sensor for monitoring hydroxychloroquine in different water matrices. **Materials**, v. 14, n. 17, p. 4990, 2021.

- doi.org/10.3390/ma14174990
- ARAÚJO, D.M.; SANTOS, E. V.; MARTÍNEZ-HUITLE, C. A.; BATTISTI, A. Achieving Electrochemical-Sustainable-Based Solutions for Monitoring and Treating Hydroxychloroquine in Real Water Matrix. **Applied Sciences**, v. 12, n. 2, p. 699, 2022. doi.org/10.3390/app12020699
- ARCHER, E.; PETRIE, B.; KASPRZYK-HORDERN, B.; WOLFAARDT, G. M. The fate of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs), endocrine disrupting contaminants (EDCs), metabolites and illicit drugs in WWTW and environmental waters. **Chemosphere**, v. 174, p. 437-446, 2017. doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.101
- BENDJEFFAL, H.; ZIATI, M.; ALOUI, A.; MAMINE, H.; METIDJI, T.; DJEBLI, A.; BOUHEDJA, Y. Adsorption and removal of hydroxychloroquine from aqueous media using Algerian kaolin: full factorial optimisation, kinetic, thermodynamic, and equilibrium studies. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, p. 1-22, 2021. doi.org/10.1080/03067319.2021.1887162
- BENELLI, G.; MEHLHORN, H. Declining malaria, rising of dengue and Zika virus: insights for mosquito vector control. **Parasitology Research**, v. 115, n. 5, p. 1747-1754, 2016. doi.org/10.1007/s00436-016-4971-z
- BENSALAH, N.; MIDASSI, S.; AHMAD, M. I.; BEDOUI, A. Degradation of hydroxychloroquine by electrochemical advanced oxidation processes. **Chemical Engineering Journal**, v. 402, p. 126279, 2020. doi.org/10.1016/j.cej.2020.126279
- BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, v. 22, n. 1, p. 25-34, 1999. doi.org/10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x
- BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 523-530, 2003. doi.org/10.1590/S0100-40422003000400015
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 05, de 28 de setembro de 2017. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial[da] União**: seção 1, Brasília, DF, n. 190, supl. p. 516-531, 03 de out. de 2017.
- BURKINA, V.; ZLABEK, V.; ZAMARATSKAIA, G. Effects of pharmaceuticals present in aquatic environments on Phase I metabolism in fish. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 40, n. 2, p. 430-444, 2015. doi.org/10.1016/j.etap.2015.07.016
- CALLEJA, M. C.; PERSOONE, G.; GELADI, P. Comparative acute toxicity of the first 50 multicentre evaluation of *in vitro* cytotoxicity chemicals to aquatic invertebrates. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 26, n. 1, p. 69-78, 1994. doi.org/10.1007/BF00212796
- CAPPELLI, F.; LONGONI, O.; RIGATO, J.; RUSCONI, M.; SALA, A.; FOCHI, I. *et al.* Suspect screening of wastewaters to trace anti-COVID-19 drugs: Potential adverse effects on aquatic environment. **Science of The Total Environment**, v. 824, p. 153756, 2022. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153756
- CHAULET, J. F.; GRELAUD, G.; BELLEMIN-MAGNINOT, P.; MOUNIER, C.; BRAZIER, J. L. Simultaneous determination of chloroquine, proguanil and their metabolites in human biological fluids by high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 12, n. 1, p. 111-117, 1994. doi.org/10.1016/0731-7085(94)80018-9
- CHEN, Y. S.; YU, S.; HONG, Y. W.; LIN, Q. Y.; LI, H. B. Pharmaceutical residues in tidal surface sediments of three rivers in southeastern China at detectable and measurable levels. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 12, p. 8391-8403, 2013. doi.org/10.1007/s11356-013-1871-y

- CONSELHO FEDERAL DE FARMÁCIA. **A busca de fórmulas milagrosas contra a Covid-19 continua impulsionando vendas de medicamentos.** Brasília: Conselho Federal de Farmácia, 2001.
- CONAMA (Brasil). Resolução nº 357 de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] União:** seção 1, Brasília, DF, n. 053, p. 58-63, 18 mar. 2005.
- CONAMA (Brasil). Resolução nº 430 de 13 de maio 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. **Diário Oficial [da] União:** seção 1, Brasília, DF, n. 92, p. 89, 16 maio 2011.
- CORCOLL, N.; ACUÑA, V.; BARCELÓ, D.; CASELLAS, M.; GUASCH, H.; HUERTA, B. *et al.* Pollution-induced community tolerance to non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in fluvial biofilm communities affected by WWTP effluents. **Chemosphere**, v. 112, p. 185-193, 2014. doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.03.128
- DABIĆ, D; BABIĆ, S.; ŠKORIĆ, I. The role of photodegradation in the environmental fate of hydroxychloroquine. **Chemosphere**, v. 230, p. 268-277, 2019. doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.032
- DAUGHTON, C. G. The Matthew Effect and widely prescribed pharmaceuticals lacking environmental monitoring: Case study of an exposure-assessment vulnerability. **Science of the Total Environment**, v. 466, p. 315-325, 2014. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.06.111
- DAVIS, S. N.; WU, P.; CAMCI, E. D.; SIMON, J. A.; RUBEL, E. W.; RAIBLE, D. W. Chloroquine kills hair cells in zebrafish lateral line and murine cochlear cultures: Implications for ototoxicity. **Hearing Research**, v. 395, p. 108019, 2020. doi.org/10.1016/j.heares.2020.108019
- DOMINGO-ECHABURU, S.; IRAZOLA, M.; PRIETO, A.; ROCANO, B.; DE TORRE-QUEREJAZU, A. L.; QUINTANA, A. *et al.* Drugs used during the COVID-19 first wave in Vitoria-Gasteiz (Spain) and their presence in the environment. **Science of The Total Environment**, p. 153122, 2022. doi-org/10.1016/j.scitotenv.2022.153122
- DONG, F.; LI, J.; LIN, Q.; WANG, D.; LI, C.; SHEN, Y. *et al.* Oxidation of chloroquine drug by ferrate: Kinetics, reaction mechanism and antibacterial activity. **Chemical Engineering Journal**, v. 428, p. 131408, 2022. doi.org/10.1016/j.cej.2021.131408
- DONGRE, V. G.; GHUGARE, P. D.; KARMUSE, P.; SINGH, D.; JADHAV, A.; KUMAR, A. Identification and characterization of process related impurities in chloroquine and hydroxychloroquine by LC/IT/MS, LC/TOF/MS and NMR. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, n. 4, p. 873-879, 2009. doi.org/10.1016/j.jpba.2009.01.013
- DRUGBANK. **Chloroquine**. Available in go.drugbank.com/drugs/DB00608 2022a.
- DRUGBANK. **Hydroxychloroquine**. Available in go.drugbank.com/drugs/DB01611 2022b.
- DRUGBANK. **Chloroquine phosphate**. Available in: https://go.drugbank.com/salts/DBSALT000025 2022c.
- DRUGBANK. **Hydroxychloroquine sulfate**. Available in: https://go.drugbank.com/salts/DBSALT000096 2022d.
- DUCHARME, J.; FARINOTTI, R. Clinical pharmacokinetics and metabolism of chloroquine. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 31, n. 4, p. 257-274, 1996. doi.org/10.2165/00003088-199631040-00003
- DUCHARME, J.; FARINOTTI, R. Rapid and simple method to determine chloroquine and its desethylated metabolites in human microsomes by high-performance liquid

- chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 698, n. 1-2, p. 243-250, 1997. doi.org/10.1016/S0378-4347(97)00273-9
- ELLIS, R. P.; PARRY, H.; SPICER, J. I.; HUTCHINSON, T. H.; PIPE, R. K.; WIDDICOMBE, S. Immunological function in marine invertebrates: Responses to environmental perturbation. **Review. Fish & Shellfish Immunology**, v. 30, n. 6, p. 1209-1222, 2011. doi.org/10.1016/j.fsi.2011.03.017
- ESTEVES, F.A. **Fundamentos da limnologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Interciência, p. 790, 2011
- FARIAS, D. F.; SOUZA, T.; SOUZA, J. A. C. R.; VIEIRA, L. R.; MUNIZ, M. S.; MARTINS, R. X. *et al.* COVID-19 Therapies in Brazil: Should we be concerned with the impacts on aquatic wildlife? **Environmental toxicology and chemistry**, v. 39, n. 12, p. 2348-2350, 2020. doi.org/10.1002/etc.4888
- FRANQUET-GRIELL, H.; GÓMEZ-CANELA, C.; VENTURA, F.; LACORTE, S. Predicting concentrations of cytostatic drugs in sewage effluents and surface waters of Catalonia (NE Spain). **Environmental Research**, v. 138, p. 161-172, 2015. doi.org/10.1016/j.envres.2015.02.015
- FÜZÉRY, A. K.; BREAUD, A. R.; EMEZIENNA, N.; SCHOOLS, S.; CLARKE, W. A. A rapid and reliable method for the quantitation of hydroxychloroquine in serum using turbulent flow liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Clinica Chimica Acta**, v. 421, p. 79-84, 2013. doi.org/10.1016/j.cca.2013.02.018
- GALANI, A.; ALYGIZAKIS, N.; AALIZADEH, R.; KASTRITIS, E.; DIMOPOULOS, M. A.; THOMAIDIS, N. S. Patterns of pharmaceuticals used during the first wave of COVID-19 pandemic in Athens, Greece as revealed by wastewater-based epidemiology. **Science of The Total Environment**, v. 798, p. 149014, 2021. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149014
- GAUTRET, P.; LAGIER, J. C.; PAROLA, P.; MEDDEB, L.; MAILHE, M.; DOUDIER, B. *et al.* Hydroxychloroquine and azithromycin as a treatment of COVID-19: results of an open-label non-randomized clinical trial. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.57, n.1, p. 105949, 2020. doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105949
- GAVRILESCU, M.; DEMNEROVÁ, K.; AAMAND, J.; AGATHOS, S.; FAVA, F. Emerging pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. **New Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 147-156, 2015. doi.org/10.1016/j.nbt.2014.01.001
- GELERIS, J.; SUN, Y.; PLATT, J.; ZUCKER, J.; BALDWIN, M.; HRIPCSAK, G. *et al.* Observational study of hydroxychloroquine in hospitalized patients with Covid-19. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 25, p. 2411-2418, 2020. doi.org/10.1056/nejmoa2012410
- GHAZY, R.M.; ALMAGHRABY, A.; SHAABAN, R.; KAMAL, A.; BESHIR, H.; MOURSI, A. *et al.* A systematic review and meta-analysis on chloroquine and hydroxychloroquine as monotherapy or combined with azithromycin in COVID-19 treatment. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-18, 2020. doi.org/10.1038/s41598-020-77748-x
- GORA, A. H.; SAHU, N. P.; SAIMA REHMAN, S. S.; AHMAD, I.; AGARWAL, D.; DAR, S. A. *et al.* Metabolic and haematological responses of *Labeo rohita* to dietary fucoidan. **Journal of Applied Animal Research**, v.46, p. 1042-1050, 2018. doi.org/10.1080/09712119.2018.1456442
- GÜMÜŞ, D.; GÜMÜŞ, F. Removal of hydroxychloroquine using engineered biochar from algal biodiesel industry waste: Characterization and design of experiment (DoE). **Arabian Journal for Science and Engineering**, p. 1-10, 2021. doi.org/10.1007/s13369-021-06235-w

- HARAHAP, Y.; ROHADATUL‘AISY, S. A.; MAGGADANI, B. P. Development and Validation of the Quantification Method for Hydroxychloroquine in Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS) Using High-Performance Liquid Chromatography- Photodiode Array. **Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences**, v. 2021, 2021. doi.org/10.1155/2021/3500279
- HERNÁNDEZ-NEGRÍN, H.; PADILLA-CUETO, D. Increasing Trend in Mortality From Systemic Lupus Erythematosus in Latin America as an Expression of Social Disparities in Health. **Reumatologia Clinica**, 2020. doi.org/10.1016/j.reuma.2020.07.004
- HORN, S.; VOGT, B.; PIETERS, R.; BOUWMAN, H.; BEZUIDENHOUT, C. Impact of potential COVID-19 treatment on South African water sources already threatened by pharmaceutical pollution. **Environmental Toxicology and Chemistry**.v.39. n.7. p. 1305-1306, 2020. doi.org/10.1002/etc.4734
- HOWE, K.; CLARK, M. D.; TORROJA, C. F.; TORRANCE, J.; BERTHELOT, C.; MUFFATO, M. *et al.* The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498-503, 2013. doi.org/10.1038/nature12111
- HU, L. X.; OLAITAN, O. J.; LI, Z.; YANG, Y. Y.; CHIMEZIE, A.; ADEPOJU-BELLO, A. *et al.* What is in Nigerian waters? Target and non-target screening analysis for organic chemicals. **Chemosphere**, v. 284, p. 131546, 2021. doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131546
- HU, J.; HELLGETH, N.; CABAY, C.; CLARK, J.; OLIARO, F. J.; VAN BONN, W. *et al.* Towards understanding microbial degradation of chloroquine in large saltwater systems. **Science of The Total Environment**, v. 807, p. 150532, 2022. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150532
- INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY. **Poisons Information Monograph: Chloroquine (PIM 123)**. 1994.
- JAMELEDDINE, M.; HARZALLAH, N.; GRATI, H.; JEBALI, M.C.; HAMOUDA, C. PIN3 Chloroquine and Hydroxychloroquine in COVID-19 with or without azithromycin: a systematic review of *in vitro* and clinical studies. **Value Health** v. 23, p. S545, 2020. dx.doi.org/10.1016%2Fj.jval.2020.08.844
- JANUÁRIO, E. F. D.; FACHINA, Y. J.; WERNKE, G.; DEMITI, G. M. M.; BELTRAN, L.; BERGAMASCO, R. *et al.* Application of activated carbon functionalized with graphene oxide for efficient removal of COVID-19 treatment-related pharmaceuticals from water. **Chemosphere**, v. 289, p. 133213, 2022. doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133213
- KARGAR, F.; BEMANI, A.; SAYADI, M. H.; AHMADPOUR, N. Synthesis of modified beta bismuth oxide by titanium oxide and highly efficient solar photocatalytic properties on hydroxychloroquine degradation and pathways. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 419, p. 113453, 2021. doi.org /10.1016/j.jphotochem.2021.113453
- KHALIL, I. F.; ALIFRANGIS, M.; RECKE, C.; HOEGBERG, L. C.; RONN, A.; BYGBJERG, I. C. *et al.* Development of ELISA-based methods to measure the anti-malarial drug chloroquine in plasma and in pharmaceutical formulations. **Malaria Journal**, v. 10, n. 1, p. 1-7, 2011. doi.org/10.1186/1475-2875-10-249
- KONO, M.; TATSUMI, K.; IMAI, A. M.; SAITO, K.; KURIYAMA, T.; SHIRASAWA, H. Inhibition of human coronavirus 229E infection in human epithelial lung cells (L132) by chloroquine: involvement of p38 MAPK and ERK. **Antiviral Research**, v. 77, n. 2, p. 150-152, 2008. doi.org/10.1016/j.antiviral.2007.10.011
- KUMARI, M.; KUMAR, A. Can pharmaceutical drugs used to treat Covid-19 infection leads to human health risk? A hypothetical study to identify potential risk. **Science of The**

- Total Environment**, v. 778, p. 146303, 2021. [dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146303](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146303)
- KURODA, K.; LI, C.; DHANGAR, K.; KUMAR, M. Predicted occurrence, ecotoxicological risk and environmentally acquired resistance of antiviral drugs associated with COVID-19 in environmental waters. **Science of The Total Environment**, v. 776, p. 145740, 2021. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145740
- LILIUS, H.; ISOMAA, B.; HOLMSTRÖM, T. A comparison of the toxicity of 50 reference chemicals to freshly isolated rainbow trout hepatocytes and *Daphnia magna*. **Aquatic Toxicology**, v. 30, n. 1, p. 47-60, 1994. [doi.org/10.1016/0166-445X\(94\)90005-1](https://doi.org/10.1016/0166-445X(94)90005-1)
- LINDROOS, M.; HÖRNSTRÖM, D.; LARSSON, G.; GUSTAVSSON, M.; VAN MARIS, A. J. Continuous removal of the model pharmaceutical chloroquine from water using melanin-covered *Escherichia coli* in a membrane bioreactor. **Journal of Hazardous Materials**, v. 365, p. 74-80, 2019. doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.10.081
- LIU, J.; CAO, R.; XU, M.; WANG, X.; ZHANG, H.; HU, H. LI, Y. *et al.* Hydroxychloroquine, a less toxic derivative of chloroquine, is effective in inhibiting SARS-CoV-2 infection *in vitro*. **Cell discovery**, v. 6, p. 1-4, 2020. doi.org/10.1038/s41421-020-0156-0
- LUZ, T. M.; COSTA-ARAÚJO, A. P.; ESTRELA, F. N.; BRAZ, H. L. B.; JORGE, R. J. B.; CHARLIE-SILVA, I. *et al.* Can use of hydroxychloroquine and azithromycin as a treatment of COVID-19 affect aquatic wildlife? A study conducted with neotropical tadpole. **Science of The Total Environment**, v. 780, p. 146553, 2021. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146553
- MACPHEE, C.; RUELLE, R. **Lethal effects of 1888 chemicals upon four species of fish from western North America**. University of Idaho Forest, 1969. p. 112.
- MALIK, M.; TAHIR, M. J.; JABBAR, R.; AHMED, A.; HUSSAIN, R. Self-medication during Covid-19 pandemic: challenges and opportunities. **Drugs & Therapy Perspectives**, v. 36, n. 12, p. 565-567, 2020. [dx.doi.org/10.1007/s40267-020-00785-z](https://doi.org/10.1007/s40267-020-00785-z)
- MARGOT, J.; KIENLE, C.; MAGNET, A.; WEIL, M.; ROSSI, L.; ALENCASTRO, L. F. *et al.* Treatment of micropollutants in municipal wastewater: ozone or powdered activated carbon? **Science of The Total Environment**, v. 461, p. 480-498, 2013. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.05.034
- MASHHADIZADEH, M. H.; AKBARIAN, M. Voltammetric determination of some anti-malarial drugs using a carbon paste electrode modified with Cu(OH)₂ nano-wire. **Talanta**, v. 78, n. 4-5, p. 1440-1445, 2009. doi.org/10.1016/j.talanta.2009.02.040
- MCCHESENEY, E. W. Animal toxicity and pharmacokinetics of hydroxychloroquine sulfate. **The American Journal of Medicine**. v. 75, p. 11-18, 1983. [doi.org/10.1016/0002-9343\(83\)91265-2](https://doi.org/10.1016/0002-9343(83)91265-2)
- MENDONÇA-GOMES, J. M.; COSTA ARAÚJO, A. P.; DA LUZ, T. M.; CHARLIE-SILVA, I.; BRAZ, H. L. B.; JORGE, R. J. B. *et al.* Environmental impacts of COVID-19 treatment: Toxicological evaluation of azithromycin and hydroxychloroquine in adult zebrafish. **Science of The Total Environment**, p. 148129, 2021. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148129
- MESHNICK, S. R. Chloroquine as intercalator: a hypothesis revived. **Parasitology Today**, v. 6, n. 3, p. 77-79, 1990. [doi.org/10.1016/0169-4758\(90\)90215-P](https://doi.org/10.1016/0169-4758(90)90215-P)
- MEZZELANI, M.; GORBI, S.; DA ROS, Z.; FATTORINI, D.; D'ERRICO, G.; MILAN, M. *et al.* Ecotoxicological potential of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in marine organisms: bioavailability, biomarkers and natural occurrence in *Mytilus galloprovincialis*. **Marine Environmental Research**, v. 121, p. 31-39, 2016. doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.03.005
- MIDASSI, S.; BEDOUI, A.; BENSALAH, N. Efficient degradation of chloroquine drug by electro-Fenton oxidation: Effects of operating conditions and degradation mechanism.

- Chemosphere**, v. 260, p. 127558, 2020. doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127558
- MONTAGNER, C. C.; JARDIM, W. F. Spatial and seasonal variations of pharmaceuticals and endocrine disruptors in the Atibaia River, São Paulo State (Brazil). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 8, p. 1452-1462, 2011. doi.org/10.1590/S0103-50532011000800008
- MOORE, M. N.; VIARENGO, A.; DONKIN, P.; HAWKINS, A. J. Autophagic and lysosomal reactions to stress in the hepatopancreas of blue mussels. **Aquatic Toxicology**, v. 84, n. 1, p. 80-91, 2007. doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.06.007
- MÜLLER, D.; BLASCHKE, G. Enantioselective assay of chloroquine and its main metabolite desethyl chloroquine in human plasma by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatographic Science**, v. 38, n. 10, p. 435-440, 2000. doi.org/10.1093/chromsci/38.10.435
- MURRAY, S. M.; DOWN, C. M.; BOULWARE, D. R.; STAUFFER, W. M.; CAVERT, W. P.; SCHACKER, T. W. *et al.* Reduction of immune activation with chloroquine therapy during chronic HIV infection. **Journal of Virology**, v. 84, n. 22, p. 12082-12086, 2010. doi.org/10.1128/JVI.01466-10
- MURUGAN, K.; PANNEERSELVAM, C.; SUBRAMANIAM, J.; MADHIYAZHAGAN, P.; HWANG, J. S.; WANG, L. *et al.* Eco-friendly drugs from the marine environment: sponge-derived synthesized silver nanoparticles are highly effective on *Plasmodium falciparum* and its vector *Anopheles stephensi*, with little non-target effects on predatory copepods. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 16, p. 16671-16685, 2016. doi.org/10.1007/s11356-016-6832-9
- NASIR, M.; CHOWDHURY, A. S. M. S.; ZAHAN, T. Self-medication during COVID-19 outbreak: a cross sectional online survey in Dhaka city. **International Journal of Basic & Clinical Pharmacology**, v. 9, n. 9, p. 1325-30, 2020. dx.doi.org/10.18203/2319-2003.ijbcp20203522
- NASON, S. L.; LIN, E.; GODRI POLLITT, K. J.; PECCIA, J. Changes in Sewage Sludge Chemical Signatures During a COVID-19 Community Lockdown, Part 2: Nontargeted Analysis of Sludge and Evaluation with COVID-19 Metrics. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 2021. doi.org/10.1002/etc.5217
- NELSON, O.; OLAJIRE, A.; AYODEJI, A. Rapid spectrofluorimetric determination of chloroquine phosphate tablets. **International Journal of Drug Development and Research**, v. 2, n. 2, p. 412-417, 2010.
- OLAITAN, O. J.; ANYAKORA, C.; BAMIRO, T.; TELLA, A. T. Determination of pharmaceutical compounds in surface and underground water by solid phase extraction- liquid chromatography. **Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology**, v. 6, n. 3, p. 20-26, 2014. doi.org/10.5897/JECE2013.0312
- OLIVEIRA, A. R. M.; BONATO, P. S. Stereoselective determination of hydroxychloroquine and its major metabolites in human urine by solid-phase microextraction and HPLC. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 15, p. 2351-2359, 2007. doi.org/10.1002/jssc.200700121
- OECD. **Guidelines for the Testing of Chemicals, Test No. 203: Fish Acute Toxicity Test**. Paris, 2019.
- PACHECO, C. A. R.; HILARES, R. T.; ANDRADE, G. D. J. C.; MOGROVEJO-VALDIVIA, A.; TANAKA, D. A. P. Emerging contaminants, SARS-CoV-2 and wastewater treatment plants, new challenges to confront: A short review. **Bioresource Technology Reports**, p. 100731, 2021. doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100731
- PAPADIMITROPOULOS, E.; BRNABIC, A.; VORSTENBOSCH, E.; LEONARDI, F.; MOYANO, S.; GOMEZ, D. The burden of illness of rheumatoid arthritis in Latin America—A systematic literature review. **International Journal of Rheumatic**

- Diseases**, 2022. doi.org/10.1111/1756%2D185X.14295
- PENG, X.; WU, J.; ZHAO, Z.; WANG, X.; DAI, H.; WEI, Y. *et al.* Activation of peroxymonosulfate by single atom Co-NC catalysts for high-efficient removal of chloroquine phosphate via non-radical pathways: Electron-transfer mechanism. **Chemical Engineering Journal**, v. 429, p. 132245, 2022. doi.org/10.1016/j.cej.2021.132245
- PUBCHEM. PubChem Compound Summary for CID 64927, Chloroquine phosphate. 2022a. Available in: pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chloroquine-phosphate
- PUBCHEM. **PubChem Annotation Record for CHLOROQUINE**, Source: Hazardous Substances Data Bank (HSDB). 2022b. Available in: pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/3029
- PUBCHEM. **PubChem Compound Summary for CID 95478, Desethyl chloroquine**. 2022c. Available in: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/desethylchloroquine#section=Other-Identifiers
- PUBCHEM. **PubChem Compound Summary for CID 71826, Cletoquine**. 2022d. Available in: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/desethylhydroxychloroquine#section=Computed-Properties
- QUADRA, G. R.; SOUZA, H. O.; SANTOS-COSTA, R.; SANTOS-FERNANDEZ, M. A. Do pharmaceuticals reach and affect the aquatic ecosystems in Brazil? A critical review of current studies in a developing country. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 2, p. 1200-1218, 2017. doi.org/10.1007/s11356-016-7789-4
- RAINSFORD, K. D.; PARKE, A. L.; CLIFFORD-RASHOTTE, M.; KEAN, W. F. Therapy and pharmacological properties of hydroxychloroquine and chloroquine in treatment of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and related diseases. **Inflammopharmacology**, v. 23, n. 5, p. 231-269, 2015. doi.org/10.1007/s10787-015-0239-y
- RAMESH, M.; ANITHA, S.; POOPAL, R. K.; SHOBANA, C. Evaluation of acute and sublethal effects of chloroquine (C₁₈H₂₆ClN₃) on certain enzymological and histopathological biomarker responses of a freshwater fish *Cyprinus carpio*. **Toxicology Reports**, v. 5, p. 18-27, 2018. doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.11.006
- REDDY, N. R.; PRABHAVATHI, K.; CHAKRAVARTHY, I. E. A new spectrophotometric estimation of chloroquine phosphate from tablets. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 66, n. 2, p. 240, 2004.
- REIS, E. O.; FOUREAUX, A. F. S.; RODRIGUES, J. S.; MOREIRA, V. R.; LEBRON, Y. A.; SANTOS, L. V. *et al.* Occurrence, removal and seasonal variation of pharmaceuticals in Brazilian drinking water treatment plants. **Environmental Pollution**, v. 250, p. 773-781, 2019. doi.org/10.1016/j.envpol.2019.04.102
- RENDAL, C.; KUSK, K.O; TRAPP, S. The effect of pH on the uptake and toxicity of the bivalent weak base chloroquine tested on *Salix viminalis* and *Daphnia magna*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 2, p. 354-359, 2011. doi.org/10.1002/etc.391
- ROBERTS, P. H.; BERSUDER, P. Analysis of OSPAR priority pharmaceuticals using high-performance liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1134, n. 1-2, p. 143-150, 2006. doi.org/10.1016/j.chroma.2006.08.093
- ROMANO, S.; GALANTE, H.; FIGUEIRA, D.; MENDES, Z.; RODRIGUES, A. T. Time-trend analysis of medicine sales and shortages during COVID-19 outbreak: data from community pharmacies. **Research in Social and Administrative Pharmacy**, v. 17, n.

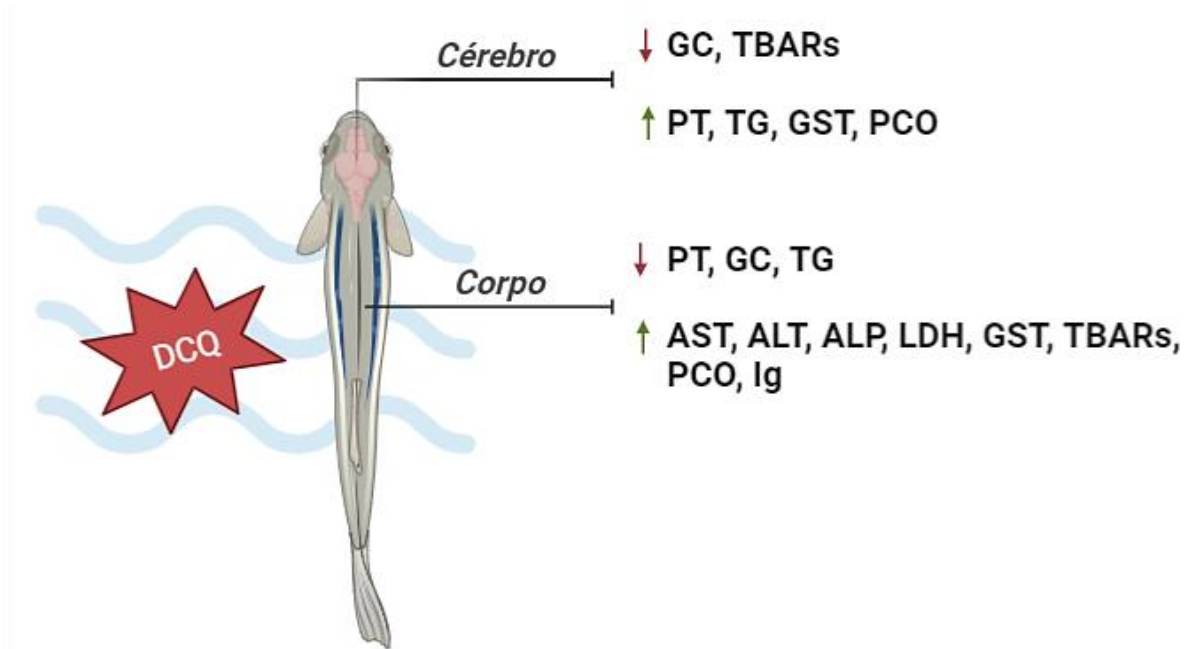
- 1,p. 1876-1881, 2021. doi.org/10.1016/j.sapharm.2020.05.024
- ROSENBERG, E. S.; DUFORT, E. M.; UDO, T.; WILBERSCHIED, L. A.; KUMAR, J.; TESORIERO, J. *et al.* Association of treatment with hydroxychloroquine or azithromycin with in-hospital mortality in patients with COVID-19 in New York state. **Journal of the American Medical Association**, v. 323, n. 24, p. 2493–2502, 2020. doi.org/10.1001/jama.2020.8630
- RUIZ, J. M. G.; SOUZA, E. F.; PAIVA, M. J. M. The media influence on self-medication of the new coronavirus: a literature review. **Research, Society and Development**, v. 10, n.13, p. e53101321015-e53101321015, 2021. doi.org/10.33448/rsd-v10i13.21015
- SAKA, C. Analytical methods on determination in pharmaceuticals and biological materials of Chloroquine as available for the treatment of COVID-19. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, p. 1-16, 2020. doi.org/10.1080/10408347.2020.1781592
- SANDERS, J. M.; MONOGUE, M. L.; JODLOWSKI, T. Z.; CUTRELL, J. B. Pharmacologic treatments for coronavirus disease 2019 (COVID-19): a review. **Journal of the American Medical Association**, v. 323, n. 18, p. 1824-1836, 2020. doi.org/10.1001/jama.2020.6019
- SANGHI, S. K.; VERMA, A.; VERMA, K. K. Determination of amodiaquine in pharmaceuticals by reaction with periodate and spectrophotometry or by high-performance liquid chromatography. **Analyst**, v. 115, n. 3, p. 333-335, 1990. doi.org/10.1039/AN9901500333
- SANTOS, A. V.; COUTO, C. F.; LEBRON, Y. A. R.; MOREIRA, V. R.; FOUREAUX, A. F.S.; REIS, E. O. *et al.* Occurrence and risk assessment of pharmaceutically active compounds in water supply systems in Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 746, p. 141011, 2020. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141011
- SAVARINO, A. *et al.* Effects of chloroquine on viral infections: an old drug against today's diseases. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 11, p. 722-727, 2003. doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00806-5
- SCHWAB, B. W.; HAYES, E. P.; FIORI, J. M.; MASTROCCO, F. J.; RODEN, N. M.; CRAGIN, D. *et al.* Human pharmaceuticals in US surface waters: a human health risk assessment. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 42, n. 3, p. 296-312, 2005. doi.org/10.1016/j.yrtph.2005.05.005
- SHENTON, F. C.; BOTS, M.; MENON, A.; EGGELTE, T. A.; DE WIT, M.; GREENWOOD, B. M. An ELISA test for detecting chloroquine in urine. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 2, p. 216-220, 1988. doi.org/10.1016/0035-9203(88)90415-4
- SHUKLA, A.; MOHABEER, P.; KASHYAP, A.; ROBINSON, J.; BANERJEE, I. Azithromycin and Hydroxychloroquine combination: The future pharmacotherapy of COVID-19. **Journal of Biomedical Sciences**, v. 7, n. 2, p. 54-57, 2020. dx.doi.org/10.3126/jbs.v7i2.33997
- SILVA, P. L.; NIPPES, R. P.; MACRUZ, P. D.; HEGETO, F. L.; SCALIANTE, M. H. N. O. Photocatalytic degradation of hydroxychloroquine using ZnO supported on clinoptilolite zeolite. **Water Science and Technology**, v. 84, n. 3, p. 763-776, 2021. doi.org/10.2166/wst.2021.265
- SILVESTRE, F. Signaling pathways of oxidative stress in aquatic organisms exposed to xenobiotics. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology**, p. 1-13, 2020. doi.org/10.1002/jez.2356
- SINGH, A.; ROOPKISHORA, C. L.; GUPTA, R.; KUMAR, S.; KUMAR, M. Development and validation of reversed-phase high performance liquid chromatographic method for hydroxychloroquine sulphate. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 77, n. 5, p. 586, 2015. doi.org/10.4103/0250-474x.169038

- SNYDER, H. Literature review as a research methodology: An overview and guidelines. **Journal of Business Research**, v. 104, p. 333-339, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jbusres.2019.07.039>
- 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, and Soil Pollution**, v. 206, n. 1, p. 57-67, 2010. [dx.doi.org/10.1007/s11270-009-0086-9](https://doi.org/10.1007/s11270-009-0086-9)
- SRIVASTAVA, M.; TIWARI, P.; MALL, V. K.; SRIVASTAVA, S. K.; PRAKASH, R. Voltammetric determination of the antimalarial drug chloroquine using a glassy carbon electrode modified with reduced graphene oxide on WS2 quantum dots. **Microchimica Acta**, v. 186, n. 7, p. 1-10, 2019. doi.org/10.1007/s00604-019-3525-3
- TARAZONA, J. V.; MARTÍNEZ, M.; MARTÍNEZ, M. A.; ANADÓN, A. Environmental impact assessment of COVID-19 therapeutic solutions. **A prospective analysis. Science of The Total Environment**, v. 778, p. 146257, 2021. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146257
- TEGEGNE, B.; CHANDRAVANSHI, B. S.; ZEWGE, F.; CHIMUKA, L. Solid-phase optimisation for simultaneous determination of thirteen pharmaceuticals in Ethiopian water samples with HPLC-DAD detection: An initial assessment. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 193, n. 5, p. 1-14, 2021. <https://doi.org/10.1007/s10661-021-08999-y>
- TETT, S. E.; CUTLER, D. J.; BROWN, K. F. High-performance liquid chromatographic assay for hydroxychloroquine and metabolites in blood and plasma, using a stationary phase of poly (styrene divinylbenzene) and a mobile phase at pH 11, with fluorimetric detection. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 344, p. 241-248, 1985. [doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)82024-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)82024-1)
- TOJO, J.; SANTAMARINA, M. T.; UBEIRA, F. M.; LEIRO, J.; SANMARTIN, M. L. Efficacy of antiprotozoal drugs against Gyrodactylosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Bulletin of the European Association of Fish Pathologists**, 13, p.79-82, 1993.
- USEPA. **Water quality criteria documents for the protection of aquatic life in ambient water—1995 Updates**. EPA-820-B-96-001. Technical Report. Washington, DC, 1996.
- VADUGANATHAN, M.; VAN MEIJGAARD, J.; MEHRA, M. R.; JOSEPH, J.; O'DONNELL, C. J.; WARRAICH, H. J. Prescription fill patterns for commonly used drugs during the COVID-19 pandemic in the United States. **Jama**, v. 323, n. 24, p. 2524-2526, 2020. doi.org/10.1001/jama.2020.9184
- VINCENT, M. J.; BERGERON, E.; BENJANNET, S.; ERICKSON, B. R.; ROLLIN, P. E.; KSIAZEK, T. G.; SEIDAH, N.G.; NICHOL, S. T. Chloroquine is a potent inhibitor of SARS coronavirus infection and spread. **Virology Journal**, v. 2, n. 1, p. 1-10, 2005. doi.org/10.1186/1743-422X-2-69
- WALKER, O.; ADEMOWO, O. G. A rapid, cost-effective liquid chromatographic method for the determination of chloroquine and desethylchloroquine in biological fluids. **Therapeutic drug monitoring**, v. 18, n. 1, p. 92-96, 1996.
- WANG, L. Z.; ONG, R. Y. L.; CHIN, T. M.; THUYA, W. L.; WAN, S. C.; WONG, A. L. A. *et al.* Method development and validation for rapid quantification of hydroxychloroquine in human blood using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 61, p. 86-92, 2012. doi.org/10.1016/j.jpba.2011.11.034
- WANG, M.; CAO, R.; ZHANG, L.; YANG, X.; LIU, J.; XU, M. *et al.* Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. **Cell Research**, v. 30, n. 3, p. 269-271, 2020. doi.org/10.1038/s41422-020-0282-0

- WANG, F. X.; WANG, C. C.; DU, X.; LI, Y.; WANG, F.; WANG, P. Efficient removal of emerging organic contaminants via photo-Fenton process over micron-sized Fe-MOF sheet. **Chemical Engineering Journal**, v. 429, p. 132495, 2022. doi.org/10.1016/j.cej.2021.132495
- WENIGER, H. **Review of side effects and toxicity of chloroquine**. Geneva: WHO, 1979. WHO. **World Malaria Report**. Geneva, 2020.
- WICHMANN, O.; EGGELTE, T.A.; GELLERT, S.; OSMAN, M. E.; MYLIUS, F.; EHRHARDT, S. *et al.* High residual chloroquine blood levels in African children with severe malaria seeking healthcare. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n. 7, p. 637-642, 2007. doi.org/10.1016/j.trstmh.2007.03.004
- YAN, Y.; ZOU, Z.; SUN, Y.; LI, X.; XU, K. F.; WEI, Y. *et al.* Anti-malaria drug chloroquine is highly effective in treating avian influenza A H5N1 virus infection in an animal model. **Cell Research**, v. 23, n. 2, p. 300-302, 2013. doi.org/10.1038/cr.2012.165
- YASMEEN, T.; ALI, Q.; ISLAM, F.; NOMAN, A.; AKRAM, M. S.; JAVED, M. T. Biologically treated wastewater fertigation induced growth and yield enhancement effects in *Vigna radiata L.* **Agricultural Water Management**, v. 146, p. 124-130, 2014. doi.org/10.1016/j.agwat.2014.07.025
- YAZDANY, J.; KIM, A. H. J. Use of hydroxychloroquine and chloroquine during the covid-19 pandemic: what every clinician should know. **Annals of Internal Medicine** v.31. 2020. doi.org/10.7326/m20-1334
- ZHOU, H.; YING, T.; WANG, X.; LIU, J. Occurrence and preliminarily environmental risk assessment of selected pharmaceuticals in the urban rivers, China. **Scientific Reports**, v.6, n. 1, p. 1-10, 2016. doi.org/10.1038/srep34928
- ZURITA, J. L.; JOS, Á.; DEL PESO, A.; SALGUERO, M.; LÓPEZ-ARTÍGUEZ, M. REPETTO, G. Ecotoxicological evaluation of the antimalarial drug chloroquine. **Aquatic Toxicology**, v. 75, n. 2, p. 97-107, 2005. doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.07.009

Capítulo 2. Utilização de biomarcadores bioquímicos para avaliar a toxicidade de Difosfato de Cloroquina em *Danio rerio*

RESUMO GRÁFICO



Fonte: Autora (criado com BioRender.com)

RESUMO

Os biomarcadores bioquímicos são importantes em estudos ecotoxicológicos, sendo uma forma de avaliar os impactos do Difosfato de Cloroquina (DCQ) no ambiente, pois permitem detectar alterações biológicas precocemente em animais aquáticos. Este medicamento é utilizado no tratamento de doenças como a malária e doenças autoimunes, mas seu uso envolvido e descarte inadequado levam à contaminação ambiental. O objetivo desse estudo foi avaliar as alterações em biomarcadores bioquímicos no corpo, muco e cérebro de peixe-zebra (*Danio rerio*) adulto, após a exposição crônica de 21 dias, utilizando concentrações de DCQ relatadas em águas superficiais e residuais (0,6; 1,8; 5,4; 16,2 e 48,6 µg/L) e o controle sem o fármaco. Para realizar as análises bioquímicas foram utilizados 8 animais de cada grupo com a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro. Os dados foram comparados estatisticamente entre o controle e os grupos expostos, utilizando o teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, no software PAST[®]. Os peixes expostos apresentaram diminuição de proteínas totais, glicose e triglicerídeos nas concentrações mais elevadas como compensação energética pelo aumento na atividade das enzimas alanina aminotransferase (AST), aspartato aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (ALP), lactato desidrogenase (LDH) e glutathione S-transferase (GST). Os níveis aumentados de proteínas carboniladas (PCO) a partir de 0,6 µg/L e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) em 1,8 µg/L, sugerem estresse oxidativo devido ao desequilíbrio redox promovido pelo fármaco. No muco houve um aumento de imunoglobulinas (Ig) em 5,4 e 48,6 µg/L, sugerindo uma resposta adaptativa a exposição de DCQ. No cérebro o aumento de proteínas totais e triglicerídeos nas concentrações mais altas, o aumento da GST e PCO em 1,8 µg/L, e a diminuição da glicose em 48,6 µg/L e TBARs a partir de 5,4 µg/L, evidenciaram que o fármaco alterou a homeostase do órgão. A análise de componentes principais (ACP), demonstrou que os biomarcadores mais responsivos a exposição de DCQ foram enzimas AST e GST no corpo e o TBARs no cérebro, enquanto a concentração 1,8 µg/L esteve correlacionada ao dano oxidativo de proteínas e lipídeos no corpo e no cérebro. A inovação deste trabalho está em demonstrar que as concentrações ambientais DCQ causam alterações significativas em biomarcadores bioquímicos no peixe-zebra, revelando estresse oxidativo e respostas adaptativas, o que contribuem para a compreensão dos efeitos tóxicos desse poluente emergente.

Palavras-chave: Metabolismo, biomarcadores de exposição, ACP.

ABSTRACT

Biochemical biomarkers are important in ecotoxicological studies, being a way to assess the impacts of Chloroquine Diphosphate (CQD) on the environment, as they allow early detection of biological changes in aquatic animals. This drug is used to treat diseases such as malaria and autoimmune diseases, but its involved use and improper disposal lead to environmental contamination. The objective of this study was to evaluate the changes in biochemical biomarkers in the body, mucus and brain of adult zebrafish (*Danio rerio*) after chronic exposure of 21 days, using CQD concentrations reported in surface and wastewater (0.6; 1.8; 5.4; 16.2 and 48.6 $\mu\text{g/L}$) and the control without the drug. To perform the biochemical analyses, 8 animals from each group were used and the absorbance readings were performed in a spectrophotometer. The data were statistically compared between the control and exposed groups using the nonparametric Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test in the PAST® software. The exposed fish showed a decrease in total proteins, glucose and triglycerides at the highest concentrations as energetic compensation for the increase in the activity of the enzymes alanine aminotransferase (AST), aspartate aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), lactate dehydrogenase (LDH) and glutathione S-transferase (GST). The increased levels of carbonyl proteins (PCO) from 0.6 $\mu\text{g/L}$ and thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) at 1.8 $\mu\text{g/L}$ suggest oxidative stress due to the redox imbalance promoted by the drug. In the mucus, there was an increase in immunoglobulins (Ig) at 5.4 and 48.6 $\mu\text{g/L}$, suggesting an adaptive response to CQD exposure. In the brain, the increase in total proteins and triglycerides at the highest concentrations, the increase in GST and PCO at 1.8 $\mu\text{g/L}$, and the decrease in glucose at 48.6 $\mu\text{g/L}$ and TBARs from 5.4 $\mu\text{g/L}$, showed that the drug altered the organ's homeostasis. Principal component analysis (PCA) demonstrated that the biomarkers most responsive to CQD exposure were AST and GST enzymes in the body and TBARs in the brain, while the concentration 1.8 $\mu\text{g/L}$ was correlated with oxidative damage of proteins and lipids in the body and brain. The innovation of this work is to demonstrate that environmental concentrations of CQD cause significant changes in biochemical biomarkers in zebrafish, revealing oxidative stress and adaptive responses, which contribute to the understanding of the toxic effects of this emerging pollutant.

Keywords: Metabolism, exposure biomarkers, PCA.

1. INTRODUÇÃO

A pandemia da COVID-19 trouxe desafios globais significativos, incluindo impactos sobre o meio ambiente. Entre esses, destaca-se a poluição por fármacos, como o Difosfato de Cloroquina (DCQ), que tem potencial para afetar a biota aquática. Esses compostos podem entrar nos ecossistemas aquáticos e causar alterações fisiológicas nos organismos. Assim, estudos ecotoxicológicos são essenciais para estimar concentrações ambientalmente relevantes e avaliar os efeitos potenciais desses fármacos nos ecossistemas.

Para a avaliação ambiental, os biomarcadores podem fornecer informações sobre os efeitos biológicos de um contaminante, entre eles as alterações bioquímicas são comumente utilizadas como marcadores pois respondem rapidamente a produtos químicos (Viarengo *et al.*, 2007; Kadim; Risjani, 2022). Os biomarcadores podem ser classificados em três tipos: exposição (confirma a exposição individual ou grupal para uma substância), efeito (efeitos adversos à saúde decorrentes da exposição a uma substância) e susceptibilidade (refletem a predisposição genética ou fisiológica de um organismo em reagir a exposição) (Amorim, 2003; Li *et al.*, 2023). Como exemplo, temos produtos metabólitos, imunológicos e enzimas, além de produtos do estresse oxidativo, relacionados a exposição ao poluente (Figura 1).

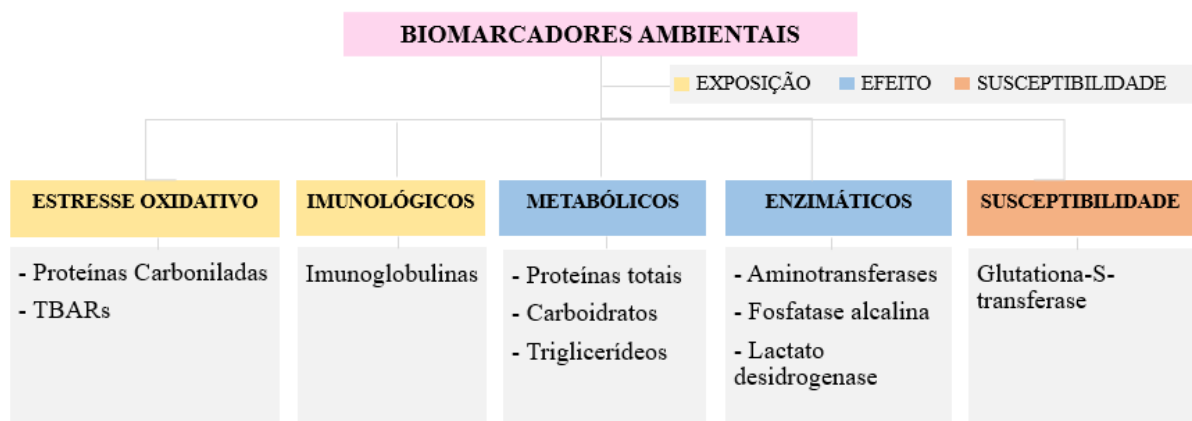


Figura 1. Classificação dos biomarcadores que foram selecionados para essa pesquisa.

Fonte: Autora.

Os parâmetros metabólicos, como proteína total, glicose e triglicerídeos, são biomarcadores frequentemente utilizados para examinar o estado nutricional e saúde dos peixes (Olivares-Rubio; Vega-Lopez, 2016; Kroon *et al.*, 2017). As proteínas são moléculas importantes envolvidas principalmente nas funções estruturais, enzimáticas e de transporte celular (Valerio-García *et al.*, 2017), também é empregada como biomarcador imunobioquímico e pode ser modulada sob estresse de diferentes compostos químicos, ou xenobióticos (Khen *et al.* 2016). Enquanto o triglicerídeo e a glicose são essenciais para

fornecer energia celular, inclusive como compensação em situação de estresse oxidativo (Atli *et al.*, 2015; Olivares-Rubio; Vega-Lopez, 2016; Magalhães *et al.*, 2020).

As enzimas metabólicas como as enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (ALP) e a lactato desidrogenase (LDH), são indicadores importantes da saúde dos peixes, uma vez que esses, quando expostos a estressores, modulam e ajustam seu metabolismo (Malarvizhi *et al.*, 2012). A ALP, a AST e a LDH são encontradas no coração, fígado, rim, músculo esquelético e eritrócitos, sendo muito utilizadas como marcadores de alterações patológicas do órgão, pois respondem rapidamente a químicos (Ramesh *et al.*, 2014) por estarem envolvidas no metabolismo de proteínas e carboidratos, além de servirem como indicadores de estresse (Abhijith *et al.*, 2016; Gora *et al.*, 2018).

A fosfatase alcalina (ALP), outro biomarcador enzimático metabólico, está envolvida na absorção de nutrientes e na síntese de proteínas, além de estar intimamente associada ao crescimento de organismos aquáticos e ao sistema imunológico (Wu *et al.*, 2019), atuando na defesa contra patógenos invasores com aumento nas taxas de fagocitose e biodegradação (Gisbert *et al.*, 2018; Xia; Wu 2018; Chen *et al.*, 2021).

Além desses biomarcadores, outros em ascensão vem sendo utilizados em estudos sobre o papel imunológico do muco dos peixes (Peatman *et al.*, 2015; Dash *et al.*, 2018). Isso porque no muco dos peixes contem linfócitos B que produzem localmente imunoglobulinas (Igs), principalmente IgMs tetraméricas, em vez de representarem transudados do plasma (Rombout *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 2010; Segner *et al.*, 2012). Essa produção é estimulada devido a diferentes perturbações ambientais que afetam o equilíbrio entre as Igs e a microbiota dos peixes, bem como a qualidade da água e a presença de substâncias tóxicas. Assim, compreender a causa desses distúrbios, possibilita estudos que proponham intervenções e previnam desequilíbrios de Ig protegendo a saúde dos peixes (Salinas *et al.*, 2021).

A toxicidade dos fármacos também induz impactos estressantes em peixes causando liberação excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) com prejuízos na imunidade celular, aumentando a suscetibilidade a doenças e patógenos (Ellis *et al.*, 2011; Silvestre, 2020). As respostas de estresse oxidativo podem ser avaliadas quanto a produção de proteínas carboniladas (PCO), produção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) e na atividade da enzima Glutathione S-transferase (GST). A formação de PCO é um indicador de dano oxidativo às proteínas enquanto o TBARs está relacionado ao dano lipídico, já a GST é uma enzima bem conhecida envolvida na proteção contra o estresse oxidativo e em processos de desintoxicação (Parvez; Raissudin 2005; Lushchak, 2016)

O estresse oxidativo pode provocar danos diretos nas proteínas por modificação química de aminoácidos nestas moléculas e podem dar origem a PCO (Lushchak, 2007; Fedorova *et al.*, 2014). A introdução de grupos carbonila (C=O) nos resíduos de aminoácidos é uma característica de modificações oxidativas e os níveis elevados de PCO são geralmente associados a níveis elevados de estresse oxidativo mostrando um resultado integrado do dano oxidativo (Dalle-Donne *et al.*, 2003; Pisoschi *et al.*, 2021). Além das proteínas, produtos da peroxidação lipídica promovida por EROS são comumente analisados, sendo a avaliação dos níveis de dialdeído malônico ou malondialdeído (MDA) a principal. Frequentemente, o MDA é medido devido à sua reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que também demonstra o estresse oxidativo resultando na modificação oxidativa de lipídios (Lushchak, 2016).

A glutathione S-transferase (GST) catalisa a conjugação de uma ampla gama de compostos, como produtos farmacêuticos, e compostos endógenos incluindo produtos de peroxidação lipídica e produtos do estresse oxidativo, isso porque é uma das principais enzimas que medeiam a fase II da desintoxicação celular (Glisic *et al.*, 2015). A catálise envolve o ataque nucleofílico do átomo de enxofre da glutathione reduzida (GSH) ao substrato (composto original ou metabólito), reduzindo sua reatividade e aumentando sua solubilidade em água, facilitando a eliminação por meio de transportadores de efluxo (Mannervik *et al.*, 1985; Sau *et al.*, 2010; Mannervik, 2023).

O Sistema Nervoso Central (SNC) é particularmente vulnerável aos efeitos deletérios do estresse oxidativo, devido a níveis elevados de oxigênio quando comparado a outros órgãos, presença de ácidos graxos insaturados e alto teor lipídico, sendo alvo de espécies reativas de oxigênio, além de possuir baixa concentração de defesas antioxidantes (Salim, 2017). Nesse sentido, o peixe-zebra (*Danio rerio*) é ideal para pesquisas sobre estresse, pois reflete mudanças comportamentais e fisiológicas quando exposto a agentes estressores, tanto em laboratório quanto no ambiente (Williams *et al.*, 2017).

Utilizar o *D. rerio* como espécie modelo pode ajudar a identificar biomarcadores responsivos à exposição ao DCQ, facilitando futuros programas de monitoramento ambiental. Isso se deve à facilidade de administrar medicamentos e produtos químicos solúveis em água a esses peixes, à sua genética bem conhecida e à extensa base de dados (Keller; Keller, 2018). A atividade de metabólitos e enzimas pode ser comparada ao grupo controle por espectrofotometria, permitindo a análise de concentrações não letais que possam causar disfunções fisiológicas.

Diante do exposto, a hipótese deste estudo é que a exposição crônica ao DCQ, em concentrações encontradas no ambiente, vai alterar os biomarcadores metabólicos, enzimáticos, imunológico e de estresse oxidativo em peixe-zebra (*Danio rerio*) e fornecerá dados sobre a ecotoxicidade deste fármaco.

2. OBJETIVOS

Este estudo avaliou a toxicidade crônica do Difosfato de Cloroquina, no peixe modelo de água doce, *Danio rerio*, utilizando biomarcadores bioquímicos como *endpoints*.

Os objetivos específicos foram:

- I. Quantificar a concentração de Difosfato de Cloroquina na água de exposição;
- II. Determinar a(s) concentração(ões) em que o fármaco altera proteínas, carboidratos e triglicerídeos;
- III. Definir a(s) concentração(ões) em que o fármaco modifica a produção de imunoglobulina (Ig) no muco.
- IV. Estabelecer a(s) concentração(ões) em que o fármaco altera a atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (ALP), e lactato desidrogenase (LDH);
- V. Determinar a(s) concentração(ões) em que o fármaco promove o estresse oxidativo por meio da produção de proteínas carboniladas (PCO) e espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs), bem como na atividade da enzima glutathione S-transferase (GST);
- VI. Indicar os biomarcadores mais responsivos a exposição do fármaco para o cérebro e corpo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ÁREA DE ESTUDO

O teste de exposição com os peixes *Danio rerio* foi realizado no Laboratório de Toxicologia de Contaminantes Ambientais e Histopatologias (LATHIS) do Instituto de Ciência e Tecnologia de Sorocaba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP após homologada a licença pelo Comitê de Ética de Pesquisas em Animais (CEUA) (Anexo I) e as análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Biomarcadores (LaBioM) da Universidade Federal de São Carlos UFSCar, *Campus* de Sorocaba após homologada a licença pelo Comitê de Ética de Pesquisas em Animais (CEUA) (Anexo II).

3.2 OBTENÇÃO E UTILIZAÇÃO DO FÁRMACO

O Padrão Analítico do sal Difosfato de Cloroquina ($C_{18}H_{26}ClN_3 \cdot 2H_3PO_4$; CAS: 50-63-5) foi adquirido pela Sigma-Aldrich® para a realização dos testes contemplando concentrações ambientais para o fármaco na água superficial anterior a pandemia de 0,6 $\mu\text{g/L}$ (Olaitan *et al.* 2014) e durante a pandemia de 1,8; 5,4; 16,2 e 48,6 $\mu\text{g/L}$ (Marques *et al.*, 2023; Domingo-Echaburu *et al.*, 2022; Cappelli *et al.*, 2022; Nason *et al.* 2021), adotando a progressão volumétrica de razão 3. As soluções-teste nas concentrações escolhidas foram preparadas por diluição de uma solução estoque de 5.000 μg de Difosfato de Cloroquina em 1L de água deionizada misturadas no balão volumétrico.

3.3 MANUTENÇÃO DO PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*)

Espécimes de *D. rerio* (205 animais), com comprimento (2-3 cm), peso médio (0,3 g) e idade semelhantes (10-16 semanas), correspondendo a indivíduos adultos (Maack; Segner, 2003), foram obtidos em um comércio de Sorocaba, acondicionados em sacos plásticos com capacidade de 80 L e imediatamente transportados para o *Campus* de Sorocaba da UNESP, onde os experimentos foram conduzidos (Figura 2). No Laboratório de Toxicologia de Contaminantes Ambientais e Histopatologias (LATHIS), os animais foram aclimatados durante 15 dias em aquários de 30 L dotados de circulação contínua (1,2 L/h) de água reconstituída (Anexos III e IV), aeração constante, pH $7 \pm 0,2$; dureza $44 \pm 4 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$; condutividade $227 \pm 22 \mu\text{S/cm}$; oxigênio dissolvido 5 mg/L; temperatura $26^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, amônia $<0,011 \text{ ppm}$, atendendo os parâmetros de água adequados e critérios de qualidade do lote seguindo as normas da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) n. 203 (OECD, 2019) com menos de 5% de mortalidade durante o período.

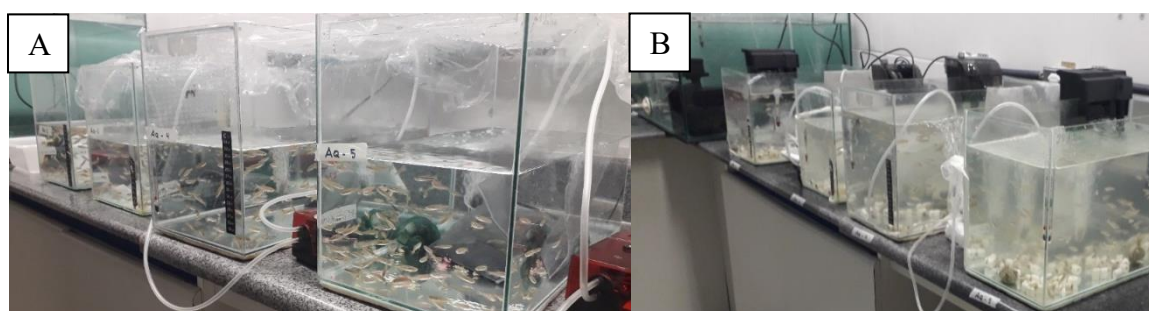


Figura 2. Aclimação do lote de peixes utilizado nos testes no LATHIS. (A) primeiro dia, (B) 15º dia.

Fonte: Autora

Após a aclimação, foi realizado o teste de sensibilidade 48 horas baseado na Norma NBR 15499 para substância de referência Cloreto de Sódio (NaCl) (ABNT, 2022). As diluições

foram feitas a partir de uma solução-estoque de 100g/L, de NaCl em água reconstituída em cinco concentrações (5; 7,5; 11,25; 16,88; 25,32 g/L de NaCl) e o controle sem o sal, contendo cinco animais em cada. O teste foi realizado em réplica, sendo a concentração letal a 50% dos organismos (CL_{50}) em um período de 48 h calculada (Anexo V).

O ensaio de toxicidade crônica foi realizado baseado no protocolo 123 da OECD (OECD, 2009) com adaptações para coleta bioquímica, utilizando como agente tóxico o Difosfato de Cloroquina. Noventa e seis peixes adultos saudáveis (ou seja, com movimentos normais de natação e sem deformidades morfológicas ou lesões aparentes) foram distribuídos em cinco grupos experimentais e controle (n = 16 peixes/grupo; 4 réplicas).

O período de exposição teve duração de 21 dias (com renovação total da solução teste a cada 48 h). Os animais foram mantidos em tanques (2 L), alimentados com ração comercial para peixes Tetramin® (97% de proteína bruta) duas vezes ao dia. A temperatura foi mantida em $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e o fotoperíodo de 12:12 (12 horas claro/ 12 horas escuro), enquanto a média dos parâmetros da água monitorados durante o teste foram: pH 7 ± 2 , dureza 44 ± 4 mg CaCO_3 L^{-1} , condutividade 227 ± 22 $\mu\text{S}/\text{cm}$, oxigênio dissolvido 6 ± 1 mg/L, amônia $<0,011$ ppm.

Uma solução estoque de Difosfato de Cloroquina a 5000 $\mu\text{g}/\text{L}$ foi preparada com água destilada, com diluições em fator 3 (0,6; 1,8; 5,4; 16,2 e 48,6 $\mu\text{g}/\text{L}$) contemplando concentrações ambientais reais durante a pandemia. Os grupos foram expostos a água reconstituída sem cloro contendo as diferentes concentrações de DCQ. No grupo controle, peixe-zebra foram mantidos apenas em água reconstituída sem cloro (Figura 3).

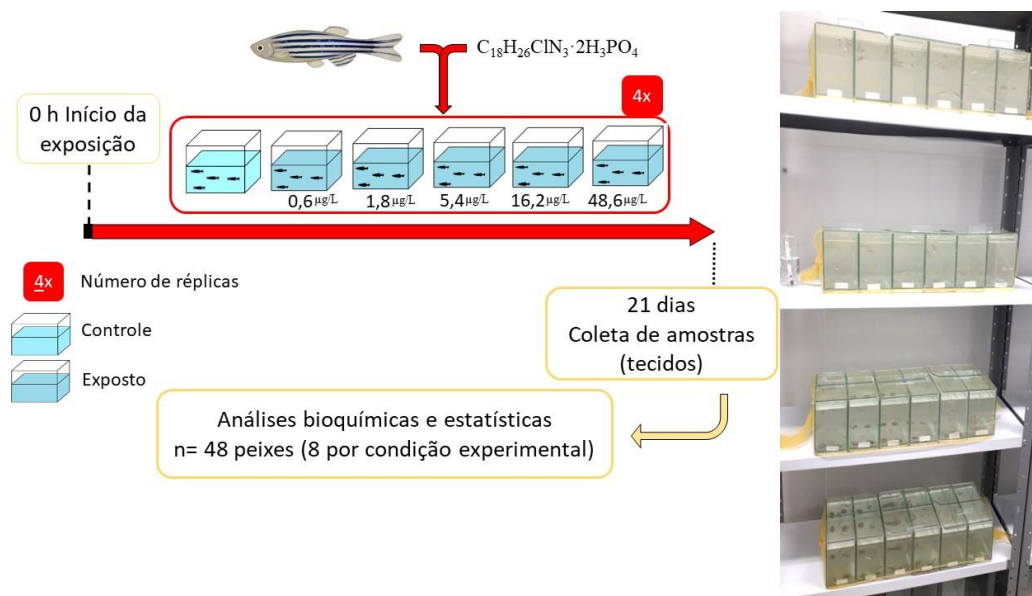


Figura 3. Desenho experimental da exposição da espécie *Danio rerio* as diferentes concentrações de Difosfato de Cloroquina ($\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{ClN}_3 \cdot 2\text{H}_3\text{PO}_4$) para as análises bioquímicas.

Fonte: Autora.

3.4. ANÁLISE DA ÁGUA DE EXPOSIÇÃO LC-MS/MS

As análises das amostras de águas da exposição foram feitas no Laboratório de Fisiologia de Plantas sob Estresse (LFPE) da Universidade Federal do Paraná, e a extração da DCQ seguiu o protocolo descrito por Marques *et al.* (2024) (Anexo VI). A quantificação da Cloroquina seguiu o método descrito por Omotola e Olatunji, (2020) utilizando Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS/MS). O sistema compreende um espectrômetro de massa triplo quadrupolo Xevo TQD (Waters) com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI) acoplada a um HPLC Varian SYS-LC-240-E com amostrador automático. As análises foram realizadas no modo de íons positivos ESI utilizando uma coluna ZORBAX SB-C18 (Agilent, EUA) com dimensões de 2,1 x 100 mm e tamanho de partícula de 1,8 µm.

3.5 COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Utilizando uma metodologia menos invasiva, o muco da pele dos espécimes de *D. rerio* anestesiados foi coletado de acordo com o método de Palaksha *et al.* (2008) com algumas modificações de (Cerezuela *et al.*, 2016). Após o período de exposição (21 dias), o muco foi obtido dos animais anestesiados com benzocaína 0,01% por raspagem da superfície dorso-lateral de cada indivíduo com uma espátula macia. A coleta foi feita com cuidado para evitar a contaminação com sangue e excreções urino-genitais e intestinais. O muco obtido de cada animal foi diluído em 300 µL de solução salina tamponada com Tris (TrisHCl 50 mM, 150 mM NaCl) em pH 8. Posteriormente, foi feita uma união das amostras (com dois indivíduos por réplica), homogeneizou-se com ultraturrax IKA 10®, e centrifugou-se (1500 rpm, 10 min, 4 °C). O sobrenadante foi coletado e armazenado a -20 °C até o momento de uso.

Após a coleta do muco o animal foi eutanasiado por secção medular e o cérebro foi separado do restante do corpo. O corpo e o cérebro dos peixes foram homogeneizados em tampão fosfato-salina (PBS) pH 7,2, contendo NaCl 1,365 M, KCl 0,027 M, Na₂HPO₄ (7H₂O) 0,054 M e KH₂PO₄, 0,018 M homogeneizador do tipo ultraturrax e centrifugados a 12.000 rpm por 5 min (a 4 °C). Os sobrenadantes foram separados em alíquotas e mantidos a -80 °C para serem utilizadas nas diferentes análises bioquímicas. Todas as análises bioquímicas foram realizadas no espectrofotômetro Biotec Synergy HTX Reader (Figura 4).

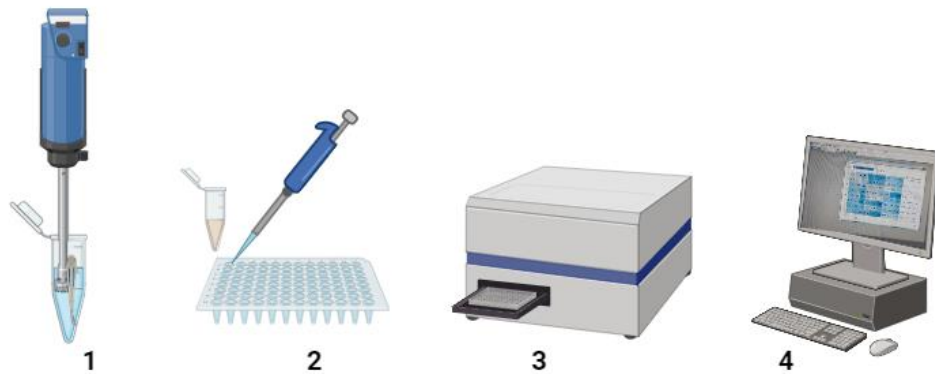


Figura 4. Etapas para a realização das análises bioquímicas. 1) Homogeneização do peixe (corpo/cérebro) utilizando ultra-turrax. 2) As alíquotas são pipetadas em microplaca 96 poços contendo os reagentes para a reação colorimétrica. 3) A microplaca é lida no espectrofotômetro acoplado ao computador com a obtenção das absorvâncias.

Fonte: Autora (criado com BioRender.com).

3.6 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

A concentração de proteínas em cada amostra foi determinada pelo método de Bradford (1976) que se baseia na interação do corante coomassie brilliant blue com as cadeias laterais básicas ou aromáticas das proteínas (Bradford, 1976). A albumina de soro bovino (BSA, Sigma) foi utilizada como padrão proteico (Kruger, 2009). Desta forma, 10 μL do sobrenadante de cada amostra foi pipetado em triplicata na microplaca de 96 poços acrescido de 200 μL da solução de Bradford. A média das absorvâncias foi aplicada na equação da curva da proteína e o resultado é expresso em mg/mL .

3.7 DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS

A concentração da glicose foi determinada pelo kit Labtest Ref. 133 com algumas modificações. O método se baseia na oxidação da glicose pela glicose oxidase com formação de peróxido de hidrogênio que reage com 4-aminoantipirina e fenol (ação catalisada pela peroxidase). A reação oxidativa é detectada pela formação de antipirilquinonimina vermelha cuja intensidade de cor é proporcional à concentração da glicose na amostra. Assim, 2 μL da amostra e 200 μL do reagente foram pipetados em triplicata, incubados por 10 minutos a 25°C (temperatura ajustada para peixes) e lida a 505 nm. O cálculo foi feito a partir da obtenção de uma curva padrão de glicose e o resultado é expresso em mg/dL .

3.8 DETERMINAÇÃO DE TRIGLICERÍDEOS

A concentração de triglicerídeos foi determinada pelo kit Labtest Ref. 87 com algumas modificações. O método se baseia na hidrólise dos triglicerídeos liberando glicerol e ácidos graxos pela lipoproteína lipase. Os produtos são convertidos, pela glicerolquinase, em glicerol-3-fosfato o qual é oxidado a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio na presença da glicerolfosfato oxidase. Em seguida ocorre uma reação de acoplamento entre peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, catalisada pela peroxidase, produzindo uma quinoneimina de coloração avermelhada que é diretamente proporcional a quantidade dos triglicerídeos na amostra. Assim, 2 μL da amostra e 200 μL do reagente foram pipetados em triplicata, incubados por 10 minutos a 25° e lida a 505 nm. O cálculo foi feito a partir da obtenção de uma curva padrão de triglicerídeos e o resultado é expresso em mg/dL.

3.9 ANÁLISES METABÓLICAS ENZIMÁTICAS

A atividade das enzimas Aspartato aminotransferase (AST), Alanina aminotransferase (ALT) e Fosfatase alcalina (ALP) foram medidas usando kit comercial da Labtest, referencias no. 109, 108 e 79 respectivamente. As análises foram modificadas para peixes e adaptadas a leitora de microplacas. As leituras foram feitas em triplicatas.

Para a determinação da AST, o método utilizado se baseia na catálise desta enzima pela transferência do grupo amina do ácido aspártico para o cetoglutarato com a formação de glutamato oxalacetato. Este é reduzido a malato (pela ação da malato desidrogenase) com oxidação da coenzima NADH a NAD^+ sendo diretamente proporcional a atividade de AST na amostra. Desta forma, pipetou-se 152 μL da mistura da solução Reagente 1 (Tampão Tris 105 mmol/L, L-aspartato 330 mmol/L, LDH 1200, MDH 825 U/L e azida sódica 0,095%) + Reagente 3 (Tampão Tris 20 mmol/L, pirodoxal fosfato 11,1 mmol/L, azida sódica 0,095%) e 20 μL de amostra, seguida de incubação por 5 minutos a 25°C (temperatura adaptada para peixes). Posteriormente, adicionou-se 38 μL da solução de Reagente 2 (Tampão Tris 20 mmol/L, NADH 1320 $\mu\text{mol/L}$, α -cetoglutarato 66 mmol/L, azida sódica 0,095%), incubou-se a 25°C por 1 minuto e efetuou-se a leitura da absorbância a 340 nm nos intervalos de 2 minutos.

Para a determinação da ALT o método utilizado se baseia na transferência do grupo L-alanina para o cetoglutarato pela enzima com a formação de glutamato e piruvato. O piruvato é reduzido a lactato (pela ação da lactato desidrogenase) e da coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) que é oxidada a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) sendo diretamente proporcional a atividade de ALT na amostra. Desta forma, pipetou-se 152 μL da mistura da solução Reagente 1 (Tampão Tris 132,5 mmol/L, L-alanina 687,5 mmol/L,

LDH 2300 U/L e azida sódica 0,095%) + Reagente 3 (Tampão Tris 20 mmol/L, pirodoxal fosfato 11,1 mmol/L, azida sódica 0,095%) e 20 µL de amostra, seguida de incubação por 5 minutos a 25°C (temperatura adaptada para peixes). Posteriormente, adicionou-se 38 µL da solução de Reagente 2 (Tampão Tris 20 mmol/L, NADH 1320 µmol/L, α-cetoglutarato 82,5 mmol/L, azida sódica 0,095%), incubou-se a 25°C por 1 minuto e efetuou-se a leitura da absorbância a 340 nm nos intervalos de 2 minutos.

Para a determinação da ALP o método utilizado se baseia na hidrólise do p-nitrofenilfosfato pela enzima liberando o p-nitrofenol que é diretamente proporcional a atividade enzimática da ALP na amostra. Pipetou-se 200 µL da mistura da solução Reagente 1 (HEDTA 2 mmol/L, sulfato de zinco 1,2 mmol/L, acetato de magnésio 2,5 mmol/L, azida sódica 8 mmol/L) e Reagente 2 (p-Nitrofenilfosfato 60 mmol/L e fenol 50 mmol/L) e 10 µL de amostra, seguida de incubação por 1 minuto a 25°C. Posteriormente, realizou-se a leitura em 405 nm e a absorbância foi registrada em intervalos de 2 minutos.

Para avaliar a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH), foi utilizado o método de Bergmeyer *et al.*, (1974), com os substratos piruvato e NADH. A LDH oxida o NADH e reduz o substrato piruvato formando lactato e NAD⁺. Para a determinação enzimática, pipetou-se 20 µL da amostra e 180 µL do meio de reação em tampão Tris-HCl 200 mM pH 7,4, contendo NADH 0,14 mM e piruvato 1 mM. A atividade catalítica é calculada a partir da velocidade de desaparecimento do NADH, que é proporcional à atividade de LDH nas amostras a 340 nm, em intervalos de 20 segundos, durante 10 minutos. Foi utilizado o coeficiente de extinção de 6,22 para NADH. A atividade é expressa em milimol (mmol) de substrato hidrolisado por minuto por mg de proteína.

3.10. ANÁLISE IMUNOLÓGICA

A imunoglobulina (Ig) foi determinada pelo método de Siwicki *et al.* (1994) com algumas modificações. Aliquotas de 100 µL de muco, obtidas de cada animal, foram misturadas em 100 µL de polietilenoglicol 12% (PEG; Sigma-Aldrich) e incubadas por 2h sob agitação a temperatura ambiente (±20°C). Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 3000g por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. A concentração de proteínas do precipitado foi determinada como Ig e este resultado foi subtraído da concentração de proteínas totais.

3.11. ANÁLISE DE ESTRESSE OXIDATIVO E DESINTOXICAÇÃO

O índice de carbonilação de proteínas (PCO) foi determinado utilizando o método descrito por Levine *et al.* (1994), que é baseado na reação de proteínas carboniladas utilizando

o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) 10 mM, que gera dinitrofenil hidrazona a 370 nm. Dessa forma, foi utilizado 100 μL de amostra e a concentração de PCO foi expressa como nmol por mg de proteína calculado a partir do coeficiente de extinção molar, $22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

As substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARs) foram determinadas utilizando o procedimento descrito por Federici (2007). Utilizou-se 5 μL de hidroxitolueno butilado (BHT) 1 M, 90 μL de PBS (pH 7,2) e 30 μL de amostra. Em seguida, foram adicionados 25 μL de ácido tricloroacético (TCA) 50% p/v e 50 μL ácido tiobarbitúrico (TBA) 1,3% p/v (diluído em 0,3% p/v de NaOH).

A solução foi incubada em baixa rotação por 90 minutos a 40°C e resfriada em gelo. A absorbância foi lida em 530 nm e a concentração de TBARs foi calculada a partir da curva padrão de dialdeído malônico (MDA) sendo expressa em nmol de MDA por mL.

A atividade da enzima glutationa S-transferase (GST), foi determinada conforme o método de Keen et al., (1976), em meio de reação contendo GSH 1,5 mM e 1-cloro-2, 4-dinitrobenzeno (CDNB) 2 mM, diluídos em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,5. Para a determinação enzimática, foram adicionados 20 μL de amostra e 180 μL do meio de reação. Posteriormente, realizou-se a leitura em de 340 nm, nos intervalos de 20 segundos, durante 5 minutos. A atividade da enzima é expressa como nmole de CDNB conjugado formado por min por mg de proteína, usando o coeficiente de extinção molar $9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.12. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software PAST[®] com nível de significância de $p < 0,05$. Devido ao tamanho amostral pequeno, algumas análises não apresentarem uma distribuição normal e afim de padronizar todas as análises, aplicou-se o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, seguido pelo pós teste de Dunn, para a comparação entre o controle e os tratamentos, utilizando um $n=8$ indivíduos por concentração, sendo dois de cada réplica.

Para a Análise de Componentes Principais (ACP) dos biomarcadores, os dados bioquímicos foram padronizados em escore Z.

4. RESULTADOS

4.1. CONCENTRAÇÕES DE DIFOSFATO DE CLOROQUINA NA ÁGUA DE EXPOSIÇÃO

Os valores obtidos na leitura em LC-MS/MS, são apresentados na Tabela 1. Variando menos que 10% da concentração nominal.

Tabela 1. Concentrações de Difosfato de Cloroquina (DCQ) obtidos por Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS/MS) na água de exposição dos diferentes grupos. Valores médios das leituras \pm desvio padrão.

Concentração nominal DCQ ($\mu\text{g/L}$)	Média ($\mu\text{g/L}$)	Desvio Padrão
Controle	0	0
0,6	0,60	0,02
1,8	1,88	0,08
5,4	5,49	0,01
16,2	16,15	0,09
48,6	48,64	0,02

4.2. ALTERAÇÕES NOS BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

Os valores de proteínas totais no corpo dos peixes expostos ao DCQ diminuíram em relação ao grupo controle a partir da concentração 1,8 $\mu\text{g/L}$, enquanto no cérebro houve um aumento em relação ao grupo controle a partir da concentração 5,4 $\mu\text{g/L}$ (Figura 5A). Os níveis de glicose no corpo dos peixes expostos ao DCQ, diminuíram em relação ao grupo controle a partir da concentração 1,8 $\mu\text{g/L}$ e no cérebro em 48,6 $\mu\text{g/L}$ (Figura 5B). Os níveis de triglicerídeos no corpo dos peixes expostos ao DCQ, tiveram uma diminuição em relação ao grupo controle a partir da concentração 5,4 $\mu\text{g/L}$, enquanto no cérebro houve um aumento a partir da concentração 16,2 $\mu\text{g/L}$ (Figura 5C).

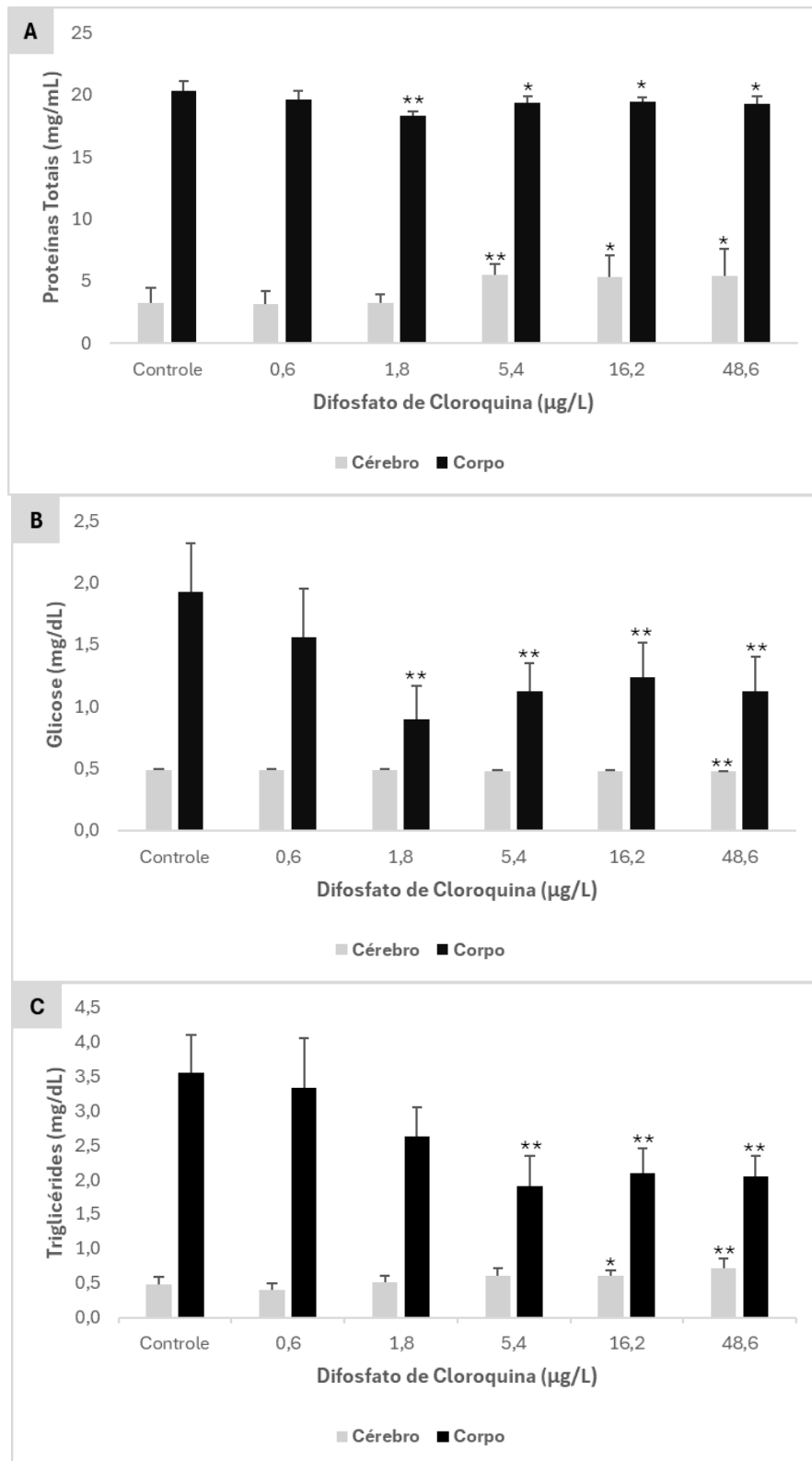


Figura 5. Efeitos da exposição a concentrações de Difosfato de Cloroquina (DCQ) sobre as proteínas totais (A), glicose (B) e triglicerídeos (C) do corpo e do cérebro de *Danio rerio* após 21 dias de exposição. Valores são apresentados como média \pm erro padrão. (*) $p < 0,05$ em relação ao controle. (**) $p < 0,01$ em relação ao controle.

As imunoglobulinas do muco dos peixes expostos ao DCQ, aumentaram em relação ao grupo controle nas concentrações 5,4 e 48,6 $\mu\text{g/L}$, apesar das proteínas totais entre as concentrações não variar (Figura 6).

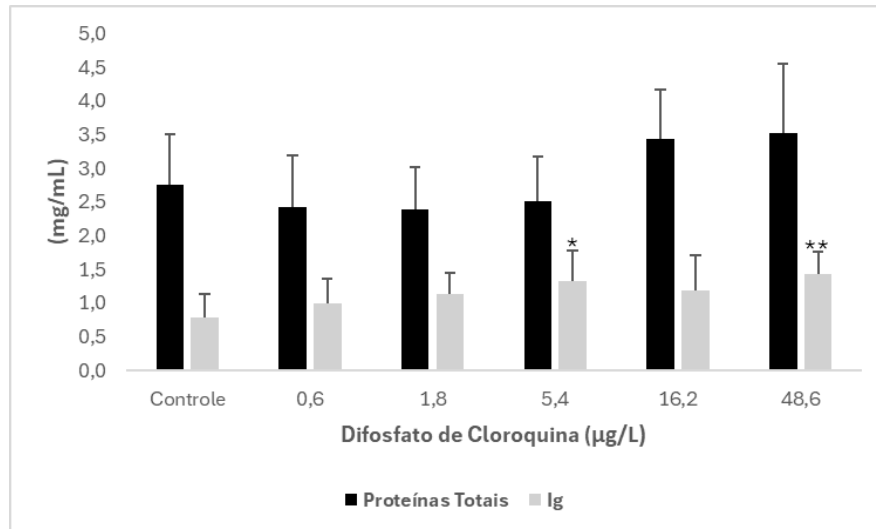


Figura 6. Efeitos da exposição ao Difosfato de Cloroquina (DCQ) sobre as imunoglobulinas (Ig) e proteínas totais do muco de *Danio rerio* após 21 dias de exposição. Valores são apresentados como média \pm erro padrão. (*) $p < 0,05$ em relação ao controle. (**) $p < 0,01$ em relação ao controle.

A atividade das enzimas aminotransferases AST e ALT aumentaram no corpo dos peixes expostos ao DCQ em relação ao grupo controle a partir da concentração 1,8 $\mu\text{g/L}$ para AST e a partir de 5,4 $\mu\text{g/L}$ para ALT (Figura 7A). A atividade da ALP aumentou no corpo dos peixes expostos ao DCQ nas concentrações 1,8 $\mu\text{g/L}$ e 16,2 $\mu\text{g/L}$ em relação ao grupo controle (Figura 7B). A atividade da LDH aumentou nos grupos expostos ao DCQ na concentração 48,6 $\mu\text{g/L}$ em relação ao grupo controle (Figura 7C).

Os níveis de PCO aumentaram no cérebro em 1,8 $\mu\text{g/L}$ e no corpo a partir de 0,6 $\mu\text{g/L}$ de DCQ, quando comparados ao controle (Figura 8A). A produção de TBARs teve um aumento na concentração 1,8 $\mu\text{g/L}$ de DCQ no corpo, enquanto no cérebro houve a diminuição de TBARs a partir da concentração 5,4 $\mu\text{g/L}$ de DCQ em relação ao grupo controle (Figura 8B). A enzima GST analisada no corpo dos peixes, aumentou sua atividade nos grupos expostos ao DCQ no corpo a partir da concentração 1,8 $\mu\text{g/L}$ em relação ao grupo controle, enquanto no cérebro a enzima aumentou nas concentrações 0,6 e 1,8 $\mu\text{g/L}$ de DCQ e nas demais não diferiu do controle (Figura 8C).

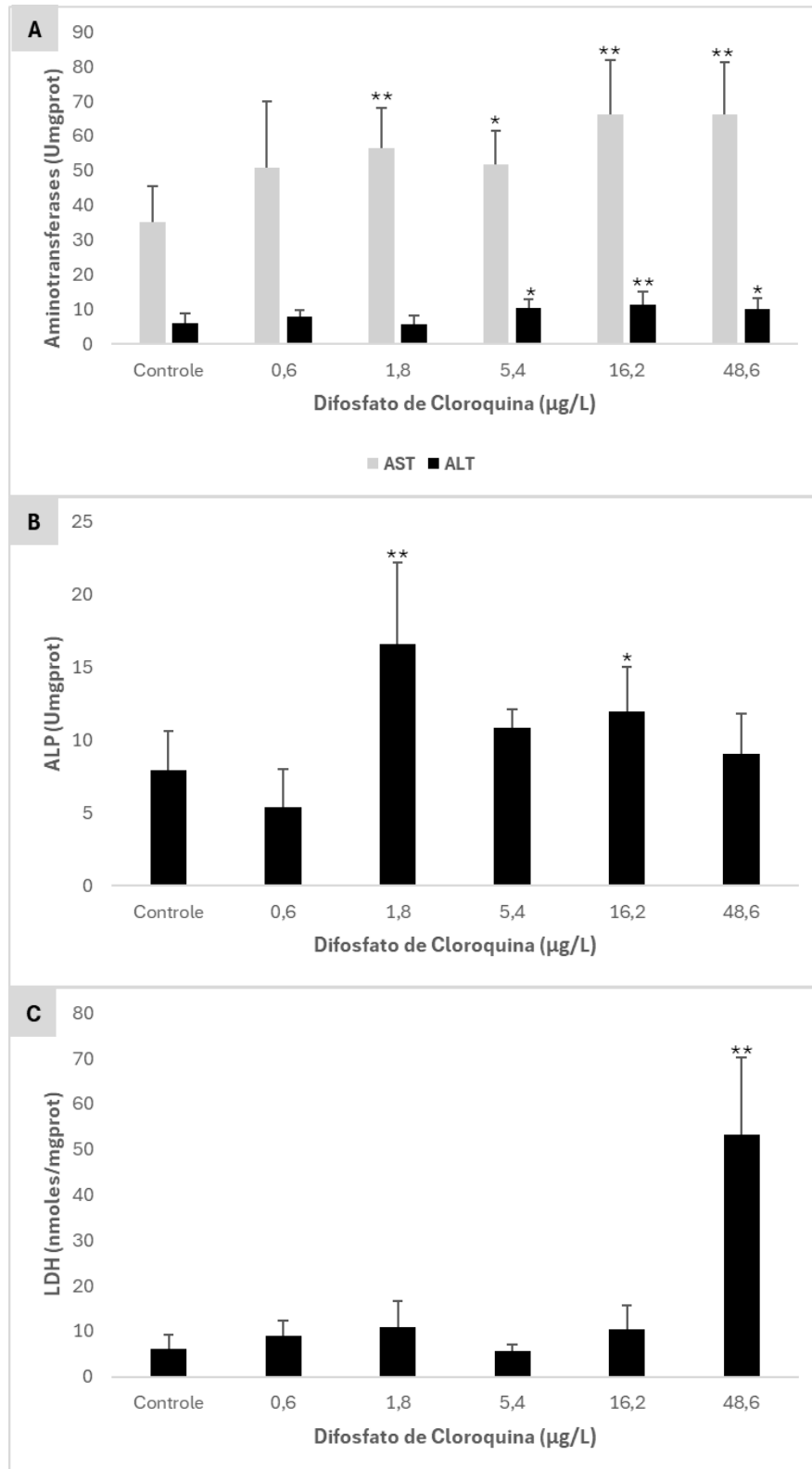


Figura 7. Efeitos da exposição a concentrações de Difosfato de Cloroquina (DCQ) sobre a atividade da Alanina aminotransferase (ALT) e da Aspartato aminotransferase (AST) (A), Fosfatase alcalina (ALP) (B), e Lactato desidrogenase (LDH) (C) no corpo de *Danio rerio* após 21 dias de exposição. Valores são apresentados como média \pm erro padrão. (*) $p < 0,05$ em relação ao controle. (**) $p < 0,01$ em relação ao controle.

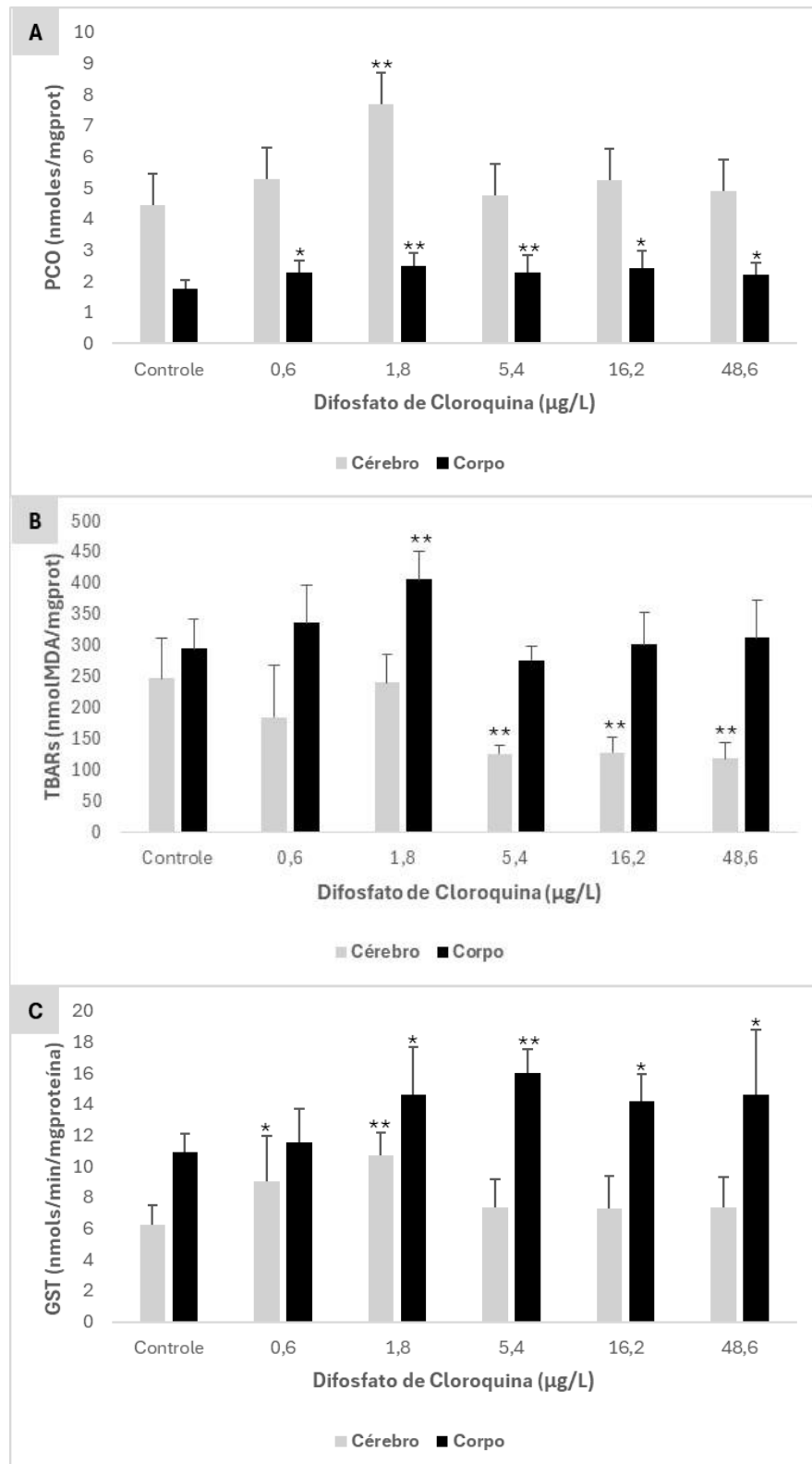


Figura 8. Efeitos da exposição a concentrações de Difosfato de Cloroquina (DCQ) sobre a produção de Proteínas carboniladas (PCO) (A), produção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) (B), e atividade da glutathione S-transferase (GST) (C) no cérebro e no corpo de *Danio rerio* após 21 dias de exposição. Valores são apresentados como média \pm erro padrão. (*) $p < 0,05$ em relação ao controle. (**) $p < 0,01$ em relação ao controle.

4.3. ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (ACP)

Na análise de componentes principais (ACP) dos biomarcadores do cérebro, aproximadamente 41% da variância pode ser atribuída ao PC1 representado pelos TBARs (0,4958), PCO (0,4041), GC (0,3567) e GST (0,3299) relacionados as concentrações mais baixas de DCQ (0,6 e 1,8 µg/L). O PC2 representou, aproximadamente 20% da variância e foi caracterizado pelos TG (0,303) e GST (0,6753) relacionados as concentrações mais altas (Figura 9).

Na análise de componentes principais (ACP) dos biomarcadores do corpo, aproximadamente 30% da variância pode ser atribuída ao Componente 1 (PC1) representado pelos AST (0,3485), GST (0,3226), ALT (0,2730), LDH (0,1852) e Ig (0,2590) relacionados as concentrações mais altas de DCQ e ALP (0,2745), PCO (0,2182) e TBARs (0,076) relacionados a concentração 1,8 µg/L. O PC2 representou, aproximadamente 19% da variância e foi caracterizado pelos ALT (0,4212), PT (0,3386) e GC (0,2846) relacionados a concentração 0,6 µg/L e ao controle (Figura 10).

Nesse cenário os biomarcadores que foram mais responsivos na ACP para a exposição ao DCQ foram TBARs>PCO>GC>GST no cérebro e AST>GST>ALP>ALT>Ig no corpo de *D. rerio*.

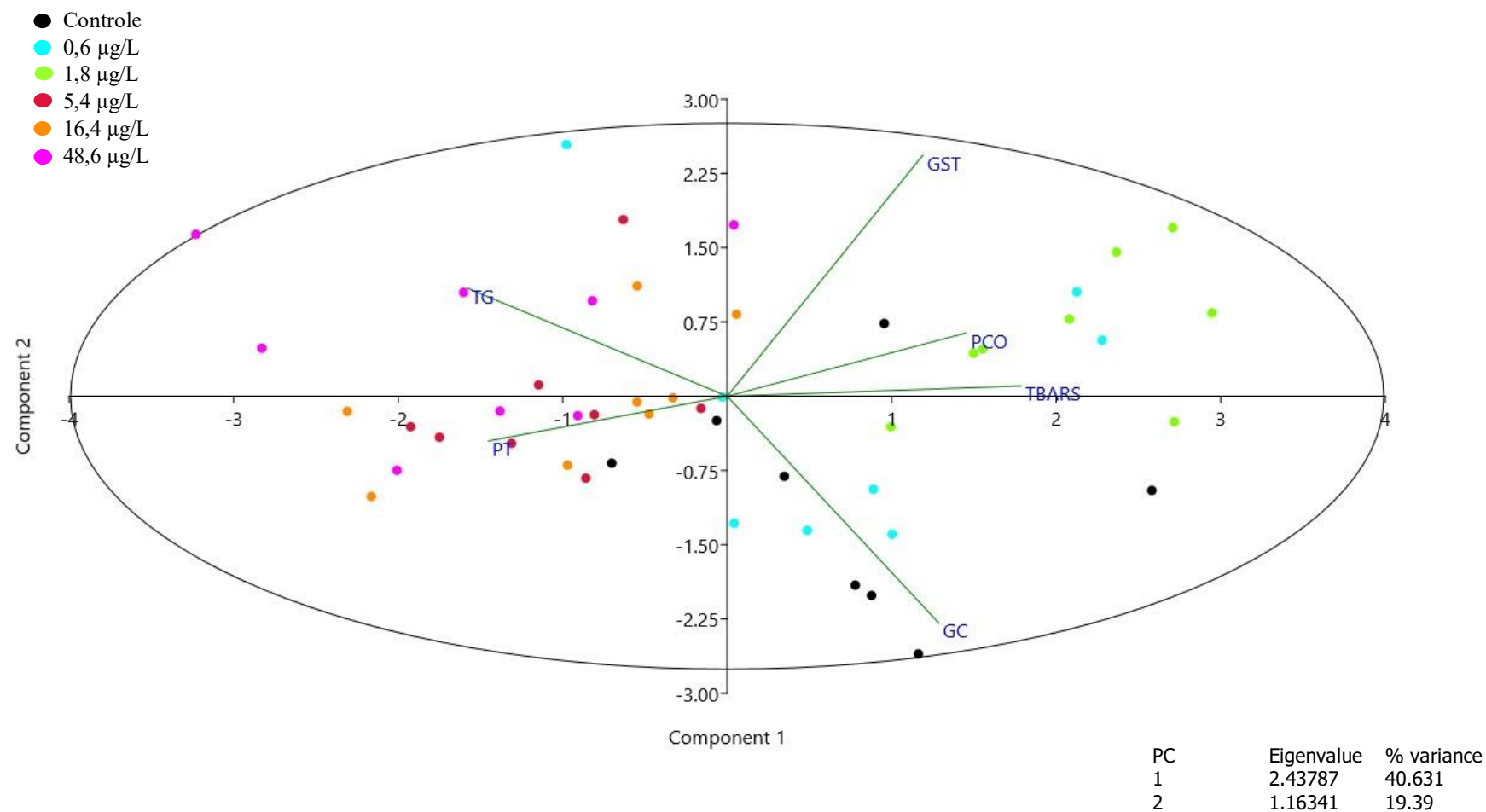


Figura 9. Análise de Componentes Principais (ACP) de biomarcadores no cérebro de *Danio rerio* expostos ao Difosfato de Cloroquina (DCQ). PT proteínas totais; GC glicose; TG triglicerídeos, PCO proteínas carboniladas; TBARs espécies reativas do ácido tiobarbitúrico; GST glutationa S-transferase.

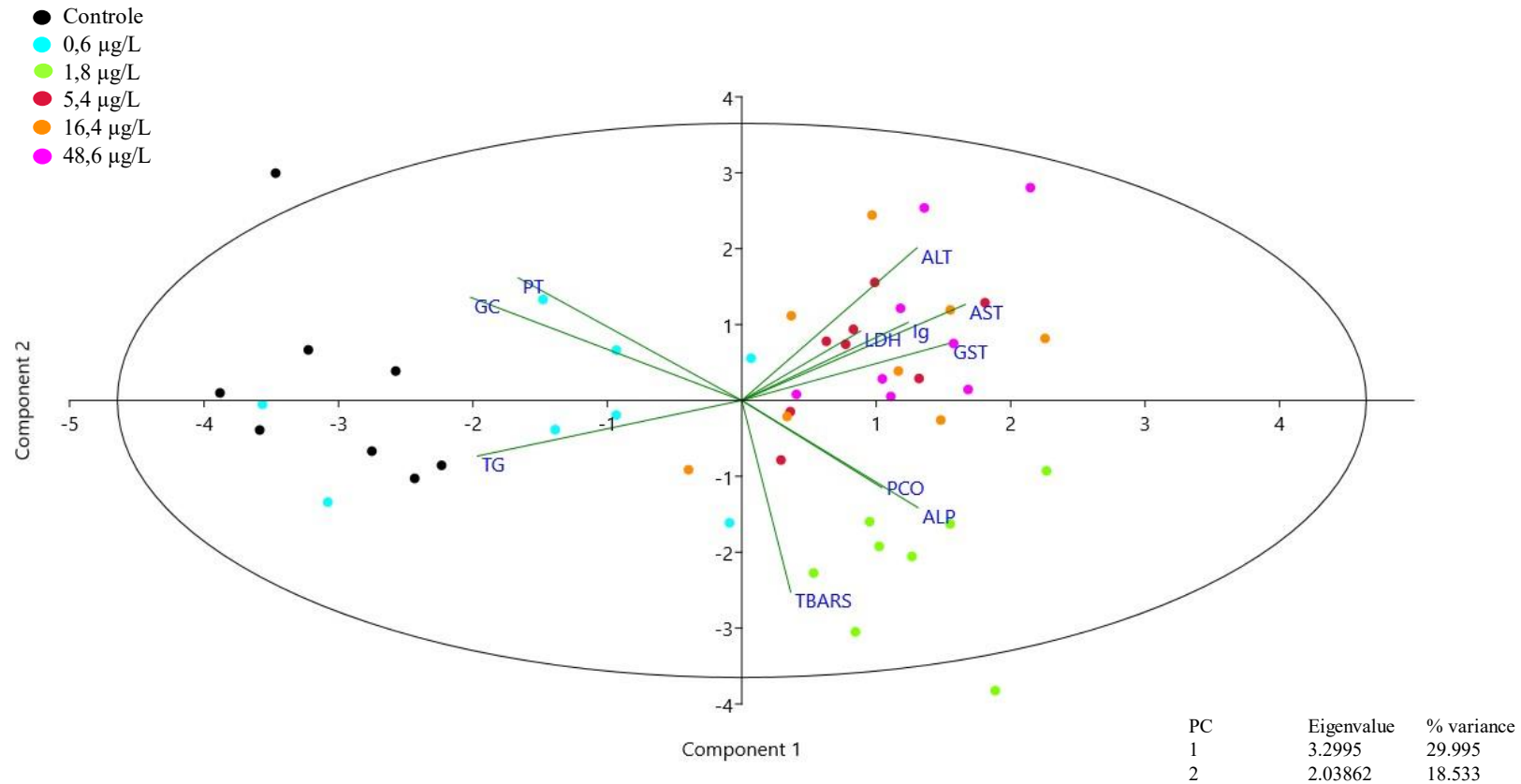


Figura 10. Análise de Componentes Principais (ACP) de biomarcadores no corpo de *Danio rerio* expostos ao Difosfato de Cloroquina (DCQ). PT proteínas totais; GC glicose; TG triglicerídeos, PCO proteínas carboniladas; TBARS espécies reativas do ácido tiobarbitúrico; GST glutationa S-transferase; AST aspartato aminotransferase; ALT alanina aminotransferase; ALP fosfatase alcalina; LDH lactato desidrogenase; Ig imunoglobulinas.

5. DISCUSSÃO

O ambiente aquático é afetado por uma variedade de produtos químicos com propriedades diferentes e que impactam o ambiente e a biota aquática. O presente estudo demonstrou que as concentrações crescentes de DCQ foram importantes para o estudo das respostas biológicas de *D. rerio*.

O aumento das proteínas totais no cérebro dos animais expostos a partir de 5,4 µg/L de DCQ observado nesse estudo, pode ter acontecido devido ao fármaco, assim como outros compostos, provocarem uma modulação no metabolismo destas moléculas como sua estimulação (Smet; Blust, 2001; Saha *et al.*, 2023). De acordo com Jancsó; Hermesz (2015) a adaptação celular provocada pela exposição a agentes químicos, ocorre em associação com aumento na expressão de genes distintos de proteínas envolvidas no estresse oxidativo.

A redução das proteínas totais observadas no corpo de *D. rerio*, evidenciado a partir da concentração 1,8 µg/L de DCQ, pode ser consequência da destruição do tecido, perturbação celular e ao comprometimento da síntese proteica, isso porque durante o estresse, as proteínas também são usadas como fonte de energia (Roberts *et al.*, 2010; Naqvi *et al.*, 2017; Younas *et al.*, 2022). Além disso, a depleção proteica pode resultar da adaptação fisiológica, aumento da atividade proteolítica, danos ao DNA, alterações no equilíbrio hormonal e das atividades enzimáticas (Nwani *et al.*, 2015; Banaee *et al.*, 2016). Naqvi *et al.* (2017) demonstraram que os pesticidas como cipermetrina, malatião, clorpirifós alteraram o metabolismo das proteínas em peixes, afetando a taxa de síntese e degradação. Similarmente ao observado nesse estudo, Mendonça-Gomes *et al.* (2022) observaram a diminuição da proteína total em *D. rerio* expostos por 72h a 12,5 µg/L de hidroxicloroquina (HCQ).

A glicose apresentou uma redução no cérebro na exposição a 48 µg/L e no corpo a partir de 1,8 de µg/L de DCQ. Essa redução do potencial glicolítico pode se relacionar ao aumento da demanda energética nos processos de desintoxicação dos órgãos para lidar com os efeitos tóxicos do contaminante (Soengas, 2002; Polakof *et al.*, 2012; Arzate-Cárdenas; Martínez-Jerónimo, 2012). No caso da cloroquina (CQ), diferentes estudos demonstraram seu efeito hipoglicemiante, *in vitro* e *in vivo*, com o metabolismo hepático da insulina aumentando, após determinadas doses, a ligação ao seu receptor, potenciando a ação na redução da glicose (Hage *et al.*, 2014). Enquanto os glicocorticóides parecem ter uma ação hiperglicemiante em peixes (Hamilton *et al.*, 2022).

No cérebro dos peixe-zebra nesse estudo, foi visto um aumento de triglicerídeos a partir de 16,2 µg/L que pode ser em função deste órgão ter maior teor de lipídeos, que desempenham

funções estruturais e de sinalização a mudanças no seu metabolismo, que podem indicar suscetibilidade a doenças cerebrais degenerativas (Hernández-Cáceres, 2023). Estudos sobre a concentração de lipídeos em cérebros de peixes são escassos, e os mecanismos que levam ao aumento e as suas consequências precisam ser elucidados.

Neste estudo, a redução dos triglicerídeos no corpo ocorreu em 21 dias de exposição a partir da concentração 5,4 µg/L, o que também foi observado em *D. rerio* expostos por 72h a 12 µg/L de HQ (Mendonça-Gomes *et al.*, 2022). A CQ tem sido associada a redução dos níveis metabólicos de triglicerídeos (Wong, 2021), um dos motivos pelos quais é um medicamento amplamente utilizado no controle de doenças cardiovasculares, lúpus eritematoso sistêmico e doenças reumáticas em humanos (Morris *et al.*, 2011; Cairoli *et al.*, 2012; Masui *et al.*, 2019).

Além disso, os triglicerídeos são utilizados como fonte de energia, onde o corpo aumenta a lipólise, quebrando os triglicerídeos em ácidos graxos e glicerol, para processos de desintoxicação e para superar o estresse fisiológico (Shahjahan *et al.*, 2022). Uma vez que os triglicerídeos constituem as gotículas lipídicas do fígado protegendo os hepatócitos da lipotoxicidade, o estresse oxidativo por EROs pode causar distúrbios no metabolismo lipídico, como regulação das enzimas (Chen *et al.*, 2020).

Além dessas macromoléculas, foi observado que a produção de Ig no muco de *D. rerio* aumentou nas exposições de 5,4 e 48,6 µg/L ao DCQ. A Cloroquina é conhecida por suas propriedades imunomoduladoras (Peng *et al.*, 2022), o que pode afetar a resposta imune dos peixes expostos como mecanismo de defesa contra possíveis danos celulares e estresse oxidativo induzidos pelo composto, recrutando e ativando várias células do sistema imunológico no muco de peixes, entre elas as imunoglobulinas (Lieke *et al.*, 2024).

Outros compostos químicos detectados no meio ambiente que também induziram a resposta imunológica em peixes, como o nitrato de prata, nanopartículas de óxido de zinco, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, etc (Luebke *et al.*, 1997; Hawkins *et al.*, 2014; Rashidian *et al.*, 2021). O aumento da concentração de Ig no muco pode, portanto, contribuir para a defesa do organismo contra doenças (Segner *et al.*, 2012), pois representam o principal componente do sistema imunológico humoral em todas as classes de vertebrados, incluindo os peixes (Verma *et al.*, 2012). Ademais, este aumento também ocasiona demanda energética e pode ser compensada por outros componentes na tentativa de manter a homeostase.

Além dos biomarcadores metabólicos e imunológico, as alterações na atividade enzimática são excelentes índices para o diagnóstico de distúrbios toxicológicos (Safahieh *et al.*, 2010; Sepperumal; Saminathan, 2014). A atividade das enzimas metabólicas pode ser

aumentada ou reduzida, devido a desnaturação ou distorção do sítio ativo pelos efeitos dos poluentes, ou ainda, em resposta a demanda energética (Saha *et al.*, 2023).

Neste estudo, o aumento dependente da concentração de DCQ nas atividades das enzimas AST, ALT, ALP e LDH no corpo de *D. rerio* pode indicar uma descompensação metabólica provocado pela exposição crônica ao fármaco, uma vez que as atividades dessas enzimas em animais aquáticos expostos a medicamentos farmacêuticos refletem a toxicidade farmacêutica hepática (Li *et al.*, 2010; Malarvizhi *et al.*, 2012).

O aumento da AST e ALT é considerado como um sinal clínico para diagnóstico de danos celulares e teciduais como alterações nos hepatócitos que levam a degeneração e hipofunção do fígado, necrose e inflamação, bem como indicativo de doença em peixes (Firat *et al.*, 2011; Zaman *et al.*, 2024). Além disso, pode indicar uma atividade compensatória destas enzimas para disponibilizar substratos e manter o funcionamento do ciclo de Krebs com fornecimento de intermediários metabólicos em uma situação de estresse (Tretter; Adam-Vizi, 2000; Banaee *et al.*, 2011; Mauro *et al.*, 2021; Younas *et al.*, 2022; Impellitteri *et al.*, 2023).

Estudos em peixes com diferentes fármacos indicaram um aumento destas enzimas em *D. rerio* exposto ao cetoprofeno (Rangasamy *et al.*, 2018). *Cirrhinus mrigala* exposta ao ibuprofeno (Saravanan *et al.*, 2012), *Cirrhinus mrigala* exposta ao ácido clofibrico e diclofenaco (Saravanan *et al.*, 2013) e *Cyprinus carpio* expostos à Cloroquina (Ramesh *et al.*, 2018).

A ALP é frequentemente sintetizada no fígado, ossos e, em menor grau, no intestino e rins (Telega, 2018), sendo uma metaloenzima onipresente ligada à membrana, essencial em processos fisiológicos, incluindo fosforilação de proteínas, crescimento celular, apoptose e migração celular (Sharma *et al.*, 2014). Portanto, dano à membrana celular pode alterar a atividade da enzima ALP, e indicar apoptose celular, obstrução dos ductos biliares, cálcio no sangue (hiperparatireoidismo), deficiência de vitamina D ou danos nas células do fígado (Banaee *et al.*, 2019; Sharma *et al.*, 2014). Além disso, o aumento de espécies reativas ao oxigênio (EROs) também podem elevar a atividade desta enzima (Banaee, 2020). Similar ao que foi observado neste estudo, Mikula *et al.*, (2024) verificaram aumento na atividade dessa enzima no plasma de carpas, *Cyprinus carpio* expostas aos anti-inflamatórios diclofenaco e ibuprofeno.

O aumento de enzimas da via glicometabólica, para produzir energia para a manutenção das atividades biológicas do organismo, como a LDH indica que a capacidade do fígado em armazenar ou sintetizar glicogênio foi reduzida (Zhang *et al.*, 2023). Outros estudos demonstraram um aumento da enzima em peixes expostos a anti-inflamatórios (Rangasamy *et*

al., 2018; Priyadarshinee *et al.*, 2023). O aumento da LDH no corpo de *D. rerio* exposto a 48,6 µg/L DCQ sugere aumento de produção de energia devido a um elevado estado de estresse oxidativo com consequente dano oxidativo corroborado pelo o aumento da atividade da GST e dos níveis de PCO e TBARs.

Como produto mais comum da oxidação de proteínas induzida por EROs, as vias de carbonilação de proteínas podem ser divididas em oxidação direta, oxidação catalisada por metal, reação com açúcares livres e produtos de peroxidação lipídica (Fedorova; Bollineni; Hoffmann, 2014). Devido à oxidação da cadeia lateral de alguns aminoácidos (Arg, Lys, His e Pro) ou à oxidação dos resíduos Asp, Pro e Glu, a carbonilação pode ser considerada como um indicador permanente e destrutivo da oxidação de proteínas (Hawkins; Davies, 2001; Nystrom, 2005; Hematyar *et al.*, 2019) e associada a diversas doenças (Fagan *et al.*, 1999; Gonos *et al.*, 2018).

O aumento dos níveis de PCO, no cérebro e no corpo (1,8 µg/L DCQ), como efeito da oxidação de proteínas, pode estar ligado a níveis aumentados de radicais como um resultado integrado de dano oxidativo, além de indicar que o metabolismo normal da proteína foi prejudicado devido a ação de DCQ no organismo. Similarmente aos nossos achados, peixes expostos a anti-inflamatórios também apresentaram um aumento na produção de PCO (Sibiya *et al.*, 2023).

Um aumento nos níveis de PCO pode indicar que o metabolismo normal da proteína foi interrompido, resultando no acúmulo de moléculas danificadas (Almroth *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2020). Almeida *et al.*, (2021) observaram em *Astyanax altiparanae* expostos a imidacloprida que o estresse oxidativo leva à substituição de proteínas oxidadas por proteínas recém-sintetizadas. Da mesma forma, pode ter acontecido para a PCO do cérebro de *D. rerio* que aumentou somente na exposição 1,8 µg/L, mas nas concentrações seguintes não diferiu do controle. Embora estudos relacionando a PCO em peixes expostos a fármacos de ocorrência e persistência ambiental sejam importantes, ainda são escassos, sendo necessários mais pesquisas para compreensão dos seus efeitos.

Outro biomarcador que reflete o estresse oxidativo é o TBARs, sendo um produto importante da peroxidação lipídica após ataque de radicais livres nas membranas biológicas (Al-Ghanim *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017). Os aldeídos e cetonas fazem a varredura para reticulação com porções nucleofílicas de proteínas, ácidos nucleicos e aminofosfolipídios, e níveis maiores de TBARS resultam em aumento da citotoxicidade e danos acelerados às células e tecidos (Buege, 1978; Xu *et al.*, 2021).

A diminuição de TBARs no cérebro de *D. rerio* a partir da exposição na concentração de 5,4 µg/L DCQ pode indicar diminuição de radicais e combate dos mesmos pelos sistemas antioxidantes, conforme relatado no estudo de Nunes *et al.* (2015) no peixe *Gambusia holbrooki* expostas a tetraciclina. Ou, ainda, que o estresse oxidativo levou a substituição de lipídios peroxidados por lipídios recém-sintetizados (Almeida *et al.*, 2021). Também é importante considerar que a técnica utilizada de TBARs detecta o produto final da peroxidação lipídica, como o MDA, outras técnicas medem diretamente os equivalentes de hidroperóxidos de lipídeos (método de Fe(III) xilenol orange complex formation - FOX) (Hermes-Lima *et al.*, 1995; Abuzaytoun *et al.*, 2020). Desta forma, mesmo que os níveis de TBARs tenham diminuído pode haver formação de outras espécies de radicais que não foram detectados neste estudo.

Já o aumento na produção de TBARs, ou seja, lipídeos que sofreram um dano oxidativo, observado no corpo de *D. rerio* exposto a 1,8 µg/L DCQ, pode resultar em danos as membranas celulares e alterações em macromoléculas (DNA e proteínas) (Van Der Oost; Beyer; Vermeulen, 2003; Li *et al.*, 2022). O estudo de Mendonça-Gomes *et al.*, (2022) demonstrou a produção de TBARs em peixe-zebra após a exposição de 72h a HCQ. Guerra *et al.*, (2021) descrevem uma relação entre o aumento da atividade de GST e diminuição de TBARs em peixe-zebra expostos a imidacloprido. Então é possível que o TBARs no corpo dos peixes expostos ao DCQ não tenha variado com o controle nas concentrações mais altas como resultado da atividade da GST.

A enzima GST tem a função de catalisar a conjugação de compostos (xenobióticos) com a glutatona reduzida para desintoxicação, além de catalisar diversos compostos endógenos incluindo produtos do estresse oxidativo, assim, sua atividade reflete a influência das EROs no organismo e sua capacidade antioxidante (Glasic *et al.*, 2015). A exposição ao DCQ causou a indução do GST, tanto no cérebro como no corpo de peixe-zebra, indicando ação da GST sobre o fármaco, ou em seus metabólitos, para eliminação pelo organismo ou para desintoxicação pelas enzimas da fase I, ou, ainda, no combate ao estresse oxidativo (Huang *et al.*, 2014; Nunes *et al.*, 2015).

Inicialmente, a atividade da GST no cérebro foi induzida devido ao seu papel protetor, que é semelhante à resposta a baixas concentrações de DCQ (0,6 e 1,8 µg/L). No entanto, o DCQ pode começar a se acumular quando a sua concentração excede a capacidade de desintoxicação e a resposta ao estresse desaparece (Lin *et al.*, 2014). Um aumento na atividade dessa enzima também foi reportado em *D. rerio* exposto a antibióticos (Lin *et al.*, 2014) e anti-inflamatórios (Bartoskova *et al.*, 2015). Assim, podemos observar que na medida que a atividade da GST aumenta, geralmente a produção de alguns biomarcadores de estresse

oxidativo como TBARs e PCO diminuem ou se estabilizam, indicando uma eficiência do sistema de defesa antioxidante.

Neste estudo observamos uma relação de resposta não linear na expressão dos biomarcadores no cérebro. Este é um padrão comum em concentrações mais altas ou exposição prolongada, devido ao receptor ficar saturado e nenhuma resposta adicional ser observada ou o receptor pode até ser regulado negativamente para atingir a homeostase (Vandenberg *et al.*, 2012). Em concentrações maiores do que as utilizadas nesse estudo, essas respostas podem ser totalmente suprimidas ou compensadas, um fenômeno também conhecido como “hormese” (Calabrese *et al.*, 2012; Lyssimachou *et al.*, 2015).

Estas descobertas sugerem que a toxicidade do DCQ o que pode perturbar o equilíbrio redox e alterar as defesas antioxidantes, além de promover uma resposta imunológica adaptativa na tentativa de conter os distúrbios proporcionados pelo fármaco ao organismo. Os valores obtidos na ACP demonstram diferença na resposta dos biomarcadores e as concentrações tiveram papel significativo para isso, indicando que o DCQ no ambiente aquático apresenta risco para os peixes. Isto é preocupante pois os biomarcadores estudados têm um papel fundamental no metabolismo, crescimento, reprodução e migração dos peixes em cenário ambiental e, portanto, alterações na sua homeostase podem resultar em efeitos adversos a nível individual e populacional (Tocher, 2003; Lyssimachou *et al.*, 2015).

6. CONCLUSÃO

O DCQ provocou efeitos em *D. rerio* observados por alterações nos biomarcadores bioquímicos. Os níveis de glicose, proteínas e lipídeos no corpo foram reduzidos após a exposição significando uma resposta compensatória devido a toxicidade do DCQ, que provocou estresse oxidativo nos peixes expostos por meio da produção de PCO e TBARs, e o aumento da atividade da enzima GST, na tentativa do organismo combater os radicais livres e se desintoxicar. No cérebro foi observado um aumento de proteínas e triglicerídeos, além do estresse oxidativo avaliado pelo aumento de PCO e da atividade da GST, embora TBARs tenha diminuído em relação ao controle. O aumento das enzimas AST, ALT, ALP e LDH demonstraram alterações metabólicas como uma resposta ao estresse induzido pelo fármaco. O aumento das Igs nas concentrações mais altas podem ser interpretadas como resposta adaptativa do sistema imune dos peixes, visando proteger o organismo dos efeitos adversos induzidos pelo composto químico. Este estudo, integrando várias respostas bioquímicas, demonstrou o impacto de concentrações de DCQ detectadas no ambiente aquático sobre a fisiologia de peixe-zebra. Entre eles, as atividades das enzimas AST e GST foram os componentes principais para explicar os efeitos sistêmicos dos peixes na exposição crônica ao fármaco.

7. REFERÊNCIAS

- ABHIJITH, B. D.; RAMESH, M.; POOPAL, R. K. Responses of metabolic and antioxidant enzymatic activities in gill, liver and plasma of *Catla catla* during methyl parathion exposure. **The Journal of Basic and Applied Zoology**, v. 77, p. 31-40, 2016.
- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 15088: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com peixes**. Rio de Janeiro, 2022.
- ABUZAYTOUN, R. *et al.* Modification of the ferrous oxidation-xylenol orange method for determination of peroxide value in highly pigmented sea cucumber viscera lipid. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 97, n. 5, p. 509-516, 2020.
- AL-GHANIM, Khalid A. *et al.* Effects of a low-radiotoxicity uranium salt (uranyl acetate) on biochemical and hematological parameters of the catfish, *Clarias gariepinus*. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 34, p. 109-117, 2016.
- ALMEIDA, E.C. *et al.* Can the insecticide Imidacloprid affect the health of the Neotropical freshwater fish *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characidae)? **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 85, p. 103634, 2021.
- ALMROTH, B. C. *et al.* Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparus*), measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers. **Aquatic Toxicology**, v. 73, n. 2, p. 171–180, 2005.
- AMORIM, L.G.A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, p. 158-170, 2003.
- ARZATE-CÁRDENAS, M.A.; MARTÍNEZ-JERÓNIMO, F. Energy reserve modification in different age groups of *Daphnia schoedleri* (Anomopoda: Daphniidae) exposed to hexavalent chromium. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 34, n. 1, p. 106-116, 2012.
- ATLI, G *et al.* Alterations in the serum biomarkers belonging to different metabolic systems of fish (*Oreochromis niloticus*) after Cd and Pb exposures. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 40, n. 2, p. 508-515, 2015.
- BANAE M., *et al.* Evaluation of single and combined effects of cadmium and microplastic particles on biochemical and immunological parameters of common carp (*Cyprinus carpio*). **Chemosphere**, 236: 124335. 2019.
- BANAE M., *et al.* Alkaline phosphatase activity as a biochemical biomarker in aqua-toxicological studies. **International Journal of Aquatic Biology**, v. 8, n. 2, p. 143-147, 2020.

- BANAEI, M. *et al.* Effects of diazinon on biochemical parameters of blood in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 99, n. 1, p. 1-6, 2011.
- BANAEI, M. *et al.* Effects of sub-lethal toxicity of paraquat on blood biochemical parameters of common carp, *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758). **Iranian Journal of Toxicology**, v. 10, n. 6, p. 1-5, 2016.
- BARTOSKOVA, M. *et al.* Evaluation of ibuprofen toxicity for zebrafish (*Danio rerio*) targeting on selected biomarkers of oxidative stress. **Neuroendocrinology Letters**, v. 34, n. 2, p. 102-108, 2013.
- BERGMEYER, H.U. **Methods of Enzymatic Analysis**. Weinheim, Germany: Verlag Chemie, v.2, p. 565, 1974.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BUEGE, J. A. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 52, p. 302-310, 1978.
- CAIROLI, E. *et al.* Hydroxychloroquine reduces low-density lipoprotein cholesterol levels in systemic lupus erythematosus: a longitudinal evaluation of the lipid-lowering effect. **Lupus**, v. 21, n. 11, p. 1178-1182, 2012.
- CALABRESE, E. J. Toxicological awakenings: the rebirth of hormesis as a central pillar of toxicology. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 204, n. 1, p. 1-8, 2005.
- CEREZUELA, R.; GUARDIOLA, F. A.; CUESTA, A.; ESTEBAN, M. A. Enrichment of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) diet with palm fruit extracts and probiotics: effects on skin mucosal immunity. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 49, p. 100-109, 2016.
- CHEN, J.; LIU, N.; LI, B.; ZHANG, H.; ZHAO, Y.; CAO, X. The effects of fipronil exposure on oxidative stress, non-specific immunity, autophagy, and apoptosis in the common carp. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 27799–27810, 2021.
- CHEN, ZE, RUIFENG TIAN, ZHIGANG SHE, JINGJING CAI, AND HONGLIANG LI. "Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease." **Free Radical Biology and Medicine**. v. 152, p. 116-141, 2020.
- DALLE-DONNE, I. *et al.* Protein carbonylation in human diseases. **Trends in Molecular Medicine**. v.9, n.4, p. 169-176. 2003.
- DASH, S. *et al.* Epidermal mucus, a major determinant in fish health: a review. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 19, n. 2, p. 72, 2018.

- ELLIS, R. P. *et al.* Immunological function in marine invertebrates: Responses to environmental perturbation. **Review. Fish & Shellfish Immunology**, v. 30, n. 6, p. 1209-1222, 2011.
- FEDERICI, G.; SHAW, B. J.; HANDY, R. D. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. **Aquatic Toxicology**, v. 84, n. 4, p. 415-430, 2007.
- FEDOROVA, M.; BOLLINENI, R. C.; HOFFMANN, R. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. **Mass Spectrometry Reviews**. v.33, n.2, p. 79-97. 2014.
- FEDOROVA, M.; BOLLINENI, R.C.; HOFFMANN, R. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 33, n. 2, p. 79-97, 2014.
- FIRAT, Ö *et al.* A comparative study on the effects of a pesticide (cypermethrin) and two metals (copper, lead) to serum biochemistry of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 37, p. 657-666, 2011.
- GISBERT, E.; NOLASCO, H.; SOLOVYEV, M Towards the standardization of brush border purification and intestinal alkaline phosphatase quantification in fish with notes on other digestive enzymes. **Aquaculture**, v. 487, p. 102-108, 2018.
- GLISIC, B. *et al.* Characterization of glutathione-S-transferases in zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, v. 158, p. 50-62, 2015.
- GONOS, E. S. *et al.* Origin and pathophysiology of protein carbonylation, nitration and chlorination in age-related brain diseases and aging. **Aging (Albany NY)**, v. 10, n. 5, p. 868, 2018.
- GORA, A. H. *et al.* Metabolic and haematological responses of *Labeo rohita* to dietary fucoidan. **Journal of Applied Animal Research**, v.46, p. 1042-1050, 2018.
- GUERRA, Luciana Joner *et al.* Biochemical and behavioral responses in zebrafish exposed to imidacloprid oxidative damage and antioxidant responses. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 81, n. 2, p. 255-264, 2021.
- HAGE, M. P.; AL-BADRI, M. R.; AZAR, S. T. A favorable effect of hydroxychloroquine on glucose and lipid metabolism beyond its anti-inflammatory role. **Therapeutic advances in Endocrinology and Metabolism**, v. 5, n. 4, p. 77-85, 2014.
- HAMILTON, C. M. *et al.* Are synthetic glucocorticoids in the aquatic environment a risk to fish? **Environment International**, v. 162, p. 107163, 2022.

- HAWKINS, A.D. *et al.* Alteration in *Pimephales promelas* mucus production after exposure to nanosilver or silver nitrate. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, n. 12, p. 2869-2872, 2014.
- HAWKINS, C L.; DAVIES, M. J. Generation and propagation of radical reactions on proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1504, n. 2-3, p. 196-219, 2001.
- HEMATYAR, N. *et al.* Relationship between lipid and protein oxidation in fish. **Aquaculture Research**, v. 50, n. 5, p. 1393-1403, 2019.
- HERNÁNDEZ-CÁCERES, M.P. *et al.* Role of lipids in the control of autophagy and primary cilium signaling in neurons. **Neural Regeneration Research**, 2023.
- HUANG, Y *et al.* A novel gigaporous GSH affinity medium for high-speed affinity chromatography of GST-tagged proteins. **Protein Expression and Purification**, v. 95, p. 84-91, 2014.
- IMPELLITTERI, F *et al.* Exploring the Impact of Contaminants of Emerging Concern on Fish and Invertebrates Physiology in the Mediterranean Sea. **Biology**, v. 12, n. 6, p. 767, 2023.
- JANCSÓ, Z.; HERMESZ, E. Impact of acute arsenic and cadmium exposure on the expression of two haeme oxygenase genes and other antioxidant markers in common carp (*Cyprinus carpio*). **Journal of Applied Toxicology**, v. 35, n. 3, p. 310-318, 2015.
- KADIM, M. K.; RISJANI, Y. Biomarker for monitoring heavy metal pollution in aquatic environment: An overview toward molecular perspectives. **Emerging Contaminants**, v. 8, p. 195-205, 2022.
- KEEN, JAMES H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 20, p. 6183-6188, 1976.
- KELLER, J. M.; KELLER, E. T. The use of mature zebrafish (*Danio rerio*) as a model for human aging and disease. *In: Conn's Handbook of Models for Human Aging*. Academic Press, p. 351-359, 2018.
- KHAN, A. *et al.* Quantitative determination of lethal concentration LC_{50} of atrazine on biochemical parameters; total protein and serum albumin of freshwater fish grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 25, n. 4, p. 1555-1561, 2016.
- KROON, F.; STRETEN, C.; HARRIES, S. A protocol for identifying suitable biomarkers to assess fish health: A systematic review. **PLoS One**, v. 12, n. 4, p. e0174762, 2017.

- KRUGER, N. J. **The Bradford method for protein quantitation. In: The protein protocols handbook.** Totowa, New Jersey: Humana Press, p. 17-24, 2009.
- LABTEST DIAGNÓSTICA. **ALT/GPT Ref. 108.** Disponível em https://labtest.com.br/wp-content/uploads/2016/09/INS_USO_108_EdicaoJulho1994_RevAgosto2022_Ref12072303_Port_.pdf Acesso em 20 de outubro de 2023.
- LABTEST DIAGNÓSTICA. **AST/GOT Ref. 109.** Disponível em https://labtest.com.br/wp-content/uploads/2016/09/AST_GOT_Liquiform_109_Port.pdf Acesso em 20 de outubro de 2023.
- LABTEST DIAGNÓSTICA. **Fosfatase Alcalina Ref. 79.** Disponível em https://labtest.com.br/wp-content/uploads/2016/09/Ref_79_RevMaio2011_Ref280113_Port.pdf Acesso em 20 de outubro de 2023.
- LABTEST DIAGNÓSTICA. **Glicose Ref. 133.** Disponível em https://labtest.com.br/wp-content/uploads/2016/09/Ref_133_Edi%C3%A7%C3%A3oDezembro2011_Ref050219_Port.pdf Acesso em 20 de outubro de 2023.
- LABTEST DIAGNÓSTICA. **Triglicérides Ref. 87.** Disponível em https://labtest.com.br/wp-content/uploads/2016/09/Ref_87_RevJulho2014_Ref260117_Port.pdf Acesso em 20 de outubro de 2023.
- LEVINE, R. L. *et al.* Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *In: Methods in Enzymology.* Academic press, 1994. p. 346-357.
- LI, D. *et al.* Bioaccumulation and oxidative damage of polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures in Manila clam *Ruditapes philippinarum*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 197, p. 110558, 2020.
- LI, H. *et al.* Research progress of zebrafish model in aquatic ecotoxicology. **Water**, v. 15, n. 9, p. 1735, 2023.
- LI, X. *et al.* Evaluation of DNA damage, biomarkers of oxidative stress, and status of antioxidant enzymes in freshwater fish (*Labeo rohita*) exposed to pyriproxyfen. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2022, n. 1, p. 5859266, 2022.
- LI, Z. H. *et al.* Hepatic antioxidant status and hematological parameters in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, after chronic exposure to carbamazepine. **Chemico-biological Interactions**, v. 183, n. 1, p. 98-104, 2010.
- LIEKE, T. *et al.* Fulvic acid modulates mucosal immunity in fish skin: Sustainable aquaculture solution or environmental risk factor? **Journal of Hazardous Materials**, p. 133737, 2024.

- LIN, T. *et al.* Integrated biomarker responses in zebrafish exposed to sulfonamides. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 38, n. 2, p. 444-452, 2014.
- LUEBKE, R.W. *et al.* Aquatic pollution-induced immunotoxicity in wildlife species. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 37, n. 1, p. 1-15, 1997.
- LUSHCHAK, V. I. Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 42, p. 711-747, 2016.
- LUSHCHAK, V. I. Free radical oxidation of proteins and its relationship with functional state of organisms. **Biochemistry (Moscow)**, v. 72, n. 8, p. 809-827. 2007.
- LYSSIMACHOU, A. *et al.* The mammalian “obesogen” tributyltin targets hepatic triglyceride accumulation and the transcriptional regulation of lipid metabolism in the liver and brain of zebrafish. **PLoS One**, v. 10, n. 12, p. e0143911, 2015.
- MAACK, G.; SEGNER, H. Morphological development of the gonads in zebrafish. **Journal of Fish Biology**, v. 62, n. 4, p. 895-906, 2003.
- MAGALHÃES, C. R. *et al.* Protein changes as robust signatures of fish chronic stress: a proteomics approach to fish welfare research. **BMC Genomics**, v. 21, p. 1-16, 2020.
- MALARVIZHI, A. *et al.* Carbamazepine (CBZ) induced enzymatic stress in gill, liver and muscle of a common carp, *Cyprinus carpio*. **Journal of King Saud University-Science**, v. 24, n. 2, p. 179-186, 2012.
- MANNERVIK, B *et al.* Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, n. 21, p. 7202-7206, 1985.4
- MANNERVIK, B. Versatility of Glutathione Transferase Proteins. **Biomolecules**, v. 13, n. 12, p. 1749, 2023.
- MASUI, Y *et al.* Effects of anti-malarial drug, hydroxychloroquine, on glucose and lipid metabolism in Japanese population. **Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 9, n. 5, p. 159-164, 2019.
- MAURO, M *et al.* Human drug pollution in the aquatic system: the biochemical responses of *Danio rerio* adults. **Biology**, v. 10, n. 10, p. 1064, 2021.
- MIKULA, P. *et al.* Long-term dietary exposure to the non-steroidal anti-inflammatory drugs diclofenac and ibuprofen can affect the physiology of common carp (*Cyprinus carpio*) on multiple levels, even at “environmentally relevant” concentrations. **Science of The Total Environment**, v. 917, p. 170296, 2024.

- MORRIS, S. J. *et al.* Hydroxychloroquine use associated with improvement in lipid profiles in rheumatoid arthritis patients. **Arthritis Care & Research**, v. 63, n. 4, p. 530-534, 2011.
- NAQVI, G.-E.-Z.; SHOAI, N.; ALI, A.M. Pesticides impact on protein in fish (*Oreochromis mossambicus*) tissues. **Indian Journal of Geo Marine Sciences**. v. 46, p. 1864–1868, 2017.
- NWANI, C. D. *et al.* Physiological effects of paraquat in juvenile African catfish *Clarias gariepinus* (Burchfiel 1822). **Journal of Coastal Life Medicine**, v. 3, n. 1, p. 35-43, 2015.
- NYSTRÖM, T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. **The EMBO journal**, v. 24, n. 7, p. 1311-1317, 2005.
- OLIVARES-RUBIO, H. F.; VEGA-LÓPEZ, A. Fatty acid metabolism in fish species as a biomarker for environmental monitoring. **Environmental Pollution**, v. 218, p. 297-312, 2016.
- OMOTOLA, E.O.; OLATUNJI, O. S. Quantification of selected pharmaceutical compounds in water using liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry (LC-ESI-MS). **Heliyon**, v. 6, n. 12, 2020.
- ORGANIZAÇÃO PARA A COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO. **OECD Guidance Document for the Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonadst; OECD: Paris, France, 2009.** Disponível em <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/42140701.pdf> Acesso em 20 de janeiro de 2021.
- ORGANIZAÇÃO PARA A COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO. **OECD, Guidelines for the Testing of Chemicals, Test No. 203: Fish Acute Toxicity Test; OECD: Paris, France, 2019.** Disponível em <https://doi.org/10.1787/9789264069961-en>. Acesso em 20 de janeiro de 2021.
- PALAKSHA, K. J.; SHIN, G. W.; KIM, Y. R.; JUNG, T. S. Evaluation of non-specific immune components from the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 24, n. 4, p. 479-488, 2008.
- PARVEZ, S.; RAISUDDIN, S. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 20, n. 1, p. 112-117, 2005.
- PEATMAN, E. *et al.* Physiology and immunology of mucosal barriers in catfish (*Ictalurus spp.*). **Tissue Barriers**, v. 3, n. 4, p. e1068907, 2015.

- PENG, C. *et al.* Chloroquine treatment influences immunological memory through the PD-1/PD-L1 pathway during the initiation of *Plasmodium chabaudi* infection. **International Immunopharmacology**, v. 113, p. 109403, 2022.
- PISOSCHI, A. M. *et al.* Oxidative stress mitigation by antioxidants-an overview on their chemistry and influences on health status. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 209, p. 112891, 2021.
- POLAKOF, S. *et al.* Glucose metabolism in fish: a review. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 182, p. 1015-1045, 2012.
- PRIYADARSHINEE, S.; UMAMAHESWARI, S.; RAMESH, M. Non-steroidal Anti-inflammatory Drug (NSAID) Naproxen-Induced Hepatotoxicity in a Freshwater Fish *Labeo rohita*. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 234, n. 1, p. 28, 2023.
- RAMESH, M.; ANITHA, S.; POOPAL, R. K.; SHOBANA, C. Evaluation of acute and sublethal effects of chloroquine (C₁₈H₂₆ClN₃) on certain enzymological and histopathological biomarker responses of a freshwater fish *Cyprinus carpio*. **Toxicology Reports**, v. 5, p. 18-27, 2018.
- RAMESH, M.; SANKARAN, M.; VEERA-GOWTHAM, V.; POOPAL, R. K. Hematological, biochemical and enzymological responses in an Indian major carp *Labeo rohita* induced by sublethal concentration of waterborne selenite exposure. **Chemico-biological Interactions**, v. 207, p. 67-73, 2014.
- RANGASAMY, B. *et al.* Developmental toxicity and biological responses of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to anti-inflammatory drug ketoprofen. **Chemosphere**, v. 213, p. 423-433, 2018.
- RASHIDIAN, G. *et al.* Chemically and green synthesized ZnO nanoparticles alter key immunological molecules in common carp (*Cyprinus carpio*) skin mucus. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 6, p. 3270, 2021.
- ROBERTS, R. J. *et al.* Heat shock proteins (chaperones) in fish and shellfish and their potential role in relation to fish health: a review. **Journal of Fish Diseases**, v. 33, n. 10, p. 789-801, 2010.
- ROMBOUT, J. H. W. M. *et al.* Differences in mucus and serum immunoglobulin of carp (*Cyprinus carpio* L.). **Developmental & Comparative Immunology**, v. 17, n. 4, p. 309-317, 1993.
- SAFAHIEH, A. *et al.* Effect in vitro exposure of mercury chloride on phosphatase enzymes in yellowfin sea bream (*Acanthopagrus Latus*). **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 2, n. 4, p. 208-14, 2010.

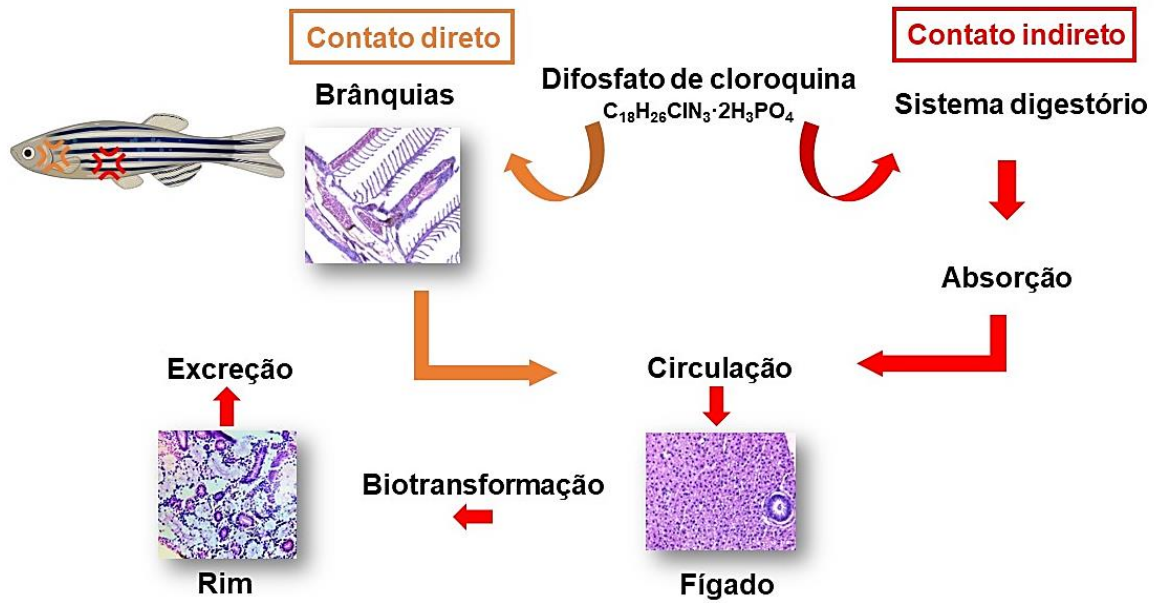
- SAHA, S. *et al.* Sub-lethal acute effects of environmental concentrations of inorganic mercury on hematological and biochemical parameters in walking catfish, *Clarias batrachus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 264, p. 109511, 2023.
- SAHA, S.; SAU, D.; HAZRA, T. Economic viability analysis of recycling waste plastic as aggregates in green sustainable concrete. **Waste Management**, v. 169, p. 289-300, 2023.
- SALIM, S. Oxidative stress and the central nervous system. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 360, n. 1, p. 201-205, 2017.
- SALINAS, I. *et al.* Mucosal immunoglobulins of teleost fish: A decade of advances. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 121, p. 104079, 2021.
- SARAVANAN, M. *et al.* Effects of Ibuprofen on hematological, biochemical and enzymological parameters of blood in an Indian major carp, *Cirrhinus mrigala*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 34, n. 1, p. 14-22, 2012.
- SARAVANAN, M.; RAMESH, M.; PETKAM, R. Alteration in certain enzymological parameters of an Indian major carp, *Cirrhinus mrigala* exposed to short-and long-term exposure of clofibric acid and diclofenac. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 39, p. 1431-1440, 2013.
- SAU, A. *et al.* Glutathione transferases and development of new principles to overcome drug resistance. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 500, n. 2, p. 116-122, 2010.
- SEGNER, H. *et al.* Immunotoxic effects of environmental toxicants in fish—how to assess them? **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, p. 2465-2476, 2012.
- SEPPERUMAL, U.; SAMINATHAN, S. Modulation of Enzyme activity in *Oreochromis mossambicus* (Tilapia) exposed to Butylbenzylphthalate. **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, v. 1, n. 3, p. 94-98, 2014.
- SHAHJAHAN, M *et al.* Blood biomarkers as diagnostic tools: An overview of climate-driven stress responses in fish. **Science of the Total Environment**, v. 843, p. 156910, 2022.
- SHARMA, U.; PAL, D.; PRASAD, R. Alkaline phosphatase: an overview. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 29, p. 269-278, 2014.
- SIBIYA, A. *et al.* Response of hepatic biochemical parameters and neurotoxicity to carbamazepine and ibuprofen in *Oreochromis mossambicus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, p. 1-13, 2023.

- SILVESTRE, F. Signaling pathways of oxidative stress in aquatic organisms exposed to xenobiotics. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology**, p. 1-13, 2020.
- SIWICKI, A. K.; ANDERSON, D. P.; RUMSEY, G. L. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 41, n. 1-2, p. 125-139, 1994.
- SMET, H.; BLUST, R. Stress responses and changes in protein metabolism in carp *Cyprinus carpio* during cadmium exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 48, n. 3, p. 255-262, 2001.
- SOENGAS, J. L.; ALDEGUNDE, M. Energy metabolism of fish brain. **Comparative Biochemistry And Physiology Part B: Biochemistry And Molecular Biology**, v. 131, n. 3, p. 271-296, 2002.
- TELEGA G.W. Jaundice. *In*: R.M. Kliegma, P.S. Lye, B. Bordini, H. Toth, D. Basel (Eds.). **Nelson Pediatric Symptom-Based Diagnosis**, Elsevier, 2018. p. 255-274.
- TOCHER, D. R. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. **Reviews in Fisheries Science**, v. 11, n. 2, p. 107-184, 2003.
- TRETTNER, L.; ADAM-VIZI, V. Inhibition of Krebs cycle enzymes by hydrogen peroxide: a key role of α -ketoglutarate dehydrogenase in limiting NADH production under oxidative stress. **Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 24, p. 8972-8979, 2000.
- VALERIO-GARCÍA, R. C. *et al.* Exposure to silver nanoparticles produces oxidative stress and affects macromolecular and metabolic biomarkers in the goodeid fish *Chapalichthys pardalis*. **Science of the Total Environment**, v. 583, p. 308-318, 2017.
- VANDENBERG, L. N. *et al.* Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. **Endocrine Reviews**, v. 33, n. 3, p. 378-455, 2012.
- VERMA, V. K. *et al.* Immunostimulatory response induced by supplementation of *Ficus benghalensis* root powder, in the artificial feed the Indian freshwater murrel, *Channa punctatus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 33, n. 3, p. 590-596, 2012.
- VIARENGO, L.D.; BOLOGNESI, C.; FABBRI, E.; KOEHLER, A. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, n. 3, p. 281-300, 2007.
- WILLIAMS, T.A.; BONHAM, L.A.; BERNIER, N.J. High environmental ammonia exposure has developmental-stage specific and long-term consequences on the cortisol stress

- response in zebrafish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 254, p. 97-106, 2017.
- WONG, S. K. Repurposing new use for old drug chloroquine against metabolic syndrome: a review on animal and human evidence. **International Journal of Medical Sciences**, v. 18, n. 12, p. 2673, 2021.
- XIA, Z.; WU, S. Effects of glutathione on the survival, growth performance and non-specific immunity of white shrimps (*Litopenaeus vannamei*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 73, p. 141-144, 2018.
- XU, Z. *et al.* Toxic effects on bioaccumulation, hematological parameters, oxidative stress, immune responses and tissue structure in fish exposed to ammonia nitrogen: a review. **Animals**, v. 11, n. 11, p. 3304, 2021.
- YOUNAS, W. *et al.* Toxicity of synthesized silver nanoparticles in a widespread fish: A comparison between green and chemical. **Science of The Total Environment**, v. 845, p. 157366, 2022.
- ZAMAN, M. *et al.* Physiological and histopathological effects of polystyrene nanoparticles on the filter-feeding fish *Hypophthalmichthys molitrix*. **Science of the Total Environment**, v. 912, p. 169376, 2024.
- ZHANG, J *et al.* Study on the mechanism of liver toxicity induced by acenaphthene in zebrafish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 249, p. 114441, 2023.
- ZHANG, Y.A. *et al.* IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. **Nature Immunology**, v. 11, n. 9, p. 827-835, 2010.
- ZHANG, Z. *et al.* Chlorpyrifos exposure in common carp (*Cyprinus carpio* L.) leads to oxidative stress and immune responses. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 67, p. 604-611, 2017.

Capítulo 3. Histopatologia das brânquias, fígado e rim de *Danio rerio* expostos a diferentes concentrações de Difosfato de Cloroquina

RESUMO GRÁFICO



RESUMO

A pesquisa histológica com peixes é fundamental para entender os efeitos de poluentes emergentes, como o antimalárico e anti-inflamatório Difosfato de Cloroquina (DCQ), que teve seu uso intensificado mundialmente nos últimos anos. Nesse contexto, os biomarcadores branquiais, hepáticos e renais são importantes bioindicadores de exposição e efeitos desse agente estressor. Esse estudo teve como objetivo avaliar as alterações histológicas em peixe-zebra (*Danio rerio*) adulto, após a exposição crônica de 21 dias as concentrações ambientais 0,6; 1,8; 5,4; 16,2 e 48,6 µg/L de DCQ. Após a exposição, os tecidos dos peixes foram coletados, processados (álcool e xilol), impregnados em parafina, corados com hematoxilina-eosina e analisados em microscópio óptico. Foram observados nos peixes expostos, a partir das concentrações de DCQ registradas em águas superficiais (0,6 µg/L e 1,8 µg/L), alterações como hiperplasias, encurtamento lamelar, fusões totais e parciais, aneurismas e o desprendimento do epitélio branquial, nas brânquias; alterações nucleares, vacuolização e degeneração citoplasmáticas, no fígado; dilatação tubular, oclusão de luz, alterações nos néfrons, aumento glomerular e redução do espaço de Bowman, no rim. O Índice de Alteração Histológica (IAH) demonstrou que após a exposição ao DCQ, os órgãos foram de levemente a moderadamente modificados, com exceção dos rins que estiveram dentro da normalidade. A análise de componentes principais (ACP) indicou que os biomarcadores mais responsivos a exposição do fármaco foram a dilatação do seio venoso central para as brânquias, núcleos picnóticos para fígado e a redução do espaço de Bowman para o rim. Estes resultados fornecem informações valiosas sobre a ecotoxicidade do DCQ em concentrações ambientalmente relevantes em peixes, contribuindo para a definição de biomarcadores mais sensíveis para o monitoramento ambiental.

Palavras-chave: Biologia celular, tecidos, microscopia, patologia.

ABSTRACT

Histological research with fish is essential to understand the effects of emerging pollutants, such as the antimalarial and anti-inflammatory drug Chloroquine Diphosphate (CQD), which has seen increased use worldwide in recent years. In this context, gill, liver and kidney biomarkers are important bioindicators of exposure and effects of this stressor. This study aimed to evaluate histological changes in adult zebrafish (*Danio rerio*) after chronic exposure of 21 days to environmental concentrations of 0.6; 1.8; 5.4; 16.2 and 48.6 $\mu\text{g/L}$ of DCQ. After exposure, fish tissues were collected, processed (alcohol and xylene), embedded in paraffin, stained with hematoxylin-eosin and analyzed under an optical microscope. In exposed fish, changes such as hyperplasia, lamellar shortening, total and partial fusions, aneurysms and detachment of the gill epithelium were observed in the gills; nuclear changes, vacuolization and cytoplasmic degeneration in the liver; tubular dilation, lumen occlusion, changes in the nephrons, glomerular enlargement and reduction of Bowman's space in the kidney were observed based on the concentrations of CQD recorded in surface waters (0.6 $\mu\text{g/L}$ and 1.8 $\mu\text{g/L}$). The Histological Change Index (HII) showed that after exposure to CQD, the organs were slightly to moderately modified, with the exception of the kidneys, which were within normal limits. Principal component analysis (PCA) indicated that the biomarkers most responsive to drug exposure were dilation of the central venous sinus for the gills, pyknotic nuclei for the liver and reduction of Bowman's space for the kidney. These results provide valuable information on the ecotoxicity of CQD at environmentally relevant concentrations on fish, contributing to the definition of more sensitive biomarkers for environmental monitoring.

Key words: Cell biology, tissues, microscopy, pathology.

1. INTRODUÇÃO

Para estabelecer diretrizes para a regulamentação de substâncias antropogênicas no ambiente, deve ser determinado o potencial de produtos químicos afetarem negativamente a vida selvagem e os seres humanos, bem como as concentrações de exposição nas quais ocorrem efeitos adversos (Wolf, 2021). Neste sentido, o peixe-zebra é um organismo modelo para avaliar a toxicidade e segurança de medicamentos, uma vez que os perfis de toxicidade dos humanos e do peixe-zebra são surpreendentemente semelhantes (McGrath; Li; 2008; Li *et al.*, 2023).

Balula (2011) destaca que, dentre os biomarcadores que devem ser utilizados nos estudos da ecotoxicologia moderna, estão os histológicos, por meio de índices, adequando-se as análises qualitativas com os riscos que tais alterações representam, considerando-se as frequências de alterações detectadas. Um dos principais pontos fortes da histopatologia é que ela facilita a documentação de alterações em uma variedade de tecidos e órgãos sem suposições a priori relacionadas a uma doença específica, e o pequeno tamanho do peixe permite o exame de essencialmente todos os órgãos em uma lâmina usando imagens sagitais (Kent *et al.*, 2020).

Embora os dados qualitativos sejam utilizados para estudar as patologias causadas pelos poluentes ambientais, os dados quantitativos de tais alterações demonstram melhor as reações dos organismos aos poluentes (Ayas *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2009; Balula, 2011; Wolf *et al.*, 2015). Portanto, os biomarcadores histológicos qualitativos e quantitativos são respostas de elevada sensibilidade por refletirem a atuação de poluentes nos sistemas biológicos.

Em peixes, os órgãos frequentemente avaliados em estudos histológicos são as brânquias, o fígado e os rins, pois apresentam elevada atividade metabólica e, juntos, são responsáveis pela biotransformação e eliminação de substâncias de origem endógena e exógena (Wolf *et al.*, 2015). Além de seu papel na excreção de resíduos, as brânquias são principalmente utilizadas pelos peixes para a oxigenação do sangue e desempenham um papel importante no equilíbrio ácido-base e na osmorregulação (Menke *et al.*, 2011).

No peixe zebra, assim como nos teleósteos, as brânquias ficam posicionadas internamente e são cobertas pelo opérculo, sendo compostas pelos arcos branquiais que sustentam os filamentos branquiais e dão origem às lamelas secundárias (células epiteliais, sustentadas e separadas por células pilares), locais de troca gasosa (Evans *et al.*, 2005; Borges *et al.*, 2019) (Figura 1).

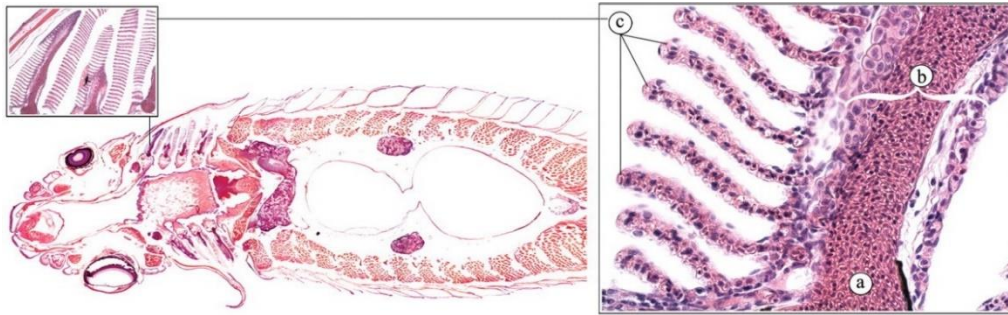


Figura 1. Brânquias de *Danio rerio*. (a) Artéria lamelar; (b) lamela primária; (c) lamela secundária. Aumento de 20x.

Fonte: Menke *et al.* (2011).

Como as brânquias estão diretamente expostas ao poluente, passam por uma maior variedade de traumas, mas o tecido branquial também tem uma incrível capacidade de recuperação (Wolf *et al.*, 2015). As alterações patológicas constantemente descritas para brânquias em peixes expostos a químicos são hiperplasia, hipertrofia, telangiectasia, fusão entre lamelas, espessamento de vasos, hemorragia e necrose (Yancheva *et al.*, 2016; Borges *et al.*, 2019). Dependendo da intensidade dessas lesões podem propiciar o aparecimento de doenças como neoplasias, hipóxia e fibrose (Novotny, 2021).

O fígado do peixe-zebra é sensível a ação de poluentes, isso porque há uma maior lentidão do fluxo sanguíneo em relação ao débito cardíaco, prolongando a depuração de toxinas e o tempo de efeito da substância no tecido hepático (Campos *et al.*, 2008; Vliegenthart *et al.*, 2014). Trata-se de um órgão bastante vascularizado, localizado na parte anterior da cavidade abdominal, constituído por três lobos assimétricos, dois longos laterais, e um mais curto transversal, que se encontram ao longo do trato intestinal (Menke *et al.*, 2011; Yao *et al.*, 2012) (Figura 2).

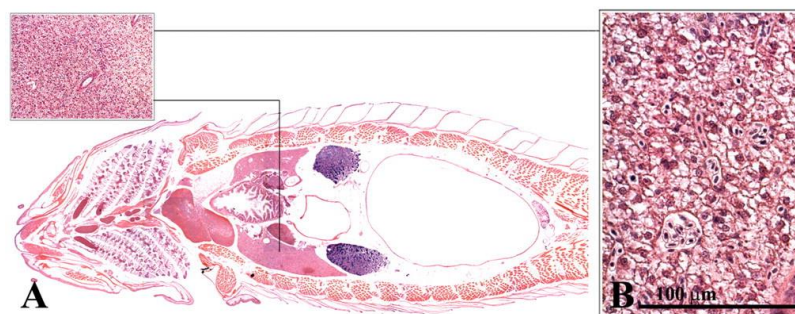


Figura 2. Fígado de *Danio rerio*. (a) Vista dorsal; (b) Fígado. Aumento de 20x.

Fonte: Menke *et al.* (2011).

O fígado dos peixe-zebra apresenta os ductos biliares, veias porta e artérias hepáticas não organizadas no sistema porta hepático, sendo distribuído aleatoriamente em todo parênquima hepático, além de não possuir células de Küpffer (Davico, 2021). As células que o constituem os hepatócitos e podem apresentar alterações como atrofia, hipertrofia, hiperplasia, depósitos, alterações nucleares, vacuolização e degeneração (Bernet *et al.*, 1999; Rodrigues *et al.* 2019). E de acordo com a severidade dessas alterações, o órgão pode apresentar doenças como colestase (Pham; Yin, 2019), esteatose (Schlegel, 2012), tumores hepáticos fibrose, cirrose, cancro e insuficiência hepática (Goessling; Sadler, 2015), similarmente a seres humanos.

O rim do peixe-zebra fica em uma localização retroperitoneal, logo ventral da coluna vertebral, sendo composto por glomérulos, túbulos proximais, túbulos distais, ductos coletores, além do tecido hematopoiético (Menke *et al.*, 2011) (Figura 3).

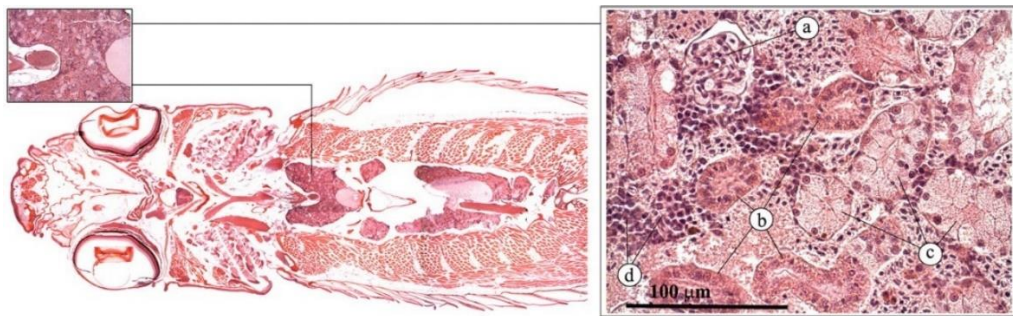


Figura 3. Rim de *Danio rerio*. (a) Glomérulo; (b) Túbulo proximal ou distal; (c) Duto coletor; (d) Tecido hematopoiético. Aumento de 20x.

Fonte: Menke *et al.* (2011).

Em peixe-zebra, assim como nos demais peixes, apenas os rins cefálicos (pronéfricos) e excretor (mesonéfricos) se desenvolveram, assim possuem tecido urinário por toda extensão do órgão e os rins esquerdo e direito são predominantemente conjuntos (Swanhart *et al.*, 2011). Além disso, o rim do peixe-zebra abriga progenitores renais únicos, que permitem a nefrogênese ao longo da vida e se tornam mais ativos na formação de néfrons em resposta a danos agudos nos órgãos (Diep *et al.*, 2011). Desta forma, o peixe-zebra foi estabelecido como um excelente modelo para estudar doenças que alteram o desenvolvimento e a fisiologia dos néfrons (Poureetezadi; Wingert, 2016).

A nefrotoxicidade pode levar a alterações como atrofia, hipertrofia, hiperplasia, degeneração e necrose nos túbulos, glomérulos e tecido intersticial, acúmulo de detritos no lúmen tubular, obstrução tubular, dilatação tubular e alterações no tamanho glomerular e o espaço de Bowman (Bernet, *et al.*, 1999; Miyawaki, 2020), que dependendo da severidade das

lesões, podem progredir para doenças renais por lesão aguda (LRA), doença glomerulares e várias doenças císticas (Poureetezadi; Wingert, 2016).

Estudos a nível celular sobre os efeitos dos produtos farmacêuticos em peixes são escassos, na medida que se sabe que tais compostos alcançam o ambiente aquático por meio de esgotos domésticos em concentrações residuais (Wu *et al.*, 2019). Em trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) expostas a concentrações de diclofenaco variando de 1 a 500 µg/L (28 dias) revelou alterações renais, necrose das células pilares e lesão da parede capilar das lamelas secundárias das brânquias (Schwaiger *et al.*, 2004).

Em *Danio rerio* expostos por 21 dias a carbamazepina, ácido fenofibrico, propranolol, sulfametoxazol e trimetoprima apresentaram aumento da imunomarcção da vitelogenina, aumento da massa e volume do núcleo no fígado (Madureira *et al.*, 2012). Enquanto em carpas comum (*Cyprinus carpio*) expostas a 3,16 mg/ml de Cloroquina (35 dias) apresentaram fusões lamelares, hipertrofia, vacuolização, levantamento epitelial e necrose nas brânquias; vacuolização, edema celular, aumento do espaço sinusoidal, necrose e alteração de hepatócitos no fígado; e o espessamento da cápsula de Bowman, redução do lúmen, degeneração tubular e necrose no rim (Ramesh *et al.*, 2018).

Diante do exposto, a Cloroquina é de particular relevância devido a concentrações residuais detectadas em águas superficiais e ao crescente uso deste fármaco durante a pandemia da COVID-19 (Ferreira; Carvalho, 2022). A hipótese desse estudo é que a exposição crônica (21 dias) ao Difosfato de Cloroquina (DCQ) em peixe-zebra (*Danio rerio*) causa alterações histopatológicas nas brânquias, fígado e rim afetando negativamente a saúde dos peixes.

2. OBJETIVOS

Este estudo avaliou a toxicidade crônica do Difosfato de Cloroquina, no peixe modelo de água doce, *Danio rerio*, utilizando biomarcadores histológicos de brânquias, fígados e rins como *endpoints*.

Os objetivos específicos foram:

- I. Descrever e quantificar as lesões em cada concentração;
- II. Calcular o Índice de Alteração Histológica (IAH) para cada concentração;
- III. Definir os biomarcadores mais responsivos a toxicidade do fármaco.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. DESENHO EXPERIMENTAL

A aquisição, aclimação e manutenção dos peixe-zebra ao Difosfato de Cloroquina ($C_{18}H_{26}ClN_3 \cdot 2H_3PO_4$; CAS: 50-63-5 Sigma-Aldrich) foram descritas no capítulo 2 desta tese. Para a exposição dos peixes ao Difosfato de Cloroquina nas concentrações de ocorrência ambiental 0,6; 1,8; 5,4; 16,2 e 48,6 $\mu\text{g/L}$ (Olaitan *et al.* 2014; Marques *et al.*, 2023; Domingo-Echaburu *et al.*, 2022; Cappelli *et al.*, 2022; Nason *et al.* 2021), utilizou-se 8 animais, por grupo distribuídos em quatro réplicas considerando eventuais perdas por mortalidade ou no processamento de tecidos, sendo que entre estes 5 (ao menos um por réplica) foram utilizados para as análises histológicas.

O ensaio durou 21 dias, com renovação total da solução a cada 48h (Figura 4). Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (ração Tetramin[®]), sendo mantidos em temperatura ($26^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$) e fotoperíodo de 12:12 (12 horas claro/ 12 horas escuro), enquanto os parâmetros da água tiveram as seguintes variações pH 7 ± 2 , dureza 44 ± 4 mg $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$, condutividade 212 ± 29 $\mu\text{S/cm}$, oxigênio dissolvido 6 ± 1 mg/L, amônia $<0,011$ ppm.

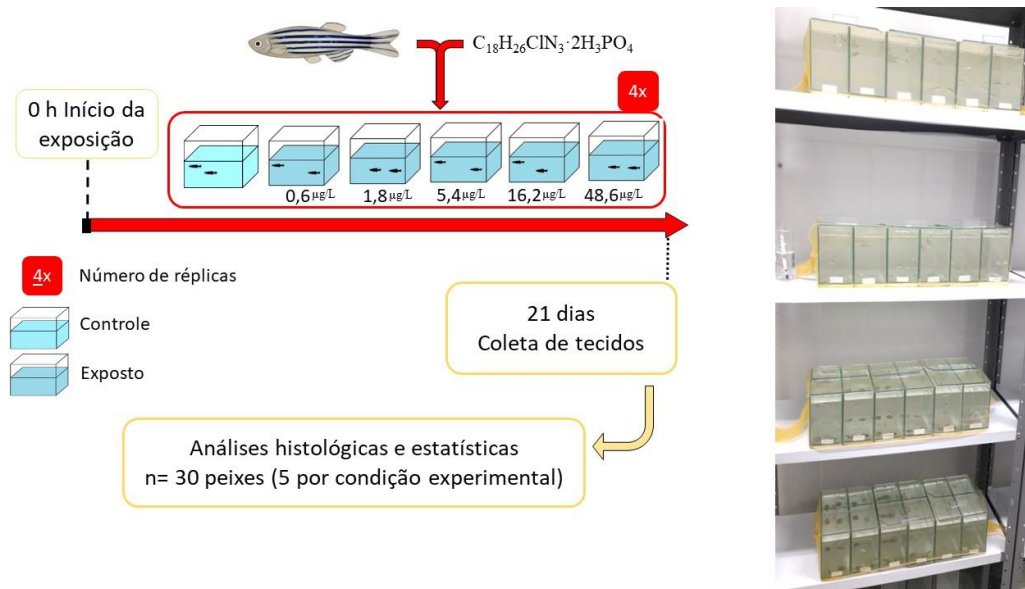


Figura 4. Desenho experimental da exposição da espécie *Danio rerio* as diferentes concentrações de Difosfato de Cloroquina ($C_{18}H_{26}ClN_3 \cdot 2H_3PO_4$) para as análises histológicas.

Fonte: Autora.

3.2. PROCESSAMENTO DE TECIDOS PARA ANÁLISE HISTOLOGICA

Após a exposição, os peixes foram eutanasiados em água com gelo a 4°C (Wilson *et al.*, 2009). Retirou-se o excesso de escamas, barbatana e as nadadeiras, separando-os por condição experimental em frascos universal de coleta contendo formol tamponado 10% durante vinte

horas. Posteriormente, foram colocados em álcool 70% renovados após vinte e quatro horas e mantidos até o momento do processamento.

O processamento de tecidos histológicos (Anexo VII) foi realizado no processador de tecidos O Patologista, colocando o corpo inteiro de cada indivíduo em um cassete histológico identificado conforme sua concentração. Após o terceiro e último banho de parafina, os cassetes com os peixes foram preenchidos com parafina e armazenados ao abrigo de umidade.

Os cortes histológicos foram feitos no sentido longitudinal e tiveram a espessura de 5 a 7 μm realizados no micrótomo semi-automático modelo Micron HM 340E. Os cortes contendo os tecidos foram levados em banho Maria para a abertura e, em seguida, fixados em lâminas contendo uma gota da solução albumina-glicerina (1:1). Posteriormente, foram mantidas em estufa por cerca de vinte e quatro horas à 30° C para a etapa da coloração por Hematoxilina-Eosina (HE) (Anexo VIII). As lâminas prontas foram analisadas e fotografadas em um microscópio óptico Leica modelo DM 3000 LED, utilizando o software Leica Application Suite para a marcação das alterações observadas. A Figura 5 demonstra passo-a-passo dos procedimentos realizados para as análises histológicas.

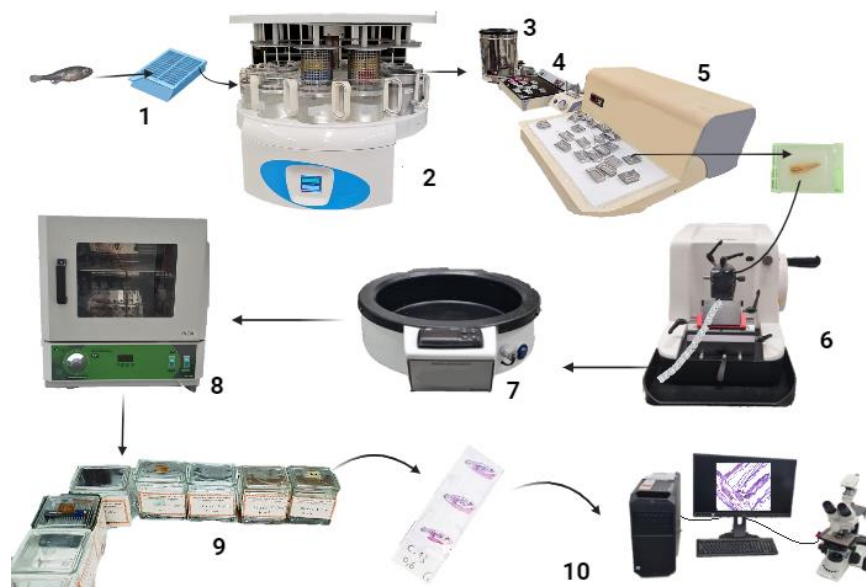


Figura 5. Etapas do processamento histológico. 1) O peixe é colocado no cassete histológico. 2) Processador de tecidos automático. 3) Dispensador de parafina. 4) Mesa aquecedora para reemblocar o material biológico, se necessário. 5) Mesa refrigeradora para solidificação do bloco. 6) Secção do bloco em micrótomo. 7) Banho histológico para disposição da fita com tecidos e montagem da lâmina. 8) Estufa para manutenção das lâminas. 9) Bateria de coloração hematoxilina-eosina (H.E.). 10) Análise em microscópio óptico com captura.

Fonte: Autora.

3.3. ANÁLISES QUALITATIVAS E SEMIQUANTITATIVAS

O uso de sistemas de classificação semiquantitativos e quantitativos são importantes para evitar uma interpretação falsa do que é normal (ou da normalidade) e, também evitar alterações decorrentes do procedimento (eutanásia, por exemplo) como sendo efeitos da substância avaliada (Fournie *et al.*, 2000; Wolf *et al.*, 2014; Wolf *et al.*, 2015). Assim, foi contabilizado, manualmente, quantas vezes estas alterações apareceram em toda a extensão dos órgãos e verificado quanto ao aumento significativo em relação ao controle. Este procedimento foi feito em comparação com o controle para isolar os efeitos da eutanásia e do fármaco.

Deste modo, foram selecionados ao menos um animal de cada réplica, sendo um total de 5 animais para cada concentração. Contabilizou-se 100 cortes por órgão de cada indivíduo, contemplando diferentes profundidade, para a padronização das análises qualitativas e quantitativas conforme descrito em Smith *et al.* (2007). As alterações foram baseadas na metodologia descrita por Polecsik; Mitrovic-Tutundizc (1994) e adaptado por Fracácio (2006) para brânquias (Tabela 1) e Rigolin-Sá (1998) para fígado (Tabela 2) e rim (Tabela 3). As lesões são classificadas em 3 estágios: I - Lesões de primeiro estágio (reversíveis); II - Lesões de segundo estágio (podem ou não ser reversíveis); III – Lesões de terceiro estágio (irreversíveis).

Tabela 1. Alterações branquiais e estágio da lesão correspondente segundo Polecsik; Mitrovic-Tutundizc (1994) e adaptado por Fracácio (2006).

Estágios		
I	II	III
Hipertrofia do epitélio respiratório	Desprendimento do epitélio branquial	Fibrose
Hiperplasia das células epiteliais	Adensamento tecidual	Necrose
Leucócitos no epitélio branquial	Fusão completa das lamelas	
Desprendimento de células do epitélio	Telangiectasia/ Aneurismas	
Desprendimento das células mucosas	Hemorragia por ruptura de capilares	
Dilatação do seio venoso central		
Presença de células de cloreto nas lamelas secundárias		
Fusão parcial das lamelas secundárias		
Diminuição das lamelas secundárias		
Espessamento de vasos sanguíneos		

Tabela 2. Alterações hepáticas e estágio da lesão correspondente segundo Rigolin-Sá (1998).

Estágios		
I	II	III
Edema intercelular	Hiperplasia	Necrose
Hipertrofia	Infiltração	
Atrofia	Vacuolização nuclear	
Aumento da frequência de vasos	Degeneração citoplasmática	
Deformação do contorno nuclear	Núcleos picnóticos	
Núcleos na periferia da célula	Rompimento celular	
Desarranjo dos cordões hepáticos	Estagnação biliar	
Melanomacrófagos	Ruptura de vasos	
Vacuolização citoplasmática	Congestão	
Grânulos eosinófilos		

Tabela 3. Alterações renais e estágio da lesão correspondente segundo Rigolin-Sá (1998).

Estágios		
I	II	III
Hipertrofia das células tubulares	Degeneração tubular	Necrose
Degeneração hialina	Degeneração glomerular	
Oclusão da luz tubular	Sangue no espaço de Bowman	
Vacuolização celular		
Dilatação tubular		
Dilatação dos capilares glomerular		
Aumento/atrofia do glomérulo		
Redução do espaço de Bowman		
Novos néfrons/Regeneração		

Para a elaboração dos Índices de Alteração Histológica (IAH) seguiu a equação formulada por Polecsik e Mitrovic-Tutundizc, (1994):

$$I = \sum a + 10. \sum b + 100. \sum c$$

Onde: a= quantidade de alterações de primeiro grau; b= quantidade de alterações de segundo grau e c= quantidade de alterações de terceiro grau.

O valor foi classificado para compreender a gravidade dos efeitos gerados nos animais expostos ao DCQ (Tabela 4).

Tabela 4. Índices de Alteração Histológica (IAH), com os valores de alterações correspondentes ao efeito no órgão formulados por Polecsik e Mitrovic-Tutundizc (1994).

Valor	Efeito
0-10	Funcionamento normal do órgão
11-20	Alterações leves a moderadas
21-50	Alterações moderadas a graves
>100	Alterações irreversíveis

3.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS QUANTITATIVAS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software PAST[®] com nível de significância de $p < 0,05$. Devido ao tamanho amostral pequeno, algumas análises não apresentarem uma distribuição normal e afim de padronizar todas as análises, aplicou-se o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, seguido pelo pós teste de Dunn, para a comparação entre o controle e os tratamentos, utilizando um $n=5$ indivíduos por concentração.

Para a Análise de Componentes Principais (ACP) dos biomarcadores, os dados histológicos foram padronizados em escore Z.

4. RESULTADOS

4.1. ANÁLISES HISTOLÓGICAS QUALITATIVAS

BRÂNQUIAS

Os filamentos branquiais dos peixes pertencentes ao grupo controle estavam bem preservados. Os espaços entre as lamelas secundárias apresentaram-se bem definidos, com fusões de lamelas, encurtamentos e dilatação do seio venoso central pontuais. As células epiteliais estavam bem arranjadas, sem o extravasamento de eritrócitos (Figura 6).

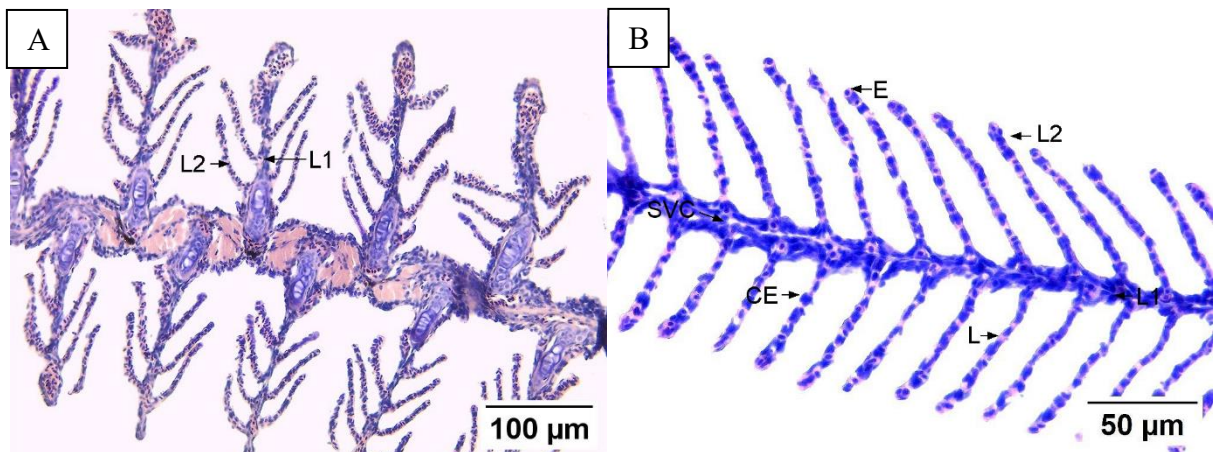


Figura 6. Brânquias de *Danio rerio*, grupo controle. (A) 20x (B) 40x. L1 – Lamela primária. L2 – Lamela secundária. CE – Célula epitelial. L – Lúmen capilar (lacuna). E – Eritrócito. SVC – Seio Venoso Central. Coloração Hematoxilina-Eosina (H.E).

Na concentração 0,6 µg/L de DCQ, hiperplasias, dilatação do seio venoso central e fusões parciais apareceram com mais frequência (Figura 7).

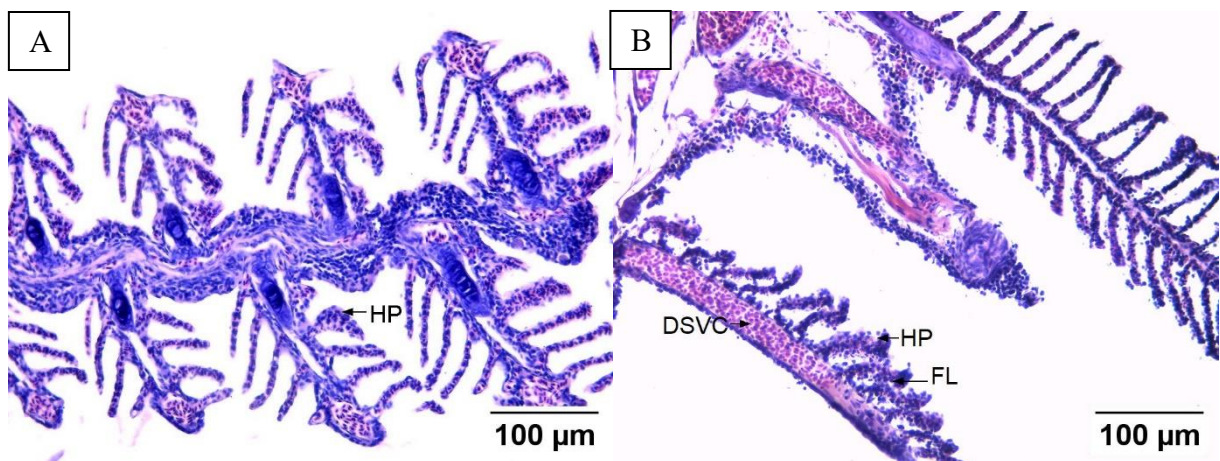


Figura 7. Brânquias de *Danio rerio*, exposto a 0,6 µg/L de Difosfato de Cloroquina. (A) 20x (B) 20x. HP – Hiperplasia. FL – Fusão lamelar. DSVC – Dilatação do seio venoso central. Coloração Hematoxilina-Eosina (H.E).

A partir da concentração 1,8 $\mu\text{g/L}$, além das hiperplasias, dilatação do seio venoso central, encurtamento e fusão de lamelas secundárias, houve o aparecimento de aneurismas (Figura 8).

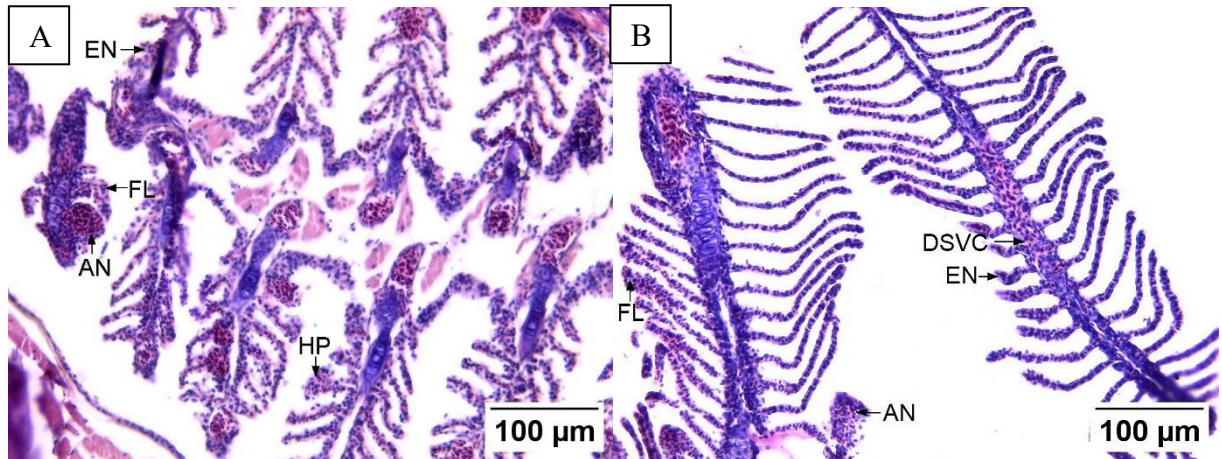


Figura 8. Brânquias de *Danio rerio*, exposto a 1,8 $\mu\text{g/L}$ de Difosfato de Cloroquina. (A) 20x (B) 20x. HP – Hiperplasia. FL – Fusão lamelar. DSVC – Dilatação do seio venoso central. AN – Aneurisma. EN – Encurtamento de lamelas. Coloração Hematoxilina-Eosina (H.E).

Nas concentrações 5,4 e 16,2 $\mu\text{g/L}$ houve um aumento na ocorrência das alterações já relatadas (Figura 9 e 10).

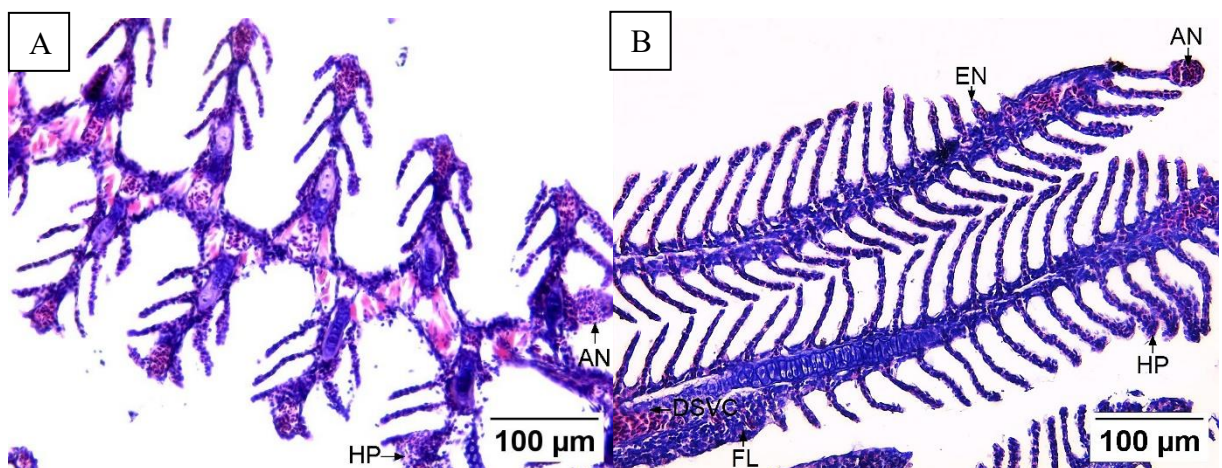


Figura 9. Brânquias de *Danio rerio*, exposto a 5,4 $\mu\text{g/L}$ de Difosfato de Cloroquina. (A) 20x (B) 20x. HP – Hiperplasia. FL – Fusão lamelar. DSVC – Dilatação do seio venoso central. AN – Aneurisma. EN – Encurtamento de lamelas. Coloração Hematoxilina-Eosina (H.E).

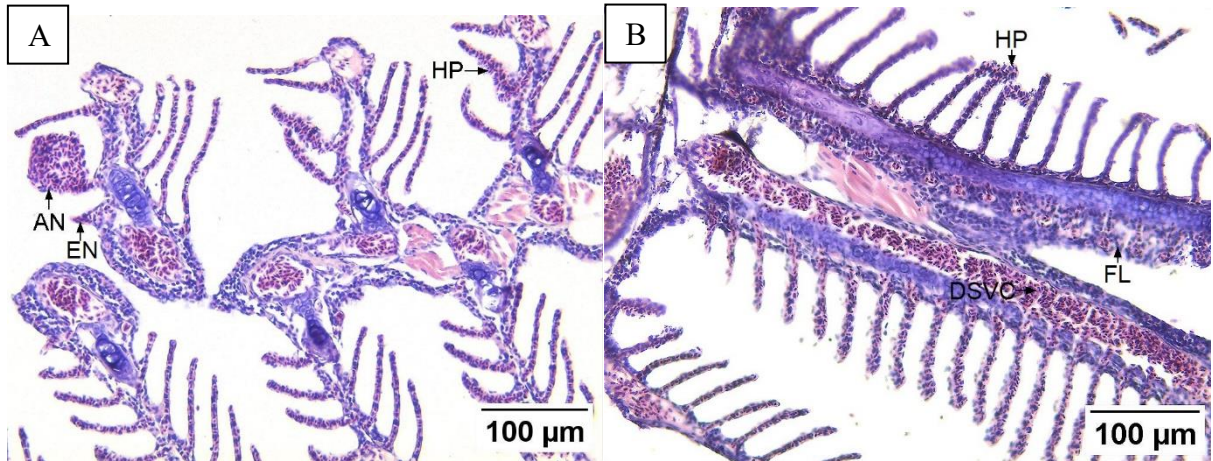


Figura 10. Brânquias de *Danio rerio*, exposto a 16,2 µg/L de Difosfato de Cloroquina. (A) 20x (B) 20x. HP – Hiperplasia. FL – Fusão lamelar. DSVC – Dilatação do seio venoso central. AN – Aneurisma. EN – Encurtamento de lamelas. Coloração Hematoxilina-Eosina (H.E).

A concentração 48,6 µg/L teve a ocorrência das alterações já descritas com ênfase na prevalência de fusão total de lamelas e no descolamento do epitélio branquial (Figura 11).

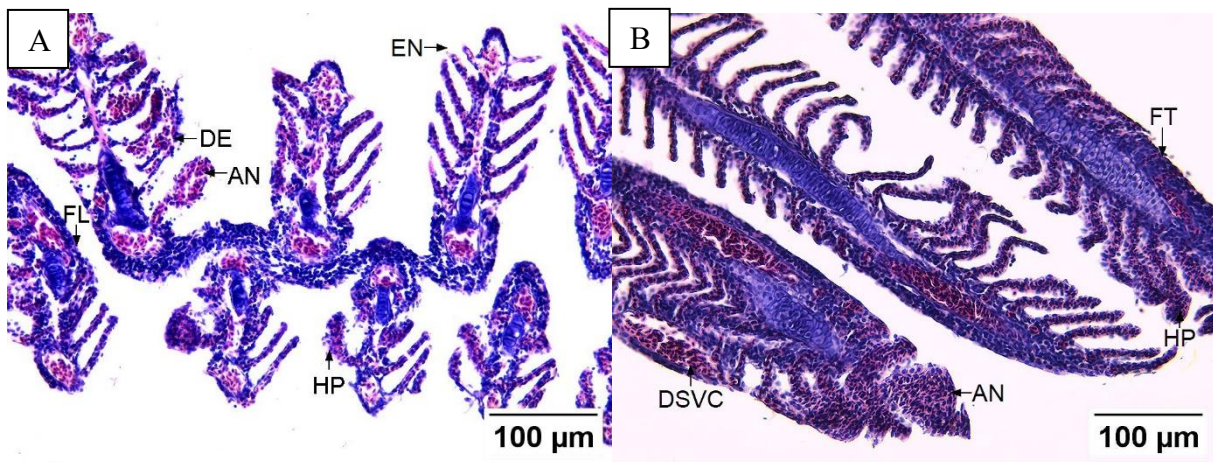


Figura 11. Brânquias de *Danio rerio*, exposto a 48,6 µg/L de Difosfato de Cloroquina. (A) 20x (B) 20x. HP – Hiperplasia. FL – Fusão lamelar. DSVC – Dilatação do seio venoso central. AN – Aneurisma. EN – Encurtamento de lamelas. DE – Descolamento do epitélio. FT – Fusão total das lamelas. Coloração Hematoxilina-Eosina (H.E).

FÍGADO

O tecido hepático do grupo controle apresentou hepatócitos bem definidos, com núcleos centralizados, estando a maioria em tamanhos e configurações normais, sem sinais de degeneração. As veias e artérias hepáticas apresentavam-se sem alterações (Figura 12).

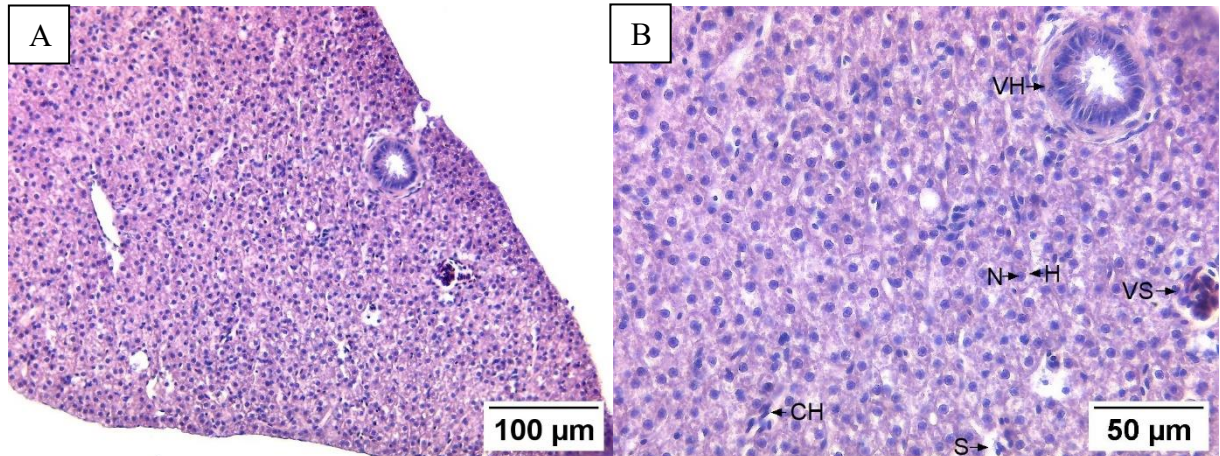


Figura 12. Fígado de *Danio rerio*, grupo controle. (A) 20x (B) 40x. H – Hepatócito. N – Núcleo. CH – Cordão Hepático. S – Sinusóide. VH – Veia hepática. VS – Vaso sanguíneo. Coloração Hematoxilina-Eosina (H.E).

Na concentração 0,6 µg/L, houve a intensificação da vacuolização citoplasmática com algumas áreas pontualmente degeneradas, além da ocorrência de hipertrofia citoplasmática e nuclear (Figura 13).

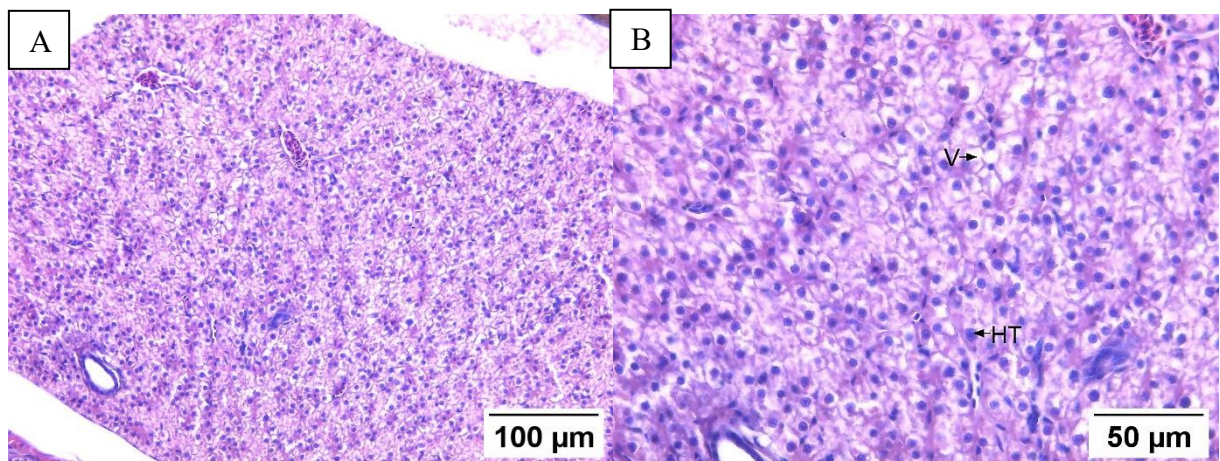


Figura 13. Fígado de *Danio rerio*, exposto a 0,6 µg/L de Difosfato de Cloroquina. (A) 20x (B) 40x. V – Vacuolização citoplasmática. HT – Hipertrofia. Coloração Hematoxilina-Eosina (H.E).

Na concentração 1,8 $\mu\text{g/L}$, houve a ocorrência de núcleos picnóticos além do aumento das alterações observadas na concentração 0,6 $\mu\text{g/L}$ DCQ (Figura 14).

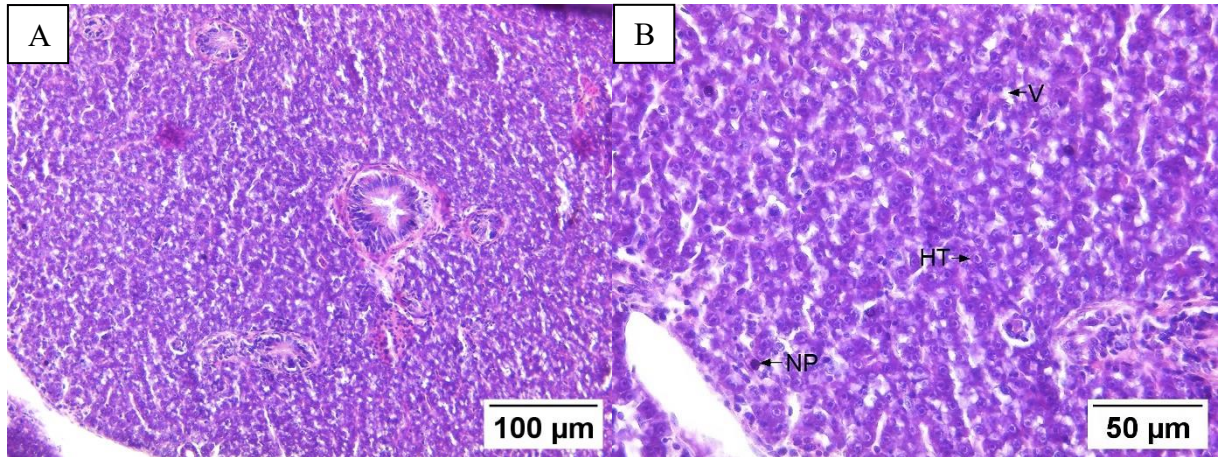


Figura 14. Fígado de *Danio rerio*, exposto a 1,8 $\mu\text{g/L}$ de Difosfato de Cloroquina. (A) 20x (B) 40x. V – Vacuolização citoplasmática. NP – Núcleo picnótico. HT – Hipertrofia. Coloração Hematoxilina-Eosina (H.E).

Na concentração 5,4 $\mu\text{g/L}$, foi observado a deformação do contorno nuclear dos hepatócitos e prevalência das demais alterações (Figura 15).

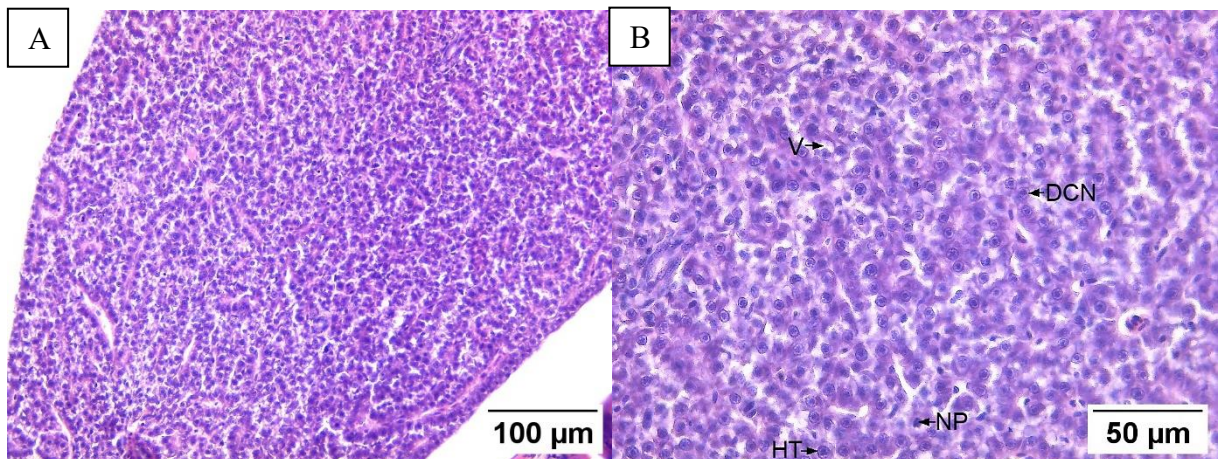


Figura 15. Fígado de *Danio rerio*, exposto a 5,4 $\mu\text{g/L}$ de Difosfato de Cloroquina. (A) 20x (B) 40x. V – Vacuolização citoplasmática. NP – Núcleo picnótico. HT – Hipertrofia. DCN – Deformação do contorno nuclear. Coloração Hematoxilina-Eosina (H.E).

Nas concentrações 16 $\mu\text{g/L}$ e 48,6 $\mu\text{g/L}$, foi a intensificação de áreas com vacuolização e degeneração citoplasmática. Bem como alterações nucleares, como núcleos picnóticos, com deformação e hipertróficos (Figuras 16 e 17).

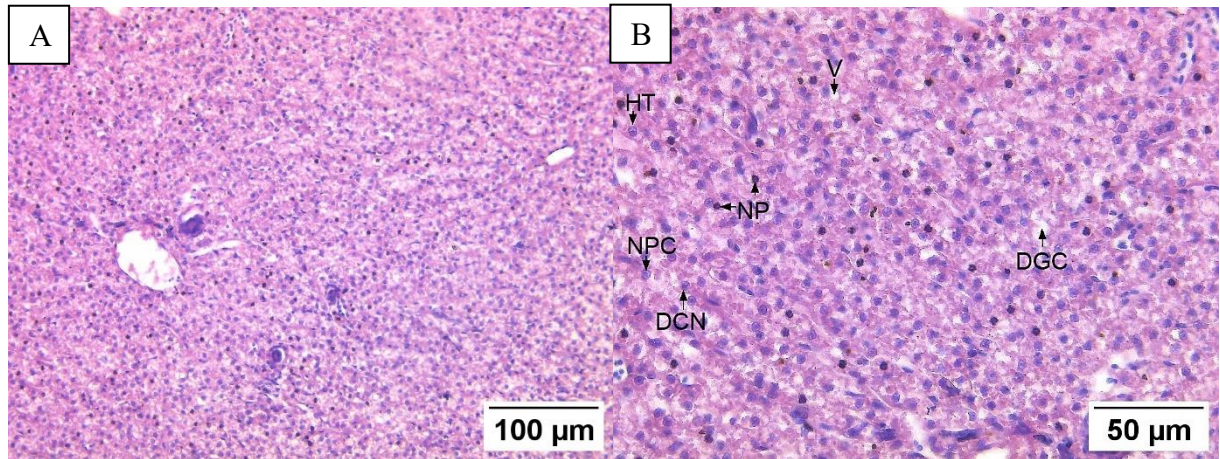


Figura 16. Fígado de *Danio rerio*, exposto a 16,2 $\mu\text{g/L}$ de Difosfato de Cloroquina. (A) 20x (B) 40x. V – Vacuolização citoplasmática. DGC – Degeneração citoplasmática. NPC – Núcleo na periferia da célula. NP – Núcleo picnótico. HT – Hipertrofia. DCN – Deformação do contorno nuclear. Coloração Hematoxilina-Eosina (H.E).

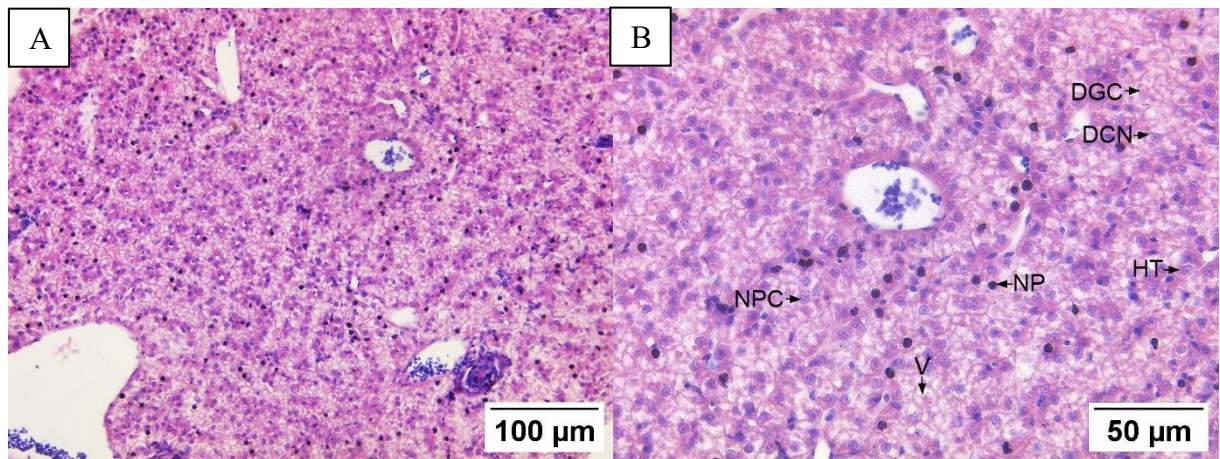


Figura 17. Fígado de *Danio rerio*, exposto a 48,6 $\mu\text{g/L}$ de Difosfato de Cloroquina. (A) 20x (B) 40x. V – Vacuolização citoplasmática. DGC – Degeneração citoplasmática. NPC – Núcleo na periferia da célula. NP – Núcleo picnótico. HT – Hipertrofia. DCN – deformação do contorno nuclear. Coloração Hematoxilina-Eosina (H.E).

RIM

Os peixes do grupo controle apresentaram glomérulos normais, com espaço de Bowman bem definido, túbulos contorcidos distal e proximal preservados com células epiteliais colunares bem definidas e núcleos centralizados (Figura 18). Além disso, notou-se que os túbulos (distal e proximal) de peixe-zebra são naturalmente vacuolizados.

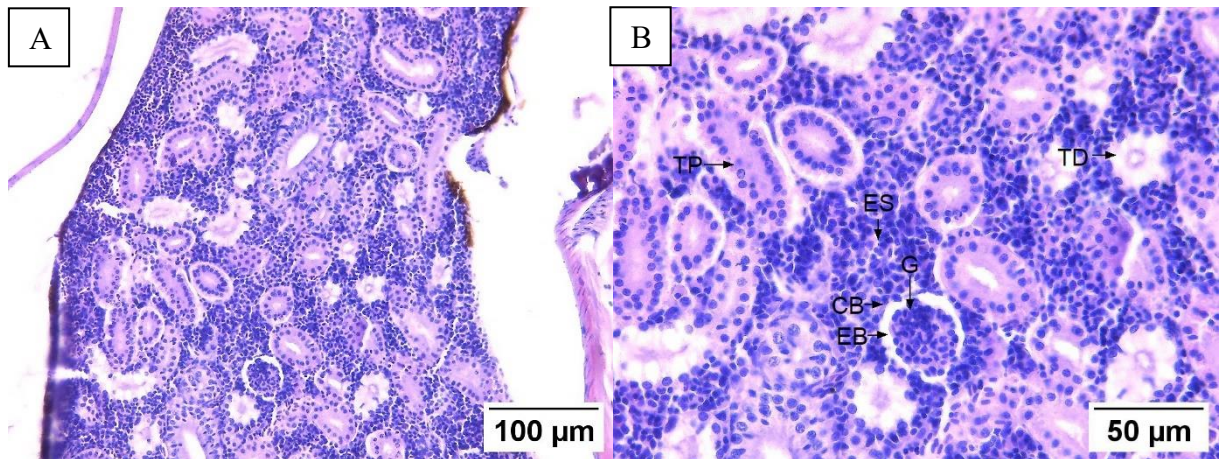


Figura 18. Rim de *Danio rerio*, grupo controle. (A) 20x (B) 40x. CB – Cápsula de Bowman. EB – Espaço de Bowman. G – Glomérulo. TD – Túbulo contorcido distal. TP – Túbulo contorcido proximal. ES – Espaço estroma. Coloração Hematoxilina-Eosina (H.E).

Na concentração 0,6 µg/L, houve um aumento na ocorrência de dilatações nos túbulos proximais e distais, bem como a oclusão da luz de alguns destes túbulos (Figura 19).

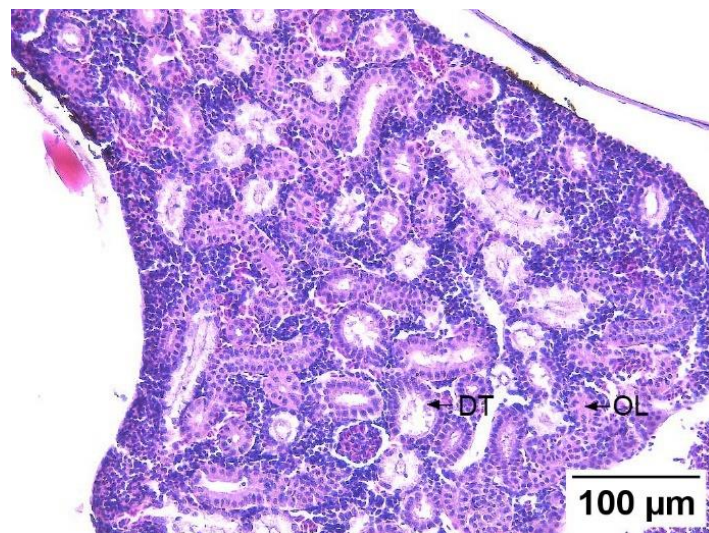


Figura 19. Rim de *Danio rerio*, exposto a 0,6 µg/L de Difosfato de Cloroquina (20x). DT – Dilatação tubular. OL – Oclusão da luz tubular. Coloração Hematoxilina-Eosina (H.E).

Na concentração de 1,8 $\mu\text{g/L}$, ocorreu com mais frequência dilatações tubulares, perda do espaço de Bowman e oclusão da luz tubular (Figura 20).

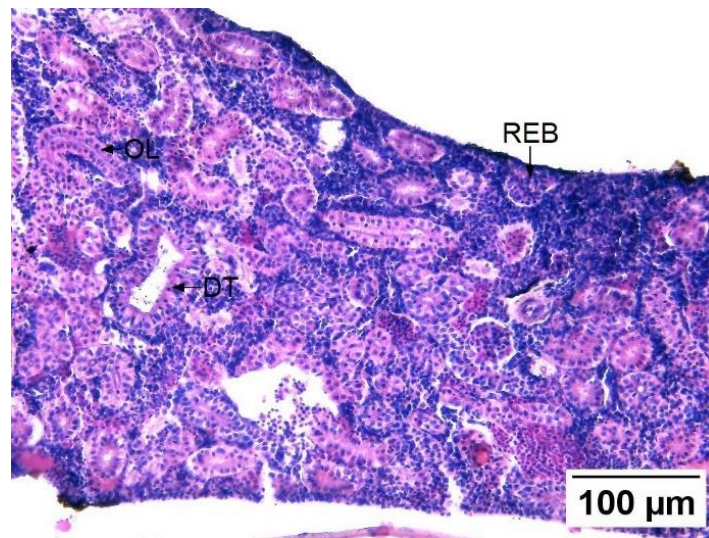


Figura 20. Rim de *Danio rerio*, exposto a 1,8 $\mu\text{g/L}$ de Difosfato de Cloroquina (20x). DT – Dilatação tubular. OL – Oclusão da luz tubular. REB – Redução do espaço de Bowman. Coloração Hematoxilina-Eosina (H.E).

Nas demais concentrações, 5,4 $\mu\text{g/L}$, 16,2 $\mu\text{g/L}$ e 48,6 $\mu\text{g/L}$, foram observadas o aumento nas dilatações tubulares, novos néfrons ou em regeneração, aumento ou atrofia dos glomérulos, perda do espaço de Bowman e oclusão da luz tubular (Figuras 21, 22 e 23).

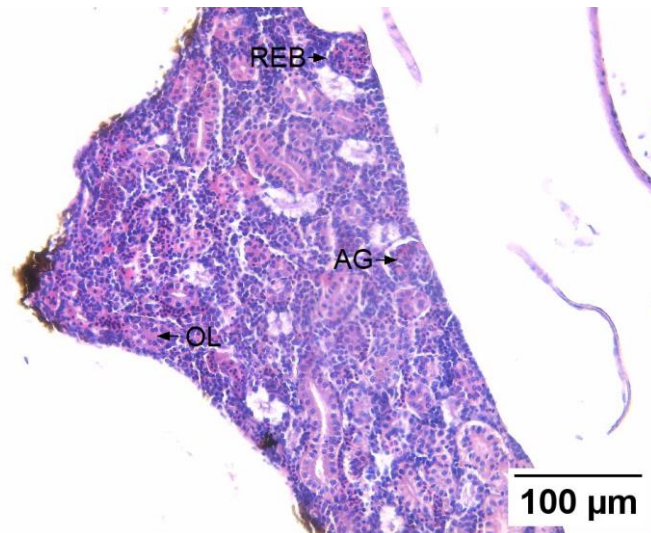


Figura 21. Rim de *Danio rerio*, exposto a 5,4 $\mu\text{g/L}$ de Difosfato de Cloroquina (20x). OL – Oclusão da luz tubular. REB – Redução do espaço de Bowman. AG – Aumento do volume glomerular. Coloração Hematoxilina-Eosina (H.E).

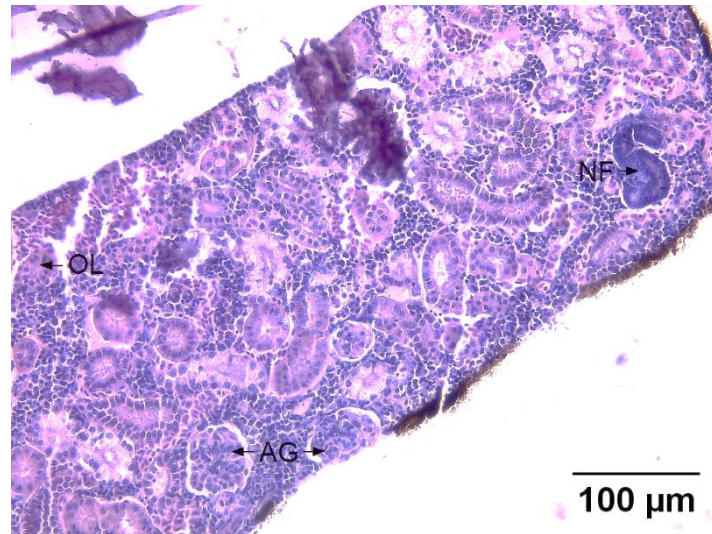


Figura 22. Rim de *Danio rerio*, exposto a 16,2 µg/L de Difosfato de Cloroquina (20x). OL – Oclusão da luz tubular. AG – Aumento do volume glomerular. NF – Néfrons em regeneração. Coloração Hematoxilina-Eosina (H.E).

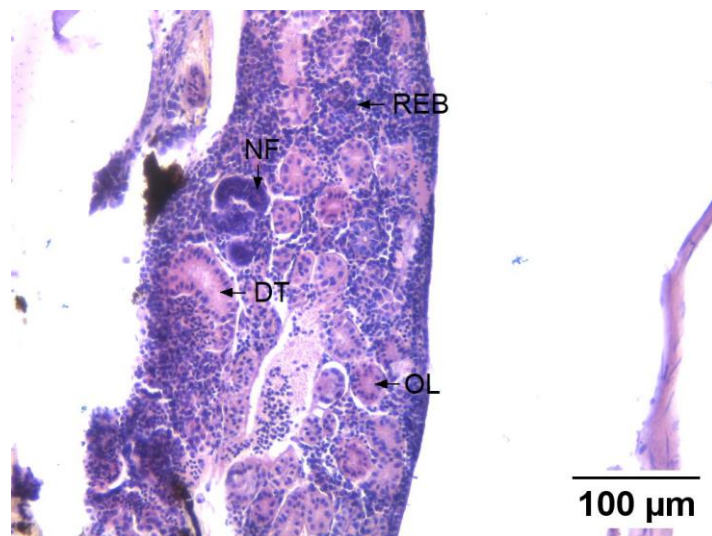


Figura 23. Rim de *Danio rerio*, exposto a 48,6 µg/L de Difosfato de Cloroquina (20x). OL – Oclusão da luz tubular. REB – Redução do espaço do Bowman. NF – Néfrons em regeneração. Coloração Hematoxilina-Eosina (H.E).

4.2. ANÁLISES HISTOLÓGICAS SEMIQUANTITATIVAS E QUANTITATIVAS

Nas brânquias dos peixes expostos a 0,6 µg/L DCQ, houve um aumento de hiperplasias em comparação ao grupo controle. Na exposição a 1,8 µg/L houve também um aumento na fusão de lamelas secundárias e encurtamento lamelar em comparação com o controle. A partir da concentração de 5,4 µg/L, houve um aumento na fusão total, dilatação do seio venoso central, aneurismas e desprendimento epitelial. As hiperplasias, encurtamento de lamelas, fusão de lamelas secundárias e desprendimento epitelial não tiveram variação significativa entre as concentrações. A fusão total, dilatação do seio venoso central e aneurismas aumentaram nas diferentes concentrações de DCQ (Tabela 5).

No fígado dos peixe-zebra, expostos em todas as concentrações de DCQ, foi observado hipertrofia, comparado com o controle. No entanto, não houve variação quanto a prevalência entre as concentrações de DCQ e o controle. Na exposição a 0,6 µg/L de DCQ, houve aumento de vacuolizações citoplasmáticas e na exposição a 1,8 µg/L houve um aumento na degeneração citoplasmática quando comparados ao controle. Na exposição a 5,4 µg/L os números de núcleos picnóticos e a deformação no contorno celular aumentaram. Na exposição 16,2 µg/L os núcleos na periferia da célula aumentaram.

A única alteração que variou significativamente entre as concentrações de DCQ foi a presença de núcleos picnóticos. Nas demais concentrações, ocorreram em todas as lâminas a partir da concentração de 0,6 µg/L, se tornando mais extensas nas concentrações superiores (Tabela 6).

Nos rins dos organismos expostos em todas as concentrações e no controle, notou-se a vacuolização e esta não variou quanto a prevalência entre as concentrações de DCQ e o controle. Entre as características que variara entre o controle e as exposições a partir de 5,4 µg/L foram dilatação tubular, aumento do volume glomerular, redução espaço de Bowman e oclusão da luz tubular. A formação de novos néfrons ou regeneração destes, apresentou aumento nas concentrações 0,6, 5,4 e 16,2 µg/L (Tabela 7).

Tabela 5. Análise Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn da ocorrência de alterações nas brânquias de *Danio rerio* grupos controle e expostos ao Difosfato de Cloroquina (DCQ). Valores são representados como média \pm desvio padrão.

Concentração DCQ ($\mu\text{g/L}$)	Fusão lamelas	Hiperplasia	Aneurisma	Dilatação do seio venoso central	Encurtamento	Fusão total	Desprendimento do epitélio
Controle	39,6 \pm 5,9	79,4 \pm 9,5	0	18,2 \pm 8,3	49,4 \pm 7	0	0
0,6	81,4 \pm 7,5	100**	0	49,2 \pm 4	83,2 \pm 8,9	3,4 \pm 1,5	0
1,8	100**	100**	76 \pm 10,7	63 \pm 12,3	100**	23,8 \pm 5,8	0
5,4	100**	100**	82,4 \pm 1,9*	80 \pm 6,2**	100**	58,2 \pm 10,3**	4,4 \pm 1,1**
16,2	100**	100**	83,4 \pm 2,7**	75,4 \pm 8,8**	100**	68,8 \pm 5,1**	4 \pm 1,6**
48,6	100**	100**	89,8 \pm 1,5**	89,2 \pm 3,5**	100**	81 \pm 6,1**	4,2 \pm 2,2**
Valor de P	<0,0001	<0,0001	0,0001	0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

(*) $p < 0,05$ em relação ao controle. (**) $p < 0,01$ em relação ao controle.

Tabela 6. Análise Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn da ocorrência de alterações no fígado de *Danio rerio* grupos controle e expostos ao Difosfato de Cloroquina (DCQ). Valores são representados como média \pm desvio padrão.

Concentração DCQ ($\mu\text{g/L}$)	Núcleo na periferia da célula	Deformação contorno nuclear	Hipertrofia hepatócito/núcleo	Núcleo picnótico	Vacuolização citoplasmática	Degeneração citoplasmática
Controle	0	0	100	0	0	0
0,6	0	0	100	8,2 \pm 4,8	100**	0
1,8	0	0	100	18,2 \pm 13,9	100**	100**
5,4	0	100**	100	28 \pm 9,8**	100**	100**
16,2	100**	100**	100	34,6 \pm 4,6**	100**	100**
48,6	100**	100**	100	42 \pm 10,2**	100**	100**
Valor de P	<0,0001	<0,0001	1	0,00047	<0,0001	<0,0001

(*) $p < 0,05$ em relação ao controle. (**) $p < 0,01$ em relação ao controle.

Tabela 7. Análise Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn da ocorrência de alterações nos rins de *Danio rerio* grupos controle e expostos ao Difosfato de Cloroquina (DCQ). Valores são representados como média \pm desvio padrão.

Concentração DCQ ($\mu\text{g/L}$)	Vacuolização	Dilatação tubular	Novo néfrons/ regeneração	Aumento/ atrofia glomérulo	Redução do espaço de Bowman	Oclusão da luz tubular
Controle	95,8 \pm 6,6	6 \pm 2,3	2,8 \pm 1,3	0	0	24 \pm 8,2
0,6	97,2 \pm 1,3	24,4 \pm 9,9	12,4 \pm 5,4**	12,2 \pm 6,1	17,8 \pm 4,7	35,8 \pm 13,7
1,8	96,8 \pm 1,3	43,6 \pm 10,3	6,6 \pm 3,1	13,8 \pm 8,1	18,4 \pm 5,5	44,6 \pm 11,3
5,4	92,4 \pm 9,5	79 \pm 9,4**	15,4 \pm 6,1**	37,6 \pm 13,2**	36,8 \pm 5,4**	51,2 \pm 9,2*
16,2	99,4 \pm 0,9	87,8 \pm 10,6**	15,4 \pm 9,3**	50 \pm 12**	51,4 \pm 8,6**	82,2 \pm 13,8**
48,6	94,8 \pm 8,3	92,2 \pm 5,6**	8,4 \pm 2,9	55,2 \pm 10,1**	52,6 \pm 7,7**	92,2 \pm 7,6**
Valor de P	0,2077	<0,0001	0,0068	0,0001	<0,0001	0,00021

(*) $p < 0,05$ em relação ao controle. (**) $p < 0,01$ em relação ao controle.

As alterações contabilizadas no grupo controle para os três órgãos, indicam que os peixes estavam saudáveis de acordo com o IAH (1-4). Na exposição a 0,6 µg/L de DCQ, as brânquias e o fígado apresentaram um IAH moderado de alterações (12-14) e o rim estava dentro da faixa da normalidade (6). Nas demais concentrações, as brânquias e os fígados estiveram dentro da faixa de IAH que indica que o órgão foi moderadamente a fortemente alterado (entre 22-34). Os rins permaneceram dentro da normalidade (6) (Tabela 8).

Tabela 8. Índices de Alteração Histológica (IAH) nos órgãos de *Danio rerio* grupo controle e expostos em diferentes concentrações de Difosfato de Cloroquina (DCQ) durante 21 dias.

Órgãos	Concentrações DCQ (µg/L)					
	Controle	0,6	1,8	5,4	16,2	48,6
Brânquias	4	14	24	34	34	34
Fígado	1	12	22	23	24	24
Rins	4	6	6	6	6	6

4.3. ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (ACP)

Na análise de componentes principais (ACP) dos biomarcadores histológicos das brânquias, aproximadamente 78% da variância pode ser atribuída ao Componente 1 (PC1) sendo os biomarcadores mais responsivos por ordem decrescente: DSVC (0,406), FL (0,404), EN (0,403), AN (0,391), FT (0,377), H (0,337) e DE (0,313) relacionados as concentrações mais altas de DCQ, exceto por FL, EN e H que foram relacionados a 1,8 µg/L. O Componente principal 2 (PC2) correspondeu a aproximadamente 13% da variância e foi caracterizado pelos DE (0,583) e FT (0,402) relacionados a concentração as concentrações mais altas (Figura 24).

Na ACP dos biomarcadores histológicos do fígado, aproximadamente 70% da variância pode ser atribuída ao Componente 1 (PC1) representado pelos NP (0,497), DCC (0,474), D (0,464), NPC (0,415) e V (0,373), relacionados as concentrações mais altas de DCQ. O Componente principal 2 (PC2) representou, aproximadamente 15% da variância e foi caracterizado pelos D (0,464) e V (0,373) relacionados a concentração 5,4 µg/L (Figura 25).

Por fim, a ACP dos biomarcadores histológicos do rim, aproximadamente 63% da variância pode ser atribuída ao Componente 1 (PC1) representado pelos REB (0,497), AG (0,489), DT (0,485), OL (0,468) e NF (0,237) relacionados as concentrações mais altas de DCQ. O Componente principal 2 (PC2) representou, aproximadamente 17% da variância e foi caracterizado pelos V (0,899) não relacionado a nenhum tratamento (Figura 26).

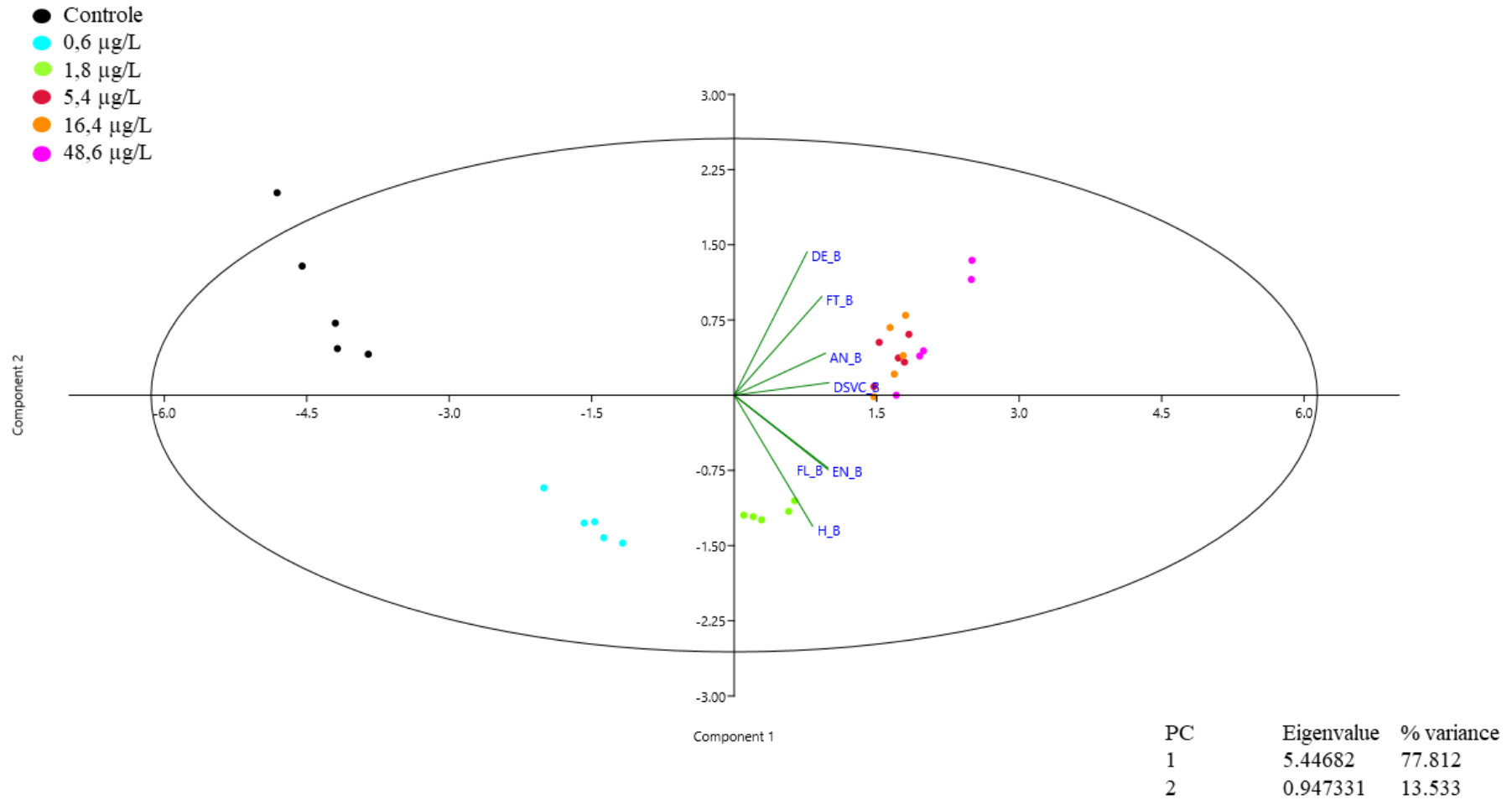


Figura 24. Análise de Componentes Principais (ACP) de biomarcadores histológicos das brânquias de *Danio rerio*. FL fusão de lamelas; H hiperplasia; NA aneurisma; DSVC dilatação seio venoso central; EN encurtamento de lamelas; FT fusão total; DE desprendimento epitelial.

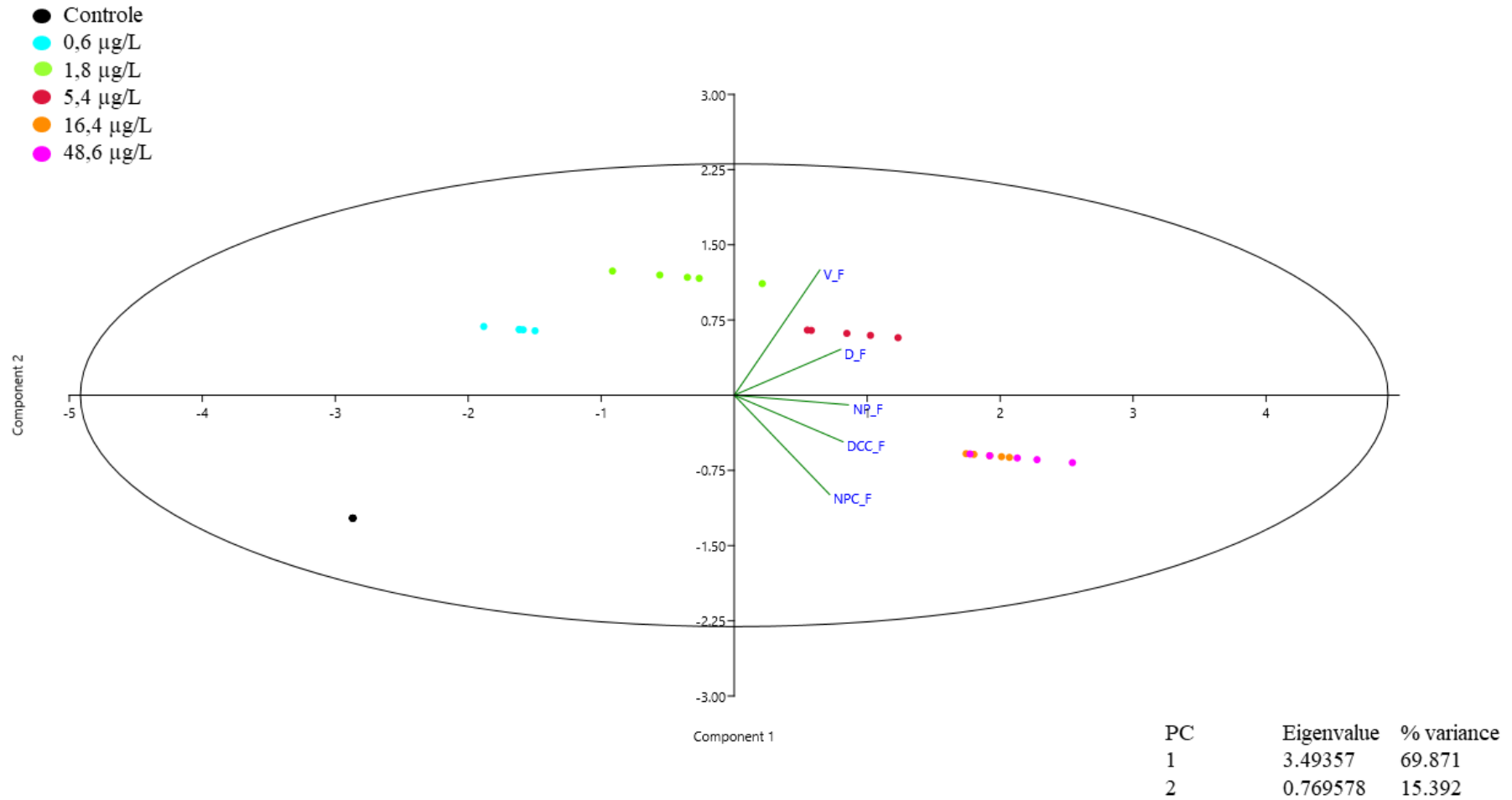


Figura 25. Análise de Componentes Principais (ACP) de biomarcadores histológicos do fígado de *Danio rerio*. NPC_F núcleo periferia da célula; DCC_F deformação no contorno celular; NP_F núcleo picnótico; V_F vacuolização citoplasmática; D_F degeneração citoplasmática.

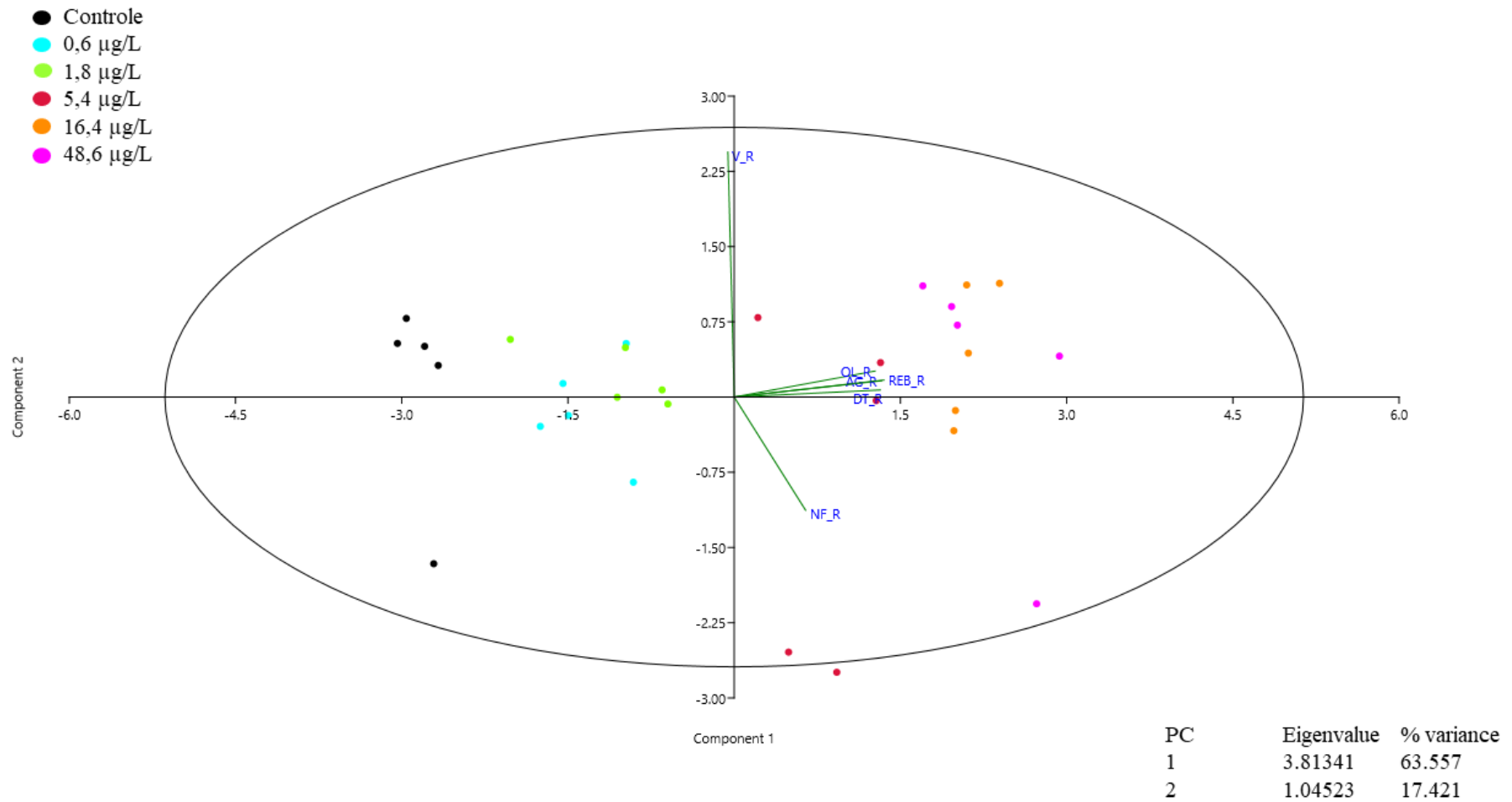


Figura 26. Análise de Componentes Principais (ACP) de biomarcadores histológicos do rim de *Danio rerio*. V_R vacuolização tubular; DT_R dilatação tubular; NF_R novos néfrons; AG_R aumento glomerular; REB_R redução do espaço de Bowman; OL oclusão da luz tubular.

5. DISCUSSÃO

As brânquias, fígado e rins são responsáveis pelas funções vitais dos peixes, como a respiração, acumulação, biotransformação e excreção de xenobióticos. O maior número de alterações observadas nas brânquias se deve ao fato deste órgão estar em contato com o fármaco e de forma contínua (Menéndez-Helman *et al.*, 2020). Entre as alterações observadas, a hiperplasia do epitélio e a fusão das lamelas secundárias (proliferações celular), bem como o encurtamento de lamelas secundárias, são consideradas mecanismos adaptativos de defesa, pois reduzem a área superficial e aumentam a distância entre os contaminantes, diminuindo a taxa de absorção (Bernet *et al.*, 1999; Capaldo *et al.*, 2019). Porém, essas alterações podem prejudicar os processos respiratórios, como redução da troca gasosa e iônica levando à hipóxia até fusão lamelar completa com o desaparecimento das lamelas secundárias e supressão da superfície respiratória (Antunes *et al.*, 2017; Gao *et al.*, 2023).

Outro mecanismo adaptativo de defesa para reduzir a captação de contaminantes, é o levantamento da camada epitelial das lamelas secundárias do tecido conjuntivo subjacente aumentando a barreira água-sangue e a distância de difusão da água circundante aos capilares (Fernandes; Mazon, 2003; Nunes *et al.*, 2014). De acordo com Bernet (1999) e Rodrigues *et al.* (2019) esta alteração é classificada como uma lesão regressiva, que pode promover a mudança da arquitetura tecidual ou até mesmo a destruição de células e tecidos provocando redução ou perda funcional. No presente estudo, esta alteração foi pouco frequente, mas o efeito não pode ser descartado se o animal permanecer neste ambiente por mais tempo ou em concentrações maiores das analisadas.

No que diz respeito às alterações circulatórias, o edema é geralmente referido como um primeiro sinal de patologia (Omar *et al.*, 2014), resulta no aumento da distância entre o sangue e a água, o que pode ser considerado um mecanismo de defesa contra substâncias tóxicas circundantes, mas também pode levar ao fornecimento insuficiente de oxigênio ao sangue e evoluir para o aneurisma (Wolf *et al.*, 2015). Já o aneurisma, é uma alteração vascular relacionada à ruptura das células pilares resultando em aumento do fluxo sanguíneo no interior das lamelas, dilatação do canal marginal e congestão sanguínea, causado pelos efeitos diretos dos contaminantes (Camargo; Martinez, 2007; Santos *et al.*, 2014). Os aneurismas foram frequentes a partir da exposição a 1,8 µg/L de DCQ, uma concentração de ocorrência ambiental em água superficial. Além disso, o aumento de dilatações no seio venoso central em função da concentração de DCQ, atuaria para reparar a falta de trocas gasosas, provavelmente associadas a esse controle respiratório mediante a exposição (Buzo, 2018).

Similarmente, fusão de lamelas secundárias, congestões sanguíneas e levantamento epitelial, foram observadas em carpa comum (*Cyprinus carpio*), na exposição a 3,16 mg/mL de DCQ por 35 dias (Ramesh, 2018). As alterações branquiais não são específicas ao fármaco ou ao *D. rerio*, uma vez que lesões branquiais são respostas generalizadas a qualquer condição de estresse, observadas em muitas espécies de peixes expostas a diferentes tipos de contaminantes aquáticos, inclusive a excreção dos peixes, que, durante o confinamento em aquários pode causar alterações de baixo risco (Thurston *et al.*, 1984; Evans, 1987; Rodrigues *et al.*, 2019; Capaldo *et al.*, 2019; Gao *et al.*, 2023; Marinsek *et al.*, 2024) que podem justificar as presentes no controle.

Assim, nossos resultados mostraram que concentrações ambientalmente relevantes de DCQ alteraram a morfologia branquial de *D. rerio*, com prejuízos na respiração, mostrando maior índice patológico branquial total e maior frequência de ocorrência de lesões contabilizadas na extensão do órgão em concentrações mais elevadas.

Já a toxicidade hepática nos peixes não apresenta um padrão de resposta local a intoxicação como é visto para outros vertebrados (Wolf *et al.*, 2015). Nesse sentido, o estresse oxidativo e a sobrecarga de adipocinas, por exemplo, promovem inflamação e podem exacerbar o dano aos hepatócitos (Goessling; Sadler, 2015).

A vacuolização dos hepatócitos é um desses casos e o aumento observado em peixe-zebra pode ser devido ao armazenamento de energia (glicogênio ou lipídio) ou uma alteração degenerativa, resposta toxicológica frequente em peixes (Braunbeck, 1998; Stehr *et al.*, 1998; Wolf; Wheeler, 2018). Por exemplo, a vacuolização do tipo glicogênio é caracterizada como floculenta, angular, com margens suaves e dilatação do núcleo, enquanto a vacuolização lipídica causa espaços circulares claros, bem delineados com o dilatação do núcleo para a periferia da célula quando o citoplasma é ocupado por um ou dois grandes vacúolos (Wolf; Wolfe, 2005; Snyder *et al.*, 2023).

A vacuolização também pode estar associada à inibição da síntese proteica, esgotamento de energia, desagregação de microtúbulos ou mudanças na utilização de substrato (Ahmed *et al.*, 2013; Younis *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2019) e, portanto, pode indicar processos de desintoxicação do DCQ com mobilização de energia, conforme descrito no capítulo 2. A vacuolização pode ainda causar um aumento nos hepatócitos, falha dos hepatócitos lesionados em se dividirem mitoticamente (megalocitose) e inchaço vacuolar das cisternas do retículo endoplasmático (degeneração hidrópica) (Hinton *et al.*, 2018).

A hipertrofia dos hepatócitos geralmente é acompanhada pela hipertrofia nuclear, e pode ocorrer naturalmente devido à capacidade dos estrogênios de aumentar o metabolismo para a produção de vitelogenina (Wester *et al.*, 2003; Real *et al.*, 2020), o que justifica a ocorrência no grupo controle. No entanto, estudos mostraram que a hipertrofia hepática induzida por medicamentos ou substâncias químicas pode ser causada pela proliferação de organelas, pelo aumento dos processos de biotransformação e por metabolização de medicamentos pela ação de enzimas (Nero *et al.*, 2006; Schramm *et al.*, 1998; Hall *et al.*, 2012).

As alterações no formato nuclear foram observadas nos peixe-zebra expostos ao DCQ, estando relacionadas a estágios de reparo da toxicose (Ferguson, 1989; Borges *et al.*, 2019). A presença de núcleos picnóticos é considerada uma alteração nuclear preocupante, pois, além de ser a forma condensada irreversível de cromatina, sugere lesão do fígado (Pal *et al.*, 2012). De acordo com Hadi; Alwan (2012) esta alteração pode estar associada ao processo de degeneração hepatocelular, podendo ser possivelmente um indicativo de necrose futura. Nos estudos de Ramesh *et al.* (2018), também foram descritas alterações hepáticas como hepatócitos alterados, vacuolização e degeneração, após a exposição de carpas ao DCQ.

A degeneração citoplasmática ocorre quando a célula não é capaz de metabolizar substâncias exógenas ou preexistentes acumulados em excesso no fígado (Kumar, 2014). No geral, a ocorrência da degeneração no fígado de peixes reduz a função celular, causando uma descompensação metabólica e imunossupressão, podendo ser reversíveis com o cessar da exposição ao contaminante ou levar a quadros clínicos mais severos com mortalidade (Raposo *et al.*, 2021). As alterações histopatológicas no fígado devido à exposição ao DCQ podem prejudicar sua funcionalidade regular, afetando suas funções vitais. Isso pode reduzir a capacidade metabólica e de desintoxicação do fígado, comprometendo outros órgãos e sistema (Rodrigues *et al.*, 2019).

A vacuolização no epitélio tubular renal pode aparecer precocemente na exposição de peixes a contaminantes, sendo reversível com a retirada do contaminante, mas, pode evoluir para alterações degenerativas (Sula *et al.*, 2020). No entanto, para a espécie *D. rerio* os túbulos são normalmente vacuolizados, não comprometendo o funcionamento do órgão (Wolf *et al.*, 2015) e no presente estudo esta característica foi observada e não foi significativa, não demonstrando, portanto, um quadro patológico.

A maior incidência de túbulos distais e proximais fechados observados em resposta ao aumento da concentração de DCQ, fornece indícios de que esta alteração respondeu a dose-efeito do contaminante. Embora, as microvilosidades (bordas em escova) dos túbulos renais

juntamente com os procedimentos de fixação e coloração possam dar impressão de oclusão da luz inclusive no controle, houve maior incidência de túbulos distais e proximais fechados em resposta ao aumento da concentração de DCQ. Como discutido por Silva e Martinez (2007) a oclusão de luz tubular impede o fluxo adequado de filtrado, ocorrendo devido ao acúmulo de certos materiais no lúmen e como consequência do inchaço das células epiteliais, atrasando a reabsorção e secreção do túbulo.

Outra alteração tubular observada nesse estudo foi a dilatação que se refere ao inchaço hidrópico, que pode ficar mais comum na exposição de contaminantes (Hadi; Alwan, 2012). Esta alteração pode ser identificada pela hipertrofia celular e presença de pequenos grânulos no citoplasma, que assume a aparência de uma rede, que pode progredir para degeneração hialina (Takashima; Hibiya, 1995; Carvalho *et al.*, 2018).

A presença de substâncias químicas no sangue pode promover alterações na cápsula de Bowman, como proliferação anormal das células epiteliais e o espessamento da lâmina basal, que podem causar aumento glomerular e a diminuição do espaço de Bowman, representando um efeito patológico devido a redução da capacidade de filtração do rim (Hinton *et al.*, 1992; Schwaiger *et al.*, 1997; Carvalho *et al.*, 2018; Borges *et al.*, 2019). Os glomérulos dos peixes são variáveis em forma, tamanho e celularidade, mesmo em rins normais. Para identificar doenças específicas, é essencial observar a presença de fibrose periglomerular e glomeruloesclerose. (Wolf *et al.*, 2015), doenças que não foram identificadas nos grupos em estudo.

A neogênese, caracterizada por segmentos basófilos escuros e imaturos (túbulos ou glomérulos) são observados em rins saudáveis, mas podem aumentar em resposta a lesão renal (Reimschuessel, 2001; Kato *et al.*, 2020) e observada neste estudo, indica adaptação e regeneração dos rins de *D. rerio*. Estudos sobre a influência de produtos farmacêuticos nos rins de peixe-zebra revelaram que ocorre produção de novos néfrons devido à ativação dos progenitores renais estromais, baseada no aparecimento de unidades de néfrons basofílicas e restauração funcional parcial em néfrons existentes alguns dias após a lesão (Diep *et al.*, 2011; Mccampbell *et al.*, 2015; Kato *et al.*, 2020). Estas pesquisas sugerem que o epitélio do túbulo do néfron danificado se recupera rapidamente do composto químico.

As alterações estruturais ocorridas nos rins dos peixes expostos ao DCQ indicaram o baixo comprometimento funcional, com IAH dentro do que é considerado normal para peixes. Isso pode ser explicado pelo contaminante passar primeiro no fígado, órgão mais comumente associado aos processos de desintoxicação e biotransformação de xenobióticos e

consequentemente, mais afetado por alterações morfológicas decorrentes de exposição a contaminantes (Rodrigues; Fanta, 1998; Vliegthart *et al.*, 2014), corroborado com o aumento do IAH no fígado de *D. rerio* após exposição a diferentes concentrações de DCQ.

Um maior IAH nas brânquias do que nos rins, pode sugerir que estas excretaram o poluente ou parte dele, isso porque fisiologicamente, o papel principal do rim urinário é a osmorregulação, e as brânquias são responsáveis por mais de 80% da excreção de resíduos nitrogenados (Evans; Piermarini; Chor, 2005; Borges *et al.*, 2019). Outra explicação para o baixo impacto no rim, após a exposição ao DCQ em todas as concentrações, pode ser devido ao aumento da GST hepática, responsável pela biotransformação e desintoxicação do fármaco pelos peixes, conforme descrito no capítulo 2.

As lesões encontradas no presente estudo são considerados alterações de moderada a baixa importância patológica, sendo geralmente reversíveis quando termina a exposição ao contaminante (Polecsik; Mitrovic-Tutundizc, 1994; Rodrigues *et al.*, 2019). Embora estas alterações não tenham causado doenças graves nos órgãos analisados ou a mortalidade dos animais nas concentrações estudadas, merecem atenção uma vez que não há um monitoramento de fármacos em águas brasileiras. Os valores obtidos na ACP evidenciam a capacidade dos biomarcadores histológicos de responderem de maneira distinta a diferentes concentrações de DCQ, permitindo uma compreensão mais profunda dos efeitos tóxicos e os mecanismos de resposta em diferentes órgãos. Isso pode ser essencial para o desenvolvimento de estratégias de monitoramento e mitigação da exposição a contaminantes.

Ademais, devido à falta de uma regulamentação de concentrações seguras de produtos farmacêuticos para o ambiente e a população e, por se tratar de uma substância que tem um potencial bioacumulativo (Kumari; Kumar, 2021), este estudo traz uma contribuição na compreensão dos efeitos do DCQ e suas possíveis consequências a saúde de peixes expostos a concentrações de ocorrência ambiental, como perda de força física devido a deformidades, prejuízos na capacidade de fuga, alimentação, reprodução e por fim, da dificuldade em chegar à vida adulta.

6. CONCLUSÃO

Os biomarcadores utilizados para as brânquias, fígado e rim de peixe-zebra são indicadores úteis da poluição ambiental aquática pelo DCQ, embora os mecanismos renais tenham sido menos acometidos, provavelmente pela eficácia da excreção branquial e biotransformações hepática, gerando subprodutos menos tóxicos. No geral foi observado com o aumento das concentrações, o aparecimento e prevalência de alterações. Os biomarcadores histológicos mais responsivos a exposição foram dilatação do seio venoso central para as brânquias, núcleos picnóticos para fígado e a redução do espaço de Bowman para rins. O Índice de Alteração Histológica (IAH) chama atenção para o estágio moderado de severidade nas lesões encontradas, sobretudo para as brânquias e fígado, em concentrações registradas em água superficiais e de ocorrência durante a pandemia da COVID-19 (1,8 µg/L). O estudo evidencia a importância do monitoramento de produtos farmacêuticos em águas residuais e em corpos hídricos, com a priorização de novas resoluções que contemplem uma faixa de concentração segura para o meio ambiente, em que este estudo poderá servir como referência.

7. REFERÊNCIAS

- AHMED, M. K. *et al.* Arsenic induced toxicity and histopathological changes in gill and liver tissue of freshwater fish, tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 65, n. 6, p. 903-909, 2013.
- ANTUNES, A. M. *et al.* Gender-specific histopathological response in guppies *Poecilia reticulata* exposed to glyphosate or its metabolite aminomethylphosphonic acid. **Journal of Applied Toxicology**, v. 37, n. 9, p. 1098-1107, 2017.
- AYAS, Z. *et al.* Histopathological changes in the livers and kidneys of fish in Sariyar Reservoir, Turkey. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 23, n. 2, p. 242-249, 2007.
- BALULA, T. L. A. **Avaliação dos efeitos histológicos ao nível das brânquias e fígado no peixe mosquito (*Gambusia holbrooki*) após uma exposição a cloreto de benzalcônio.** 2011, 30 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2011.
- BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, v. 22, n. 1, p. 25-34, 1999.
- BRAUNBECK, T. Cytological alterations in fish hepatocytes following *in vivo* and *in vitro* sublethal exposure to xenobiotics—structural biomarkers of environmental contamination. *In: Fish Ecotoxicology*. Basel: Birkhäuser Basel, 1998. p. 61-140.
- BUZO, M. G. **Alterações genéticas e histológicas em peixes neotropicais expostos a nanopartículas de prata.** 2018, 59 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Comparada) - Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2018.
- CAMARGO, M. M. P; MARTINEZ, C. B. R. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. **Neotropical Ichthyology**, v. 5, p. 327-336, 2007.
- CAMPOS, C. M.; MORAES, J. R. E; MORAES, F. R. de. 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. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 200-205, 2008.
- CAPALDO, A.; GAY, F.; LAFORGIA, V. Changes in the gills of the European eel (*Anguilla anguilla*) after chronic exposure to environmental cocaine concentration. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 169, p. 112-119, 2019.
- CARVALHO, J. C. T. *et al.* Effects of *Bothrops alternatus* venom in zebrafish: a histopathological study. **Inflammopharmacology**, v. 26, p. 273-284, 2018.

- COSTA, P. M. *et al.* Histological biomarkers in liver and gills of juvenile *Solea senegalensis* exposed to contaminated estuarine sediments: a weighted indices approach. **Aquatic Toxicology**, v. 92, n. 3, p. 202-212, 2009.
- DAVICO, C. E. **Hepatotoxicidade do herbicida a base de glifosato, utilizando *Danio rerio* como modelo experimental.** 2021. 118 p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e do Desenvolvimento) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2021
- DIEP, C. Q. *et al.* Identification of adult nephron progenitors capable of kidney regeneration in zebrafish. **Nature**, v.470, n. 7332, p. 95-100, 2011.
- EVANS, D. H. The fish gill: site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. **Environmental Health Perspectives**, v. 71, p. 47-58, 1987.
- EVANS, D. H.; PIERMARINI, P. M.; CHOE, K. P. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. **Physiological Reviews**, v. 85, n. 1, p. 97-177, 2005.
- FERGUSON, H. W. *et al.* Systemic pathology of fish. A text and atlas of comparative tissue responses in diseases of teleosts. Iowa State University Press, Iowa, 1989. 263 p.
- FERNANDES, M. N.; MAZON, A. F. Environmental pollution and gill morphology. *In*: VAL, A. L.; KAPOOR, B. G. (Eds.). **Fish Adaptations**. USA: Science Publishers. 2003, c. 9, p. 203 – 231.
- FERREIRA, M. T; CARVALHO, C. S. Chloroquine and hydroxychloroquine in the environment and aquatic organisms: a review. **Revista Ambiente & Água**, v. 18, p. e2880, 2023.
- FOURNIE, J. W.; KROL, R. M.; HAWKINS, W. E. Fixation of fish tissues. *In*: **The laboratory Fish**. New York: Academic Press, 2000. p. 569-578.
- FRACÁCIO, R. **Estudos limnológicos e ecotoxicológicos (laboratoriais e *in situ*), com ênfase na avaliação da toxicidade de metais e de pesticidas organoclorados em peixes (*Danio rerio* e *Poecilia reticulata*) sub-bacia do rio Monjolinho (São Carlos SP).** 2006, 209 p. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.
- FRAZIER, K. S. *et al.* Kidney pathology and investigative nephrotoxicology strategies across species. *In*: **Seminars in Nephrology**. WB Saunders, 2019. p. 190-201.
- GAO, Y *et al.* Effects of the water-soluble fraction of diesel oil on the sera biochemical indicators, histological changes, and immune responses of black rockfish *Sebastes schlegelii*. **Marine Environmental Research**, v. 187, p. 105953, 2023.

- GOESSLING, W.; SADLER, K. C. Zebrafish: an important tool for liver disease research. **Gastroenterology**, v. 149, n. 6, p. 1361-1377, 2015.
- HADI, A. A.; ALWAN, S. F. Histopathological changes in gills, liver and kidney of fresh water fish, *Tilapia zillii*, exposed to aluminum. **International Journal of Pharmacy & Life Sciences**, v. 3, n. 11, 2012.
- HALL, A. P. *et al.* Liver hypertrophy: a review of adaptive (adverse and non-adverse) changes—conclusions from the 3rd International ESTP Expert Workshop. **Toxicologic Pathology**, v. 40, n. 7, p. 971-994, 2012.
- HINTON, D. E. *et al.* Histopathologic biomarkers. *In: Biomarkers*. Boca Raton: CRC Press, 2018. p. 155-210.
- HINTON, D. E. *et al.* Histopathologic Biomarkers. *In: HUGGETT, R. J.; KIMERLI, R. A.; MEHRLE, P. M.; BERGMAN, H. L. Biomarkers Biochemical, Physiological And Histological Markers Of Anthropogenic Stress*. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992. cap. 4, p. 155 –196.
- KATO, Y. *et al.* Adult zebrafish model for screening drug-induced kidney injury. **Toxicological Sciences**, v. 174, n. 2, p. 241-253, 2020.
- KENT, M. L. *et al.* Special procedures for zebrafish diagnostics. *In: The Zebrafish in Biomedical Research*. Academic Press, 2020. p. 547-556.
- KUMAR,V; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N; ASTER, J.C. ROBBINS, S.L. **Patologia -Bases Patológicas das Doenças**. 8ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.
- KUMARI, M.; KUMAR, A. Can pharmaceutical drugs used to treat Covid-19 infection leads to human health risk? A hypothetical study to identify potential risk. **Science of the Total Environment**, v. 778, p. 146303, 2021.
- LI, H. *et al.* Research progress of zebrafish model in aquatic ecotoxicology. **Water**, v. 15, n. 9, p. 1735, 2023.
- MADUREIRA, T. V. *et al.* The toxicity potential of pharmaceuticals found in the Douro River estuary (Portugal): evaluation of impacts on fish liver, by histopathology, stereology, vitellogenin and CYP1A immunohistochemistry, after sub-acute exposures of the zebrafish model. **Environmental Toxicology And Pharmacology**, v. 34, n. 1, p. 34-45, 2012.
- MARINSEK, G.P. *et al.* Multiple biomarkers in pufferfish as a proxy of environmental health in brazilian marine protected areas. **Science of The Total Environment**, v. 914, p. 169742, 2024.
- MCCAMPBELL, K. K. *et al.* Atlas of cellular dynamics during zebrafish adult kidney regeneration. **Stem Cells International**, v. 2015, 2015.

- MCGRATH, Pa.; LI, C.Q.. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 9-10, p. 394-401, 2008.
- MENÉNDEZ-HELMAN, R. J. *et al.* Effects on ultrastructure, composition and specific surface area of the gills of *Odontesthes bonariensis* under subchronic glyphosate-based herbicide exposure. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 105, p. 835-840, 2020.
- MENKE, A. L. *et al.* Normal anatomy and histology of the adult zebrafish. **Toxicologic Pathology**, v. 39, n. 5, p. 759–775, 2011.
- NERO, V. *et al.* Gill and liver histopathological changes in yellow perch (*Perca flavescens*) and goldfish (*Carassius auratus*) exposed to oil sands process-affected water. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, v. 63, n. 3, p. 365-377, 2006.
- NOVOTNY, L. Respiratory Tract disorders in fishes. **Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice**, v. 24, n. 2, p. 267-292, 2021.
- NUNES, B. *et al.* Acute effects of tetracycline exposure in the freshwater fish *Gambusia holbrooki*: antioxidant effects, neurotoxicity and histological alterations. **Archives Of Environmental Contamination And Toxicology**, v. 68, p. 371-381, 2015.
- OMAR, W. A.; SALEH, Y. S.; MARIE, M. A. S. Integrating multiple fish biomarkers and risk assessment as indicators of metal pollution along the Red Sea coast of Hodeida, Yemen Republic. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, v. 110, p. 221-231, 2014.
- PAL, S. *et al.* Histopathological alterations in gill, liver and kidney of common carp exposed to chlorpyrifos. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 47, n. 3, p. 180-195, 2012.
- PHAM, D.H.; YIN, C. Zebrafish as a model to study cholestatic liver diseases. **Experimental Cholestasis Research**, p. 273-289, 2019.
- POLEKSIĆ, V.; MITROVIĆ-TUTUNDŽIĆ, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. *In: Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish*, Oxford: Fishing News Books, 1994, 339-352 p.
- POUREETEZADI, S. J.; WINGERT, R. A. Little fish, big catch: zebrafish as a model for kidney disease. **Kidney International**, v. 89, n. 6, p. 1204-1210, 2016.
- RAMESH, M. *et al.* Evaluation of acute and sublethal effects of chloroquine (C₁₈H₂₆ClN₃) on certain enzymological and histopathological biomarker responses of a freshwater fish *Cyprinus carpio*. **Toxicology Reports**, v. 5, p. 18-27, 2018.

- RAPOSO, R. S. *et al.* Mortalidade em tilápias (*Oreochromis niloticus*) provocada por falhas de manejo e o desafio diagnóstico para os serviços veterinários oficiais. **Pubvet**, v. 15, p. 188, 2021.
- REAL, M. V. F. *et al.* Histology and design-based estimation of hepatocellularity and volumes of hepatocytes in control and ethynylestradiol exposed males of platyfish (*Xiphophorus maculatus*). **Tissue and Cell**, v. 63, p. 101327, 2020.
- REIMSCHUESSEL, R. A fish model of renal regeneration and development. **ILAR journal**, v. 42, n. 4, p. 285-291, 2001.
- RIGOLIN-SÁ, O.R. **Avaliação da toxicidade do herbicida Roundup (Glifosato) e do acaricida Omite (Propargito) nas fases iniciais da ontogenia do bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) (Pimelodidae, Siluriformes)**. 1998, 309 p. Tese (Doutorado em Recursos Naturais) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos 1998.
- RODRIGUES, E.L.; FANTA, E. Liver histopathology of the fish *Brachydanio rerio* after acute exposure to sublethal levels of the organophosphate Dimetoato 500. **Revista Brasileira de Zoologia**. **15**: 441-450, 1998.
- RODRIGUES, S. *et al.* Histopathological effects of the antibiotic erythromycin on the freshwater fish species *Oncorhynchus mykiss*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 181, p. 1-10, 2019.
- SANTOS, D. M. S *et al.* Histological changes in gills of two fish species as indicators of water quality in Jansen Lagoon (São Luís, Maranhão State, Brazil). **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, v. 11, n. 12, p. 12927-12937, 2014.
- SCHLEGEL, A. Studying non-alcoholic fatty liver disease with zebrafish: a confluence of optics, genetics, and physiology. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, p. 3953-3961, 2012.
- SCHRAMM, M.; MULLER, E.; TRIEBSKORN, R. Brown trout *Salmo trutta* f. Fario liver ultrastructure as a biomarker for assessment of small stream pollution. **Biomarkers**, v. 3, n. 2, p. 93-108, 1998.
- SCHWAIGER, J. *et al.* The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v. 6, p. 75-86, 1997.
- SCHWAIGER, J. *et al.* Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. **Aquatic Toxicology**, v. 68, n. 2, p. 141-150, 2004.
- SILVA, A.G.; MARTINEZ, C. B., 2007. Morphological changes in the kidney of a fish living in an urban stream. **Environmental Toxicology and Pharmacology** 23(2), 185-192.

- SMITH, C. J.; SHAW, B. J.; HANDY, R. D. Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. **Aquatic Toxicology**, v. 82, n. 2, p. 94-109, 2007.
- SNYDER, S. M. *et al.* Spatiotemporal patterns in the prevalence of microscopic hepatic changes in Gulf of Mexico Tilefish (*Lopholatilus chamaeleonticeps*) and associations with hepatic PAHs. **Aquatic Toxicology**, v. 258, p. 106512, 2023.
- STEHR, C. M.; JOHNSON, L. L.; MYERS, M. S. Hydropic vacuolation in the liver of three species of fish from the US West Coast: lesion description and risk assessment associated with contaminant exposure. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 32, n. 2, p. 119-135, 1998.
- SULA, E. *et al.* Evaluation of kidney histopathological alterations in Crucian Carp, *Carassius carassius*, from a pesticide and PCB-contaminated freshwater ecosystem, using light microscopy and organ index mathematical model. **International Journal Of Aquatic Biology**, v. 8, n. 3, p. 154-165, 2020.
- SWANHART, L. M. *et al.* Zebrafish kidney development: basic science to translational research. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**, v. 93, n. 2, p. 141-156, 2011.
- TAKASHIMA F.; HIBIYA T. **An atlas of fish histology: normal and pathological features**. 2^o ed. Tokyo: Kodansha Ltd. 1995. 195 p.
- TEH, S. J.; ADAMS, S. M.; HINTON, D. E. Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. **Aquatic Toxicology**, v. 37, n. 1, p. 51-70, 1997.
- THURSTON, R. V. *et al.* Chronic toxicity of ammonia to rainbow trout. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 113, n. 1, p. 56-73, 1984.
- VAN der OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. 13: 57- 149, 2003.
- VLIEGENTHART, A. D. B. *et al.* Zebrafish as model organisms for studying drug-induced liver injury. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 78, n. 6, p. 1217-1227, 2014.
- WESTER, P. W. *et al.* Identification of endocrine disruptive effects in the aquatic environment- a partial life cycle study in zebrafish. 2003.
- WILSON, J. M.; BUNTE, R. M.; CARTY, A. J. Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 48, n. 6, p. 785-789, 2009.

- WOLF, J. C. A critical review of morphologic findings and data from 14 toxicological studies involving fish exposures to diclofenac. **Toxicologic Pathology**, v. 49, n. 5, p. 1024-1041, 2021.
- WOLF, J. C. *et al.* Nonlesions, misdiagnoses, missed diagnoses, and other interpretive challenges in fish histopathology studies: a guide for investigators, authors, reviewers, and readers. **Toxicologic Pathology**, v. 43, n. 3, p. 297-325, 2015.
- WOLF, J. C.; WHEELER, J. R. A critical review of histopathological findings associated with endocrine and non-endocrine hepatic toxicity in fish models. **Aquatic Toxicology**, v. 197, p. 60-78, 2018.
- WOLF, J. C.; WHEELER, J. R. A critical review of histopathological findings associated with endocrine and non-endocrine hepatic toxicity in fish models. **Aquatic Toxicology**, v. 197, p. 60-78, 2018.
- WOLF, J. C.; WOLFE, M. J. A brief overview of nonneoplastic hepatic toxicity in fish. **Toxicologic Pathology**, v. 33, n. 1, p. 75-85, 2005.
- WU, G. *et al.* Abiotic and biotic processes of diclofenac in enriched nitrifying sludge: kinetics, transformation products and reactions. **Science of the Total Environment**, v. 683, p. 80-88, 2019.
- YANCHEVA, V. *et al.* Histological biomarkers in fish as a tool in ecological risk assessment and monitoring programs: a review. **Applied Ecology and Environmental Research**, v. 14, n. 1, p. 47-75, 2016.
- YAO, Y. *et al.* Fine Structure, Enzyme Histochemistry, and Immunohistochemistry of Liver in Zebrafish. **Anatomical Record**, v. 295, n. 4, p. 567–576, 2012.
- YOUNIS, E. M. *et al.* Histological changes in the liver and intestine of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to sublethal concentrations of cadmium. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 45, n. 3, p. 833-841, 2013.

Capítulo 4. Considerações finais e perspectivas

A análise da toxicologia do Difosfato de Cloroquina (DCQ) em peixe-zebra, combinando biomarcadores histológicos e bioquímicos, é de suma importância para compreender os efeitos sistêmicos da exposição crônica desse composto na água. Os biomarcadores histológicos, como alterações em órgãos como fígado, rins e brânquias, proporcionam uma visão detalhada dos danos causados pelo DCQ no nível celular e tecidual. Já os biomarcadores bioquímicos, como enzimas hepáticas e estresse oxidativo, revelam mudanças metabólicas e oxidativas, indicando a resposta fisiológica do organismo à substância.

O anexo IX (Correlação de Spearman entre os biomarcadores histológicos das brânquias e os biomarcadores bioquímicos do cérebro) e o anexo X (Correlação de Spearman entre os biomarcadores histológicos do fígado e do rim, e os biomarcadores bioquímicos do corpo) demonstram que pode haver a correlação entre esses biomarcadores.

As alterações nos biomarcadores branquiais correlacionaram positivamente entre o aumento de proteínas totais e triglicerídeos no cérebro, o que pode explicar as proliferações celulares que levam a fusões totais. Além disso, os triglicerídeos também foram correlacionados a danos como o desprendimento epitelial, dilatação do seio venoso central e edemas, que pode ser devido a alteração na permeabilidade das membranas celulares e acúmulo de fluidos.

Os biomarcadores histológicos das brânquias apresentaram correlação forte entre si, o que pode estar associado aos mecanismos de defesa do órgão. Enquanto o estresse oxidativo no cérebro foi visto pela correlação positiva entre os biomarcadores PCO, TBARs e GST, demonstra a sensibilidade deste órgão para danos oxidativos. Além disso, os níveis de glicose no cérebro foram correlacionados ao estresse oxidativo por PCO e TBARs.

No corpo, destacam-se as correlações positivas entre os metabólitos proteínas, triglicerídeos e glicose, possivelmente devido esses metabólitos poderem estar sendo utilizados conjuntamente na compensação energética em situação de estresse da exposição, além do DCQ apresentar propriedades hipoglicemiante e de redução dos triglicerídeos.

A correlação positiva entre GST e as aminotransferases (AST e ALT) pode estar associada a intensa atividade dos órgãos, principalmente do fígado, para resistir a exposição. Isso pode ser confirmado devido as enzimas AST, ALT e LDH estarem correlacionadas positivamente as alterações hepatocelulares inclusive núcleos picnóticos e na periferia da célula, sendo a AST ainda relacionada ao aumento da degeneração e vacuolização citoplasmáticas. Além do fígado, estas enzimas também foram correlacionadas positivamente a alterações renais como dilatação tubular, aumento glomerular, redução do espaço de Bowman e oclusão da luz tubular, evidenciando suas intensas ações nesses órgãos após a exposição.

A atividade da ALP foi correlacionada positivamente as TBARs, uma vez que o aumento do estresse oxidativo pode modular a atividade dessa enzima, e com os danos nas células do fígado, como a vacuolização citoplasmática, com quem também teve correlação. Em algumas condições, onde há alteração do fígado, tanto os níveis de ALP quanto de imunoglobulinas podem estar elevados, sendo que as Igs também foram correlacionadas a degeneração dos hepatócitos, o que pode ser uma justificativa do seu aumento no muco.

Os biomarcadores do fígado e do rim correlacionaram-se de maneira positiva entre si, isso porque o DCQ e seus metabólitos são metabolizados no fígado e excretados pelos rins, dessa forma os danos hepáticos podem alterar a metabolização dos medicamentos, potencializando a toxicidade renal.

Algumas correlações negativas entre os triglicerídeos e os biomarcadores hepáticos como vacuolização e degeneração pode estar atrelado a diminuição dos lipídeos que agem como uma proteção dos hepatócitos. A glicose também apresentou correlações negativas entre biomarcadores do fígado, rim e as enzimas ALP, AST, GST bem como TBARs e PCO, indicando que pode ter sido um mecanismo de compensação em situação de estresse. Os biomarcadores de estresse oxidativo não apresentaram nenhuma relação entre si no corpo.

Essa abordagem integrada permite não apenas identificar os efeitos adversos do DCQ no peixe-zebra, mas também compreender os mecanismos subjacentes. Além disso, esses estudos são fundamentais para avaliar os riscos potenciais da contaminação da água por Cloroquina para os ecossistemas aquáticos e para a saúde humana, uma vez que os peixes são uma importante fonte de alimento em muitas comunidades.

Portanto, a análise combinada de biomarcadores histológicos e bioquímicos em peixe-zebra é essencial para uma avaliação abrangente dos efeitos da Cloroquina no ambiente aquático, contribuindo para a tomada de decisões informadas em relação a sua concentração no ambiente ($<1,8 \mu\text{g/L}$), o seu uso e descarte adequados, visando a preservação da saúde dos ecossistemas aquáticos e a proteção da saúde humana.

Como perspectivas futuras, recomenda-se a atenção na interação da Cloroquina com compostos inorgânicos, como os metais e orgânicos, como os microplásticos, agroquímicos e outros produtos farmacêuticos, coexistindo no mesmo ambiente aquático e podendo ter a sua toxicidade alterada. Além disso, estudos de remoção da Cloroquina na água, conforme visto na revisão de bibliografia no primeiro capítulo, são extremamente escassos, demonstrando a necessidade de avaliar diferentes matrizes que ajudem a degradar esse composto na água, incluindo o estudo com substâncias químicas ou organismos vivos como plantas, algas e fungos.

ANEXOS

ANEXO I. Autorização comitê de ética UNESP



CERTIFICADO

CEUA ICTS – Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciência e Tecnologia de Sorocaba - UNESP

CERTIFICAMOS, que o protocolo registrado sob o nº **02/2022**, intitulado:- *“Efeitos da cloroquina utilizada no tratamento da COVID-19 sobre biomarcadores de peixe-zebra (Danio rerio)”* sob a responsabilidade da **Profa. Dra Cleoni dos Santos Carvalho (UFSCar – Campus Sorocaba-SP)**, tendo como **colaboradores:- a Doutoranda Marina Tauche Ferreira (Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental (PPGBMA))** e a **Profa. Dra. Renata Fracacio Francisco (UNESP ICTS)**, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA – ICTS – CAMPUS DE Sorocaba-UNESP)**, em reunião de 30/08/2022.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Outubro/2022 a outubro/2024
Espécie/linhagem/raça	<i>Danio rerio</i>
Nº de Animais	225
Peso/Idade	Aproximadamente 3 meses (cerca de 2 cm e 0,3g)
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Aquisição comercial
Compromisso/Relatório(s)	Parcial:- Envio para a CEUA:- outubro/2023 Final:- Envio para a CEUA:- outubro/2024

Sorocaba, 01 de setembro de 2022

Darllan Collins da
Cunha e
Silva:22397267845

Assinado de forma digital por
Darllan Collins da Cunha e
Silva:22397267845
Dados: 2022.09.01 17:32:55
-03'00'

Prof.Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva**Vice-Coordenador/CEUA ICTS**

ANEXO II. Autorização comitê de ética UFSCar

Pró Reitoria
de Pesquisa

Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITOS DA CLOROQUINA UTILIZADA NO TRATAMENTO DA COVID-19 SOBRE BIOMARCADORES DE PEIXE-ZEBRA (Danio rerio).", protocolada sob o CEUA nº 9517190922 (ID 001712), sob a responsabilidade de **Cleoni dos Santos Carvalho** e equipe; *Renata Fracácio Francisco*; *Marina Tauche Ferreira* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 17/10/2022.

We certify that the proposal "EFFECTS OF CHLOROQUINE USED IN THE TREATMENT OF COVID-19 ON ZEBRAFISH BIOMARKERS (Danio rerio).", utilizing 205 Fishes (males and females), protocol number CEUA 9517190922 (ID 001712), under the responsibility of **Cleoni dos Santos Carvalho and team**; *Renata Fracácio Francisco*; *Marina Tauche Ferreira* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 10/17/2022.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [11/2022](#) a [01/2023](#) Área: [Biologia](#)

Origem: [Animais provenientes de estabelecimentos comerciais](#)

Espécie: [Peixes](#) sexo: [Machos e Fêmeas](#) idade: [10 a 16 semanas](#) N: [205](#)

Linhagem: [Danio rerio](#) Peso: [01 a 1 g](#)

Local do experimento: Laboratório de Toxicologia de Contaminantes Ambientais e Histopatologias (LATHIS) do Instituto de Ciência e Tecnologia de Sorocaba da Universidade Estadual Paulista [Júlio de Mesquita Filho] UNESP.

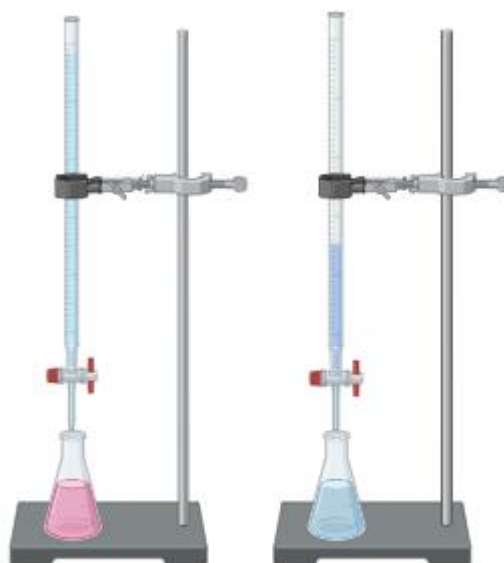
São Carlos, 21 de outubro de 2022

Profa. Dra. Luciana Thie Seki Dias
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos

Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho
Vice-presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos

ANEXO III. Medição da dureza

1. Coletou-se amostra de água do aquário (100 mL)
2. Adicionou-se a água em um Erlenmeyer (250 mL)
3. Pipetou-se 1,5 mL de solução de NH_4CL .
4. Adicionou-se eriocromo de modo a solução ficar em uma coloração rosa claro.
5. Utilizando uma bureta para a titulação, completou-se-a com EDTA.
6. Foi iniciada a titulação do EDTA na solução do Erlenmeyer até que se atingisse uma coloração azul (ponto de virada), fechando-se a válvula e anotando o valor registrado na bureta em mL.
7. O valor dado em mL era convertido para $\text{mg CaCO}_3/\text{L}$ multiplicando-o por 10.
8. Se a dureza estivesse acima dos 50 $\text{mg CaCO}_3/\text{L}$, adicionava-se água filtrada seguindo a equação do volume $\boxed{C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2}$ Onde C1= concentração da dureza; C2= concentração ideal “44”; V1= volume de água do aquário; e V2= volume pretendido. Após determinar o valor de V2 subtraiu-se do valor de V1 para saber o volume de água a ser completado.
9. Se a dureza estivesse abaixo dos 40 $\text{mg CaCO}_3/\text{L}$, adicionava-se água reconstituída (ANEXO IV), seguindo a formula $\boxed{y = x \cdot 0,5 \cdot v}$ Onde x= a concentração obtida em mg subtraída da concentração ideal “44”; y=quantidade em mL de solução 1 e metade (y/2) da quantidade em mL da solução 2; e V= volume do aquário em L.



ANEXO IV. Preparação da água reconstituída

SOLUÇÃO 1.

1. Pesou-se 3g de Sulfato de Cálcio Dihidratado ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e completou-se um balão volumétrico de 2L com água destilada.
2. Colocou-se em agitação e brando aquecimento até que a solução se dissolvesse.
3. Estocou-se em frasco âmbar e armazenou-se em temperatura ambiente

SOLUÇÃO 2.

1. Em um balão volumétrico de 2 L adicionou-se 0,4 g de KCL (cloreto de potássio), 9,6 g de NaHCO_3 (bicarbonato de sódio) e 12,2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de magnésio heptahidratado)
2. Agitou-se vigorosamente até que não fosse possível observar partes não dissolvidas.
3. Estocou-se em frasco âmbar e manteve-se em refrigeração em 4 a 10° C.

ANEXO V. Teste de sensibilidade com substância de referência cloreto de sódio (NaCl).

Concentrações (g/L)	Número de organismos expostos	Número de mortes em 48 h
0	10	0
5	10	0
7,5	10	0
11,25	10	8
16,88	10	10
25,22	10	10

CL₅₀ NaCl em 48 h = 9,96

↑ Limite máximo = 11,04

↓ Limite mínimo = 8,99



ANEXO VI. AVALIAÇÃO LC-MS/MS

Extração farmacêutica

Para amostras de água, o pH foi ajustado para 6,0 usando gotas de ácido fórmico concentrado e 500 mg de Na₂EDTA foram adicionados para evitar a quelação de produtos farmacêuticos com cátions metálicos. Amostras de 50 mL foram então enriquecidas com padrão interno azitromicina-d₃ (AZI-d₃; concentrações finais 10 mg/L) adquiridas da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil) e posteriormente filtradas através de cartuchos Oasis HLB de 6 cc, 500 mg SPE (Waters, Milford, MA, EUA) pré-condicionado com 4 mL de metanol seguido de 6 mL de água ultrapura. Após carregar as amostras, os cartuchos foram suavemente secos com nitrogênio gasoso e eluídos com 6 mL de metanol. Os eluentes foram evaporados sob uma corrente de nitrogênio até um volume de ~0,1 mL e reconstituídos com 1 mL de metanol/água (1:9 v/v) antes de serem centrifugados por 20 min a 12.000 x g. O sobrenadante resultante foi reconstituído com um tampão aquoso (0,1% de ácido fórmico) até um volume final de 1 mL.

Análise cromatográfica

A separação farmacêutica empregou eluição gradiente com uma fase móvel consistindo de 0,1% de ácido fórmico em água Milli Q (A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (B) durante um tempo total de execução de 19 minutos. O protocolo de gradiente começou com 5% de B e atingiu 80% de B em 12 minutos, depois diminuiu para 50% de B nos 14 minutos seguintes. Posteriormente, houve um aumento gradual para 65% de B em 17 minutos, retornando finalmente à concentração inicial de 5% de B no 19º minuto. Os parâmetros do instrumento que conduzem à separação eficiente incluíram uma taxa de fluxo de 0,4 mL/min, uma temperatura de coluna de 38 °C e um volume de injeção de 1 µL. As análises por espectrômetro de massa foram realizadas no modo monitoramento de múltiplas reações (MRM), com temperatura de interface de 375 °C e tensão de interface de 4000V. As transições íon precursor/íon produto para Cloroquina foram 320,2/247,2 e 324,3/146,3 e o tempo de retenção da Cloroquina foi de 10,39 minutos.

A curva de calibração foi construída utilizando o padrão analíticos Difosfato de Cloroquina Sigma Aldrich. A solução estoque padrão do composto (1000 µg/L) foi preparada usando metanol/ácido fórmico a 0,1%. A curva de calibração compreendeu dez pontos, variando de 0,1 a 500 ng/L para o analito, e incluiu 500 ng/L de padrão interno. A linearidade foi avaliada por meio de padronização externa utilizando modelo de regressão linear e soluções padrão nas concentrações de 0,3, 0,6, 1,0, 2,5, 5,0, 10, 20 e 40 µg/L. Cada lote de amostras incluiu três brancos, três padrões e três amostras fortificadas para controle de qualidade.

Validação do método

A precisão do método foi avaliada por meio de testes intradiários, com os resultados expressos como a porcentagem do desvio padrão relativo (%RSD) de três réplicas de injeções. O limite de detecção (LOD) foi determinado pela injeção de amostras de água enriquecidas (n = 20) e pela identificação da concentração mínima do analito que rendeu uma relação sinal-ruído (S/N) de 10. A precisão e o LOD foram avaliados com um aumento até 20% de tolerância em RSD.

Fármaco	Linearidade (ng/L)	R²	Intra-day RSD% (n=6)	LOD (ng/L)	Recuperação (%)
DCQ	1-40	0.997	8.15/10.12	25	82

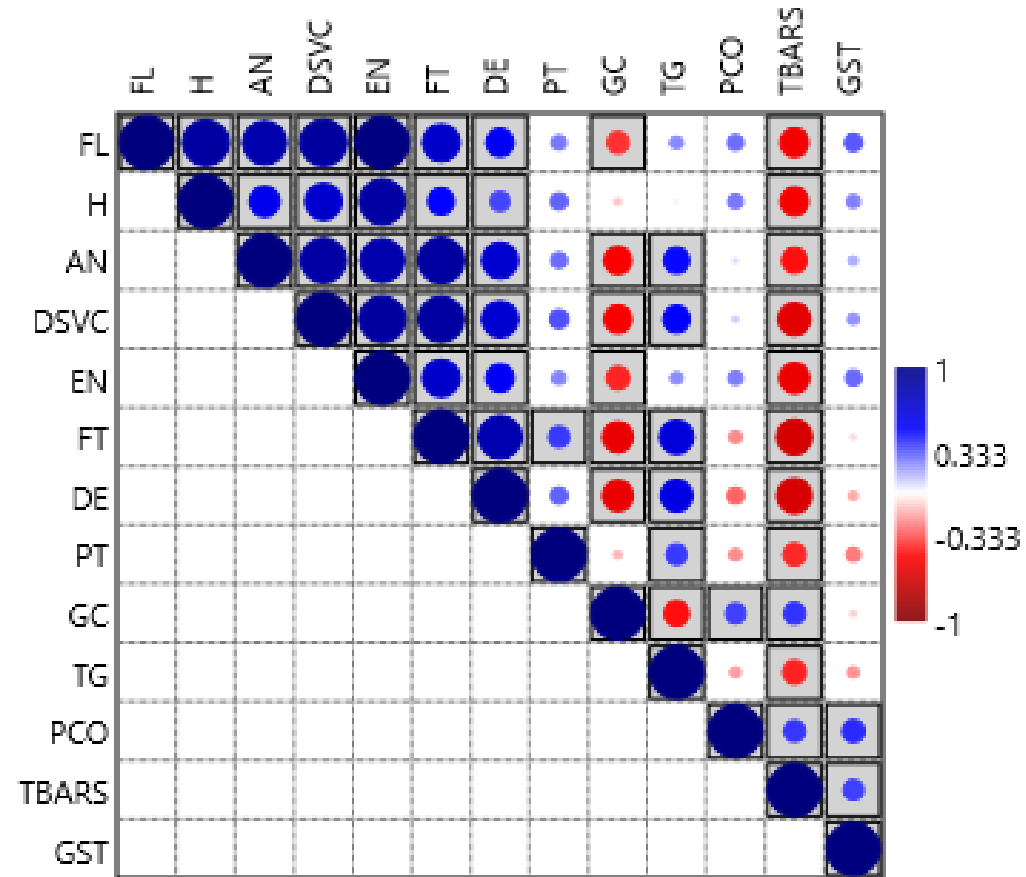
ANEXO VII. Processamento de tecidos histológicos e parafinização

Banho	Reagente	Tempo
1	Álcool Absoluto P.A	1h
2	Álcool Absoluto P.A	1h
3	Álcool Absoluto P.A	1h
4	Álcool Absoluto P.A	1h
5	Álcool Absoluto P.A	1h
6	Álcool Absoluto P.A	1h
7	Álcool Absoluto P.A	1h
8	Xilol	1h
9	Xilol	1h
10	Xilol	1h
11	Parafina (60°C)	1h
12	Parafina (60°C)	1h

ANEXO VIII. Procedimento de coloração com eosina-hematoxilina (H.E).

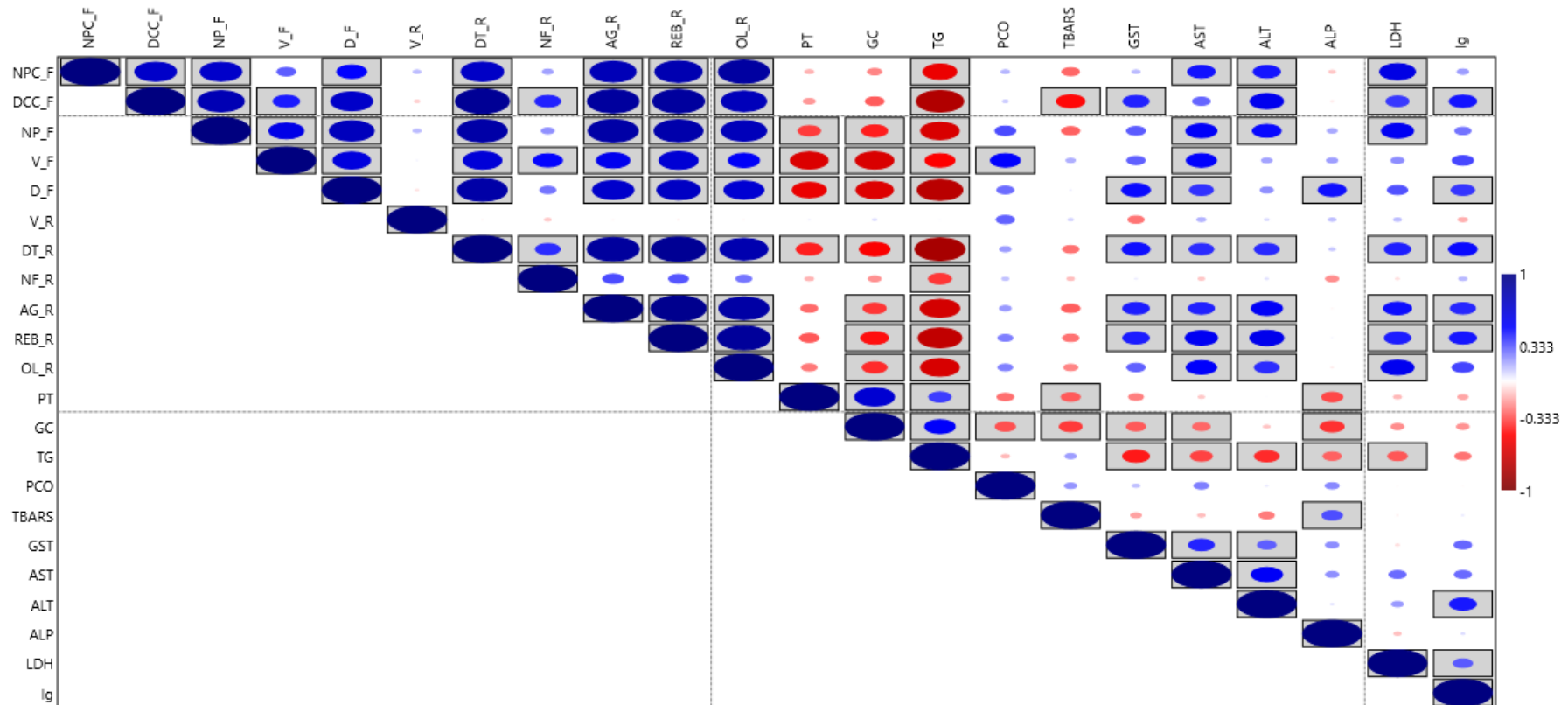
Etapa	Reagente	Tempo
1	Xilol	5 min
2	Xilol	5 min
3	Xilol	5 min
4	Álcool – Xilol (1:1)	5 min
5	Álcool Absoluto P.A	3 min
6	Álcool Absoluto P.A	3 min
7	Álcool Absoluto P.A	3 min
8	Álcool 95%	3 min
9	Álcool 90%	3 min
10	Álcool 70%	3 min
11	Água	30 s
12	Hematoxilina	4 min
13	Água	30 s
14	Eosina	2 min
15	Água	30 s
16	Álcool 70%	30 s
17	Álcool 90%	30 s
18	Álcool 95%	30 s
19	Álcool 100%	30 s
20	Álcool 100%	30 s
21	Álcool 100%	30 s
22	Álcool – Xilol (1:1)	5 min
23	Xilol	5 min
24	Xilol	5 min
25	Xilol	5 min
26	Colagem das lamínulas com Entellan	-

ANEXO IX. Correlação de Spearman entre os biomarcadores histológicos das brânquias e os biomarcadores bioquímicos do cérebro.



Nota: Nas brânquias: FL fusão de lamelas; H hiperplasia; NA aneurisma; DSVC dilatação seio venoso central; EN encurtamento de lamelas; FT fusão total; DE desprendimento epitelial. No cérebro: PT proteínas totais; GC glicose; TG triglicerídeos, PCO proteínas carboniladas; TBARS espécies reativas do ácido tiobarbitúrico; GST glutathiona S-Transferase. P<0,05

ANEXO X. Correlação de Spearman entre os biomarcadores histológicos do fígado e do rim, e os biomarcadores bioquímicos do corpo.



Nota: No fígado: NPC_F núcleo periferia da célula; DCC_F deformação no contorno celular; NP_F núcleo picnótico; V_F vacuolização citoplasmática; D_F degeneração citoplasmática. No rim: V_R vacuolização tubular; DT_R dilatação tubular; NF_R novos néfrons; AG_R aumento glomerular; REB_R redução do espaço de Bowman; OL oclusão da luz tubular. PT proteínas totais; GC glicose; TG triglicerídeos, PCO proteínas carboniladas; TBARS espécies reativas do ácido tiobarbitúrico; GST glutationa S-Transferase; AST aspartato aminotransferase; ALT alanina aminotransferase; ALP fosfatase alcalina; LDH lactato desidrogenase; Ig imunoglobulinas. P<0,05