

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA A SUSTENTABILIDADE
campus SOROCABA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E MONITORAMENTO
AMBIENTAL

BEATRIZ VIEIRA RAMOS PEREIRA

**EFEITOS AGUDOS E CRÔNICOS DOS FÁRMACOS PARACETAMOL E
PROPRANOLOL EM DIFERENTES BIOMARCADORES DE UMA ESPÉCIE DE
PEIXE NEOTROPICAL**

Sorocaba
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA A SUSTENTABILIDADE
campus SOROCABA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E MONITORAMENTO
AMBIENTAL

BEATRIZ VIEIRA RAMOS PEREIRA

**EFEITOS AGUDOS E CRÔNICOS DOS FÁRMACOS PARACETAMOL E
PROPRANOLOL EM DIFERENTES BIOMARCADORES DE UMA ESPÉCIE DE
PEIXE NEOTROPICAL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias para a Sustentabilidade da Universidade Federal de São Carlos do *Campus* de Sorocaba, para obtenção do título de mestre, no PPGBMA (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental).

Orientação: Profa. Dra. Elaine C. Mathias da Silva Zacarin

Co-orientação: Prof. Dr. Bruno Nunes

Sorocaba
2018

Vieira Ramos Pereira, Beatriz

Efeitos agudos e crônicos dos fármacos paracetamol e propranolol em diferentes biomarcadores de uma espécie de peixe neotropical / Beatriz Vieira Ramos Pereira. -- 2018.

99 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba

Orientador: Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin

Banca examinadora: Denise Grotto, Cleoni dos Santos Carvalho

Bibliografia

1. Ecotoxicologia aquática. 2. Phalloceros harpagos. 3. Biomarcadores. I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano – CRB/8 6979

BEATRIZ VIEIRA RAMOS PEREIRA

**EFEITOS AGUDOS E CRÔNICOS DOS FÁRMACOS PARACETAMOL E
PROPRANOLOL EM DIFERENTES BIOMARCADORES DE UMA ESPÉCIE DE
PEIXE NEOTROPICAL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias para a Sustentabilidade da Universidade Federal de São Carlos de *Campus* de Sorocaba, para obtenção do título de mestre, no PPGBMA (Programa de pós-graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental), Sorocaba, 28 de março de 2018.

Orientadora

Dra. Elaine C. Mathias da Silva Zacarin
Universidade Federal de São Carlos, *campus* Sorocaba.

Examinadora

Dra. Denise Grotto
Universidade de Sorocaba - UNISO

Examinador

Dra. Cleoni dos Santos Carvalho
Universidade Federal de São Carlos, *campus* Sorocaba.

Sorocaba

2018

DEDICATÓRIA

À minha irmã Renata que olha por mim de um lugar muito especial.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo financiamento do projeto vinculado ao programa Pesquisador Visitante Especial (PVE), intitulado de “Avaliação dos efeitos ecotoxicológicos de drogas terapêuticas com relevância ambiental em espécies de peixes autóctones brasileiros: uso de biomarcadores de stress oxidativo” (processo número: 88881.068122/2014-01) que deu origem ao presente trabalho. E também ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental (PPGBMA), pela disponibilização do Microscópio Confocal de Varredura a Laser (Pró-Equipamentos/CAPES: 3420/2013-17, 2610/2014-90), e pela minha bolsa de estudos da CAPES (Programa de Demanda Social - DS).

Este trabalho só foi possível graças a colaboração de diversas pessoas. Pois cada um com um pouquinho de esforço e de bondade fez muito para a elaboração de uma pesquisa científica que acrescenta para a construção de conhecimento, à essas pessoas dedico um pouquinho deste trabalho e ofereço a minha gratidão.

Agradeço à empresa Refriso de Sorocaba que nos forneceu as garrafas plásticas que foi fundamental no delineamento experimental adotado.

Gratidão às pessoas do laboratório LAMA do departamento de Biologia da UFSCar de Sorocaba, nomeadamente à Dra. Iolanda C. S. Duarte e ao Dr. André C. A. dos Santos que nos forneceu estrutura laboratorial para que os bioensaios com os animais acontecessem. Obrigada também a técnica Ms. Mônica A. Almeida do mesmo laboratório que sempre foi muito solícita quando precisávamos utilizar o laboratório.

Também não posso deixar de mencionar a Dra. Cleoni S. Carvalho que nos forneceu equipamentos necessários para homogeneização e centrifugação das amostras coletadas dos animais. Ao técnico Dr. Fernando Urban do laboratório de fisiologia que nos acompanhou durante os experimentos e sempre foi muito atencioso no período que passamos nos laboratórios.

Quando se trata das análises bioquímicas foi fundamental o apoio da professora Dra. Janaína Braga do grupo de pesquisa Bioclima, que nos forneceu estrutura laboratorial e os equipamentos necessários para essa etapa do trabalho. Neste sentido preciso oferecer os devidos créditos aos técnico Dr. Leonardo Pitombo, que me forneceu treinamento para a utilização do leitor de placas.

Devo também agradecer ao professor Osmar Malaspina da UNESP de Rio Claro, que me permitiu utilizar a estrutura do laboratório (CEIS) para desenvolver procedimentos necessários para realização de cortes histológicos no micrótomo.

Agradecimento especial ao professor Dr. George Mattox que logo no início do trabalho nos auxiliou na identificação dos peixes.

Neste momento, peço licença ao caro leitor/avaliador para eu possa escrever de forma pessoal ao ponto de, por vezes, pairar por campos sentimentais. Neste item sei que provavelmente minhas palavras não serão suficientes para expressar minha gratidão em relação às pessoas que me auxiliaram/auxiliarão neste período. Mas gostaria que soubessem que o sentimento que possuo é, sem sombra de dúvidas, mais genuíno que sou capaz de transcrever. A ordem com que escrevo este texto não classifica e nem coloca em ordem de grandeza o meu sentimento, cada um ocupa um espaço muito especial dentro de mim.

Optei por começar por aquela que me possibilitou a vida e que possui uma força da qual eu sempre busco me espelhar. Passou por obstáculos jamais imaginados, e que ainda sim, consegue se manter firme para me oferecer apoio e me ajudar a sempre enfrentar meus medos. É aquela que me incentivou a seguir meus sonhos e que sempre que eu caio me oferece colo. Cuida do próximo com todo amor e dedicação que lhe cabe no coração, ensinamento que carregarei para o resto da vida e mantereí vivo na minha memória tudo o que fez pelo ser mais puro que apareceu em nossas vidas, a Renatinha. Faz do impossível, possível para nos manter bem e que sou e para sempre serei grata. Grata por me criar da melhor forma que pode, grata por me ensinar o valor do amor verdadeiro e muito além de grata, o meu eterno amor é inteiramente dedicado a você, mãe!

Tenho como crença que a família é a base para tudo aquilo que valorizamos na vida. Mas eu sinto muito não ter herdado da minha irmã mais velha o dom de demonstrar os sentimentos sempre à flor da pele. A forma com que ela encara a vida e tudo aquilo de ruim que as pessoas são capazes de fazer, é tão sincera, carrega tanta emoção. E é por isso que ela é capaz de perdoar de forma tão leve àqueles que por vezes lhe viraram as costas. Você é o meu exemplo de perdão e me ensinou que se hoje as coisas estão ruins, amanhã elas vão melhorar! E para segurar esse turbilhão de emoção que essa moça demonstra nada poderia ser mais efetivo que a calma do meu cunhado e sim, essa calma é fundamental para equilibrar tudo o que acontece na nossa família, obrigado por nos ajudar a segurar as pontas em tantas situações.

Aos poucos a gente vai percebendo que carregamos conosco características que nos permitem passar por momentos de nossas vidas que jamais seríamos capazes de ultrapassar

sem ter tido anteriormente uma determinada lição. E isso é o básico para vida, tantas coisas aprendi com você, pai, e sei que tantas coisas ainda tenho para aprender. Coisas que não devem ser mencionadas e coisas das quais me orgulho de gritar aos quatro ventos. E devo dizer que em relação a você construí o sentimento mais paradoxal que existe dentro de mim, o da certeza e da dúvida em relação a uma pessoa e isso, felizmente ou infelizmente carrego em minhas relações pessoais e profissionais.

A honestidade em relação aos meus sentimentos é algo novo para mim, pois costumava negligenciar aquilo que sentia e isso, neste período de mestrado, quase me fez não conseguir “sacudir a poeira” depois de um tombo. Muito você fez por mim e muito me auxiliou em todas as áreas de minha vida, sempre te disse que foi tudo muito rápido e que eu não esperava tomar a proporção que tomou, mas você se tornou parte da minha vida e está presente nela até hoje e sei que em todos os momentos posso contar com você, assim como você pode contar comigo. Assim, conseguimos seguir, construindo a amizade, o carinho e a segurança um no outro. Obrigada por me mostrar o melhor que pode existir nas pessoas e obrigada por sempre estar ao meu lado e me ajudar em aspectos práticos de difícil compreensão para mim, simplesmente obrigada, Henrique.

Os primeiros passos em destino ao desconhecido sempre foram muito difíceis para mim, somados a timidez e muitas vezes a obstáculos emocionais impostos por mim mesma, fizeram com que a busca por um orientador para a minha iniciação na vida de cientista fosse muito complicada. Mas, logo na primeira vez, falei com a pessoa que é, definitivamente, a pessoa mais iluminada e alegre que conheci nessa vida, a minha atual orientadora, Elaine! Que pessoa alegre esse destino colocou na minha vida, tenho só a agradecer tudo que fez e faz por mim. Mesmo não sendo o seu papel de orientadora, me auxiliou como ser humano a ultrapassar por obstáculos emocionais, que só eu sei o quanto era difícil, através de seus conselhos sempre sábios. Pois, sempre tem uma palavra de conforto, mas ao mesmo tempo sempre tem uma palavra de estímulo e quando a coisa aperta e o caos se instala, você é a primeira a pensar em uma solução depois de afirmar que “o caos existe!”. Sempre diz que gostaria de ser uma pessoa prática nas soluções de problemas, mas tenha certeza que você é a pessoa com mais soluções para os mais diversos problemas. Que se dedica em um sábado de manhã para os nossos propósitos, que acorda às 5h da manhã e está pensando em seus orientados e que com certeza é a nossa abelha rainha e que sem a sua presença a nossa colmeia não existiria! Obrigada por me acolher na sua colmeia e que mesmo eu sendo uma abelha desajeitada, você me orienta pelo caminho certo.

Nesta fase do mestrado fui apresentada à pessoa que viria a ser meu co-orientador e me sinto muito lisonjeada por ter aprendido com um grande especialista na área de ecotoxicologia aquática. Sou muito grata por tudo que aprendi e por tudo que ainda posso aprender com o professor Bruno Nunes. Aprendi um pouco mais sobre a cultura portuguesa que é e sempre será um país muito querido para mim. Obrigada, Bruno.

Minha gratidão à professora Dra. Monica Jones que sempre foi muito atenciosa, solícita e amiga em todos os campos deste experimento, obrigada por ser uma pessoa animada que contagia, que sabe resolver os problemas de uma forma prática e não mede esforços para nos ajudar a seguir pelo caminho certo.

Neste momento também agradeço ao Caio que além de colega de trabalho se tornou um grande amigo que sempre ajudou muito no meu trabalho, nos desabafos e também me oferecendo abrigo no período em que eu deveria passar em Rio Claro, sou muito grata por todo apoio e amizade.

Além é claro de sempre ser grata aos meus companheiros de trabalho, Gregório e Paula que sempre estavam lá para me ajudar e me fazer rir em momentos de desespero. Que passamos juntos por tantos perrengues e sempre conseguimos superá-los aos trancos e barracos. Vocês têm um lugar muito especial no meu coração e saibam que vocês podem sempre contar comigo. E a técnica Eliane Morgado que sempre nos ajudou e compartilhou seus conhecimentos laboratoriais. Também agradeço a Cristiane Oliveira que se tornou uma amiga muito querida neste período. À Lilian, que me auxiliou em algumas análises estatísticas e sempre se prontificou a ajudar. E a secretaria do programa, Roseli, que sempre me orientou com muita paciência nas questões burocráticas e sempre pensou no que é o melhor para nós, alunos do programa.

Enfim, o meu sentimento de gratidão por todos aqueles que passaram na minha vida neste período é muito grande! Muito obrigada, para aqueles que estão aqui citados e também para aqueles que não citei.

RESUMO

PEREIRA, B. V. R. Efeitos agudos e crônicos dos fármacos paracetamol e propranolol em diferentes biomarcadores de uma espécie de peixe neotropical. 2018. 99 f. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental) – Universidade Federal de São Carlos, *campus* Sorocaba, Sorocaba, 2018.

A contaminação dos ambientes aquáticos emergiu majoritariamente como uma consequência das atividades humanas. A presença de xenobióticos em corpos d'água pode afetar drasticamente o ecossistema, ao causar efeitos deletérios para as espécies. A produção, o consumo e a eliminação inadequada de produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais (PCPs) têm contribuições relevantes para essa contaminação. Apesar dos estudos ecotoxicológicos existentes, ainda há falta de dados relativos a efeitos em espécies nativas de regiões neotropicais. O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de duas substâncias farmacêuticas, paracetamol e propranolol, na espécie de peixe neotropical, *Phalloceros harpagos*, nativa do Brasil e do Paraguai, por meio da análise de marcadores bioquímicos e celulares. O paracetamol é um fármaco analgésico e antipirético; o propranolol é um β -bloqueador não seletivo. A avaliação dos efeitos ecotoxicológicos dos medicamentos descritos foi realizada através da análise de marcadores bioquímicos que indicam estresse oxidativo e neurotoxicidade, nomeadamente as atividades das enzimas catalase (CAT) no fígado, glutathione-s-transferases (GSTs) nas brânquias e colinesterases (ChEs) no tecido nervoso da cabeça dos peixes. Indivíduos do organismo-teste foram expostos a 5 diferentes concentrações de cada uma das drogas sob regimes agudo (96h) e crônico (28d). Para a exposição aguda, além do controle (sem adição do fármaco), as concentrações utilizadas foram 8, 80, 800, 8000, 80000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o paracetamol e 0,1, 1, 10, 100, 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o propranolol. Para a exposição crônica, as concentrações, além do controle (sem adição do fármaco), foram de 5, 10, 20, 40, 80 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o paracetamol e 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5, 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ para propranolol. Os resultados obtidos para a exposição aguda mostraram aumento da atividade das isoenzimas GSTs para a maioria das concentrações de paracetamol (80, 800, 8000 e 80000 $\mu\text{g L}^{-1}$) e de propranolol (1, 10, 100 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$). As enzimas ChEs tiveram aumento significativo na sua atividade após exposição aguda ao paracetamol (80 $\mu\text{g L}^{-1}$). Na exposição crônica a atividade das isoenzimas GSTs foi aumentada para o propranolol (0,25 e 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$). Já para o biomarcador de estresse celular, proteínas da família HSP70, nos ensaios

agudos observou-se um aumento na intensidade de imunomarcção tanto para o paracetamol (8, 80, 800, 8000 e 80000 $\mu\text{g. L}^{-1}$), quanto para o propranolol (1, 10, e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$), em resposta à exposiçōo aos fármacos. Em contrapartida, nos ensaios crônicos houve uma diminuiçōo na intensidade de marcaçōo de HSP70, após a exposiçōo ao paracetamol (5, 10, 15, 20, 40, 80 $\mu\text{g L}^{-1}$) e um aumento após a exposiçōo crônica ao propranolol (0,0625, 0,125, 0,25 e 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$). As respostas obtidas indicam um esforço do organismo em retornar a homeostase após a exposiçōo aos fármacos, seja na tentativa de eliminar o xenobiótico e seus metabólitos (atividade das GSTs) ou na proteçōo celular (imunomarcção das HSP70). Deste modo, sob as condiçōes experimentais adotadas o peixe *P. harpagos* evidenciou alteraçōes a níveis bioquímicos e celulares, indicando a resposta primária do organismo após a exposiçōo aos compostos farmacêuticos.

Palavras-chave: Ecotoxicologia aquática. *Phalloceros harpagos*. Biomarcadores celulares. Marcadores bioquímicos.

ABSTRACT

PEREIRA, B. V. R. Acute and chronic effects of the pharmaceuticals paracetamol and propranolol in different biomarkers of a neotropical fish species. 2018. 99 f. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental) – Universidade Federal de São Carlos, *campus* Sorocaba, Sorocaba, 2018.

Aquatic environments contamination has emerged mainly as a consequence of human activities. The presence of xenobiotics in water bodies can drastically affect the ecosystem, as well as to cause deleterious effects to the species. Production, consumption and inappropriate disposal of pharmaceuticals and personal care products (PCPs) have important contribution for such contamination. Despite existing ecotoxicological studies, there is still a lack of data and studies with native species from neotropical regions and the effects of such substances on non-target species. Taking this into consideration, the present study aimed to assess the effects of two pharmaceuticals, paracetamol and propranolol, on the neotropical fish species *Phalloceros harpagos*, which genus is native to Brazil and Paraguay, through the analysis of biochemical and cellular markers. Paracetamol is an analgesic and antipyretic drug used to treat pain and fever; propranolol is a non-selective β -blocker. The evaluation of toxicological effects of the described drugs was conducted through analysis of biochemical markers that indicate oxidative stress and neurotoxicity, namely catalase (CAT) in the liver, glutathione-s-transferases (GSTs) in the gills and cholinesterases (ChEs) in the head. The test organism was exposed to 5 different concentrations of each drugs under acute (96h) and chronic regimes (28d). For the acute exposure, besides the control (without drug), the concentrations used were 8, 80, 800, 8000, 80000 $\mu\text{g L}^{-1}$ for paracetamol and 0.1, 1, 10, 100, 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ for propranolol. For the chronic exposure the concentrations, apart from the control (without drug), were 5, 10, 20, 40, 80 $\mu\text{g L}^{-1}$ for paracetamol and 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ for propranolol. Acute exposure results showed increased GSTs activity for most concentrations of paracetamol (80, 800, 8000 and 80000 $\mu\text{g L}^{-1}$) and propranolol (1, 10, 100 and 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$). ChEs had significant increase in activity for acute exposure to paracetamol (80 $\mu\text{g L}^{-1}$). In the chronic exposure GSTs activity was significantly increased for propranolol (0.25 and 0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$). For the cellular stress biochemical marker, a protein that belongs to the HSP70 family, an increase in the level of immunolabeling was detected after the acute exposure to both paracetamol (8, 80, 800, 8000 e 80000 $\mu\text{g. L}^{-1}$) and propranolol (1, 10, e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$). On the other hand, after the chronic exposure a reduction in the level of HSP70 staining was

detected after exposure to paracetamol (5, 10, 15, 20, 40, 80 $\mu\text{g L}^{-1}$) and an increase after the exposure to propranolol (0,0625, 0,125, 0,25 e 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$). The results obtained in this research indicate an effort of the organism towards recovering its homeostasis after being exposed to the compounds, whether that is through the attempt of getting rid of the xenobiotics and its metabolites (GSTs activity) or even through cellular protection (immunolabiling of HSP70). Thus, under the experimental condition adopted the fish *P. harpagos* presented alterations on both biochemical and cellular levels, indicating the organism's primary response after exposure to these pharmaceuticals.

Keywords: Aquatic Ecotoxicology. Neotropical species. *Phalloceros harpagos*. Cellular biomarkers. Biochemical markers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fontes dos contaminantes emergentes em águas superficiais e águas de consumo humano. ETE – Estação de Tratamento de Esgoto	21
Figura 2 - Representação esquemática do metabolismo do paracetamol em humanos.....	25
Figura 3 - Representação esquemática do metabolismo do propranolol no peixe <i>Carassius auratus</i>	27
Figura 4 – Peixe <i>Phalloceros harpagos</i> no ambiente aquático.	28
Figura 5 – <i>P. harpagos</i> evidenciando a diferença entre machos (A), pela presença de gonopódio, e fêmeas (B), pela ausência de gonopódio.	28
Figura 6 - Responsividade aos poluentes na hierarquização biológica. Os círculos vermelhos representam as escalas dos biomarcadores estudados neste trabalho.....	29
Figura 7 - Processo de formação das espécies reativas de oxigênio (EROS - através da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria). Nesta figura está representada a formação das três principais EROS e os seus respectivos eliminadores.	31
Figura 8 - Sistema antioxidante enzimático. SOD – Superóxido dismutase. CAT – Catalase. GPx – Glutathione peroxidase. Gred – Glutathione reductase.....	33
Figura 9 - Esquema representativo da inibição da enzima acetilcolinesterase. AChE – Acetilcolinesterase; ACh – Acetilcolina; CAT – enzima que catalisa a síntese de acetilcolina; Sinal “–” – Inibidor da acetilcolinesterase; Setas pontilhadas – caminho da ACh, da colina, do Na ⁺ ou do K ⁺ ; Setas completas – reações catalisada por enzima.	37
Figura 10 – Região da área de coleta. Ponto vermelho indica a localidade exata do riacho. À esquerda da imagem encontra-se a cidade de Cabreúva.....	40
Figura 11 – Figura representando o um grupo do delineamento experimental. O experimento se baseou em seis grupos experimentais, sendo um o controle (somente com água Klarina®) e os outros 5 com as concentrações dos fármacos.	43
Figura 12 – Representação dos ROIs na quantificação da imunomarcação.....	49
Figura 13 – Dados obtidos após a exposição aguda ao fármaco paracetamol. A) Resultados para a atividade enzimática da CAT no fígado. B) Resultados para a atividade enzimática das GSTs nas brânquias. C) Resultados para a atividade enzimática das ChEs na cabeça. Valores de média da atividade enzimática de 10 réplicas, com as respectivas barras de desvio padrão. Os * indicam diferença significativa em relação ao grupo controle, valor de p adotado $\leq 0,05$	52
Figura 14 - Dados obtidos após a exposição crônica ao fármaco paracetamol. A) Resultados para a atividade enzimática da CAT. B) Resultados para a atividade enzimática das GSTs. C)	

Resultados para a atividade enzimática das ChEs. Valores de média da atividade enzimática de 10 réplicas, com as respectivas barras de desvio padrão. Os * indicam diferença significativa em relação ao grupo controle, valor de p adotado $\leq 0,05$	53
Figura 15 - Dados obtidos após a exposição aguda ao fármaco propranolol. A) Resultados para a atividade enzimática da CAT. B) Resultados para a atividade enzimática das GSTs. C) Resultados para a atividade enzimática das ChEs. Valores de média da atividade enzimática de 10 réplicas, com as respectivas barras de desvio padrão. Os * indicam diferença significativa em relação ao grupo controle, valor de p adotado $\leq 0,05$	54
Figura 16 - Dados obtidos após a exposição crônica ao fármaco propranolol. A) Resultados para a atividade enzimática da CAT. B) Resultados para a atividade enzimática das GSTs. C) Resultados para a atividade enzimática das ChEs. Valores de média da atividade enzimática de 10 réplicas, com as respectivas barras de desvio padrão. Os * indicam diferença significativa em relação ao grupo controle, valor de p adotado $\leq 0,05$	55
Figura 17 - Fígado de <i>P. harpagos</i> . Microscopia Confocal de Varredura a Laser. A) Imunomarcção de proteínas da família HSP70 indicada pela pseudo-cor vermelha. B) Controle negativo, com ausência do anticorpo primário (anti-HSP70). C) Visão geral do parênquima hepático evidenciando a imunofluorescência (pseudo-cor vermelha) nos hepatócitos (he) e nos eritrócitos (e), presentes nos vasos sanguíneos (v) e nos capilares sinusóides (s). D) Detalhe dos hepatócitos, mostrando a imunomarcção exclusivamente no citoplasma (seta).....	56
Figura 18 - Fígado de <i>P. harpagos</i> . Exposição ao paracetamol. Imunofluorescência para marcação de HSP70 (pseudo-cor vermelha) e análise por Microscopia Confocal de Varredura a Laser. A) Exposição aguda ao paracetamol, Grupo Controle. B) Exposição aguda ao paracetamol, Grupo $8 \mu\text{g L}^{-1}$. C) Exposição crônica ao paracetamol, Grupo Controle. D) Exposição crônica ao paracetamol. Grupo $80 \mu\text{g L}^{-1}$	58
Figura 19 - Fígado de <i>P. harpagos</i> . Exposição ao propranolol. Imunofluorescência para marcação de HSP70 (pseudo-cor vermelha) e análise por Microscopia Confocal de Varredura a Laser. A) Exposição aguda ao propranolol, Grupo Controle. B) Exposição aguda ao propranolol, Grupo $1000 \mu\text{g L}^{-1}$. C) Exposição crônica ao propranolol, Grupo Controle. D) Exposição crônica ao propranolol. Grupo $0,0625 \mu\text{g L}^{-1}$	59
Figura 20 – Dados obtidos na quantificação da imunofluorescência (em pixel) indicativa da imunomarcção positiva para as proteínas da família HSP70. Valores de média de intensidade de imunomarcção dos ROIs (125 por grupo) de 5 réplicas, com as respectivas barras de	

desvio padrão. Os * indicam diferença significativa em relação ao grupo controle, valor de p adotado $\leq 0,05$ 60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração do fármaco paracetamol em ambientes aquáticos.	22
Tabela 2 - Concentração do fármaco Propranolol em ambientes aquáticos.	23
Tabela 3 – Parâmetros avaliados na água bruta da estação de tratamento de Cabreúva	41
Tabela 4 – Características físico-químicas da água Klarina® (classificação: água fluoretada, fracamente radioativa na fonte).	42
Tabela 5 – Parâmetros da água Klarina® no aquário de aclimatação (média de 15 dias de medições).....	42

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACh – Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

APA – Área de Proteção Ambiental

BChE – Butirilcolinesterase

CAT – Catalase

CDNB – 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

ChEs - Colinesterases

COX – Ciclooxygenase

CYP - Citocromo

DNA – Ácido desoxirribonucleico

GPx – Glutathione peroxidase

Gred – Glutathione reductase

GSH – Glutathione reduzida

GSTs – Glutathione-S-Transferases

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

HSP – *Heat Shock Protein*

ICSU – Comitê do Conselho Internacional de Uniões Científicas

LPO – Peroxidação lipídica

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

NAPQI – N-acetil-p-benzoquinone

OCDE - Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Econômico

PPGBMA - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental

EROS – Espécies Reativas de Oxigênio

SOD – Superóxido Dismutase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVO	18
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
3.1 ECOTOXICOLOGIA.....	19
3.2 FÁRMACOS NO AMBIENTE.....	20
3.2.1 Paracetamol	24
3.2.2 Propranolol	25
3.3 O ORGANISMO-TESTE.....	27
3.4 BIOMARCADORES	29
3.4.1 O Uso das Atividades Enzimáticas das Defesas Antioxidantes como Biomarcadores de Estresse Oxidativo	30
3.4.2 O Uso da Atividade Enzimática das Colinesterases como Biomarcador de Neurotoxicidade	35
3.4.3 Biomarcadores Celulares de Resposta ao Estresse	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 LOCAL DA COLETA	40
4.2 COLETA E ACLIMATAÇÃO	41
4.2.1 Delineamento Experimental	43
4.3 ENSAIO AGUDO	44
4.4 ENSAIO CRÔNICO	45
4.5 EUTANÁSIA E PROCESSAMENTO DOS TECIDOS	45
4.6 ENSAIOS ENZIMÁTICOS	46
4.6.1 Determinação da Atividade Enzimática da Catalase	46
4.6.2 Determinação da Atividade Enzimática das Glutathione-S-Transferases	46
4.6.3 Determinação da Atividade Enzimática das Colinesterases	47
4.6.4 Determinação do Teor de Proteínas Solúveis Totais	47
4.7. AVALIAÇÃO DE HSP70 POR IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	47
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
5 RESULTADOS	51
5.1 MARCADORES BIOQUÍMICOS.....	51
5.1.1 Exposição Aguda ao Paracetamol	51
5.1.2 Exposição Crônica ao Paracetamol	52
5.1.3 Exposição Aguda ao Propranolol	53

5.1.4 Exposição Crônica ao Propranolol.....	54
5.2 AVALIAÇÃO DE HSP70 POR IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	55
6 DISCUSSÃO	61
6.1 PARACETAMOL	61
6.2 PROPRANOLOL	68
7 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
8 REFERÊNCIAS	73
ANEXO A.....	88
ANEXO B.....	89
APÊNDICE A	90

1 INTRODUÇÃO

Os impactos ambientais decorrentes de atividades humanas vêm sendo alvo de estudos no meio científico. Descartes de inúmeras substâncias com efeito biológico adverso, que são resultado de inadequados rejeitos industriais ou domésticos, entre outros, causam no ecossistema consequências de proporções ainda desconhecidas. Com o desenvolvimento crescente de produtos e tecnologias, cujo objetivo se baseia em suprir as necessidades da sociedade moderna, diversos contaminantes ambientais emergentes, como fármacos e produtos de cuidado pessoal são descartados através de diversas vias e meios, e muitas vezes acabam por chegar aos ecossistemas aquáticos (BOLONG et al., 2009; ARCHER et al., 2017).

A detecção de tais contaminantes no meio aquático se tornou possível a partir do desenvolvimento de métodos mais sensíveis, capazes de mensurar concentrações em nível vestigiais de determinadas substâncias (FAWEL e ONG, 2012; ARCHER et al. 2017). Neste contexto os contaminantes emergentes se caracterizam por serem compostos químicos antropogênicos, como materiais cuja persistência e toxicidade afetam a biota (SAUVÉ e DESROSIERS, 2014). Segundo Sodré et al. (2007), os contaminantes emergentes não estão enquadrados por políticas ambientais que norteiem seu uso, descarte e tratamento, e, por isso, há necessidade de estudos que possam auxiliar em uma maior compreensão sobre o efeito de tais contaminantes no ecossistema aquático para subsidiar legislação futura.

Os produtos farmacêuticos se enquadram na denominação de contaminantes emergentes e seus efeitos na biota aquática são estudados no âmbito da ecotoxicologia (COLBURN e CLEMENT, 1992; ARCHER et al., 2017). Diversos fármacos de uso humano ou veterinário, e produtos de cuidados pessoais, são muito consumidos (PETROVIĆ, 2003; FURLONG et al., 2017), e constituem uma classe variada de compostos, tanto do ponto de vista da sua estrutura molecular quanto em relação ao seu mecanismo de ação e metabolismo (FAWEL e ONG, 2012).

São diversas as fontes pelas quais os fármacos chegam ao ambiente, como por exemplo, excreção humana por meio dos efluentes domésticos, degradação ineficiente nas estações de tratamento de esgoto, excreção animal, lixiviação de aterros sanitários e efluentes de indústrias (TERNES, 1998; ARCHER et al., 2017). No ambiente, os fármacos podem sofrer biodegradação, transformação e fotodegradação (EBELE et al., 2017). A classificação destes fármacos como compostos pseudopersistentes provém, justamente, do seu uso

contínuo, levando em conta que a quantidade diariamente degradada seja igual à descartada no ambiente. Além disso, sabe-se que tais compostos, mesmo que em concentrações tão baixas quanto ng L^{-1} , são capazes de exercer efeitos sobre a biota aquática (FABRI e FRANZELLITTI, 2016). Embora muitas vezes os efeitos desses compostos químicos não sejam percebidos imediatamente, a longo prazo eles podem contribuir para as alterações na estrutura do ecossistema (OERTEL e SALÁNKI, 2003).

Adicionalmente, uma parcela considerável dos fármacos é resistente à degradação e transformação, o que os torna compostos com efeitos ambientalmente relevantes (DAUGHTON e TERNES, 1999). Estes possuem também variado grau de lipofilia, o que facilita a sua entrada nas células através da membrana celular (CORREIA, 2014). Além disso, eles são desenvolvidos para exercer atividade biológica mesmo em concentrações muito baixas, e atuam em vias metabólicas, enzimáticas e celulares, que são geralmente evolutivamente conservadas (FABBRI e FRANZELLITTI, 2016).

Gunnarsson et al. (2008) realizaram estudos para compreender a similaridade dos alvos moleculares que são ativados pelos medicamentos, sendo que os resultados demonstraram que muitos dos alvos/receptores farmacológicos são evolutivamente conservados entre as espécies, podendo exercer o mesmo ou diferentes efeitos que exercem em humanos. Por exemplo, o peixe paulistinha (*Danio rerio*) possui 86% de ortologia com os alvos de humanos, o que nos permite concluir que há uma similaridade muito grande entre as vias de ação dos fármacos em humanos e neste animal. Há neste sentido a necessidade de compreender melhor como esses fármacos atuam em organismos não-alvo e assim avaliar o impacto dos mesmos nos ambientes aquáticos.

Outro fato que deve ser levado em consideração é que, uma vez no organismo, o fármaco passa pelo processo de biotransformação, que visa alterar a estrutura dos xenobióticos de modo a torná-los compostos mais hidrossolúveis, podendo então ser excretados principalmente pelos rins, através da urina. Além disso, é através desse processo que as características tóxicas de determinadas moléculas podem ser neutralizadas, sendo possível também que sejam gerados metabólitos que possuem variados graus de toxicidade (KROON et al., 2017). Os compostos farmacêuticos são desenvolvidos a fim de possuírem elevada atividade biológica e meia-vida longa, ocorrendo, no entanto, a diminuição ou inativação da sua atividade biológica por meio da biotransformação (CORREIA, 2014). Com isso, o fármaco pode ser eliminado tanto em sua forma inalterada, como nos seus metabólitos (FENT et al., 2006).

Diante do exposto, estudos vêm sendo desenvolvidos a fim de identificar quais as classes de fármacos que são mais encontradas nos meios aquáticos (RABIET et al., 2006; IBÁÑEZ et al., 2013; CAMPANHA et al., 2014). Dentre as classes farmacêuticas encontradas no ambiente, é possível detectar a presença de anti-inflamatórios, anti-hipertensivos, antidepressivos, ansiolíticos, antibióticos, antiepilépticos, entre outras classes que são usadas para o tratamento de diversas condições de saúde/patologias que afetam os seres humanos e animais (EBELE et al., 2017).

Dentre essas classes, frequentemente se encontram os analgésicos e antipiréticos, do grupo dos derivados p-aminofenólicos nos quais está incluído o acetaminofeno (paracetamol). Dentre os anti-hipertensivos mais frequentemente reportados no meio aquático, destacam-se os β -bloqueadores como o propranolol, metoprolol, atenolol, entre outros (FABBRI e FRANZELLITTI, 2016).

Muitos compostos farmacêuticos foram desenvolvidos para inibir a enzima ciclooxigenase (COX) que é responsável pela biossíntese de prostaglandinas. As prostaglandinas são moléculas sintetizadas pela COX, derivadas de ácidos graxos, que estão associadas ao processo inflamatório, inclusive nos peixes (GÓMEZ-ABELLÁN e SEPULCRE, 2016). Assim, os fármacos inibidores da COX podem interferir no processo inflamatório, na sensibilização à dor e na regulação da temperatura corporal, pelo que são designados analgésicos e antipiréticos.

O paracetamol é um analgésico antipirético muito utilizado, e seu mecanismo de ação ainda é pouco elucidado, mas sabe-se que tem por base a inibição da biossíntese das prostaglandinas (BOUTAUD et al., 2002). Devido ao seu vasto uso, ele pode ser encontrado em efluentes e também em águas superficiais em todo mundo, como por exemplo França (RABIET et al., 2006), Espanha (GROS et al., 2006; GÓMEZ et al., 2007; IBÁÑEZ et al., 2013), Estados Unidos da América (KOLPIN et al., 2002; BATT et al., 2008), e inclusive no Brasil, tendo sido detectado em concentrações de $0,840 \mu\text{g L}^{-1}$ na bacia do Ribeirão Anhumas, na região de Campinas (SODRÉ et al., 2007), $30,421 \mu\text{g L}^{-1}$ no Rio Monjolinho em São Carlos (CAMPANHA et al., 2014), ambos no estado de São Paulo, e $130 \mu\text{g L}^{-1}$ em Três Lagoas no Mato Grosso do Sul (AMÉRICO et al., 2012a). Estudos apontam que em doses terapêuticas o paracetamol é considerado seguro, no entanto, em sobredosagem esse medicamento pode causar efeitos hepatotóxicos (XU et al., 2008), nomeadamente por causar estresse oxidativo (RAMOS et al., 2014; NUNES et al., 2015).

O propranolol é um β -bloqueador muito receitado e utilizado no tratamento de hipertensão, pois atua reduzindo a frequência dos batimentos cardíacos através do bloqueio

dos adrenoreceptores (OWEN et al., 2009; ROBERTSON e BIAGGIONI, 2014). Este medicamento pode ser encontrado em efluentes e em águas superficiais de todo o mundo como, por exemplo, França (ANDREOZZI et al., 2003; COETSIER et al., 2009), Reino Unido (ROBERT e THOMAS, 2005; ASHTON et al., 2004) e Taiwan (LIN e TSAI, 2009). Segundo outros estudos, este composto foi também encontrado no Brasil nas concentrações de $0,015 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,026 \mu\text{g L}^{-1}$, nos estados de São Paulo e Amazonas, respectivamente (CAMPANHA et al., 2014; THOMAS et al., 2014). Ademais, este fármaco é capaz de exercer efeitos em organismos aquáticos, como estresse oxidativo e neurotoxicidade (SOLÉ et al., 2009; SUN et al., 2015).

No sentido de conhecer e caracterizar os potenciais efeitos ecotoxicológicos dos medicamentos, diversos estudos tratando dos efeitos de fármacos em organismos aquáticos vêm sendo desenvolvidos, incidindo principalmente na avaliação de parâmetros sub-individuais como respostas fisiológicas à presença destes compostos químicos no meio, através da quantificação de biomarcadores nos organismos (NUNES et al., 2004; NUNES et al., 2008; BRANDÃO et al., 2011; BRANDÃO et al., 2013; RODRIGUES et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015). Os biomarcadores auxiliam na compreensão de tais efeitos, uma vez que são capazes de indicar perturbações da homeostase do organismo em resposta aos xenobióticos. Assim, a homeostase, que é a habilidade de um organismo manter o seu meio interno em um equilíbrio quase constante por meio de diversos processos fisiológicos coordenados, pode ser alterada tanto por fatores biológicos internos como fatores externos, como exposição a xenobióticos que induzem estresse oxidativo, alterações metabólicas ou até mesmo inibição de enzimas que atuam na regulação de processos essenciais para a manutenção do organismo, como o neurológico, por exemplo. Estas perturbações da homeostase podem ser quantificadas e, portanto, os biomarcadores que as indicam são ferramentas amplamente utilizadas para a avaliação do impacto de contaminantes químicos presentes no ambiente sobre a biota (RODRIGUES et al., 2014).

Durante o metabolismo aeróbico envolvido no processo de respiração celular, são formadas espécies reativas de oxigênio (EROS) que desempenham papel fundamental na sinalização celular, mas que podem ser tóxicas se estiverem em excesso na célula, o que ocorre quando se esgota a capacidade de defesa antioxidante da célula. Nesta situação, pode dizer-se que se instalou um cenário de estresse oxidativo. Por isso, os organismos vivos possuem mecanismos celulares capazes de eliminar estes intermediários reativos das células, como a ação do sistema antioxidante, seja ele enzimático (composto por enzimas como a superóxido dismutase (SOD) responsável pela dismutação do ânion superóxido, que acarreta

na formação de H_2O_2 ; as enzimas que eliminam o H_2O_2 formado como a catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GPx)) ou não enzimático (composto pelo tripeptídeo glutathiona reduzida (GSH) e também por vitaminas, como A, C e E; SIES, 1986; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990; BERGAMINI et al., 2004; RAHAL et al, 2014).

O processo de biotransformação de xenobióticos também pode aumentar a produção de tais intermediários reativos, fazendo com que haja um desequilíbrio da homeostase, podendo levar a danos oxidativos no DNA, proteínas e lipídeos celulares (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; SCHEIBMEIR et al., 2005). No sentido de evitar que xenobióticos permaneçam no organismo e exerçam efeitos tóxicos, existem mecanismos de biotransformação que favorecem um aumento da sua hidrossolubilidade. Este processo de biotransformação ocorre por dois mecanismos, o de fase I que envolve reações mediadas por monooxigenases do citocromo P450 (CYP450) e o mecanismo de fase II, no qual estão envolvidas as enzimas de conjugação como as glutathionas-S-transferases (GSTs), que conjugam o xenobiótico ou espécies reativas de oxigênio (EROS) com a GSH para que assim as EROS sejam neutralizadas e o xenobiótico se torne mais hidrossolúvel e, portanto, eliminado mais facilmente pelo organismo (BUHLER e WILLIAMS, 1988; SCHINONI, 2006; CORREIA 2014). No entanto, este processo de biotransformação não é desprovido de efeitos adversos, pois o metabolismo oxidativo de fase I pode conduzir à produção exacerbada de EROS ou outro nucleófilo, mais reativo e tóxico, como no caso do metabolismo do paracetamol.

Uma vez que os fármacos são biotransformados nos organismos, a seleção de biomarcadores para a avaliação dos efeitos destes compostos químicos se dá a partir do conhecimento sobre as vias potencialmente ativadas por eles no organismo aquático (tanto farmacológicas como toxicológicas), para que assim seja possível avaliar se ocorre desvio da homeostase. Dessa forma, no presente estudo, a seleção dos marcadores bioquímicos (CAT e GSTs) determinados após a exposição do peixe *Phalloceros harpagos* ao paracetamol e propranolol foi baseada em evidências indicativas da ocorrência de estresse oxidativo em organismos expostos a ambos os fármacos (DASH et al., 1990; OWEN et al., 2007; FRANZELLITI et al., 2011; RAMOS, et al., 2014; NUNES et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2015). Já o marcador bioquímico de neurotoxicidade foi selecionado a partir de estudos que indicam que a atividade das enzimas colinesterases podem ser alteradas após as exposições a esses fármacos em organismos aquáticos, como resultado de processos de estresse oxidativo dos quais resultam intermediários reativos e oxidantes que podem reagir com esta enzima e inibir a sua atividade (SOLÉ et al., 2009; NUNES et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2015).

Assim, foram selecionadas como biomarcadores as atividades das enzimas catalase (CAT) envolvida na degradação de H₂O₂ (ŚCIBIOR e CZECHOT, 2006), das isoenzimas glutationa-S-transferases (GSTs), envolvidas na fase de conjugação durante a biotransformação de xenobióticos, além de participar no processo de desintoxicação de metabólitos tóxicos (endógenos e exógenos) e desenvolver um papel importante na defesa antioxidante (RAZA, 2012), bem como o marcador de neurotoxicidade, que é a atividade das enzimas colinesterases (ChEs), envolvidas diretamente (no caso da forma acetilcolinesterase) no processo de neurotransmissão (SMALL et al., 1996).

Em adição aos biomarcadores bioquímicos, os biomarcadores celulares como as proteínas HSPs (proteínas de choque térmico, *Heat Shock Proteins*) também contribuem para a compreensão dos efeitos subletais dos estressores em peixes (DEMEKE e TASSEW, 2016). O estresse celular gerado pela exposição do organismo aos xenobióticos pode gerar efeitos citotóxicos iniciais como o acúmulo de proteínas com alterações na sua estrutura tridimensional que, por sua vez, ativa a transcrição gênica dos membros induzíveis da família HSP70 (NADEAU e LANDRY, 2007; CASTRO et al., 2014). Como as proteínas da família HSP70 desempenham a função primordial de chaperonas celulares (ASHBURNER, 1982; GARRIDO et al., 2001), o aumento na sua quantidade nos compartimentos celulares leva a um efeito citoprotetor através do reparo das proteínas alteradas (DEMEKE e TASSEW, 2016).

Como a biotransformação hepática dos fármacos paracetamol e propranolol é passível de causar estresse oxidativo em organismos aquáticos (DASH et al., 1990; OWEN et al., 2007; FRANZELLITI et al., 2011; RAMOS, et al., 2014; NUNES et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2015), o aumento de EROS pode desencadear efeitos proteotóxicos, através da reatividade dos mesmos com as proteínas celulares (NIFOROU et al., 2014). Por esse motivo se faz significativa a seleção da HSP70 como biomarcador de proteotoxicidade a nível celular (BIERKENS, 2000). O aumento do nível de HSP70 após exposição ao paracetamol é uma resposta frequente em vertebrados (SUMIOKA et al., 2004; KNOCKAERT et al., 2011; GUILOSKI et al., 2017). De forma similar, também foi relatado em animais aquáticos expostos ao propranolol (SUN et al., 2015) e outros fármacos β-bloqueadores (CONTARDO-JARA et al., 2010).

A resposta de organismos a um mesmo composto químico pode seguir padrões espécie-específicos (OWEN et al., 2007; NUNES et al., 2014a). Existem muitos estudos que relacionam a exposição a múltiplos xenobióticos (incluindo aos fármacos acima descritos) e efeitos tóxicos a vários níveis em diversas espécies. No entanto, a maioria dos estudos que

compreendem a área da ecotoxicologia aquática com peixes como organismos-teste é realizada com organismos-teste padrão, autóctones de ambientes temperados, os quais podem não ser representativos para os demais ecossistemas, como o tropical, por exemplo. Com isso, a espécie *P. harpagos* (LUCINDA, 2008) foi selecionada como organismo-teste no presente estudo, por ser um representante dos peixes teleósteos autóctones da América do Sul, com ampla distribuição no Brasil (LUCINDA, 2008; TERRA et al., 2013; MENDONÇA et al., 2014; YOSHIDA e UIEDA, 2014). Sendo assim, pretende-se neste trabalho avaliar os efeitos dos fármacos paracetamol e propranolol em um peixe neotropical, *P. harpagos*, partindo da análise de alterações em marcadores bioquímicos (CAT, GSTs, ChEs) e celulares (HSP70), a fim de caracterizar os potenciais efeitos toxicológicos que podem acometer a biodiversidade aquática tropical.

2 OBJETIVO

Este estudo tem como objetivo principal a avaliação do uso do peixe *Phalloceros harpagos*, como representante de uma espécie nativa brasileira, em bioensaios ecotoxicológicos de exposição aguda (96 horas) e crônica (28 dias) aos fármacos propranolol e paracetamol, a partir da análise das respostas dos biomarcadores bioquímicos e celulares. Sendo assim, os objetivos específicos são:

a. Determinar a atividade enzimática em diferentes órgãos do peixe. As enzimas incluídas nesta determinação são catalase (CAT) no fígado, glutathione-S-transferases (GSTs), nas brânquias e as colinesterases (ChEs), na cabeça total.

b. Detectar e quantificar as proteínas da família HSP70 nos hepatócitos de *P. harpagos*.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 ECOTOXICOLOGIA

O conceito de ecotoxicologia foi primeiramente descrito em 1969 na reunião do *Committee of the International Council of Scientific Unions* (ICSU - Comitê do Conselho Internacional de Uniões Científicas) e se define como a ciência que estuda os efeitos tóxicos causados por poluentes naturais ou sintéticos em animais e vegetais, os quais compõem o ecossistema (TRUHAUT, 1977).

Estes organismos que fornecem informações relativas aos efeitos induzidos pelas alterações sofridas no ambiente são denominados bioindicadores (NIKINMAA, 2014). O termo bioindicador foi definido por van Gestel e van Brummelen (1996), sendo que as informações fornecidas pelo organismo perante determinadas condições ambientais são de diferentes escalas, podendo ser sua presença ou ausência, e até mesmo padrões específicos em seu comportamento que possam indicar a exposição aos contaminantes ambientais. Além disso, um organismo bioindicador deve possuir sensibilidade ou tolerância a diversos parâmetros de alterações ambientais, dentre eles a poluição (WASHINGTON, 1984).

Os estudos ecotoxicológicos podem ser também realizados em condições laboratoriais bem definidas, nas quais todas as variáveis devem ser controladas, inclusive a concentração/dose do xenobiótico para a qual é pretendido avaliar seus efeitos sobre os parâmetros toxicológicos selecionados, existindo sempre um grupo controle não exposto ao composto químico (MAGALHÃES e FERRÃO FILHO, 2008). Neste caso, quando se recorre a experimentos laboratoriais, são utilizados organismos-teste, os quais são expostos aos diferentes agentes contaminantes sob condições abióticas controladas, a fim de analisar a resposta dos mesmos à exposição (EDWARDS, 2004). Os organismos-teste podem ser algas, peixes, microcrustáceos, microrganismos, entre outros organismos aquáticos (COSTA et al., 2008).

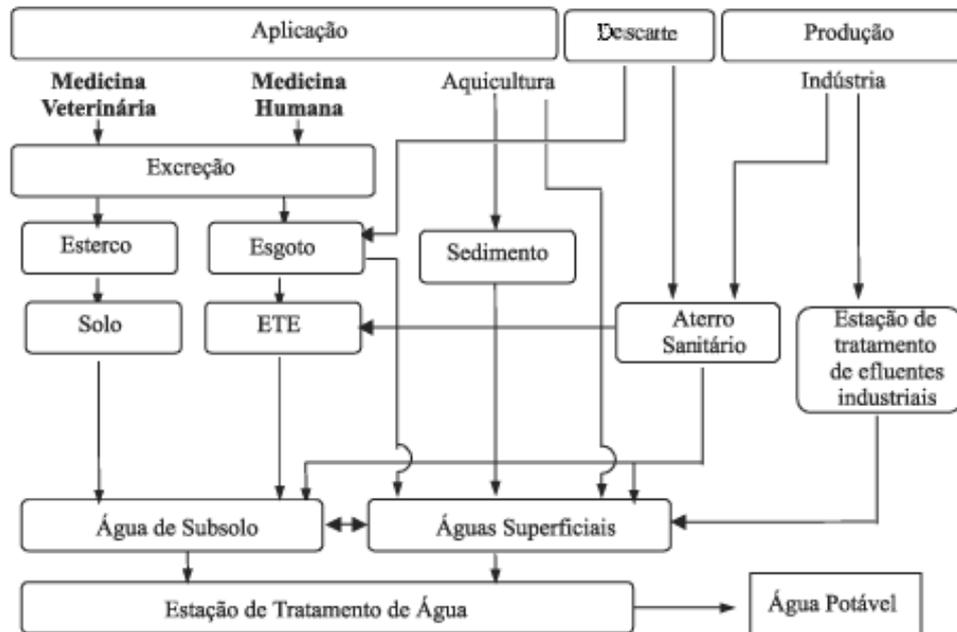
As respostas dos organismos submetidos à exposição a um contaminante ambiental, podem ser avaliadas através de biomarcadores que se definem como ferramentas sensíveis, quantificáveis, capazes de mensurar tais respostas dos organismos, sendo específicas e fáceis de quantificar podendo ser avaliados através de métodos invasivos ou não-invasivos (TIMBRELL, 1998), em nível do indivíduo ou a nível subindividual.

No sentido de avaliar respostas biológicas após exposição aos mais variados agentes químicos, é necessário selecionar organismos-teste, que são espécies que evidenciem qualidades que os tornam adequados a serem utilizados em estudos ecotoxicológicos. Dessa forma, as espécies utilizadas como organismo-teste devem apresentar algumas características importantes como a sensibilidade constante e elevada aos contaminantes ambientais, grande disponibilidade e abundância no habitat, uniformidade e estabilidade genética nas populações, representatividade de seu nível trófico, significado ambiental em relação à área de estudo, ampla distribuição, facilidade de manutenção e de adaptação às condições de laboratório (COSTA et al., 2008). Entretanto, dentre as espécies recomendadas em normas padronizadas, como OECD, por exemplo, nenhuma é de ambiente tropical (com exceção de uma norma padronizada para microcrustáceo de ambiente neotropical, a *Ceriodaphnia silvestrii*; ABNT, 2003 e 2004).

3.2 FÁRMACOS NO AMBIENTE

Os fármacos no ambiente aquático são alvo de estudos desde o início dos anos 70, pois só a partir do desenvolvimento de técnicas e equipamentos analíticos mais sensíveis foi possível detectar esses compostos em quantidades vestigiais no ecossistema aquático, incluindo na água para consumo humano (FAWELL e ONG, 2012; DAUGHTON, 2016). As classes de fármacos encontrados no ambiente de todo o mundo são diversas, uma vez que na sociedade moderna faz-se uso desses compostos tanto para a medicina humana ou veterinária, como também em práticas como aquicultura, criação de gado e criação de aves (EBELE et al., 2017). A Figura 1 evidencia as rotas pelas quais esses compostos podem chegar ao ambiente, dependendo de sua origem de utilização.

Figura 1 – Fontes dos contaminantes emergentes em águas superficiais e águas de consumo humano. ETE – Estação de Tratamento de Esgoto



Fonte: Bila e Dezotti (2003).

Como mencionado anteriormente, os fármacos estão presentes no meio aquático em variadas quantidades e são provenientes de diversas fontes. As tabelas 1 e 2 evidenciam a presença dos fármacos paracetamol e propranolol, respectivamente, em efluentes do sistema de tratamento de esgoto, rios, águas de abastecimento, entre outros ambientes aquáticos, em diversos países.

Tabela 1 - Concentração do fármaco paracetamol em ambientes aquáticos.

Fármaco	Concentração	Local	Referência
Paracetamol	6 $\mu\text{g L}^{-1}$	Efluentes ETE, Europa	TERNES, 1998
Paracetamol	10 $\mu\text{g L}^{-1}$	USA rios	KOLPIN et al, 2002
Paracetamol	2,102 $\mu\text{g L}^{-1}$	Efluente ETE, Croácia	GROS et al, 2006
Paracetamol	0,042 $\mu\text{g L}^{-1}$	Rio Ebro, Espanha	GROS et al, 2006
Paracetamol	0,0083 – 0,211 $\mu\text{g L}^{-1}$	Água de Abastecimento, Sul da França	RABIET et al, 2006
Paracetamol	0,108 – 11,300 $\mu\text{g L}^{-1}$	Água Residual, Sul da França	RABIET et al, 2006
Paracetamol	5,529 – 6,957 $\mu\text{g L}^{-1}$	Howdon WTW, Inglaterra	ROBERT; THOMAS, 2006
Paracetamol	0,220 $\mu\text{g L}^{-1}$	Efluente ETE, Espanha	GOMEZ et al, 2007
Paracetamol	0,840 $\mu\text{g L}^{-1}$	Ribeirão Anhumas, Campinas, Brasil	SODRÉ et al, 2007
Paracetamol	0,260 $\mu\text{g L}^{-1}$	Efluente ETE New Mexico, USA	BATT et al, 2008
Paracetamol	1,826 $\mu\text{g L}^{-1}$	Efluente ETE Cylfynidd, País de Gales	KASPRZYK-HORDERN et al, 2008
Paracetamol	0,062 – 0,388 $\mu\text{g L}^{-1}$	Rio Taff, Reino Unido	KASPRZYK-HORDERN et al, 2008
Paracetamol	0,078 $\mu\text{g L}^{-1}$	Rio Danúbio, Sérvia	GRUJÍC et al, 2009
Paracetamol	0,610 $\mu\text{g L}^{-1}$	Rio Sava, Sérvia	GRUJÍC et al, 2009
Paracetamol	0,085 – 15,700 $\mu\text{g L}^{-1}$	Rios Sindian, Dahan and Gaoping, Taiwan	LIN; TSAI, 2009
Paracetamol	186,500 $\mu\text{g L}^{-1}$	Efluente hospitalar, Taiwan	LIN; TSAI, 2009
Paracetamol	0,013 – 0,280 $\mu\text{g L}^{-1}$	Rio Atibaia, São Paulo, Brasil	MONTAGNER et al, 2011
Paracetamol	130 – 2403 $\mu\text{g L}^{-1}$	Córrego da Onça, Mato Grosso do Sul, Brasil	AMÉRICO et al, 2012a
Paracetamol	130 $\mu\text{g L}^{-1}$	ETE Três Lagoas, Mato Grosso do Sul, Brasil	AMÉRICO et al, 2012b
Paracetamol	1,460 – 1,780 $\mu\text{g L}^{-1}$	Afluente, Espanha	IBAÑEZ et al., 2013
Paracetamol	30,421 $\mu\text{g L}^{-1}$	Rio Monjolinho, São Carlos, Brasil	CAMPANHA et al., 2014
Paracetamol	2,566 $\mu\text{g L}^{-1}$	Água de superfície e Água subterrânea, Sango Ota, Nigéria	OLAITAN et al, 2014
Paracetamol	17 $\mu\text{g L}^{-1}$	Estuário Porto de Darwin, Austrália	FRENCH et al., 2015

Fonte: Elaboração própria

Tabela 2 - Concentração do fármaco Propranolol em ambientes aquáticos.

Fármaco	Concentração	Local	Referência
Propranolol	0,170 $\mu\text{g L}^{-1}$	Efluente ETE, Alemanha	TERNES, 1998
Propranolol	0,120 $\mu\text{g L}^{-1}$	Água de superfície, Alemanha	TERNES, 1998
Propranolol	0,01 – 0,04 $\mu\text{g L}^{-1}$	Efluente ETE, França	ANDREOZZI et al, 2003
Propranolol	0,01 $\mu\text{g L}^{-1}$	Efluente ETE, Grécia	ANDREOZZI et al, 2003
Propranolol	0,01 – 0,09 $\mu\text{g L}^{-1}$	Efluente ETE, Itália	ANDREOZZI et al, 2003
Propranolol	0,01 $\mu\text{g L}^{-1}$	Efluente ETE, Suécia	ANDREOZZI et al, 2003
Propranolol	0,026 – 1,900 $\mu\text{g L}^{-1}$	Água de superfície/efluente de água residual municipal na América do Norte	HUGGETT et al., 2003
Propranolol	0,093 $\mu\text{g L}^{-1}$	Efluente, Reino Unido	ASHTON et al, 2004
Propranolol	0,03 $\mu\text{g L}^{-1}$	Efluente, Suécia	BENDZ et al, 2005
Propranolol	0,05 $\mu\text{g L}^{-1}$	Esgoto bruto, Suécia	BENDZ et al., 2005
Propranolol	0,29 $\mu\text{g L}^{-1}$	Efluente ETE, Croácia	GROS et al, 2006
Propranolol	0,049 – 0,061 $\mu\text{g L}^{-1}$	Estuário de Tyne, Reino Unido	ROBERT; THOMAS, 2006
Propranolol	0,06 – 0,119 $\mu\text{g L}^{-1}$	Howdon WTW, Inglaterra	ROBERT; THOMAS, 2006
Propranolol	0,388 $\mu\text{g L}^{-1}$	Efluente ETE Cylfynidd, País de Gales	KASPRZYK-HORDERN et al, 2008
Propranolol	0,032 – 0,077 $\mu\text{g L}^{-1}$	Efluente ETE New Mexico, USA	BATT et al, 2008
Propranolol	0,023 $\mu\text{g L}^{-1}$	Água de superfície, North Shore Channel, Chicago	BATT et al, 2008
Propranolol	0,089 $\mu\text{g L}^{-1}$	Efluente, França	COETSIER et al., 2009
Propranolol	0,022 – 0,04 $\mu\text{g L}^{-1}$	Rio Mankyung, Coreia do Sul	KIM et al, 2009
Propranolol	0,225 $\mu\text{g L}^{-1}$	Efluente hospitalar, Taiwan	LIN; TSAI, 2009
Propranolol	0,017 $\mu\text{g L}^{-1}$	Rios Sindian e Dahan, Taiwan	LIN; TSAI, 2009
Propranolol	0,016 – 0,135 $\mu\text{g L}^{-1}$	3 ETEs, Inglaterra	ZHOU et al, 2009
Propranolol	0,015 $\mu\text{g L}^{-1}$	Rio Monjolinho, São Carlos, Brasil	CAMPANHA et al., 2014
Propranolol	0,026 $\mu\text{g L}^{-1}$	Iguarapé do 40, Manaus, Brasil	THOMAS et al, 2014

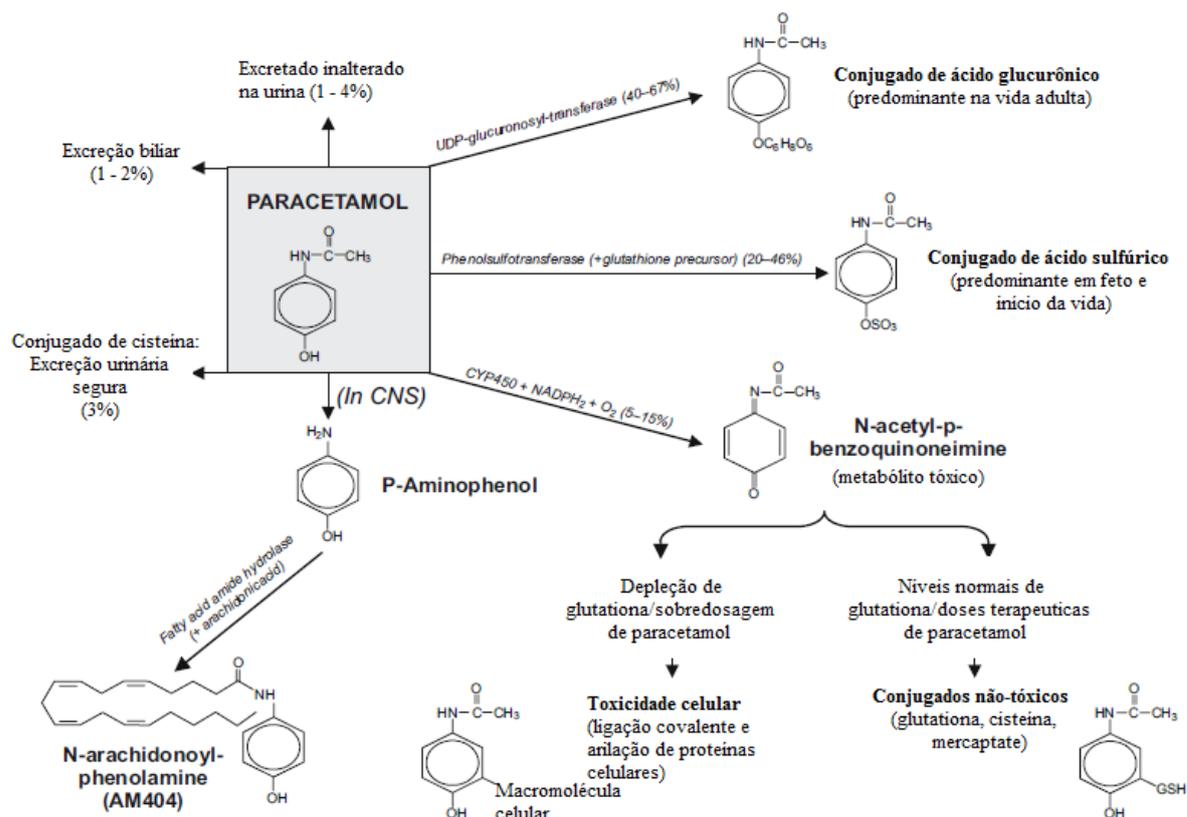
Fonte: Elaboração própria

3.2.1 Paracetamol

Como supracitado, o paracetamol é um fármaco amplamente utilizado na medicina humana para o tratamento de dores moderadas e febre. Devido a sua eficiência analgésica, esse composto pode ser utilizado em associação com cafeína e aspirina para o tratamento de dores de cabeça e enxaqueca, por exemplo, o que acarreta no aumento de consumo do paracetamol (SHANKAR e MEHENDALE, 2014).

Estudos indicam que, em doses terapêuticas, o paracetamol é considerado seguro. No entanto, em sobredosagem esse fármaco pode causar efeitos hepatotóxicos (XU et al., 2008). O paracetamol é metabolizado no fígado, através de duas possíveis vias. Uma compreende cerca de 90% do metabolismo desta substância e acarreta formação de metabólitos conjugados não-tóxicos, que são rapidamente excretados por via renal (nomeadamente, conjugado com ácido glucurônico e sulfato; XU et al., 2008). A outra via é a de bioativação do paracetamol, onde enzimas do sistema citocromo p450 realizam sua metabolização por via oxidativa, em um processo que gera o metabólito tóxico N-acetil-*p*-benzoquinoneimina – NAPQI (XU et al., 2008). Este metabólito é, por vezes, eliminado por conjugação com GSH; em sobredosagem, no entanto, os estoques intracelulares dos cofatores ácido glucurônico, sulfato e GSH se encontram exauridos e há o acúmulo de NAPQI, causando efeitos hepatotóxicos através da modificação de proteínas celulares, danos ao DNA e RNA, bem como peroxidação lipídica (XU et al., 2008; KAVITHA et al., 2011; KLOPČIČ et al., 2015). Na figura 2, é possível observar um esquema do processo metabólico do paracetamol no organismo humano.

Figura 2 - Representação esquemática do metabolismo do paracetamol em humanos.



Fonte: Adaptado de Bertolini et al. (2006)

O metabolismo do paracetamol pode também causar efeitos adversos em organismos aquáticos. Estudos ecotoxicológicos indicam que pode haver alterações a nível bioquímico em plantas, microcrustáceos, moluscos e, também, em peixes, nomeadamente através da ocorrência de estresse oxidativo, indicado pela alteração de enzimas como as glutathione peroxidase (GPx), GSTs e glutathione redutase (GRed), por exemplo (BRANDÃO et al., 2011; NUNES et al., 2014a; NUNES et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2015).

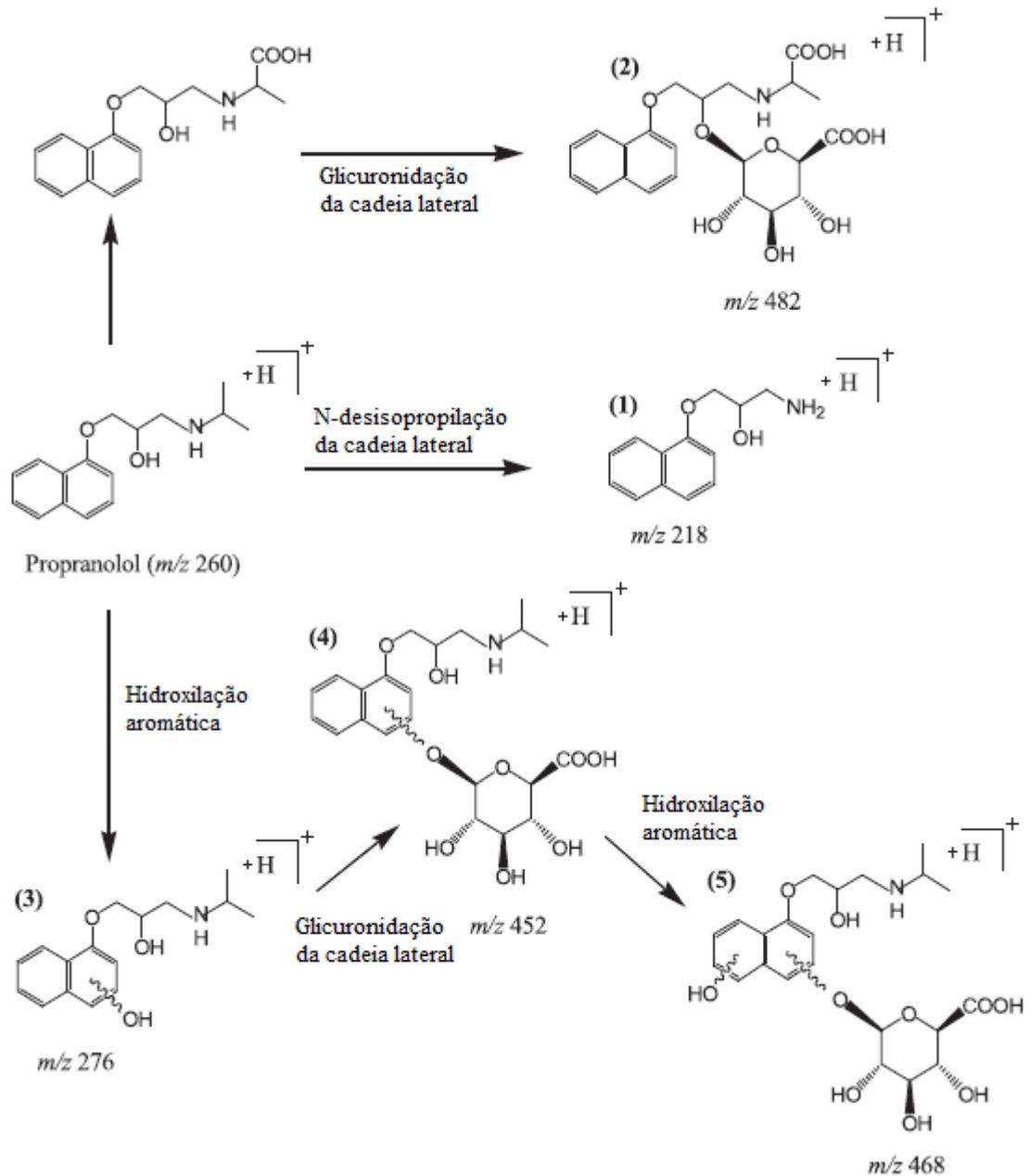
3.2.2 Propranolol

O propranolol é um bloqueador dos receptores β -adrenérgicos não seletivo, muito utilizado no tratamento de cardiopatias, hipertensão, arritmia e, também, no tratamento de angina (SHAND, 1975). Atualmente, este medicamento vem sendo utilizado em casos de ansiedade, o que aumenta ainda mais o seu consumo, entretanto para este uso ainda carece de estudos mais aprofundados (STEENEN et al., 2015).

Estudos com organismos aquáticos demonstraram a capacidade do propranolol em exercer diversos efeitos sobre eles (revisado por Owen et al., 2007), como a interferência na quimiorrecepção e resposta dos eritrócitos à acidose em peixes, bem como efeitos sobre os β -receptores do cérebro, uma vez que este fármaco tem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica em peixes e mamíferos.

Em mexilhões (*Mytilus galloprovincialis*), a exposição ao propranolol levou ao estresse oxidativo, evidenciado por uma redução concentração-dependente na estabilidade da membrana dos lisossomos dos hemócitos (FRANZELLITI et al., 2011). Dash et al. (1990) também demonstraram que o propranolol seria capaz de causar a diminuição da atividade da acetilcolinesterase dos tecidos cerebrais e cardíacos de ratos submetidos à exposição crônica. Levando isso em consideração, avaliar os marcadores bioquímicos de estresse oxidativo e neurotoxicidade pode auxiliar na observação dos efeitos da exposição ao propranolol em *P. harpagos*. Na figura 3 está representado um esquema do metabolismo do propranolol no fígado de uma espécie de peixe, a carpa cruciana (*Carassius auratus*).

Figura 3 - Representação esquemática do metabolismo do propranolol no peixe *Carassius auratus*.



Fonte: Adaptado de Ding et al. (2015).

3.3 O ORGANISMO-TESTE

A espécie utilizada como organismo-teste foi o peixe *Phalloceros harpagos* (Figura 4), por ser um representante de fauna da região neotropical, sendo classificado como consumidor secundário. *P. harpagos* pertence ao gênero *Phalloceros*, que conforme descrição de Machado et al. (2001), é caracterizado por pequeno tamanho corporal, ovovivíparo com dimorfismo sexual e fêmeas maiores e mais abundantes (Figura 5). Essa espécie é onívora,

demonstrando hábitos canibais, no entanto se alimenta preferencialmente de insetos aquáticos e terrestres, vegetais, algas e sedimento (SOUZA et al., 2009). Encontra-se amplamente distribuído na América do Sul, entre o Brasil e o Paraguai (LUCINDA, 2008). Outras características também favorecem a escolha de *P. harpagos* como organismo-teste, como sua fácil captura e manuseio. Essa espécie também é abundante e adaptável a condições laboratoriais, incluindo o processo de exposição e a sua manutenção nos aquários.

Figura 4 – Peixe *Phalloceros harpagos* no ambiente aquático.



Fonte: Modificado de Menezes et al. 2007.

Figura 5 – *P. harpagos* evidenciando a diferença entre machos (A), pela presença de gonopódio, e fêmeas (B), pela ausência de gonopódio.



Fonte: Modificado de Lucinda, 2008.

3.4 BIOMARCADORES

Os biomarcadores enzimáticos e celulares se enquadram no conceito anteriormente descrito de Timbrell (1998), por serem uma resposta biológica a nível bioquímico e celular quando o organismo é exposto a determinado contaminante. Além disso, eles se apresentam como sinais preditivos (Figura 6), uma vez que são as primeiras respostas do organismo quando em contato com o xenobiótico (VAN GESTEL e VAN BRUMMELEN, 1996; TIMBRELL, 1998).

Figura 6 - Responsividade aos poluentes na hierarquização biológica. Os círculos vermelhos representam as escalas dos biomarcadores estudados neste trabalho.



Fonte: Modificado de Magalhães e Ferrão Filho (2008).

Há três tipos de biomarcadores: os de exposição, que indicam a dose interna ou a biodisponibilidade do xenobiótico ou de seus metabólitos no organismo; os biomarcadores de efeito que indicam uma resposta adaptativa do organismo (moleculares, bioquímicas, citológicas, fisiológicas, etc); e os biomarcadores de susceptibilidade, que representam a capacidade do organismo-teste responder a exposição a um xenobiótico específico (VAN DER OOST et al., 2003). As alterações mensuradas no organismo através dos biomarcadores

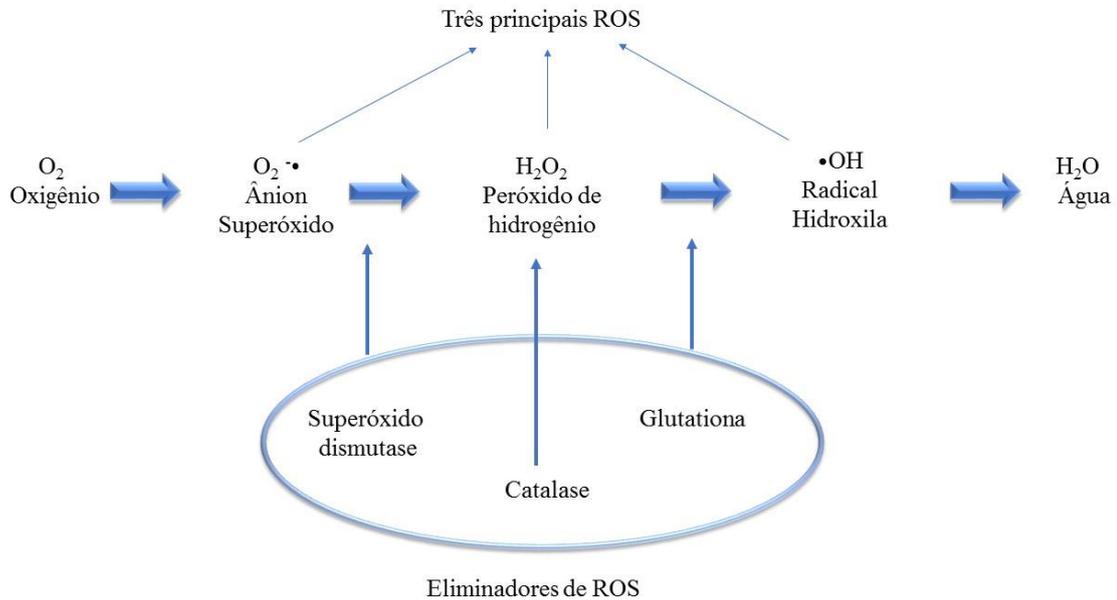
de efeito podem auxiliar na compreensão do dano causado pelos xenobióticos no ambiente, uma vez que cada biomarcador pode indicar uma resposta fisiológica do indivíduo de uma população a uma determinada condição ambiental, sendo possível analisar o impacto dos contaminantes antes que o dano atinja o ecossistema como um todo (AMORIM, 2003). A seguir serão elucidados os biomarcadores utilizados para o presente estudo.

3.4.1 O Uso das Atividades Enzimáticas das Defesas Antioxidantes como Biomarcadores de Estresse Oxidativo

Os xenobióticos que chegam aos sistemas aquáticos, muitas vezes por ações antrópicas, podem causar efeitos detectáveis a níveis bioquímicos nos organismos pertencentes a este ecossistema. O estresse oxidativo pode ser um desses efeitos e se caracteriza pelo desequilíbrio dos sistemas prooxidativo e antioxidativo, no qual os efeitos prooxidativos predominam (SIES, 1986). O estresse oxidativo é gerado pelo excedente de espécies reativas de oxigênio (EROS) nas células, as quais são intermediários químicos de existência muito fugaz, com elétrons desemparelhados em sua camada mais externa, os quais reagem facilmente com outras moléculas a fim de alcançar a estabilidade (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990). As EROS são normalmente produzidas nas células em decorrência do metabolismo celular aeróbio desempenhado pela mitocôndria, a partir da cadeia transportadora de elétrons (BERGAMINI et al., 2004). As principais moléculas, como esquematizado na figura 7, são ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que apesar de não ser radicalar, participa da reação de formação do radical hidroxila, sendo que o radical hidroxila (OH^{\cdot}) é mais deletério e reativo às proteínas e DNA, sendo capaz de oxidar grupos sulfidrilas e pontes dissulfeto (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; SCHIEBER e CHANDEL, 2014).

Entretanto, as espécies reativas não são somente as de oxigênio, também estando presentes no organismo espécies reativas de nitrogênio, que compreendem o óxido nítrico (NO^{\cdot}) e o dióxido de nitrogênio (NO_2^{\cdot}), as quais são importantes na sinalização celular, proliferação de células do músculo liso e adesão de leucócitos (IGNARRO et al., 1999; FANG et al., 2002).

Figura 7 - Processo de formação das espécies reativas de oxigênio (EROS - através da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria). Nesta figura está representada a formação das três principais EROS e os seus respectivos eliminadores.



Fonte: Adaptado de Scheibmeir et al. (2005).

Entretanto, as EROS desempenham um papel fundamental nas células, pois podem participar na sinalização intracelular, ou na ativação de células do sistema imunológico, como os macrófagos, que utilizam peróxido de hidrogênio no combate às bactérias e agentes estranhos ao organismo (RAHAL et al., 2014).

As EROS podem ser produzidas também através do processo de biotransformação de fase I que ocorre no organismo (SCHEIBMEIR et al., 2005). A biotransformação pode ocorrer em duas fases. A fase I consiste nas reações de oxidação, redução e hidrólise, que levam a uma modificação estrutural do composto a ser metabolizado, com introdução ou exposição de um grupo funcional, mais reativo. Estas reações são realizadas principalmente por enzimas do citocromo P450, localizadas no retículo endoplasmático das células (BUHLER e WILLIAMS, 1988) e normalmente acarretam um ligeiro aumento da hidrossolubilidade da molécula, que pode, contudo, não ser suficiente para a sua excreção por via renal ou fecal. Já na fase II, ocorre a conjugação do composto com substâncias endógenas, que se ligam aos grupos funcionais introduzidos e/ou expostos aquando das reações de fase I, e visa torná-lo mais hidrossolúvel (OMIECINSKI et al., 2011). Os processos das fases I e II são independentes, ou seja, o composto pode sofrer apenas reações de fase I, ou somente de fase II, ou as duas (CORREIA, 2014). Geralmente as reações da fase I introduzem um grupo

relativamente reativo, como o grupo hidroxila, na molécula, e este grupo funcional servirá, então, como ponto de ataque para o sistema de conjugação (fase II), que fixa a ele um substituto maior, como um grupo glicuronil, sulfato, acetil ou conjugação com a GSH (SCHINONI, 2006; CORREIA, 2014).

Alterações a nível de estresse oxidativo em peixes podem ocorrer tanto nas brânquias quanto no fígado, uma vez que ambos os tecidos podem exercer metabolismo de xenobióticos, nomeadamente de fase I (pelas enzimas do citocromo P450; CHAMBERS e YARBROUGH, 1976). Além disso, peixes da espécie *Oncorhynchus mykiss* após a exposição ao paracetamol em ensaios agudos e crônicos em concentrações comparáveis às concentrações adotadas no presente trabalho, Ramos et al. (2014) observaram em ambos os órgãos alterações a nível do processo de destoxificação de fase II, com envolvimento das isoenzimas GSTs. Outro estudo (Bartram et al, 2010) demonstrou o metabolismo do propranolol em fígado e brânquias pelas isoenzimas do citocromo P450, sendo o experimento realizado *in vivo* e *in vitro* na espécie de peixe *O. mykiss*, demonstrando que ambos os órgãos possuem enzimas processo de biotransformação de fase I.

Os danos celulares que podem ser causados pelo estresse oxidativo, incluem as reações com as moléculas adjacentes, como lipídios, carboidratos, proteínas, DNA, entre outros (SCHEIBMEIR et al., 2005), que podem levar a consequências fisiológicas sérias, como envelhecimento, inativação enzimática e câncer (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). A peroxidação lipídica é um dos danos mais graves à célula, pois compreende uma série de reações das EROS com os lipídeos poli-insaturados (VALAVANIDIS et al., 2006). A primeira reação é a da remoção de hidrogênio (H) do ácido graxo, por parte das EROS, o que faz com que a cadeia de carbono (C) fique instável. A seguir ocorre a reação com o oxigênio (O) e assim é formado o radical peroxil que irá reagir com outros lipídeos e será chamado de lipídio hidroperóxido. Essas moléculas ainda são instáveis e na presença de metal é formado o malondialdeído (MDA) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

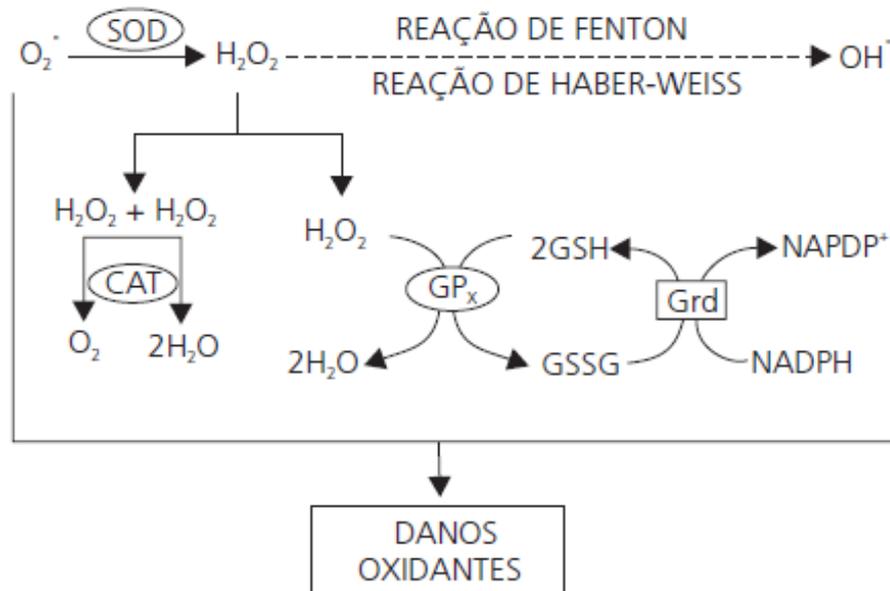
Segundo Halliwell e Gutteridge (1999), as células podem adaptar-se ao estresse celular promovendo o aumento das defesas antioxidantes ou então podem sofrer danos celulares. As defesas antioxidantes dos organismos envolvem diversas moléculas tais como enzimas, que serão elucidadas mais adiante, como também as vitaminas A, C e E que podem atuar como antioxidantes não-enzimáticos, uma vez que essas vitaminas podem doar um elétron para as EROS, tornando-o assim não reativo (BERGAMINI et al., 2004).

A glutatona na sua forma reduzida (GSH) também desempenha um papel importante no sistema antioxidante; é principalmente obtida através da alimentação, e mesmo sem a ação

de enzimas ela é eficaz na eliminação de espécies reativas, pois pode reagir diretamente com elas; a GSH ao se ligar com o oxigênio, se torna oxidada (GS) e rapidamente se liga com outra GS formando GSSG que pode ser reduzida novamente pela ação da enzima glutathiona-redutase (Gred) (FANG et al., 2002) e a coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH).

As defesas antioxidantes enzimáticas (Figura 8) são muito importantes para as células. A remoção dos $O_2^{\cdot-}$ formados a partir do metabolismo mitocondrial (HALLIWEL, 2011) é efetuada pela enzima superóxido dismutase (SOD), a qual catalisa a formação de H_2O_2 pela dismutação do radical superóxido (PISOSCHI e POP, 2015). O H_2O_2 resultante da reação da SOD pode ser decomposto pela atuação das enzimas catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx), inibindo a formação do radical hidroxilo (OH^{\cdot}), através das reações de Fenton e Haber-Weiss que ocorrem na presença de ferro e cobre (Figura 8). O radical hidroxil é especialmente nocivo para a célula, pois para ele não há nenhum sistema enzimático de defesa (BARBOSA et al., 2010).

Figura 8 - Sistema antioxidante enzimático. SOD – Superóxido dismutase. CAT – Catalase. GPx – Glutathiona peroxidase. Gred – Glutathiona redutase.



Fonte: Barbosa et al. (2010).

As isoenzimas glutathiona-S-transferases, também possuem papel na desintoxicação de xenobióticos ou seus metabólitos, pois catalisam a sua conjugação com a glutathiona reduzida

(GSH) para que assim o xenobiótico se torne solúvel e facilmente excretado (HABIG et al., 1974; LYTTLE et al., 1994; HUBER et al., 2008).

A ação das GSTs está igualmente relacionada com o combate ao estresse oxidativo. Um dos efeitos das EROS na célula é a peroxidação dos lipídeos das membranas, essa reação pode gerar eletrófilos e epoxialdeídos, compostos potencialmente genotóxicos. Neste sentido, enquadra-se o papel das GSTs no combate ao estresse oxidativo, pois será formado um complexo de conjugação com a glutatona que controlará tais compostos genotóxicos, prevenindo, assim, o dano ao DNA (HAYES et al., 2005).

Os marcadores bioquímicos enzimáticos que participam do sistema antioxidante da célula e desempenham papel fundamental na degradação desses intermediários reativos, podem ser considerados marcadores da ocorrência do estresse oxidativo nas células (HALLIWELL, 2011). As atividades destas enzimas específicas envolvidas na defesa antioxidante são utilizadas como sinalizadores do estabelecimento de alterações deletérias causadas pela exposição a agentes tóxicos, que causam aumentos ou diminuições significativas nas suas atividades. Isto permite que sejam consideradas biomarcadores, pois quando há o aumento de EROS nas células, as defesas antioxidantes enzimáticas podem aumentar a sua atividade na célula como resposta, a fim de eliminar ou neutralizar esses compostos (VALAVANIDIS et al., 2006).

Sendo assim, a escolha destes marcadores bioquímicos no *P. harpagos* se justifica pelo fato de que há estudos que associam o paracetamol e o propranolol às respostas ao estresse oxidativo como, por exemplo, o aumento da atividade enzimática da CAT, GSTs, GPx, Gred e também pelo processo de peroxidação lipídica em *Oncorhynchus mykiss* expostos ao paracetamol, tanto em ensaios agudos quanto em crônicos, descritos por Ramos et al. (2014). Outros estudos com organismos aquáticos também apontam para o mesmo efeito após exposições ao paracetamol, demonstrando que os mecanismos pelos quais este composto exerce atividade tóxica correspondem a vias evolutivamente conservadas (*Daphnia magna*, OLIVEIRA et al., 2015; plantas aquáticas, *Lemna sp*; NUNES et al., 2014b). Para o propranolol, o estresse oxidativo foi observado por meio da alteração da atividade enzimática da CAT e GSTs no molusco *Mytilus galloprovincialis*, além da redução da estabilidade da membrana dos lisossomos dos seus hemócitos, após a exposição de 7 dias a este fármaco, como descrito por Franzelliti et al. (2011).

3.4.2 O Uso da Atividade Enzimática das Colinesterases como Biomarcador de Neurotoxicidade

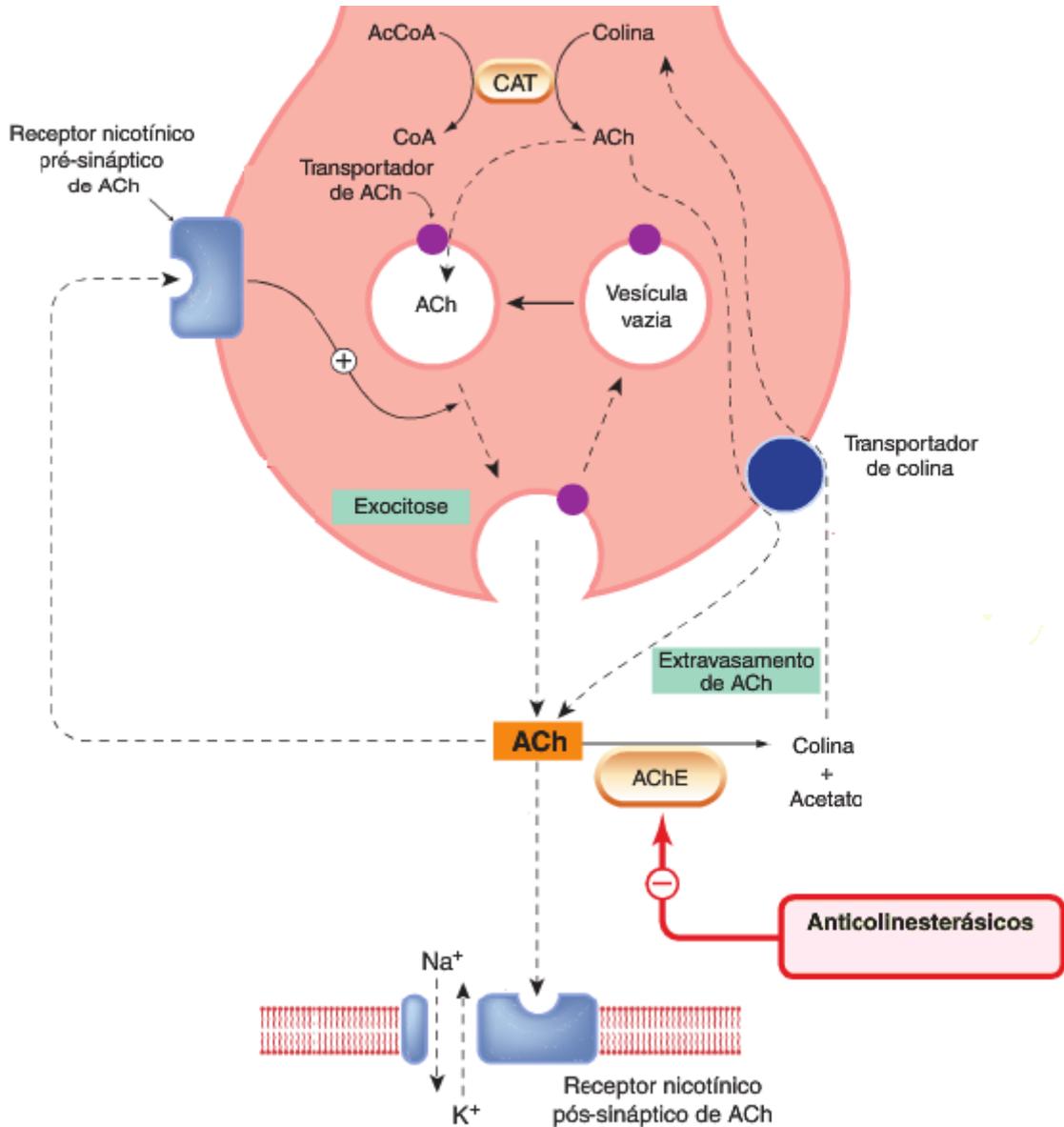
As colinesterases são enzimas da família das esterases, que realizam a hidrólise de ésteres carboxílicos e estão localizadas majoritariamente na membrana das células pós-sinápticas das terminações nervosas (RANG et al., 2012), onde realizam a hidrólise da acetilcolina. A acetilcolina é um neurotransmissor que atua tanto no sistema nervoso central, quanto no sistema nervoso periférico (AMENTA e TAYEBATI, 2008). Os receptores para este tipo de neurotransmissor são os muscarínicos e os nicotínicos (BROWN, 2006). A fonte de colina para a síntese de acetilcolina, provém de moléculas precursoras transportadas através da corrente sanguínea e também da recaptação de colina da fenda sináptica pelo neurônio pré-sináptico. A enzima colina-O-acetil-transferase (ChAT), presente no neurônio pré-sináptico, catalisa a reação de síntese da acetilcolina tendo como precursores de colina moléculas como glicerofosforilcolina, fosforilcolina e fosfatidilcolina, além do doador de acetil, a acetil-coenzima A (AMENTA e TAYEBATI, 2008; VENTURA et al., 2010). Após sua síntese, a acetilcolina é armazenada em vesículas localizadas nas células pré-sinápticas (PRADO et al., 2002). Quando ocorre o envio de um potencial de ação, na sinapse, a membrana da vesícula contendo acetilcolina se funde com a membrana plasmática da célula pré-sináptica e ocorre liberação de acetilcolina na fenda sináptica. A acetilcolina liberada se liga a seu receptor no neurônio pós-sináptico, o que provoca a despolarização na membrana desta célula pós-sináptica com a entrada de Na^+ e saída de K^+ , o que inicia um novo potencial de ação. Após ser liberada na sinapse, a acetilcolina permanece o tempo suficiente para ativar os receptores das células pós-sináptica, e é posteriormente e rapidamente hidrolisada pela enzima acetilcolinesterase, em colina e acetato. Após a hidrólise da acetilcolina, a colina retorna para o interior da célula pré-sináptica, através dos transportadores de colina (CHT), onde o neurotransmissor acetilcolina é novamente sintetizado, pela ação da enzima (ChAT), tal como demonstrado na figura 9 (AMENTA e TAYEBATI, 2008; VENTURA et al., 2010).

Quando ocorre o bloqueio da enzima acetilcolinesterase o neurotransmissor acetilcolina se acumula na fenda sináptica, podendo acarretar até mesmo na morte do organismo, uma vez que há uma hiperexcitação do neurônio pós-sináptico do sistema nervoso parassimpático ou autônomo (NUNES et al., 2005; RANG et al., 2012). Em vertebrados a inibição da colinesterase pode causar convulsões, inconsciência, secreção glandular excessiva e falência respiratória, podendo levar à morte, enquanto que em invertebrados há uma hiperexcitação e morte por exaustão (ČOLOVIĆ et al, 2013; CASIDA e DURKIN, 2013).

Em peixes, estudos demonstraram a presença da forma acetilcolinesterase (AChE) entre as colinesterases, localizada principalmente na membrana da célula pós-sináptica, e está envolvida no controle da neurotransmissão através da hidrólise da acetilcolina, substrato pelo qual possui maior afinidade, mas atua também no processo de diferenciação neuronal; e butirilcolinesterase (BChE), que está localizada principalmente no plasma, com função ainda pouco elucidada, mas está envolvida na proliferação celular (MONTEIRO et al., 2005; LETICIA e GERARDO, 2008; NUNES, 2011).

A atividade da enzima AChE tem sido tradicionalmente associada a estudos ambientais, de modo a diagnosticar a exposição de organismos não-alvo a agentes específicos anti-colinesterásicos. As AChE podem ser diretamente inibidas a partir da contaminação por pesticidas anticolinesterásicos (organofosforados, como por exemplo, o dimetoato; carbamatos, como por exemplo, o carbaril) e fármacos (rivastigmina, donepezila, neostigmina) (Figura 9) ou ainda serem indiretamente inibidas por danos causados pelo estresse oxidativo (NUNES, 2011; ČOLOVIĆ et al, 2013). Estes são os fatores que viabilizam o seu uso como biomarcador de neurotoxicidade em ecotoxicologia.

Figura 9 - Esquema representativo da inibição da enzima acetilcolinesterase. AChE: Acetilcolinesterase; ACh: Acetilcolina; CAT: enzima que catalisa a síntese de acetilcolina; Sinal “-”: Inibidor da acetilcolinesterase; Setas pontilhadas: caminho da ACh, da colina, do Na⁺ ou do K⁺; Setas completas: reações catalisada por enzima.



Fonte: Modificado de Rang et al. (2012).

3.4.3 Biomarcadores Celulares de Resposta ao Estresse

O estresse celular causado pela exposição de organismos ou cultura de células a condições adversas de temperatura ou agentes tóxicos pode ter como resposta a expressão de genes que codificam proteínas específicas, conhecidas como proteínas de choque térmico (“*Heat Shock Proteins*”, HSPs), assim denominadas por terem sido primeiramente descritas em *Drosophila* expostas a altas temperaturas, por Ritossa (1962). Posteriormente, na revisão de Lindquist e Craig (1988), o aumento das HSPs em resposta a exposição a altas

temperaturas foi também descrito tanto em bactérias e cultura de células eucariontes quanto em organismos, como fungos e ratos. Adicionalmente, os estudos evidenciaram que as HSPs são proteínas evolutivamente conservadas e, nos eucariontes, estão distribuídas nos compartimentos intracelulares (citoplasma, núcleo, retículo endoplasmático, mitocôndria, lisossomo e endossomo). As HSPs também podem estar presentes na membrana plasmática (interações das pequenas HSPs aos domínios lipídicos de membrana) ou serem exocitadas (exossomos) e secretadas (grânulos secretores), especificamente as HSP60 e HSP70, atuando como importantes mediadores da sinalização intercelular no meio extracelular, incluindo imunomodulação (HORVATH et al., 2008).

O aumento da expressão dos genes destas proteínas nos organismos não ocorre somente após exposição a mudanças de temperatura, sendo que os fatores que o induzem são diversos (POMERAI, 1996; KROON et al., 2017). Nos peixes, por exemplo, esses fatores incluem estresses abióticos, como exposição a contaminantes ambientais (metais, pesticidas, efluentes industriais), assim como descritos para outros organismos, e estressores bióticos, como os vírus, bactérias, entre outros patógenos (DEMEKE e TASSEW, 2016).

Devido a sua variedade e a diversas especificidades, as famílias de proteínas HSPs recebem nomenclatura de acordo com o seu peso molecular, tais como HSP110, HSP90, HSP70, HSP60 e pequenas HSPs (LINDQUIST e CRAIG, 1988; GARRIDO et al, 2001; JEE, 2016).

A família HSP70 é a mais estudada, pois participa de vários processos celulares envolvidos com o enovelamento de proteínas, tanto das recém-sintetizadas como o redobramento de proteínas com sua conformação tridimensional inadequada ou prevenção de sua agregação, bem como a translocação de proteínas para organelas (mitocôndria, por exemplo) e de proteínas para secreção, além de atuar no controle de qualidade estrutural das proteínas das vias de transdução de sinal envolvidas na regulação do ciclo celular, diferenciação e morte celular programada (GARRIDO et al., 2001; MAYER e BUKAU, 2005; EKAMBARAM e JAYACHANDRAN, 2015). Todas estas atividades desempenhadas pelas proteínas da família HSP70 são decorrentes da capacidade destas chaperonas em interagir com proteínas oxidadas pelo estresse oxidativo (OTT et al., 2007).

O estresse oxidativo, como anteriormente mencionado no tópico 3.4.1, pode gerar efeitos proteotóxicos nas células. Isso ocorre quando as EROS estão excedentes na célula, e as defesas antioxidantes já não são mais capazes de atuar com vista à neutralização/eliminação desses intermediários reativos (NIFOROU et al., 2014). Diante disso, as proteínas celulares

podem sofrer desnaturação, através dos efeitos negativos da reação das EROS com os resíduos de cisteína das proteínas.

Ademais, a característica das HSPs de serem induzidas por diversos estressores químicos, as tornam biomarcadores celulares indicativos de estresse na avaliação dos efeitos de xenobióticos em organismos aquáticos (WEPENER et al, 2005; ZHOU et al., 2009; SINGH et al., 2015; ZHOU et al., 2015; ANSOAR-RODRIGUES et al., 2016). Nos peixes, essas proteínas podem ser expressas em diversos órgãos, como brânquias, músculo, cérebro, fígado e, também, eritrócitos (IWAMA et al., 1998).

O aumento do nível de HSP70 nos hepatócitos de vertebrados expostos ao paracetamol é uma resposta frequentemente associada ao estresse oxidativo gerado no processo de biotransformação deste fármaco (SUMIOKA et al., 2004; KNOCKAERT et al., 2011; GUILOSKI et al., 2017). Camundongos com nocaute do gene HSP70 têm sua hepatotoxicidade aumentada quando expostos ao paracetamol, o que reflete a ausência do efeito citoprotetor exercido pela HSP70 (TOLSON et al., 2006).

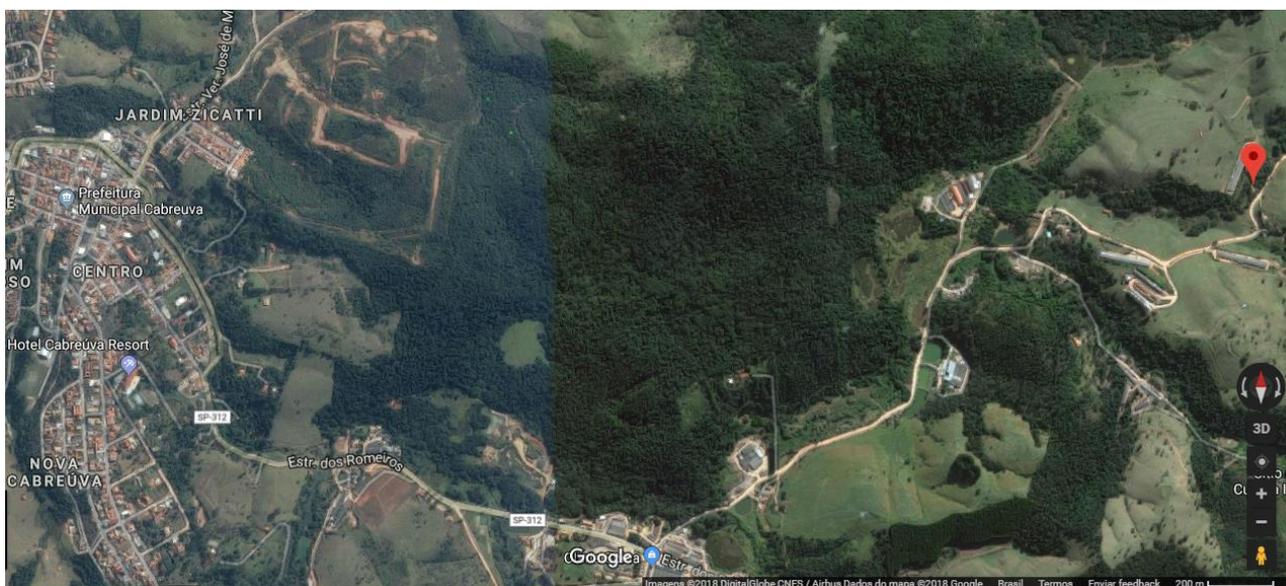
Quanto ao propranolol, foi observado o aumento da expressão gênica da HSP70 em *Danio rerio* expostos a este fármaco por 96h, provavelmente em resposta ao estresse oxidativo causado pelo propranolol, uma vez que a expressão gênica das enzimas do sistema antioxidante também estava aumentada (SUN et al., 2015). Outro estudo, com mexilhões da espécie *Dreissena polymorpha* expostos ao β -bloqueador metaprolol, também evidenciou o aumento da expressão gênica da HSP70, indicando a ativação do mecanismo de citoproteção após a exposição a este fármaco (CONTARDO-JARA et al., 2010).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LOCAL DA COLETA

Os indivíduos da espécie *Phalloceros harpagos* (LUCINDA, 2008) foram coletados em um riacho de propriedade particular na cidade de Cabreúva (Figura 10), na região da Serra do Japi, Estado de São Paulo, Brasil (23°18'23.8"S 47°05'50.4"W). Essa área faz parte das Áreas de Proteção Ambiental (APA), criadas pelas Leis nº 4.095/84 e nº4.023/84, regulamentadas pelo Decreto nº 43.284/98. A área selecionada é caracterizada por ser um importante fragmento de floresta semidescídua (JOLY, 1992). Possui poucos impactos ambientais, sendo eles geralmente causados pelas propriedades particulares ainda existentes, as quais muitas vezes exercem atividades agropecuárias (YOSHIDA e UIEDA, 2014). Ademais, considera-se que a área tenha um baixo potencial de poluição da água (PRADO e NOVO, 2015).

Figura 10 – Região da área de coleta. Ponto vermelho indica a localidade exata do riacho. À esquerda da imagem encontra-se a cidade de Cabreúva.



Fonte: GoogleMaps

A Secretaria Municipal do Meio Ambiente de Cabreúva frequentemente faz análises na água bruta nas estações de tratamento, a fim de realizar o monitoramento das águas captadas. A região de coleta da água para análise fica próxima à área de coleta dos animais. A Tabela 3

corresponde aos dados avaliados na água bruta da estação de tratamento de Cabreúva, do mês de abril de 2017, disponibilizados pela Secretaria do Meio Ambiente de Cabreúva.

Tabela 3 – Parâmetros avaliados na água bruta da estação de tratamento de Cabreúva

Temperatura	21,7 °C
pH	7
Condutividade elétrica	118,5 µS/cm
Turbidez	13 NTU
Cor	29 UC
Cianobactérias	649 células/mL
<i>Escherichia coli</i>	441 NMP/100 mL
Coliformes totais	24196 NMP/100 mL

Fonte: Ofício RJD14 028/17, Secretaria Municipal do Meio Ambiente (SMMA) de Cabreúva.

4.2 COLETA E ACLIMATAÇÃO

Os espécimes da espécie selecionada para o estudo foram capturados com auxílio de uma rede de mão, com raio de 86 cm e malha de 0,3 e 0,5 mm. As coletas foram realizadas em abril, maio, outubro e novembro de 2016, sendo que foram coletados 150 indivíduos em cada uma das duas primeiras amostragens (abril e maio) e 100 em cada uma das duas últimas amostragens (outubro e novembro), totalizando um número amostral de 500 animais. No momento da coleta, selecionaram-se indivíduos com tamanho médio de $2 \pm 0,5$ cm, com peso médio de 0,1104 g. Os indivíduos menores ou maiores, bem como demais espécies, foram imediatamente devolvidos ao riacho. Os peixes coletados eram machos (identificados pela presença de gonopódio) e fêmeas sexualmente imaturas (tamanho inferior a 2,5 cm e identificadas pela ausência de gonopódio). Em seguida, os indivíduos foram colocados em caixas de transporte com aeração constante.

No laboratório, os peixes foram aclimatados por um período de 15 dias em água mineral para consumo humano da marca Klarina® (composição química e parâmetros físico-químicos nas Tabelas 4 e 5), temperatura controlada de 23°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), fotoperíodo de 12h claro/12h escuro, aeração contínua, sendo alimentados diariamente *ad libitum* com ração floculada para peixes tropicais Tetra Min®. Neste período foram realizadas duas inspeções por dia e os animais mortos foram imediatamente retirados do aquário.

Tabela 4 – Características físico-químicas da água Klarina® (classificação: água fluoretada, fracamente radioativa na fonte).

pH (à 25°C)	5,78
Temperatura (na fonte)	19,8 °C
Condutividade elétrica (à 25°C)	30,6 µS/cm
Resíduo de evaporação (à 180°C)	30,62 mg L ⁻¹
Radioatividade (na fonte à 20°C e 760 mm de Hg)	8.88 maches
Bário	0,060 mg L ⁻¹
Fosfato	0,05 mg L ⁻¹
Estrôncio	0,031 mg L ⁻¹
Bicarbonato	8,48 mg L ⁻¹
Cálcio	1,255 mg L ⁻¹
Fluoreto	0,05 mg L ⁻¹
Magnésio	0,873 mg L ⁻¹
Nitrato	6,06 mg L ⁻¹
Potássio	1,370 mg L ⁻¹
Cloreto	1,93 mg L ⁻¹
Sódio	2,788 mg L ⁻¹
Brometo	0,02 mg L ⁻¹

Fonte: Site Klarina (<http://cerberodesign.wixsite.com/klarina/composicao-classificacao>).

Tabela 5 – Parâmetros da água Klarina® no aquário de aclimação (média de 15 dias de medições)

pH	7 – 7,2
Amônia	0,025 – 1,00 ppm
Dureza Total	50 ppm
Dureza em Carbonatos	0 – 5,90 ppm
Nitrito	0 – 2,8 ppm
Temperatura	22 – 24 °C

Fonte: Elaboração própria (medições realizadas com kits da Labcon® e termômetro)

Os ensaios com os organismos da espécie selecionada foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Protocolo CEUA/UFSCar: 2730071215, aprovado em 04/02/2016, Anexo A) e a coleta dos peixes foi autorizada pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), número 52495-1.

4.2.1 Delineamento Experimental

Para cada ensaio (agudos e crônicos) os peixes foram individualmente colocados em recipientes plásticos com 250 mL de água. Para cada um dos 6 grupos experimentais havia 15 peixes, ou seja, 90 peixes no total por ensaio (Figura 11), assim como descrito por Nunes et al. (2008). Cada recipiente contendo um peixe possuía uma entrada de ar, o qual foi ministrado constantemente com o auxílio de um compressor de ar. O fotoperíodo foi definido em 12h claro/12h escuro e temperatura de 23°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), para todos os ensaios, tanto os agudos quanto os crônicos, de ambos os compostos farmacêuticos.

Os recipientes plásticos utilizados para ambas as exposições corresponderam a garrafas de polietileno, de 2L de capacidade, previamente usadas para consumo humano de água. Foram cortadas na altura da metade, devidamente lavadas com água destilada e secas.

Figura 11 – Figura representando o um grupo do delineamento experimental. O experimento se baseou em seis grupos experimentais, sendo um o controle (somente com água Klarina®) e os outros 5 com as concentrações dos fármacos.



Fonte: Autoria própria, com base na metodologia descrita por Nunes et al. (2008).

Para a obtenção das concentrações a serem utilizadas nos ensaios foi necessário o preparo de uma solução estoque; paracetamol (CAS: 103-90-2; pureza 98 – 102%) e propranolol (CAS number: 318-98-9; pureza \geq 99%). A solução estoque nos ensaios agudos foi preparada na concentração de 400 mg L⁻¹ para o paracetamol e 10 mg L⁻¹ para o propranolol, enquanto que nos ensaios crônicos a concentração da solução estoque foi de 10 mg L⁻¹ para ambos os fármacos. Nenhum co-solvente foi utilizado para essa finalidade, uma vez que os compostos utilizados possuem elevada solubilidade em água. As concentrações para os ensaios foram obtidas a partir da diluição da solução estoque. Por se tratar de ensaios semi-estáticos e a fim de manter a concentração do fármaco constante ao longo da exposição, as trocas do volume total de meio ocorreram a cada 48 h em todos os ensaios e uma nova solução estoque, bem como as concentrações para os ensaios, foram preparadas a cada troca do meio.

4.3 ENSAIO AGUDO

O delineamento experimental para os ensaios agudos foi baseado nas normas da Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Econômico (OCDE) 203 (1992). O experimento teve duração de 96h com trocas do meio e reposição do fármaco a cada 48h e inspeções visuais diárias. Nesse período os peixes não foram alimentados. Seis grupos foram definidos, o grupo controle (somente água Klarina®) e os grupos expostos a cinco concentrações dos fármacos (paracetamol: 8, 80, 800, 8000, 80000 μ g L⁻¹; propranolol: 0.1, 1, 10, 100, 1000 μ g L⁻¹). Estas concentrações foram definidas de forma a estarem abaixo do valor de CL₅₀ calculado para a espécie de peixe *Oryzias latipes* (espécie o mais similar filogeneticamente possível a *P. harpagos*, dada a inexistência de valores de CL₅₀ para esta espécie na literatura) de acordo com Yamamoto et al. (2007) de 800 mg L⁻¹ para o paracetamol e Kim et al. (2009) de 11,40 mg L⁻¹ para o propranolol, bem como nas concentrações dos resíduos de fármacos presentes no ambiente tabelas 1 e 2 (paracetamol 6 μ g L⁻¹: TERNES, 1998; 10 μ g L⁻¹: KOLPIN et al., 2002; 5,529 – 6,957 μ g L⁻¹: ROBERT e THOMAS, 2006; tabela 1 e propranolol 0,1 – 0,09 μ g L⁻¹, ANDREOZZI et al., 2003; 0,026 – 1,900 μ g L⁻¹, HUGGETT et al., 2003; 0,016 – 0,135 μ g L⁻¹, ZHOU et al., 2009; tabela 2).

Quinze peixes por grupo experimental foram colocados em recipientes plásticos individuais com volume total de 250 mL cada um, sendo que 10 peixes coletados ao acaso

foram destinados para os ensaios enzimáticos dos marcadores bioquímicos de estresse oxidativo e de neurotoxicidade (atividade das enzimas glutathione-S-transferases, catalase e colinesterases). Os cinco peixes restantes foram destinados para a análise do biomarcador celular (HSP70).

4.4 ENSAIO CRÔNICO

A partir das normas da OCDE 215 (2000) o ensaio crônico foi delineado para ter duração de 28 dias, sendo que o meio foi trocado a cada 48 h e alimentação fornecida a cada dois dias *ad libitum* com ração floculada para peixes tropicais Tetra Min®. Seis grupos experimentais com 15 peixes por grupo foram mantidos em recipientes individuais com um volume de 250 mL por recipiente, entre eles o grupo controle (somente com água Klarina®) e os outros 5 grupos expostos as diferentes concentrações de fármacos, selecionadas com base em critérios de relevância ecológica, sendo próximas das concentrações já reportadas no ambiente. Para o paracetamol as concentrações foram: 5, 10, 20, 40, 80 $\mu\text{g L}^{-1}$ (6 $\mu\text{g L}^{-1}$: TERNES, 1998; 10 $\mu\text{g L}^{-1}$: KOLPIN et al., 2002; 5,529 – 6,957 $\mu\text{g L}^{-1}$: ROBERT e THOMAS, 2006; tabela 1) e para o propranolol as concentrações foram: 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ (0,1 – 0,09 $\mu\text{g L}^{-1}$, ANDREOZZI et al., 2003; 0,026 – 1,900 $\mu\text{g L}^{-1}$, HUGGETT et al., 2003; 0,016 – 0,135 $\mu\text{g L}^{-1}$, ZHOU et al., 2009; tabela 2). Dez peixes coletados ao acaso foram destinados para ensaios enzimáticos dos biomarcadores de estresse oxidativo, e de neurotoxicidade (quantificação das atividades das enzimas CAT, GSTs e ChEs). Os cinco peixes restantes foram destinados para a análise do biomarcador celular (HSP70).

4.5 EUTANÁSIA E PROCESSAMENTO DOS TECIDOS

Após o período de exposição aguda e crônica, os peixes foram submetidos à anestesia por hipotermia e eutanásia por decapitação. Os órgãos destinados aos ensaios enzimáticos (cérebro, brânquias e fígado) foram dissecados/isolados, coletados e armazenados em microtubos do tipo eppendorf, que foram depois armazenados a -80°C para procedimentos posteriores.

Os fígados destinados para a detecção de HSP70 (biomarcador celular de estresse) foram dissecados sob estereomicroscópio, à temperatura ambiente, e imersos em solução

fixadora (paraformaldeído 4% em tampão fostato de sódio 0,1M - pH 7,4) contida no interior de microtubos do tipo eppendorf, por 24 h a 4°C.

4.6 ENSAIOS ENZIMÁTICOS

Todos os procedimentos utilizados para os ensaios enzimáticos foram realizados na Universidade Federal de São Carlos, Campus Sorocaba, por meio da utilização de equipamentos específicos. Para a homogeneização e centrifugação dos tecidos foram utilizados o homogeneizador Ultra-Turrax Ika T-10 basic e a centrífuga Universal 320 R Hettich zentrifugen, alocado no laboratório didático de fisiologia animal e vegetal. Os ensaios enzimáticos foram realizados no laboratório de Bioclima e envolveu a utilização do leitor de placas Synergy HTX Multi-Mode Reader, BioTek.

4.6.1 Determinação da Atividade Enzimática da Catalase

A atividade da CAT foi determinada no tecido hepático, o qual foi homogeneizado em 1mL de tampão fosfato 50 mM, em pH 7,0, com Triton X-100 0,1%, seguido de centrifugação a 15000 g, por 10 minutos à 4°C, e diluição na proporção de 1:100 em tampão fostato 50mM em pH 7,0. A seguir, foi realizada a determinação da atividade enzimática, segundo o protocolo descrito por Aebi (1984), no qual ocorre a decomposição do substrato H₂O₂, que pode ser monitorado através da medição da absorbância a 240 nm. Os valores da CAT foram expressos em µmol de H₂O₂ consumido por minuto, por mg de proteína.

4.6.2 Determinação da Atividade Enzimática das Glutathione-S-Transferases

A atividade das isoenzimas GSTs foi determinada nas brânquias, as quais foram homogeneizadas em 1 mL de tampão fosfato 50mM com 0,1% de Triton X-100 em pH 7,0. Após a centrifugação a 15000g, por 10 minutos, à 4°C, o sobrenadante foi diluído na proporção de 1:10 em tampão fosfato 1M em pH 6,5. A determinação da atividade enzimática das GSTs seguiu o protocolo descrito por Habig et al. (1974), o qual descreve que as GSTs catalisam a conjugação do substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com a glutathione, formando um tioéter, cuja quantidade pode ser medida pelo aumento da absorbância a um

comprimento de onda de 340 nm. Os resultados foram expressos em mmoles de tioéter produzidos, por minuto, por miligrama de proteína.

4.6.3 Determinação da Atividade Enzimática das Colinesterases

A atividade das colinesterases foi determinada no extrato das cabeças isoladas, as quais foram homogeneizadas em 1mL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2, e centrifugadas a 3330 g, por 3 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido foi diluído no mesmo tampão na proporção de 1:40, sendo que a determinação da atividade enzimática seguiu o protocolo descrito por Ellman et al. (1961), adaptado para microplaca por Guilhermino et al. (1996). Os resultados foram expressos em nmol por minuto, por mg de proteína.

4.6.4 Determinação do Teor de Proteínas Solúveis Totais

A fim de quantificar as proteínas solubilizadas, foi utilizado o método de Bradford (1976), adaptado para microplaca. Os padrões foram preparados com γ - globulina, numa concentração de 1mg mL⁻¹.

4.7. AVALIAÇÃO DE HSP70 POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

Os fígados fixados (N = 5 por grupo experimental) foram processados para inclusão em parafina. Após 24h de fixação, estes órgãos foram, posteriormente, lavados em tampão fosfato de sódio (0,1M - pH 7,4) por duas horas. Em seguida, os fígados foram desidratados em soluções com concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 60%, 70%, 85%, 90%, 95%, 100%), à 4°C (1 hora em cada solução; SILVA-ZACARIN et al., 2012).

O material desidratado foi diafanizado em xilol e embebido em parafina líquida para posterior inclusão em parafina ultrapura (Paraplast). Secções histológicas de 6 μ m, obtidas em micrótomo (LEICA RM2255), foram estendidas sobre lâminas de vidro sialinizadas (Star Frost). Após secas, as lâminas contendo as secções histológicas em diferentes profundidades do órgão foram utilizadas para a imunomarcagem de HSP70. Foram confeccionadas 4 lâminas por indivíduo de cada grupo experimental, sendo 5 indivíduos por grupo.

Para análise de HSP70, as lâminas contendo as secções histológicas foram desparafinizadas em xilol 100%, xilol + etanol (1:1), etanol 100%, etanol 70%, etanol 50% e,

finalmente, água destilada para a reidratação do material. Em seguida, as lâminas com as secções histológicas foram submetidas à recuperação antigênica com tampão citrato de sódio, 1M, pH 6,0 por 40 minutos à 90°C. Após a recuperação antigênica as lâminas foram mantidas em tampão PBS (*phosphate buffered saline*, pH 7,4), em câmara úmida.

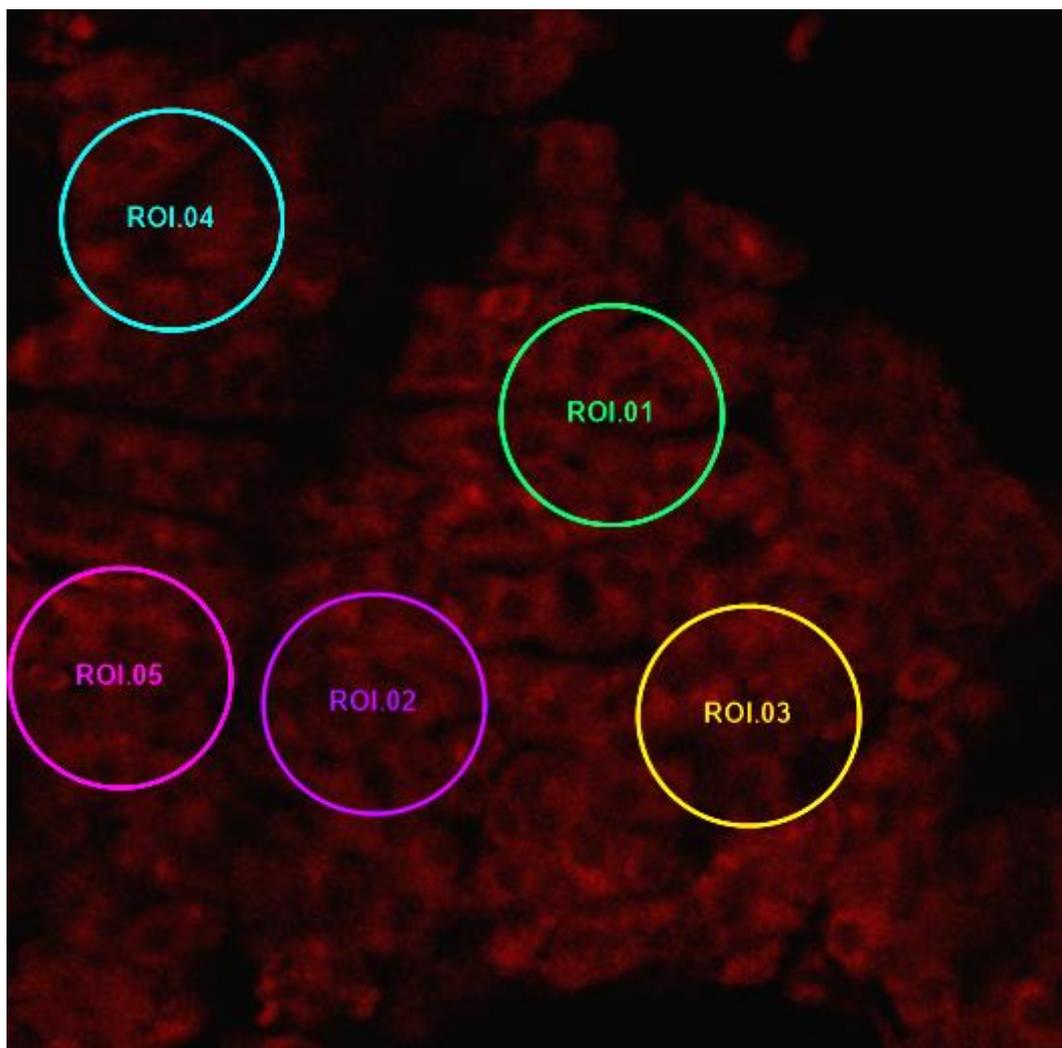
Em seguida, as lâminas contendo as secções histológicas foram permeabilizadas com Triton X-100 a 0.5% por 10min e, posteriormente, sítios inespecíficos foram inibidos com solução de albumina bovina a 3% por 30min. Após 3 lavagens em tampão PBS, as secções histológicas foram incubadas por 1 hora com o anticorpo primário monoclonal (anti-HSP70), com diluição de 1:100, na ausência de luz, a 37°C em câmara úmida.

Após a incubação no anticorpo primário, as secções histológicas foram lavadas 3 vezes em PBS, e foram posteriormente incubadas com o anticorpo secundário conjugado com Alexa 594, produzido em coelho, na diluição de 1:300, por 1 hora a temperatura ambiente, na ausência de luz em câmara úmida. Por fim, as secções histológicas foram lavadas 3 vezes em PBS, na ausência de luz em câmara úmida, e as lâminas foram montadas em meio aquoso específico (Dako) e mantidas a 4°C até o momento da análise.

A análise por imunofluorescência para detecção de HSP70 nas secções histológicas do fígado dos guarus foi realizada por meio de Microscopia Confocal de Varredura a Laser. A análise foi realizada utilizando o laser de diodo 552 nm (excitação 580 nm, emissão 650 nm) à 3% de intensidade, com 1.00 AU de abertura do pinhole (abertura do laser), ganho 800 (brilho) e offset -10% (fundo). As análises foram realizadas na objetiva de 40x e zoom óptico de 3x. A reconstrução tridimensional foi feita com espessura total de 5 µm, com espaçamento de 0,50 µm, totalizando 11 secções óticas (frames) em cada imagem 3D gerada na velocidade de 100 nm/s.

Foram avaliados 5 indivíduos de cada grupo experimental, sendo que para cada indivíduo foram analisados 5 campos, correspondentes às secções histológicas distintas, e para cada campo foram utilizadas 5 áreas circulares (ROIs = região de interesse) de aproximadamente 315 µm² cada uma (20 µm de largura e 20 µm de altura) para a quantificação da intensidade da imunofluorescência (Figura 12), totalizando 25 ROIs por indivíduo e conseqüentemente 125 ROIs por grupo experimental.

Figura 12 – Representação dos ROIs na quantificação da imunomarcção



Fonte: Elaboração própria

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises estatísticas dos resultados obtidos nos marcadores enzimáticos os dados foram transformados em raiz quadrada ou log. A homogeneidade e a normalidade foram testadas usando o método qqplot no software R e o teste de normalidade Shapiro-Wilk foi realizado no software GraphPad Prism 6. Após a realização desses procedimentos, foi realizado o teste ANOVA para comparar os grupos expostos, seguido do teste de multicomparação de Dunnet, a fim de comparar os grupos expostos ao grupo controle. Para os dados que não obtiveram homogeneidade de variâncias, verificado pelo teste de Bartlett, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de multicomparação de Dunn. Nível de significância adotado foi de 0,05.

Os dados obtidos na quantificação da marcação de imunofluorescência das proteínas da família HSP70, foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e ao teste de homogeneidade de variância (Bartlett) o que caracterizou os dados como não-paramétricos. Portanto, o teste estatístico utilizado foi o de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn para comparação entre o grupo controle e os grupos expostos aos fármacos.

Os programas utilizados para as análises estatísticas foram o R e o GraphPad Prism 6.

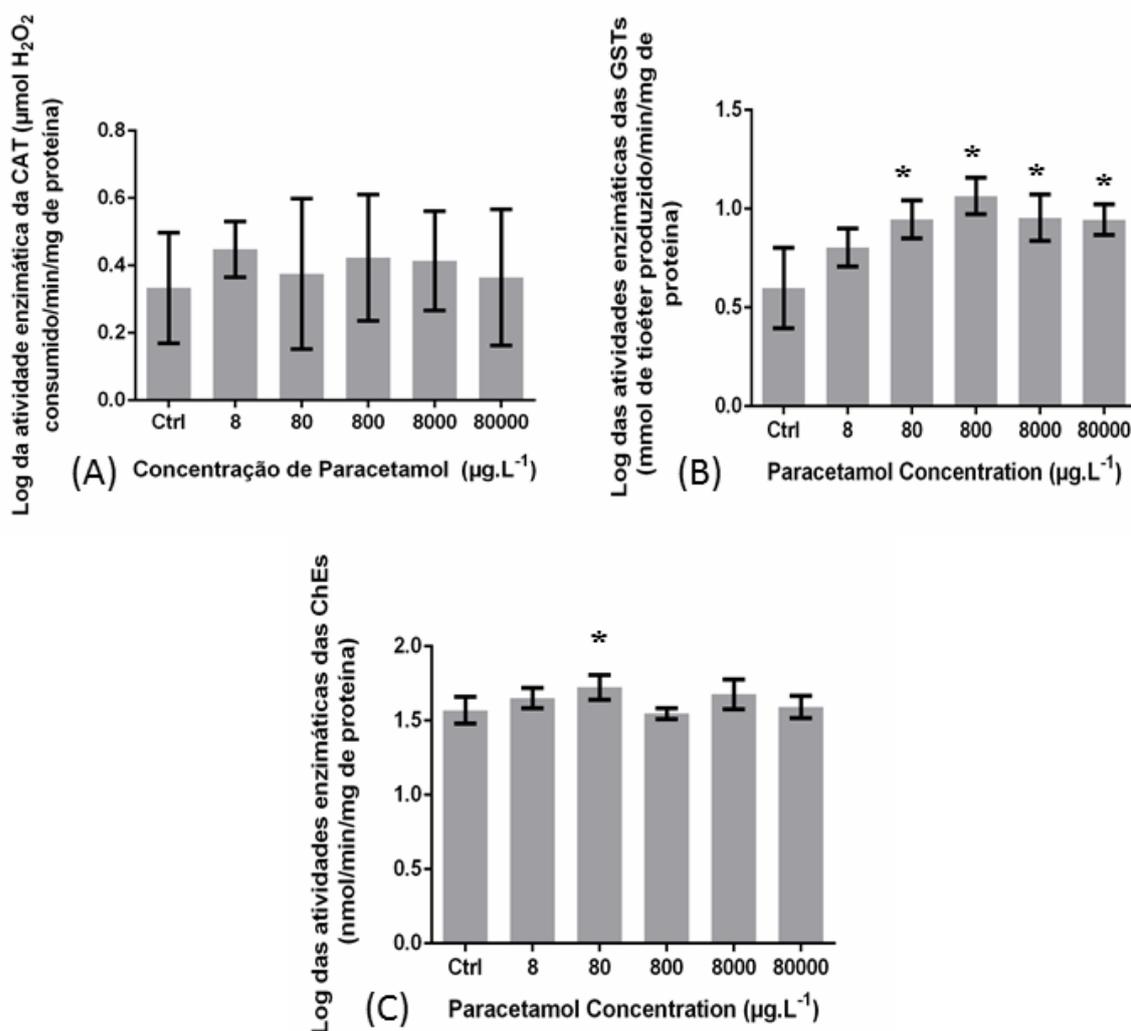
5 RESULTADOS

5.1 MARCADORES BIOQUÍMICOS

5.1.1 Exposição Aguda ao Paracetamol

A atividade enzimática da catalase (Figura 13 A) determinada em organismos expostos ao paracetamol não foi alterada significativamente ($F_{5, 50} = 0,4931$; $p = 0,7798$) em comparação com o tratamento controle. No que diz respeito à atividade das glutathiona-S-transferases (Figura 13 B), verificou-se um aumento significativo para os animais expostos às concentrações de 80, 800, 8000 e 80000 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($F_{5,60} = 34,72$; $p < 0,0001$). A atividade das colinesterases (Figura 13 C) teve um aumento significativo somente para os indivíduos expostos à concentração de 80 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($F_{5,60} = 25,94$; $p < 0,0001$) em relação aos do grupo controle.

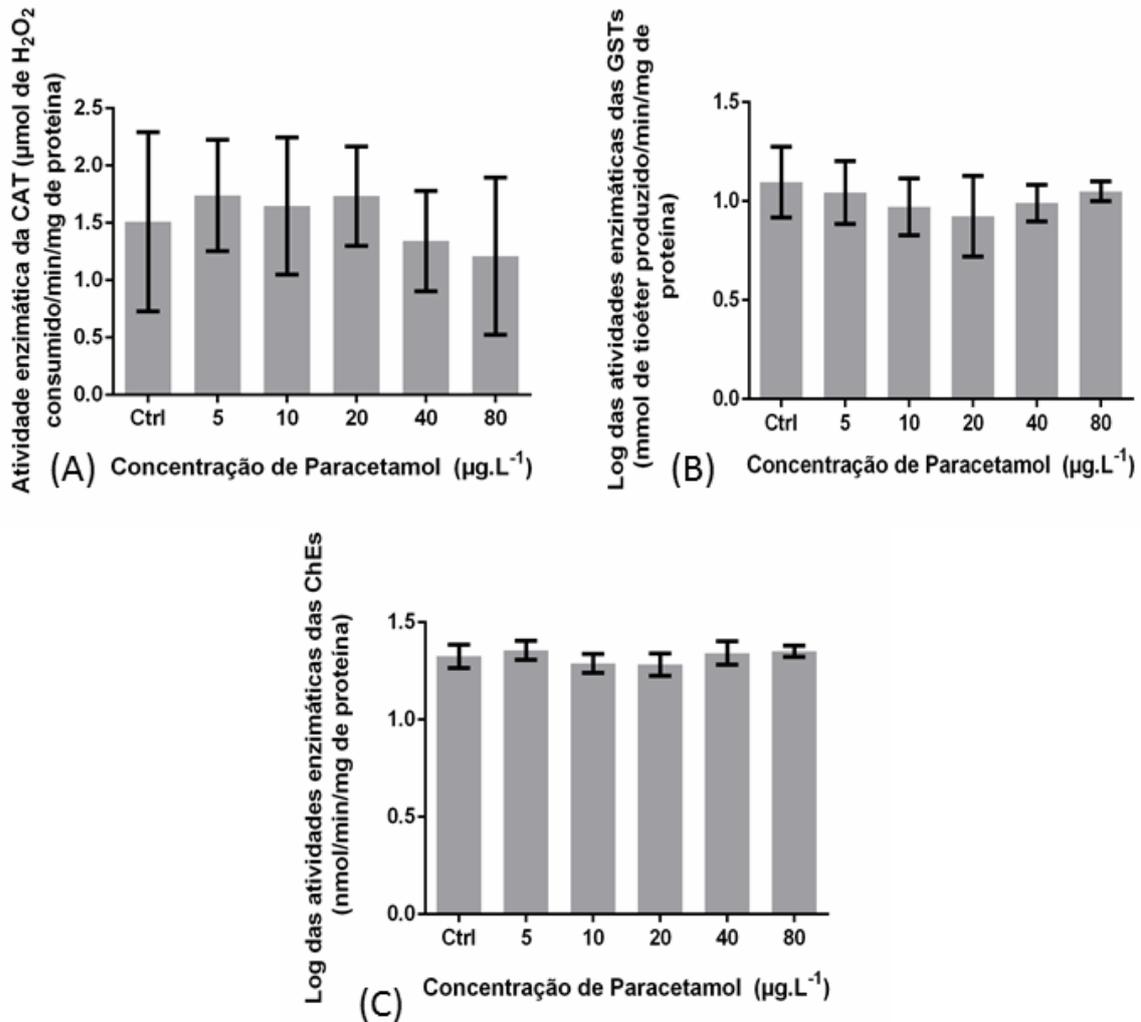
Figura 13 – Dados obtidos após a exposição aguda ao fármaco paracetamol. A) Resultados para a atividade enzimática da CAT no fígado. B) Resultados para a atividade enzimática das GSTs nas brânquias. C) Resultados para a atividade enzimática das ChEs na cabeça. Valores de média da atividade enzimática de 10 réplicas, com as respectivas barras de desvio padrão. Os * indicam diferença significativa em relação ao grupo controle, valor de p adotado $\leq 0,05$.



5.1.2 Exposição Crônica ao Paracetamol

Sob as condições experimentalmente adotadas, a atividade da enzima CAT (Figura 14 A) não sofreu alteração significativa após a exposição ($F_{5, 54} = 1,387$; $p = 0,2438$). A atividade enzimática das GSTs (Figura 14 B) também não foi significativamente alterada relativamente aos indivíduos do grupo controle ($F_{5, 60} = 6,347$; $p = 0,2739$). A atividade das colinesterases (Figura 14 C) dos organismos expostos não foi significativamente diferente entre os tratamentos ($F_{5, 54} = 3,652$; $p = 0,0064$).

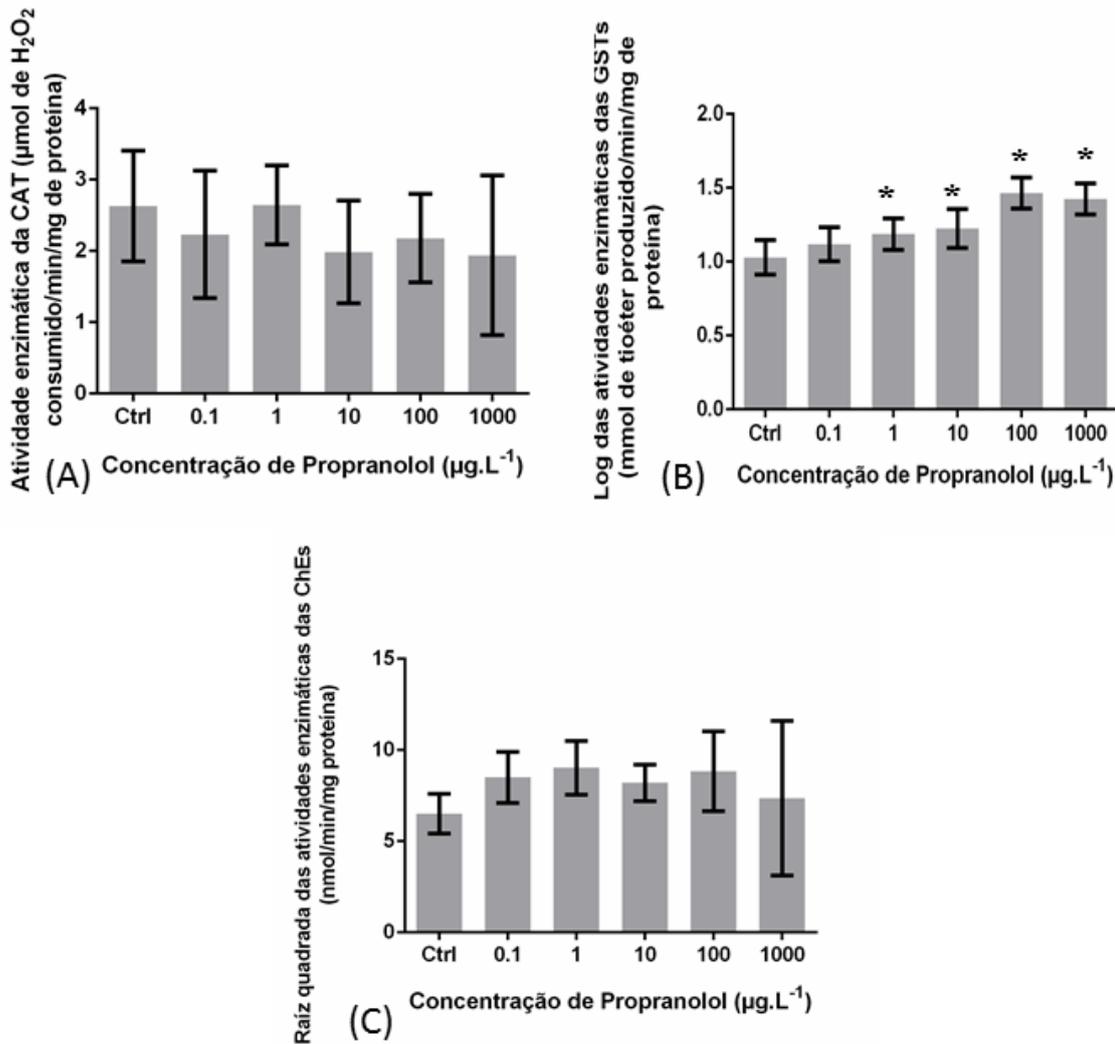
Figura 14 - Dados obtidos após a exposição crônica ao fármaco paracetamol. A) Resultados para a atividade enzimática da CAT. B) Resultados para a atividade enzimática das GSTs. C) Resultados para a atividade enzimática das ChEs. Valores de média da atividade enzimática de 10 réplicas, com as respectivas barras de desvio padrão. Os * indicam diferença significativa em relação ao grupo controle, valor de p adotado $\leq 0,05$



5.1.3 Exposição Aguda ao Propranolol

A atividade enzimática da catalase (Figura 15 A) não foi alterada significativamente nos grupos expostos em relação ao grupo controle ($F_{5, 54} = 1,460$; $p = 0,2181$). Já para a atividade enzimática das GSTs (Figura 15 B) verificou-se um aumento significativo em peixes expostos ao propranolol nas concentrações 1, 10, 100 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($F_{5, 54} = 22,55$; $p < 0,0001$). A atividade enzimática das colinesterases (Figura 15 C) determinada em organismos expostos ao propranolol não foi significativamente alterada ($F_{5, 54} = 1,91$; $p = 0,108$).

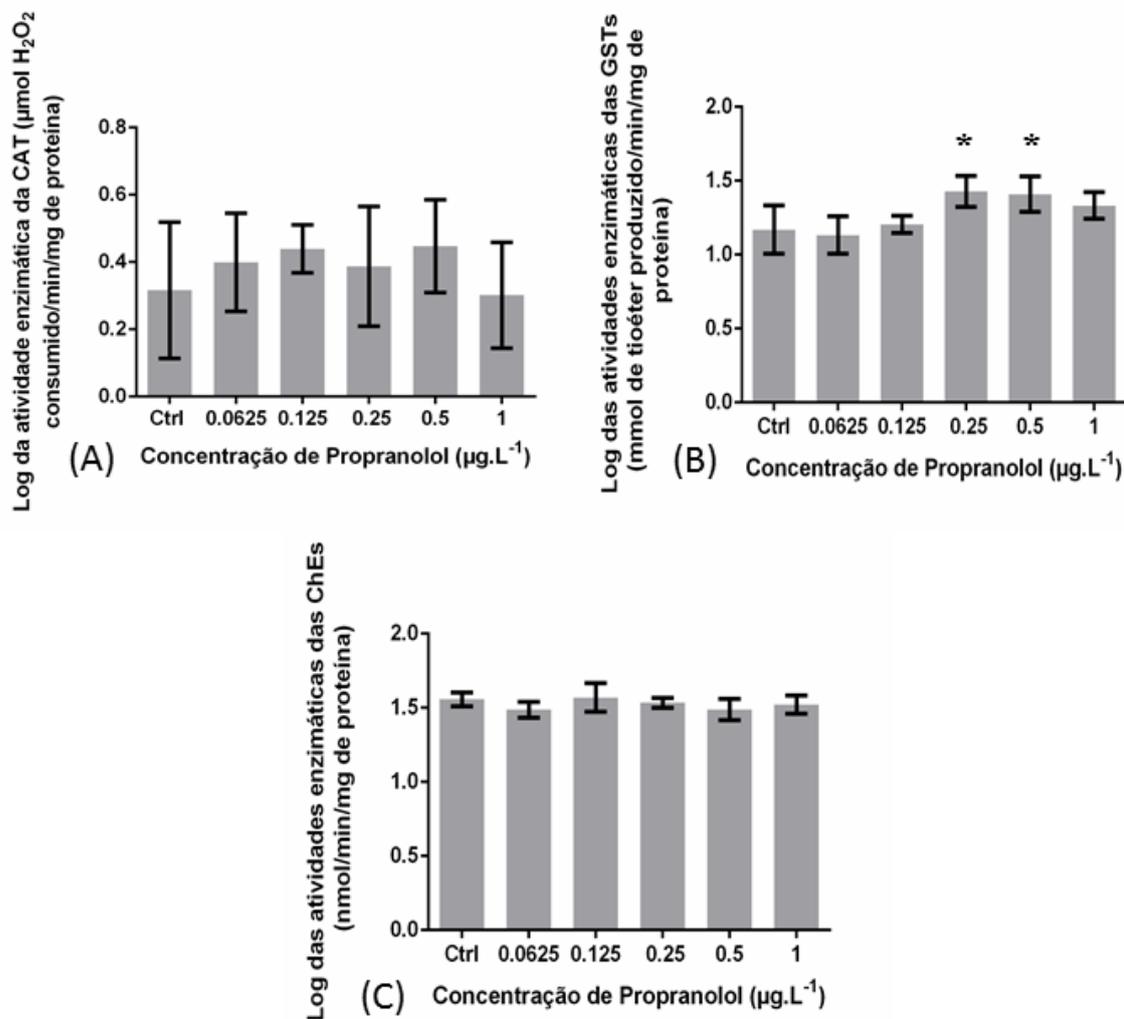
Figura 15 - Dados obtidos após a exposição aguda ao fármaco propranolol. A) Resultados para a atividade enzimática da CAT. B) Resultados para a atividade enzimática das GSTs. C) Resultados para a atividade enzimática das ChEs. Valores de média da atividade enzimática de 10 réplicas, com as respectivas barras de desvio padrão. Os * indicam diferença significativa em relação ao grupo controle, valor de p adotado $\leq 0,05$



5.1.4 Exposição Crônica ao Propranolol

A atividade enzimática da CAT (Figura 16 A) não foi alterada significativamente nos grupos expostos em relação ao grupo controle ($F_{5, 58} = 5,663$; $p = 0,3404$). A atividade das isoenzimas GSTs (Figura 16 B) foi aumentada para os organismos expostos às concentrações 0,25 e 0,50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de propranolol ($F_{5, 60} = 31,55$; $p < 0,0001$). E por fim, a atividade das colinesterases (Figura 16 C) determinada em organismos expostos ao propranolol não variou significativamente ($F_{5, 54} = 2,925$; $p = 0,0208$).

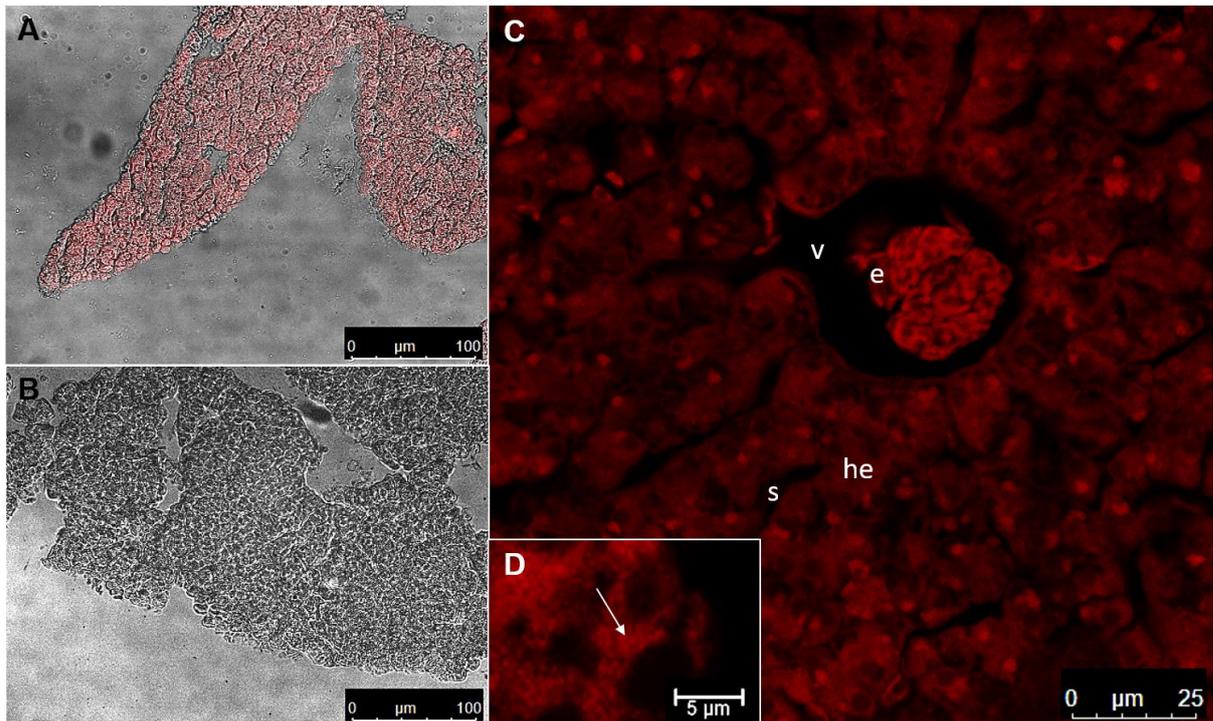
Figura 16 - Dados obtidos após a exposição crônica ao fármaco propranolol. A) Resultados para a atividade enzimática da CAT. B) Resultados para a atividade enzimática das GSTs. C) Resultados para a atividade enzimática das ChEs. Valores de média da atividade enzimática de 10 réplicas, com as respectivas barras de desvio padrão. Os * indicam diferença significativa em relação ao grupo controle, valor de p adotado $\leq 0,05$



5.2 AVALIAÇÃO DE HSP70 POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

A figura 17 evidencia a imunomarcagem de HSP70 no fígado do guaru. Nas secções histológicas dos fígados, foi realizado um controle negativo da reação, no qual não houve incubação com anticorpo primário (Figura 17 B); esse procedimento é importante para a comprovação de que a marcação do anticorpo secundário (indicada pela pseudo-cor vermelha) ocorre somente após a ligação do anticorpo primário (Figura 17 A). A imunofluorescência evidenciada no parênquima hepático (Figuras 17 C, D) indicou marcação positiva para HSP70 no citoplasma dos hepatócitos e, adicionalmente, nas células sanguíneas presentes nos vasos.

Figura 17 - Fígado de *P. harpagos*. Microscopia Confocal de Varredura a Laser. **A)** Imunomarcação de proteínas da família HSP70 indicada pela pseudo-cor vermelha. **B)** Controle negativo, com ausência do anticorpo primário (anti-HSP70). **C)** Visão geral do parênquima hepático evidenciando a imunofluorescência (pseudo-cor vermelha) nos hepatócitos (he) e nos eritrócitos (e), presentes nos vasos sanguíneos (v) e nos capilares sinusóides (s). **D)** Detalhe dos hepatócitos, mostrando a imunomarcação exclusivamente no citoplasma (seta).



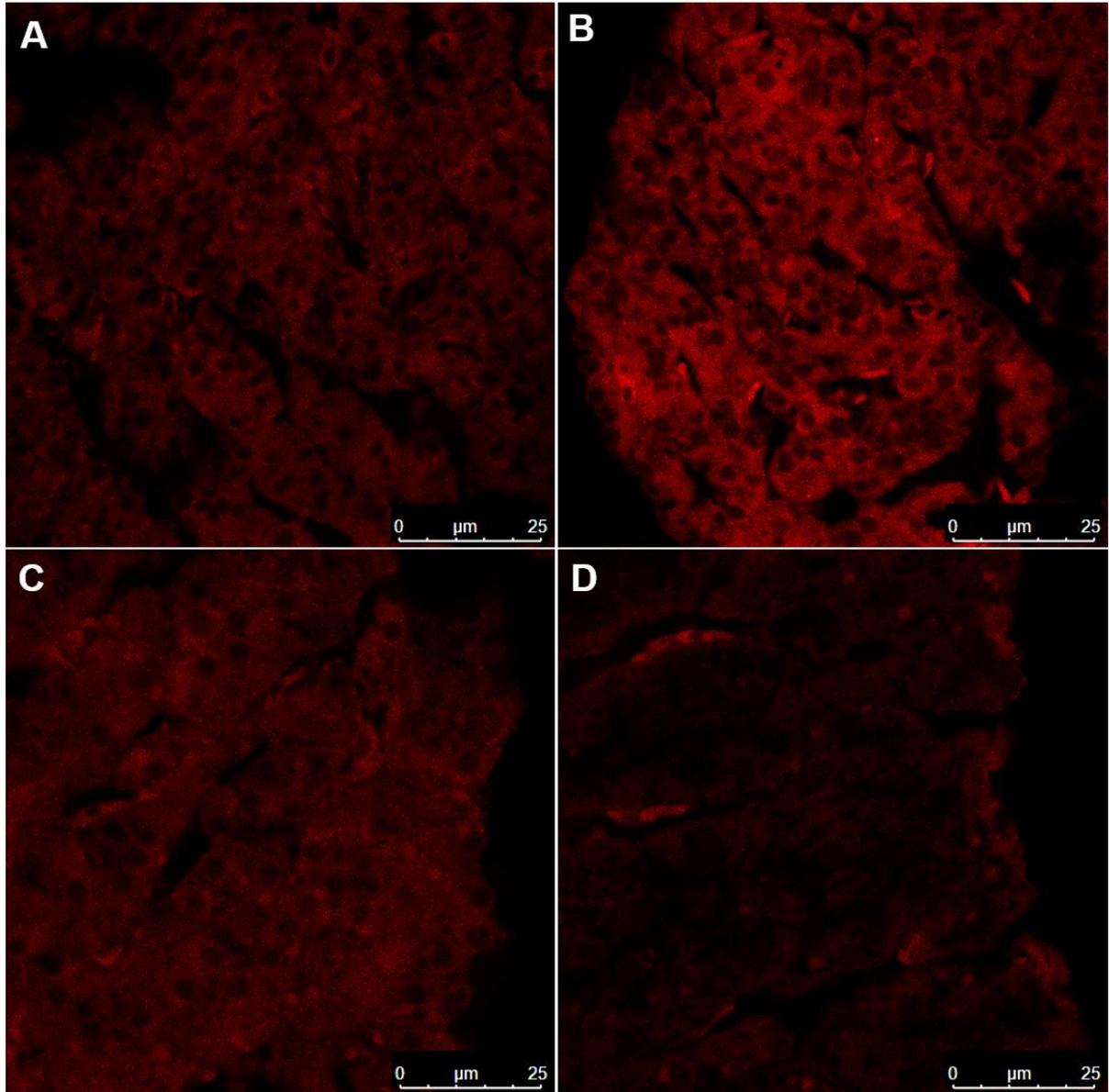
A figura 18 mostra a imunofluorescência indicativa da marcação positiva para HSP70 nos fígados dos peixes após exposição ao paracetamol, o qual evidencia a imunomarcação dos hepatócitos do *P. harpagos* no grupo controle (Figura 18 A e C) e nos grupos expostos (Figura 18 B e D). É possível notar que no ensaio agudo houve uma marcação mais evidente do grupo exposto a $8 \mu\text{g L}^{-1}$ em relação ao controle, corroborando com as análises estatísticas (Figura 20), bem como no ensaio crônico onde ocorreu uma visível diminuição da marcação do grupo exposto a $80 \mu\text{g L}^{-1}$ em relação ao controle.

A figura 19 mostra a imunofluorescência indicativa da marcação positiva para HSP70 nos fígados dos peixes após as exposições ao propranolol, o qual evidencia a imunomarcação dos hepatócitos do *P. harpagos* no grupo controle (Figura 19 A e C) e nos grupos expostos (Figura 19 B e D). Tanto na exposição aguda, quanto na exposição crônica, é possível notar o aumento da intensidade de imunomarcação dos grupos expostos em relação ao controle, em consonância com os resultados da análise estatística (Figura 20).

Para o ensaio de exposição aguda dos peixes ao paracetamol (Figura 20 A) a imunofluorescência indicativa de HSP70 no parênquima hepático teve um aumento significativo em todos os grupos expostos ao fármaco ($F_{5,750}=394,7$; $p<0,0001$), diferentemente do ensaio de exposição crônica ao paracetamol (Figura 20 B), no qual houve uma diminuição significativa desta imunofluorescência no fígado em todas as concentrações testadas ($F_{5,750}=353,3$; $p<0,0001$).

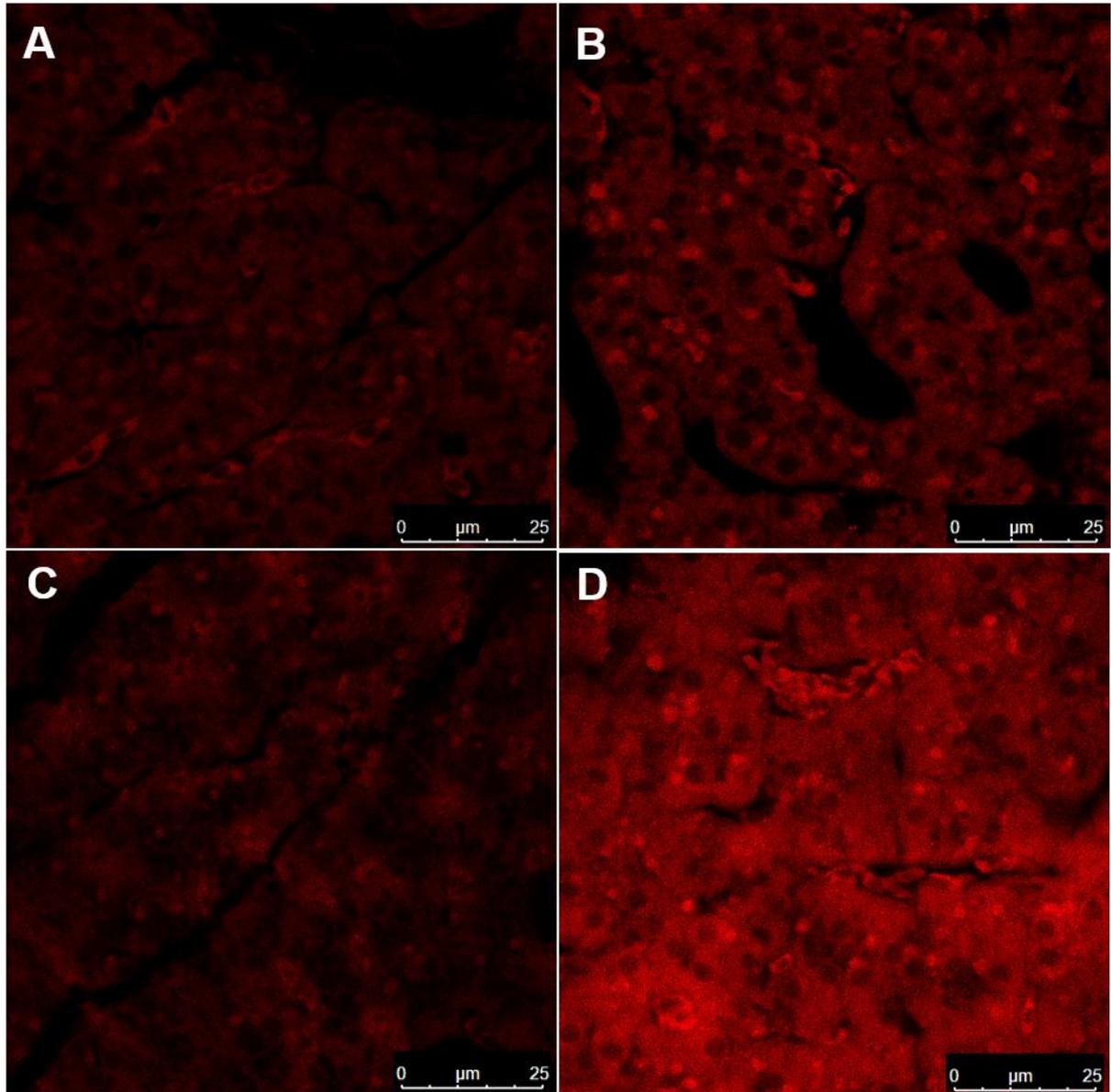
Já para as exposições ao propranolol, tanto a aguda quanto a crônica (Figura 20 C e D) apresentaram um aumento na imunofluorescência para a HSP70, sendo que na exposição aguda as concentrações com aumento significativo foram 1, 10 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($F_{5,750}=50,84$; $p<0,0001$) e, para o ensaio crônico, as concentrações que induziram o aumento significativo da imunofluorescência foram 0,0625; 0,125; 0,25 e 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($F_{5,750}=438,3$; $p<0,0001$).

Figura 18 - Fígado de *P. harpagos*. Exposição ao paracetamol. Imunofluorescência para marcação de HSP70 (pseudo-cor vermelha) e análise por Microscopia Confocal de Varredura a Laser. **A)** Exposição aguda ao paracetamol, Grupo Controle. **B)** Exposição aguda ao paracetamol, Grupo 8 $\mu\text{g L}^{-1}$. **C)** Exposição crônica ao paracetamol, Grupo Controle. **D)** Exposição crônica ao paracetamol. Grupo 80 $\mu\text{g L}^{-1}$.



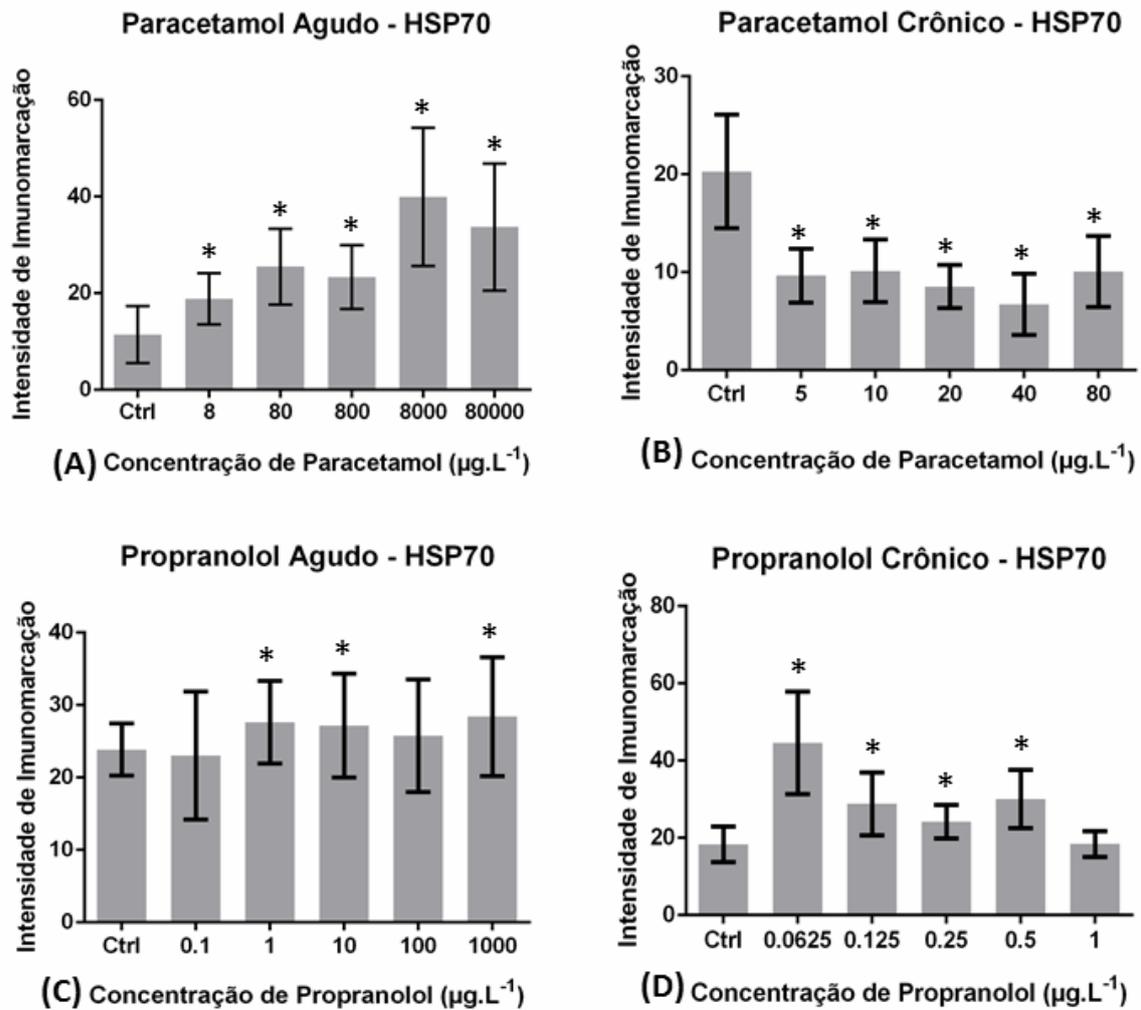
Fonte: Autoria própria

Figura 19 - Fígado de *P. harpagos*. Exposição ao propranolol. Imunofluorescência para marcação de HSP70 (pseudo-cor vermelha) e análise por Microscopia Confocal de Varredura a Laser. **A)** Exposição aguda ao propranolol, Grupo Controle. **B)** Exposição aguda ao propranolol, Grupo 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$. **C)** Exposição crônica ao propranolol, Grupo Controle. **D)** Exposição crônica ao propranolol. Grupo 0,0625 $\mu\text{g L}^{-1}$.



Fonte: Autoria própria

Figura 20 – Dados obtidos na quantificação da imunofluorescência (em pixel) indicativa da imunomarcagem positiva para as proteínas da família HSP70. Valores de média de intensidade de imunomarcagem dos ROIs (125 por grupo) de 5 réplicas, com as respectivas barras de desvio padrão. Os * indicam diferença significativa em relação ao grupo controle, valor de p adotado $\leq 0,05$.



6 DISCUSSÃO

6.1 PARACETAMOL

O metabolismo do paracetamol compreende em duas vias principais, sendo a primeira delas a conjugação com ácido glucurônico e sulfato, formando metabólitos não tóxicos (XU et al. 2008). Outra via é a metabolização pelas enzimas do sistema CYP450, o que gera o metabólito tóxico NAPQI. Em sobredosagem este fármaco pode exercer efeitos hepatotóxicos, pois as duas vias de conjugação iniciais (ácido glucurônico e sulfato) são saturadas e o paracetamol restante é bioativado pelo sistema de oxidação microsomal hepático; ocorre assim a hiperprodução do metabólito tóxico NAPQI, que é formado e acumulado em altas concentrações nas células hepáticas. A toxicidade deste composto é favorecida devido ao esgotamento de co-fatores críticos, como a glutatona em sua forma reduzida, que é habitualmente utilizada pela célula para conjugar o NAPQI, que fica na sua forma livre de modo a exercer toxicidade (KLOPČIČ et al., 2015). Isso pode resultar em estresse oxidativo, que pode ser compensado por uma série de mecanismos de defesa, incluindo o aumento da expressão de enzimas antioxidantes (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

No presente trabalho, tanto nas exposições agudas quanto nas exposições crônicas, a atividade da CAT não foi alterada. Entretanto, estudos anteriores têm demonstrado a ocorrência de efeitos pró-oxidativos após exposição a paracetamol. Nestes estudos, as atividades das enzimas SOD e CAT, envolvidas na resposta antioxidante, foram significativamente aumentadas após exposição aguda ao paracetamol (dose de 500 mg/kg durante 24h) na espécie de peixe *Oreochromis mossambicus* (KAVITHA et al., 2011). A SOD é uma enzima que catalisa a transformação de radicais superóxido, formados durante o metabolismo de muitos xenobióticos, em H_2O_2 (BARBOSA et al., 2010), enquanto que a CAT atua posteriormente ao degradar o H_2O_2 formado após a dismutação do radical superóxido em H_2O e O_2 (AEBI, 1984). Assim, este aumento de ambas as enzimas evidencia uma tentativa da parte do organismo de compensar o excesso de EROS pelo aumento da expressão de componentes da sua defesa antioxidante enzimática. No entanto, as consequências desses efeitos pro-oxidantes podem ter efeitos paradoxais. O paracetamol pode causar redução na atividade enzimática da CAT em carpas (*Cyprinus carpio*) expostas de forma aguda (96h) na concentração de $100 \mu g L^{-1}$ ao paracetamol, como sugerido por Nava-Álvarez et al. (2014), pois os metabólitos reativos ou EROS formados durante o metabolismo

deste composto podem causar danos diretos às enzimas, oxidando-as e alterando a sua conformação, fazendo com que percam sua atividade enzimática. De igual forma, exposições mais prolongadas a paracetamol, mas a doses mais reduzidas podem também culminar em efeitos pro-oxidantes, tal como os resultados obtidos por Guiloski et al. (2017) mostraram que, após uma exposição crônica de 21 dias ao paracetamol nas concentrações de 0,25 e 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, a espécie de peixe *Rhamdia quelen* sofreu aumento na atividade de SOD, uma resposta claramente relacionada à estresse oxidativo.

Considerando a ausência de alterações na atividade da CAT após as exposições crônicas e agudas ao paracetamol, é possível sugerir que apesar de um organismo estar realizando a metabolização do paracetamol, com potencial produção de NAPQI, se em sobredosagem, a via da CAT pode não ter sido ativada. Neste caso, é possível que o aumento da atividade de outras enzimas que fazem parte do sistema antioxidante, como as enzimas de conjugação GSTs, possam ter sido suficientes para fazer face ao NAPQI formado, no sentido da sua conjugação e posterior eliminação. O aumento das GSTs em resposta à exposição ao paracetamol foi evidenciado em diversos estudos (NUNES et al., 2014a; RAMOS et al., 2014; NUNES et al., 2015). O trabalho conduzido por Ramos et al. (2014), demonstrou que após exposições agudas e crônicas ao paracetamol houve um aumento significativo da atividade enzimática das GSTs no fígado de peixes *Oncorhynchus mykiss*, bem como um aumento da atividade da GPx, enzima responsável por conjugar a GSH com H_2O_2 ; o mesmo se passou com a atividade da Gred, enzima responsável por reduzir a GSSG em GSH, e CAT corroborando com o cenário oxidativo do estudo em questão (RAMOS et al., 2014).

Outras vias estão relacionadas também na defesa antioxidante, como o caso da glutationa na sua forma reduzida, pois pode ser oxidada com formação do seu dímero (GSSG) e simultânea neutralização de espécies reativas eletrofílicas (FANG et al., 2002). Este padrão foi observado no estudo de Bebianno et al. (2017) com *Crassostrea gigas* expostos em ensaios agudos ao paracetamol nas concentrações de 1 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$; neste estudo foi observada uma diminuição da GSH intracelular que, apesar de não ter sido determinada no presente estudo, não é de se excluir essa possibilidade. A ausência de resposta em termos de atividade da CAT após exposição a paracetamol pode ocorrer devido ao envolvimento de outras vias de desintoxicação de EROS. De fato, como descrito por Solé et al. (2009), mexilhões marinhos (*Mytilus galloprovincialis*) expostos a paracetamol, no período de 10 dias, nas concentrações de 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$, não demonstraram resposta relacionada ao aumento de atividade de CAT, apesar da ocorrência de estresse oxidativo, indicado por

alterações na peroxidação lipídica (LPO). Este resultado foi justificado pelos autores como sendo um sinal do efeito protetor da SOD, que fez com que a ação da CAT fosse redundante.

Esse resultado não é de todo incomum, levando-se em conta que o metabolismo e a toxicidade do paracetamol possuem vias evolutivamente conservadas, com possíveis diferenças diminutas entre espécies, incluindo peixes (RAMOS et al., 2014, NUNES et al., 2015), crustáceos (NUNES et al., 2014a; OLIVEIRA et al., 2015), moluscos (BRANDÃO et al., 2011; ANTUNES et al., 2013; CORREIA et al., 2016; NUNES et al., 2017) e até mesmo plantas (NUNES et al., 2014b). Independentemente de qual espécie está sob análise, o estresse oxidativo é aparentemente o efeito mais comum como resultado da exposição ao paracetamol, incluindo a participação de múltiplos mecanismos, os quais podem ou não agir simultaneamente e de forma antagônica. Em plantas aquáticas, por exemplo das espécies *Lemna minor* e *Lemna gibba*, os autores Nunes et al. (2014b) observaram uma maior resistência à danos causados por exposição ao paracetamol de uma espécie em relação a outra, enquanto a *L. minor* evidenciou um aumento na peroxidação lipídica e uma diminuição do número de frondes, a espécie *L. gibba* apresentou uma diminuição do teor em prolina, um aminoácido importante na fisiologia da planta, incluindo regulação do estresse oxidativo. Neste exemplo é possível notar que as respostas em relação à exposição ao fármaco pode ser espécie específicas.

Tal como referido acima, as alterações da atividade das GSTs nas brânquias podem indicar uma resposta ao estresse oxidativo, uma vez que a função das GSTs é catalisar a conjugação de xenobióticos (incluindo espécies de oxigênio reativas e peróxidos; NUNES et al., 2015) com o co-fator GSH (HABIG et al., 1974). Por outro lado, este fenômeno de conjugação permite aumentar a hidrossolubilidade de xenobióticos eletrofílicos, favorecendo a sua excreção. Estes são mecanismos de defesa *in vivo* efetivos, que não só garantem a excreção de substâncias nucleofílicas, mas também favorecem a redução do estresse oxidativo. Ao serem mais rapidamente excretados dos organismos, muitos xenobióticos tornam-se menos tóxicos para o organismo (RAMOS et al. 2014; NUNES et al., 2014a). Este é o processo preferencial descrito para a eliminação do metabolito altamente reativo e oxidante NAPQI, que resulta do metabolismo habitual do paracetamol e que é responsável pelos seus efeitos oxidativos. Os resultados obtidos no presente estudo mostram aumento significativo na atividade de GSTs em animais submetidos à exposição aguda nas maiores concentrações de paracetamol. Resultados similares foram obtidos para as espécies *Dreissena polymorpha* (ensaio de 96 h, com concentrações de 1, 5 e 10 nM de paracetamol), *Oncorhynchus mykiss* (ensaio de 96h, com concentrações de 0,05, 0,5 e 5 mg L⁻¹ de

paracetamol) e *Anguilla anguilla* (ensaio de 96h, com concentrações de 5, 25, 125, 625, 3125 $\mu\text{g L}^{-1}$ de paracetamol) após exposição aguda ao paracetamol concentrações similares às utilizadas no presente trabalho (PAROLINI et al., 2010; RAMOS et al., 2014; NUNES et al., 2015). Considerando o papel central das GSTs no metabolismo da fase II para a conjugação de xenobióticos com GSH, que é fundamental para a eliminação do NAPQI (ver figura 2), os resultados deste trabalho mostraram um maior esforço do organismo para eliminar esse composto. Assim, este aumento da atividade das GSTs pode de fato significar uma tentativa da parte do organismo de diminuir a presença deste composto no organismo, limitando consequentemente a sua toxicidade, incluindo a decorrente dos seus efeitos oxidantes. No entanto, isso pode ser também uma evidência indireta do estabelecimento de modificações pró-oxidativas. O conjunto de resultados aqui obtidos mostra que a ativação da via de conjugação com GSH, de forma semelhante à descrita para outras espécies, ocorre muito prontamente e é altamente responsiva à exposição aguda ao paracetamol.

Os dados referentes à exposição crônica ao paracetamol indicaram que no peixe *P. harpagos* não foi observada nenhuma alteração significativa em termos de atividade das GSTs. Assim, é necessário sugerir a ativação de mecanismos bioquímicos alternativos que expliquem a ausência da ativação destas isoenzimas. Nem sempre se verifica este padrão de aparente falta de responsividade na ativação das isoenzimas GSTs após exposição a paracetamol. Moluscos da espécie de ameijoas de água doce *Corbicula fluminea*, cronicamente (28d) expostos ao paracetamol nas concentrações de 3,88, 7,74, 15,49, 30,98, 61,95 $\mu\text{g L}^{-1}$, apresentaram um decréscimo na atividade das enzimas GSTs, que segundo Brandão et al. (2011), pode ser indicativo de toxicidade do paracetamol para o organismo. No entanto, a falta de alterações nesta via, não indica por si só que não houve resposta nas brânquias do *P. harpagos* após a exposição crônica ao paracetamol, uma vez que outras vias podem estar envolvidas. Peixes da espécie *O. mykiss* quando expostos cronicamente ao paracetamol evidenciaram um aumento dessas enzimas, tanto nas brânquias quanto nos fígados, indicando que a toxicidade foi acompanhada por um aumento da atividade de conjugação por essa via, a fim de eliminar o composto do organismo. Adicionalmente, o mesmo estudo mostra o aumento das enzimas CAT, GPx e Gred e dos níveis de TBARS, que apontam para o estabelecimento de um cenário oxidativo (RAMOS et al., 2014).

A imunomarcação para o ensaio agudo do paracetamol indicou um aumento significativo das proteínas da família HSP70 nos hepatócitos do *P. harpagos* para todos os grupos expostos. Como supracitado, o metabolismo do paracetamol pode gerar NAPQI. Este composto, quando em excesso na célula, pode causar a modificação por via oxidativa de

proteínas celulares (XU et al., 2008) e, neste caso, o aumento de proteínas danificadas (estrutura tridimensional alterada) ativaria o mecanismo de transcrição de HSP70 e síntese *de novo* destas chaperonas, a fim de proteger as células deste efeito tóxico (IWAMA et al., 1998; CASTRO et al., 2014). Um dos efeitos das EROS na célula é, justamente a reatividade com proteínas celulares (SCHEIMEIR et al. 2005), com alteração da sua conformação. O paracetamol é um composto que pode gerar estresse oxidativo nas células (BRANDÃO et al., 2011; NUNES et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2015), causando oxidação dos grupos tiólicos proteicos, o que poderá requerer a estimulação da produção de HSPs. Este aumento pode ser assim indicativo da ocorrência de danos às proteínas celulares. Estes efeitos explicariam o aumento da marcação das HSP70 nos hepatócitos em resposta ao estresse químico e oxidativo após a exposição aguda ao paracetamol. De acordo com o estudo com ratos *knockout* para os genes da HSP70 expostos ao paracetamol, foi observado um efeito de proteção celular exercido pela proteína HSP70 em resposta aos danos causados após à exposição ao paracetamol (TOLSON et al., 2006). A via de ativação de HSP70 nos eucariontes é evolutivamente conservada, onde proteínas parcialmente desnaturadas ou com alterações na sua conformação tridimensional ativam a resposta UPR (*Unfolded Protein Response*) que, por sua vez, levam ao aumento do nível de transcrição dos genes HSPs pelos fatores de transcrição específicos (FUJIMOTO e NAKAI, 2010; GARBUZ, 2017), tais como HSF1, via ativação redox-dependente (AHN e THIELE, 2003), conduzindo ao aumento intracelular da quantidade de proteínas HSP70 nos compartimentos celulares. Knockaert et al. (2011) construíram um plasmídeo contendo o cDNA da CYP2E1 mitocondrial de rato e transfectaram vetores de expressão gênica de mamíferos (linhagem de células pShooter pEF/myc/mito, e pEF/myc/cyto) para avaliar a metabolização do paracetamol *in vitro*, sendo que os resultados indicaram que a metabolização do paracetamol pela CYP2E1 mitocondrial resultou na produção de EROS, bem como no esgotamento da GSH, com o aumento da expressão de HSP70 mitocondrial e citotoxicidade. Considerando que o aumento na quantidade intracelular de proteínas HSP70 após à exposição ao paracetamol é uma resposta frequente em vertebrados (SUMIOKA et al., 2004; KNOCKAERT et al., 2011; GUILOSKI et al., 2017), e sendo os genes da família HSP70 evolutivamente conservados (RICHTER et al., 2010; DEMEKE; TASSEW, 2016), é possível sugerir que esta mesma resposta tenha ocorrido nos indivíduos de *P. harpagos* expostos no nosso trabalho.

Entretanto, para a exposição crônica ao paracetamol houve uma diminuição significativa na marcação da HSP70 nos hepatócitos dos peixes expostos ao fármaco. Isso pode ter acontecido devido a danos causados nos hepatócitos, que podem ter interferido de

forma indireta na expressão gênica dos membros induzíveis da família HSP70. Isso pode ter acontecido devido a citotoxicidade do fármaco para os hepatócitos após exposição crônica, afetando a síntese *de novo* dos membros induzíveis da família HSP70. Alterações na histologia do fígado de peixes *Danio rerio*, expostos cronicamente ao paracetamol em concentrações 0,5 e 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$, indicaram uma perda citoplasmática e vacuolização dos hepatócitos (GALUS et al., 2013), que são características de morte celular. No presente estudo, a menor concentração de paracetamol utilizada no bioensaio de exposição crônica (5 $\mu\text{g.L}^{-1}$) está nesta faixa avaliada para os peixes *D. rerio*. Como já dito anteriormente, a exposição crônica ao paracetamol resultou em estresse oxidativo, evidenciado por peroxidação lipídica em *Oncorhynchus mykiss* (RAMOS et al., 2014). Quando há acúmulo de proteínas com alterações conformacionais nas células, foi descrito anteriormente que pode ocorrer o aumento das proteínas HSP70, entretanto, quando o dano celular é muito grande pode ocorrer uma exaustão das proteínas chaperonas inicialmente induzidas (exposição aguda) e ausência de síntese *de novo* com a continuidade da exposição, e consequente diminuição da sua quantidade nas células sofrendo danos. Neste caso, proteínas chaperonas existentes podem não ser suficientes para suprir a necessidade celular, tal cenário pode ocorrer em caso de citotoxicidade (SÕTI et al., 2003).

Quanto ao biomarcador de neurotoxicidade, a atividade da enzima colinesterase, foi possível observar um aumento significativo, mas somente após exposição aguda ao paracetamol, e na concentração de 80 $\mu\text{g L}^{-1}$. Estes dados mostram que o paracetamol pode de fato interferir no processo neurológico de *P. harpagos* sob as condições de teste adotadas. No entanto, este não é um resultado comum, uma vez que o critério do efeito toxicológico é geralmente a inibição das colinesterases, em vez de seu aumento. Muitos estudos mostraram que o paracetamol pode inibir formas colinesterásicas em organismos aquáticos. Solé et al. (2009) demonstraram que a atividade de ChE medida em brânquias diminuiu em mexilhões após a exposição ao paracetamol. Resultados semelhantes (redução de ChE) foram obtidos por Nunes et al. (2015) após exposição aguda do peixe *A. anguilla* ao paracetamol, tendo os autores sugerido uma relação entre estresse oxidativo e neurotoxicidade, considerando que a atividade das colinesterases pode ser alterada devido à interferência de EROS diretamente na enzima, com oxidação desta (DELWING-DE LIMA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2015). Pelo contrário, o efeito de indução aqui observado pode resultar de uma interferência por colinesterases séricas não específicas, cuja atividade pode ser aumentada após exposição aguda ao paracetamol. O método de Ellman (1961) não é totalmente específico para a determinação da atividade da acetilcolinesterase, e a contribuição de outras formas

colinesterásicas também pode ocorrer (NUNES, 2011). O procedimento experimental adotado no presente estudo incluiu a homogeneização da cabeça total de *P. harpagos*, principalmente composta por tecido nervoso, que é extremamente irrigado e que pode conter elevadas quantidades de colinesterases séricas inespecíficas, que têm o potencial de interferir na determinação, sobre-estimando o resultado final. Por outro lado, o aumento da atividade das colinesterases séricas pode ocorrer devido ao dano tecidual e ao conseqüente processo inflamatório, uma vez que a molécula ACh também pode atuar como uma molécula anti-inflamatória (DAS, 2007). Foi identificado aumento na atividade da colinesterase por Silva et al. (2017) ao realizar exposição de aves (*Coturnix coturnix*) a aflotoxinas, anteriormente descritas como causadoras de danos ao tecido do fígado devido ao seu metabolismo.

Sob exposição crônica, a atividade da ChE não teve alterações significativas, não demonstrando neurotoxicidade para as condições testadas. No entanto, o paracetamol é um composto que possui potencial atividade anticolinesterásica, por efeito oxidativo direto na enzima que leva a sua desnaturação, uma vez que resultados da literatura apontam para um efeito inibitório desta enzima, a partir do estresse oxidativo que ele provoca (DELWING-DE LIMA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2015; NUNES et al., 2015). Os ensaios crônicos foram realizados com concentrações baixas do fármaco que podem não ter sido suficientes para atingir o nível de estresse oxidativo que seria necessário para a inibição da atividade da ChE. Este resultado é suportado pela falta de alterações da atividade enzimática da CAT e das GSTs que são indicativas de estresse oxidativo.

Um fator importante a ter em consideração reside na questão da relevância ecológica dos dados aqui obtidos. A menor concentração que causou alterações significativas nas atividades de ambas as enzimas (GSTs e ChEs) foi de 80 $\mu\text{g L}^{-1}$, enquanto que a menor concentração que foi capaz de induzir alterações no teor de HSP70 foi de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$. Essas concentrações são comparáveis ou da mesma ordem de grandeza às já encontradas na natureza. De acordo com o estudo de Américo et al. (2012; Tabela 1), foram reportados níveis de paracetamol de 130 $\mu\text{g L}^{-1}$ em águas de superfície. As concentrações aqui utilizadas são, portanto, consideradas ambientalmente relevantes. Por outro lado, no ambiente os compostos farmacêuticos (incluindo o paracetamol) se encontram associados a outros contaminantes, incluindo outros fármacos que atuam através da mesma via farmacológica e toxicológica (DAUGHTON e TERNES, 1999; FAWEL e ONG, 2012) o que pode potencializar esses efeitos. Portanto, organismos expostos por via ambiental poderão estar continuamente sob a ação tóxica destes compostos. Os fármacos são, em geral, considerados pseudopersistentes, com entrada contínua no ambiente aquático (EBELE et al., 2017), que iguala a capacidade

que o ambiente possui de os degradar, fazendo com que os organismos aquáticos estejam continuamente expostos a níveis relativamente elevados destes compostos.

6.2 PROPRANOLOL

Os organismos-teste, após exposição tanto aguda como crônica ao propranolol, não evidenciaram alterações significativas em relação à atividade da CAT. Em um estudo com mexilhões marinhos (*M. galloprovincialis*) expostos ao propranolol, Solé et al. (2009) não observaram alterações na atividade de CAT, tendo os autores sugerido que o propranolol não seja metabolizado por intermédio do citocromo P450, via metabólica que geralmente é responsável pela produção de espécies reativas de oxigênio (BUHLER e WILLIAMS, 1988). No entanto, esse mesmo estudo relatou um aumento de LPO em brânquias na maior concentração testada (200 µg L⁻¹), indicando danos celulares, sugerindo a ocorrência de alterações de base oxidativas. Os resultados obtidos por Steinbach et al. (2014) também mostraram a ausência de efeitos em termos de atividade da CAT após a exposição da truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) ao β-bloqueador atenolol. Os autores sugeriram que a atividade da CAT não foi alterada, provavelmente devido à ausência de metabolismo oxidativo desta substância, pois também não foram observados efeitos nem em termos de conteúdo total nem na atividade das isoformas do citocromo p450. No entanto, Ding et al. (2015) demonstraram a capacidade de resposta da carpa *Carassius auratus* em relação ao propranolol; esta substância foi metabolizada pelo citocromo p450, com o envolvimento da enzima etoxiresorufina-O-deetilase (EROD; CYP1A1). Além disso, a atividade de SOD também foi aumentada, sugerindo a ocorrência de alterações pro-oxidativas (DING et al., 2015). A expressão gênica para as enzimas do sistema antioxidante (CAT, SOD e GPx) foi aumentada no peixe *Danio rerio* após a exposição ao propranolol, indicando assim, uma resposta do organismo a maior produção de EROS, o que levaria a uma minimização do efeito tóxico (SUN et al. 2015). Este estudo demonstra que o metabolismo do propranolol em espécies sensíveis pode acarretar a ativação da defesa antioxidante. Assim, é possível sugerir que o metabolismo oxidativo do propranolol (e provavelmente dos β-bloqueadores em geral) é específico da espécie e pode terminar no estabelecimento de condições pró-oxidativas apenas em espécies sensíveis. Particularmente, no caso do presente trabalho, e a partir dos dados relativos à enzima CAT, é possível observar que não ocorreu a ativação da via de desintoxicação do H₂O₂ no fígado do *P. harpagos*, o que é indicativo da ausência de estresse oxidativo.

Apesar de poucos estudos metabólicos mostrarem o destino deste composto em peixes, é possível estabelecer algum paralelismo com o metabolismo humano. De fato, o metabolismo do propranolol em seres humanos pode ocorrer por três vias hepáticas diferentes (YOSHIMOTO et al, 1995), como a glucoronidação direta, que resulta em glucuronido de propranolol como metabólito; hidroxilação de anel, formando hidroxipropranolol, que pode ser, por sua vez, conjugado com ácido glucurônico e sulfato; e a terceira via corresponde à N-desalquilação, seguida da oxidação da cadeia lateral, que resulta em ácido naftiloxiláctico (YOSHIMOTO et al., 1995; MEHVAR e BROCK, 2001). Um processo semelhante parece ocorrer na carpa *C. auratus* (DING et al., 2015).

Os dados aqui obtidos permitiram observar um aumento significativo da atividade das GSTs após a exposição aguda ao propranolol, nomeadamente para as maiores concentrações (1, 10, 100, 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$). De igual forma, os dados do ensaio crônico permitiram concluir que a atividade enzimática das GSTs aumentou em organismos expostos às concentrações mais elevadas (0,25 e 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$). Estes resultados podem sugerir que o propranolol é metabolizado através da via de conjugação com a GSH, com o envolvimento de GSTs. O estudo já mencionado realizado por Solé et al (2009) mostrou que o propranolol era responsável pelo aumento das atividades de GSTs nas brânquias de *M. galloprovincialis*. A exposição a propranolol também mostrou ser causadora da atividade aumentada de GSTs em *Daphnia magna*, combinada com maior atividade de glutathione peroxidase (GPx), que é uma enzima antioxidante. Este conjunto de dados permitiu aos autores identificar essas alterações como indicadores de estresse oxidativo (OLIVEIRA et al., 2015). No entanto, não é possível afirmar que um cenário claro de estresse oxidativo se tenha verificado no presente estudo. Assim, podemos sugerir que o metabolismo do propranolol foi realizado pela via das GSTs, sendo conjugado com a GSH, se tornando mais hidrossolúvel e mais fácil de ser eliminado do organismo.

As brânquias são um dos primeiros órgãos através do qual o xenobiótico pode entrar no organismo, sendo assim uma importante via de eliminação deste composto, tal como referido anteriormente. Um estudo que evidencia essa afirmativa é o de Bartram et al. (2010), no qual o peixe *Oncorhynchus mykiss* foi exposto ao propranolol de em ensaio agudo na concentração de 1 mg L^{-1} e foi quantificada a atividade da EROD (CYP1A1) a fim de analisar o metabolismo do fármaco por esta via. Os autores observaram que houve um aumento da atividade dessas enzimas nas brânquias, se comparado com o fígado, indicando assim que as brânquias podem ser consideradas uma primeira via pela qual o xenobiótico é metabolizado pelo organismo. Ainda nesta temática, foi observado resposta na atividade enzimática das

GSTs nas brânquias de peixes *Lepomis gibbosus* expostos a fármacos neuroativos, como diazepam, que não apresentou alterações no fígado. Neste contexto os autores Brandão et al. (2013) consideraram as brânquias como sendo uma primeira linha de desintoxicação deste composto também.

Tanto na exposição aguda, como na exposição crônica ao propranolol observou-se um aumento significativo na marcação da HSP70 nos hepatócitos do *P. harpagos*, o que indica uma alteração na homeostase celular em resposta ao estresse gerado pela exposição ao fármaco. No estudo de Sun et al. (2015) os autores observaram que após uma exposição aguda (96h) ao propranolol houve o aumento da expressão do gene da HSP70, o que, segundo os autores, indica um mecanismo protetivo contra o dano proteotóxico. O aumento da expressão dos genes da proteína HSP70 também ocorreu em brânquias e glândulas digestivas em mexilhões da espécie *Dreissena polymorpha* expostos ao β -bloqueador metaprolol, indicando uma necessidade da célula em ativar os mecanismos de reparo, transporte ou até mesmo proteção de proteínas (CONTARDO-JARA et al., 2010). Entretanto, os artigos que relacionam a HSP70 após exposição ao propranolol em organismos aquáticos são escassos.

A exposição aguda e crônica ao propranolol não mostrou alteração significativa na atividade da ChE. O estudo de Solé et al. (2009) que mediram a atividade de ChE em brânquias de mexilhões expostos ao propranolol e mostrou uma diminuição significativa na atividade deste biomarcador. O propranolol pode atuar como um inibidor das colinesterases cerebrais e cardíacas em ratos (ALKONDON et al., 1986) e um estudo com atividade de colinesterases séricas humanas demonstrou que o propranolol poderia ter um papel importante como inibidor competitivo das colinesterases (STANKOV-JOVANOVIĆ et al., 2012). No entanto, a ausência de alterações na atividade das ChE indica que o propranolol não teve efeito neurotóxico em *P. harpagos*, nas condições adotadas neste estudo, tanto para os ensaios agudos quanto para os ensaios crônicos. Como houve um aumento da atividade das GSTs para ambas as exposições, bem como um aumento na imunomarcação das HSP70, sendo assim, pode-se inferir que o organismo aumentou sua eficiência na eliminação do composto, e na correção de possíveis efeitos proteotóxicos, prevenindo assim efeitos que pudessem acarretar em neurotoxicidade.

Nomeadamente no que diz respeito às alterações observadas após as exposições ao propranolol, pode-se inferir que o aumento da atividade enzimática das GSTs (observado tanto no ensaio agudo, como no ensaio crônico) fomentou a conjugação com a GSH a fim de levar a uma maior eliminação deste fármaco pelo organismo, sendo a menor concentração de efeito $0,025 \mu\text{g L}^{-1}$. Ademais, o aumento da imunomarcação das enzimas HSP70 indicam um

aumento na citoproteção após ambas exposições, sendo que neste biomarcador a menor concentração de efeito foi $0,0625 \mu\text{g L}^{-1}$. A partir das respostas compensatórias observadas neste estudo, pode-se sugerir, baseado nos conceitos apresentados por van der Oost et al. (2003), uma diminuição da capacidade do organismo em responder a novos desafios ambientais que possam surgir acrescido da exposição a este fármaco. Considerando o fato da existência de diferentes bloqueadores dos receptores β no ambiente aquático, como metoprolol e atenolol, o que pode potencializar esses efeitos, devido à semelhança do modo de ação. As alterações observadas em relação à exposição ao propranolol são em concentrações ecologicamente relevantes, uma vez que já foram descritas em ambientes aquáticos ($0,026 - 1,900 \mu\text{g L}^{-1}$, HUGGETT et al., 2003; Tabela 2).

Em uma análise global dos resultados dos biomarcadores utilizados no presente estudo (apêndice A) para avaliação dos efeitos da exposição aguda e crônica ao paracetamol e ao propranolol nos peixes, evidenciaram alterações a níveis bioquímicos e celulares que indicam a resposta primária do organismo. As respostas aqui obtidas representam dados a níveis subindividuais em relação aos dois fármacos analisados individualmente, e mesmo assim os efeitos foram observados no sentido do esforço do organismo em eliminar esses compostos e prevenir possíveis danos citotóxicos resultantes da proteotoxicidade, induzida pelos fármacos, nos hepatócitos. Sendo assim, os biomarcadores selecionados no presente estudo foram representativos para o tipo de exposição aos fármacos, pois permitiu estabelecer uma relação de significância toxicológica (VAN DER OOST et al., 2003), uma vez que sua escolha foi baseada no modo de ação do fármaco nos organismos (alvo e não-alvos). Desta forma, com base nos resultados obtidos no presente estudo, estes biomarcadores são preditivos de possíveis impactos que podem ser gerados a nível de população, comunidades e ecossistemas neotropicais, uma vez que esses compostos não serão encontrados de forma individual no meio aquático, mas sim em adição a diversos outros contaminantes e condições ambientais.

7 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O peixe neotropical *P. harpagos* provou ser um organismo-teste adequado em condições laboratoriais, além de ser uma espécie responsiva quando exposto aos medicamentos aqui testados, importantes contaminantes emergentes de ambientes aquáticos.

Para as condições experimentais adotadas neste estudo, e para ambas exposições aos dois fármacos ocorreram em geral alterações significativas para os marcadores bioquímicos determinados. Adicionalmente, as respostas do biomarcador celular HSP70, indicaram o efeito citoprotetor e/ou proteotóxico em resposta ao estresse induzido pelos fármacos no fígado dos peixes expostos.

É importante ressaltar que as alterações mencionadas ocorreram em concentrações tão baixas, como $\mu\text{g L}^{-1}$, e são ecologicamente relevantes, uma vez que foram descritas para ambientes aquáticos.

8 REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, v. 6, p. 105–121, 1984.
- AHN, S. G.; THIELE, D. J. Redox regulation of mammalian heat shock factor 1 is essential for Hsp gene activation and protection from stress. *Genes & Development*, v. 17, n. 4, p. 516-28, 2003.
- ALKONDON, M.; RAY, A.; SEN, P. Tissue cholinesterase inhibition by propranolol and related drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 38, p. 848-850, 1986.
- AMENTA, F.; TAYEBATI, S. K. Pathways of Acetylcholine Synthesis, Transport and Release as Targets for Treatment of Adult Onset Cognitive Dysfunction. *Current Medicinal Chemistry*, v. 15, p. 488-498, 2008.
- AMÉRICO, J. H. P.; MINILLO, A.; CARVALHO, S., L. Detecção do analgésico paracetamol no córrego da onça, Três Lagoas – MS. *VIII Fórum Ambiental Da Alta Paulista*, v. 8, n. 12, p. 38-47, 2012 a.
- AMÉRICO, J. H. P. A.; ISIQUE, W. D.; MINILLO, A.; CARVALHO, S. L. Fármacos em Uma Estação de Tratamento de Esgoto na Região Centro-Oeste do Brasil e os Riscos aos Recursos Hídricos. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos*, v. 17, n. 3, p.61-67, 2012 b.
- AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 6, n. 2, 2003.
- ANDREOZZI, R.; RAFFAELE, M.; NICKLAS, P. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere*, v. 50, p. 1319-1330, 2003.
- ANSOAR-RODRÍGUEZ, Y.; CHRISTOFOLETTI, C. A.; CORREIA, J. E.; SOUZA, R. B.; MOREIRA-DE-SOUZA, C.; MARCATO, A. C. C.; BUENO, O. C.; MALASPINA, O.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; FONTANETTI, C. S. Liver alterations in *Oreochromis niloticus* (Pisces) induced by insecticide imidacloprid: Histopathology and heat shock protein in situ localization. *Journal Of Environmental Science And Health, Part B*, v. 51, n. 12, p.881-887, 20 out. 2016.
- ANTUNES, S. C.; FREITAS, R.; FIGUEIRA, E.; GONÇALVES, F.; NUNES, B. Biochemical effects of acetaminophen in aquatic species: edible clams *Venerupis decussata* and *Venerupis philippinarum*. *Environmental Science and Pollution*, v. 20, p. 6658-6666, 2013.
- ARCHER, E.; PETRIE, B.; KASPRZYK-HORDEN, B.; WOLFAARDT, G. M. The fate of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs), endocrine disrupting contaminants (EDCs), metabolites and illicit drugs in a WWTW and environmental waters, *Chemosphere*, v. 174, p. 437 – 446, 2017.

ASHBURNER, M. The effects of heat shock and other stress on gene activity: an introduction. In: SCHLESINGER, M. J.; ASHBURNER, M. AND TISSIÉRES, A. *Heat Shock Proteins: from bacteria to human*. New York: Spring Harbor Laboratory Press, 1982. p.1-9.

ASHTON, D.; HILTON, M.; THOMAS, K. V. Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. *Science of the Total Environment*, v. 333, p. 167-184, 2004.

ASSOCIAÇÃO DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). *NBR 12713: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade Aguda – Método de Ensaio com *Daphnia spp.**, p. 21, 2004.

ASSOCIAÇÃO DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). *NBR 13373: Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Crônica – Método de Ensaio com *Ceriodaphnia spp* (Cladocera, Crustácea)*, p.12, 2003.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARTRAM, A. E.; WINTER, M. J.; HUGGETT, D. B.; MACCORMACK, P.; CONTANTINE, L. A.; HETHERIDGE, M. J.; HUTCHINSON, T. H.; KINTER, L. B.; ERICSON, J. F.; SUMPTER, J. P.; OWEN, S. F. *In vivo* and *In vitro* Liver and Gill EROD Activity in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Exposed to the Beta-Blocker Propranolol. *Environmental Toxicology*, v. 27, n. 10, p. 573-582, 2011.

BATT, A. L.; KOSTICH, M. S.; LAZORCHAK, J. M. Analysis of ecologically relevant pharmaceuticals in wastewaters and surface water using selective solid-phase extraction and UPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry*, v. 80, p. 5021-5030, 2008.

BEBIANNI, M. J.; MELLO, A. C.P.; SERRANO, M. A. S.; FLORES-NUNES, F., MATTOS, J. J.; ZACCHI, F. L.; PIZZA, C. E.; SIEBERT, M. N.; PIAZZA, R. S.; GOMES, C. H. A. M.; MELO, C. M. R.; BAINY, A. C. D. Transcriptional and cellular effects of paracetamol in the oyster *Crassostrea gigas*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 144, p. 258-267, 2017.

BENDZ, D.; PAXÉUS, N. A.; GINN, T. R.; LOGE, F. J. Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Höje River in Sweden. *Journal of Hazardous Materials*, v. 122, p. 195-204, 2005.

BERGAMINI, C. M.; GAMBETTI, S.; DONDI, A.; CERVELATTI, C. Oxygen, Reactive Oxygen Species and Tissue Damage. *Current Pharmaceutical Design*, v. 10, p. 1611-1626, 2004.

BERTOLINI, A.; FERRARI, A.; OTTANI, A.; GUERZONI, S.; TACCHI, R.; LEONE, S. Paracetamol: New Vistas of na Old Drug. *CNS Drugs Reviews*, v. 12, n. 3-4, p. 250-275, 2006.

BIERKENS, J. G. Applications and pitfalls of stress-proteins in biomonitoring. *Toxicology*, v. 153, n. 1-3, p. 61-72, 2000.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. *Química Nova*, v. 26, n. 4, p. 523-530, 2003.

BOLONG, N. et al. A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. *Desalination*, v. 239, n. 1-3, p.229-246, abr. 2009.

BOUTAUD, O.; ARONOFF, D. M.; RICHARDSON, J. H.; MARNETT, L. J.; OATES, J. A. Determinants of the cellular specificity of acetaminophen as an inhibitor of prostaglandin H2 synthases. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, v. 99, n. 10, p.7130-7135, 2002.

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*, n. 72, p. 248-254, 1976.

BRANDÃO, F. P.; PEREIRA, J. L.; GONÇALVES, F.; NUNES, B. The Impact of Paracetamol on Selected Biomarkers of de Mollusc Species *Corbicula fluminea*. *Environmental Toxicology*, v. 29, p. 74-83, 2011.

BRANDÃO, F. P.; RODRIGUES, S.; CASTRO, B B.; GONÇALVES, F.; ANTUNES, S. C.; NUNES, B. Short-term effects of neuroactive pharmaceutical drugs on a fish species: Biochemical and behavioural effects. *Aquatic Toxicology*, v. 144-145, p. 218-229, 2013.

BROWN, D. A. Acetylcholine. *British Journal of Pharmacology*, v. 147, p. S120-S126, 2006.

BUHLER, D. R.; WILLIAMS, D. E. The Role of Biotransformation in the Toxicity of Chemicals. *Aquatic Toxicology*, v. 11, p. 19-28, 1988.

CAMPANHA, M. C.; AWAN, A. T.; DE SOUSA, D. N.; GROSSELI, G. M.; MOZETO, A. A.; FADINI, P. S. A 3- year study on occurrence of emerging contaminants in an urban stream of São Paulo State of Southeast Brazil. *Environmental Science and Pollution Research International*, v. 22, n. 10, p. 7936-7947, 2014.

CASIDA, J. E.; DURKIN, K. A. Anticholinesterase insecticide retrospective. *Chemico-Biological Interactions*, v. 203, p. 221-225, 2013.

CASTRO, S. V.; LOBO, C. H.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Proteínas de Choque Térmico (HSP70): Estrutura e Atuação em Resposta ao Estresse Celular. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 7, n. 4, p. 261-271, 2014.

CHAMBERS, J. E. e YARBROUGH, J. D. Xenobiotic biotransformation systems in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 55C, p. 77-84, 1976.

COETSIER, C. M.; SPINELLI, S.; LIN, L.; ROIG, B.; TOURAUD, E. Discharge of pharmaceutical products (PPs) through a conventional biological sewage treatment plant: MECs vs PECs? *Environmental International*, v. 35, p. 787-792, 2009.

COLBURN, T.; CLEMENT, C. Chemically-induced alterations in sexual and functional development: the wildlife/human connection. *Advances in Modern Environmental Toxicology*, v. 21, p. 129-145, 1992.

ČOLOVIĆ, M. B.; KRSTIĆ, D. Z.; LAZAREVIĆ-PAŠTI, T. D.; BONDŽIĆ, A. M.; VASIĆ, V. M. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology*, v. 11, p. 315-335, 2013.

CONTARDO-JARA, V.; PFLUGMACHER, S.; NÜTZMANN, G.; KLOAS, W.; WIERGAND, C. The β -receptor blocker metoprolol alters detoxification processes in the non-target organism *Dreissena polymorpha*. *Environmental Pollution*, v. 158, n. 6, p.2059-2066, 2010.

CORREIA, B.; FREITAS, R.; FIGUEIRA, E.; SOARES, A. M. V. M.; NUNES, B. Oxidative effects of the pharmaceutical drug paracetamol on the edible clam *Ruditapes philippinarum* under different salinities. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, v. 179, n. 8, p. 116-124, 2016.

CORREIA, M. A. Biotransformação de Fármacos. In: KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. *Farmacologia Básica e Clínica*. Tradução de Ademar Valadares Fonseca et al. 12^o edição. Porto Alegre: AMGH, 2014, p. 53 – 68.

COSTA, C. R.; OLIVI, P; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A Toxicidade em Ambientes Aquáticos: Discussão e Métodos de Avaliação. *Química Nova*, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

DAS, U.N. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. *Medical Science Monitor*, v. 13, p. 214-221, 2007.

DASH, N. K.; AZAM, M.; GUPTA, G.; BAQUER, N. Z. Effect of chronic administration of propranolol on acetylcholinesterase and 5-hydroxytryptamine levels in rat brain and heart. *Biochemistry International*, v. 22, n. 3, p. 475-82, 1990.

DAUGHTON, C. G. Pharmaceuticals and the Environment (PiE): Evolution and impact of the published literature revealed by bibliometric analysis. *Science of the Total Environment*, v. 562, p. 391-426, 2016.

DAUGHTON, C. G.; TERNES, T. A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environmental Health Perspectives*, v. 107, n. 6, p. 907–938, 1999.

DELWING-DE LIMA, D.; WOLLINGER, L. F.; CASAGRANDE, A. C. M.; DELWING, F.; DA CRUZ, J. G. P.; WYSE, A. T. S.; MAGRO, D. D.–D. Guanidino compounds inhibit acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities: effect neuroprotector of vitamins E plus C. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v. 28, n. 6, p. 465–473, 2010.

DEMEKE, A.; TASSEW, A. Heat Shock Protein and their Significance in Fish Health. *Research & Reviews: Journal of Veterinary Sciences*, v. 2, n. 1, p. 66-75, 2016.

DING, J.; LU, G.; LI, S.; NIE, Y.; LIU, J. Biological fate and effects of propranolol in an experimental aquatic food chain. *Science of the Total Environment*, v. 532, p. 31-39, 2015.

EBELE, A. J.; ABDALLAH, M. A.-E.; HARRAD, S. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in freshwater aquatic environment. *Emerging Contaminants*, v. 3, n.1, p. 1-16, 2017.

EDWARDS, Cliver A. *Earthworm Ecology*. 2. ed. Londres: Crc Press, 2004. 442 p.

EKAMBARAM, P.; JAYACHANDRAN, T. HSP70 Downregulation by Pifithrin- μ Upregulates Pro-Apoptotic Changes in Stressed Fish Hepatocytes. *International Journal of Science and Research*, v. 4, n. 10, p. 1143-1152, 2015.

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

FABBRI, E.; FRANZELLITTI, S. Human pharmaceuticals in the marine environment: Focus on exposure and biological effects in animal species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 35, n. 4, p.799-812, 2016.

FANG, Y.-Z.; YANG, S.; WU, G. Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. *Nutrition*, v. 18, n. 10, p. 872-879, 2002.

FAWELL, J.; ONG, C. N. Emerging Contaminants and the Implications for Drinking Water. *International Journal of Water Resources Development*, v. 28, n. 2, p.247-263, 2012.

FENT, K.; WESTON, A. A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Ecotoxicology*, v. 76, p. 122-159, 2006.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 43, n 1, p. 61-68, 1997.

FRANZELLITTI, S.; BURATTI, S.; VALBONESI, P. CAPUZZO, A.; FABBRI, E. The β -blocker propranolol affects cAMP-dependent signaling and induces the stress response in Mediterranean mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, v. 101, n. 2, p.299-308, 2011.

FRENCH, V. A.; CODI KING, S.; KUMAR, A.; NORTHCOTT, G.; MCGUINNESS, K.; PARRY, D. Characterisation of microcontaminants in Darwin Harbour, a tropical estuary of northern Australia undergoing rapid development. *Science of the Total Environment*, v. 536, p. 639-647, 2015.

FUJIMOTO, M.; NAKAI, A. The heat shock factor family and adaptation to proteotoxic stress. *FEBS Journal*, v. 277, n. 20, p. 4112-4125 2010.

FURLONG, E. T.; BATT, A. L.; GLASSMEYER, S. T.; NORIEGA, M. C.; KOLPIN, D. W.; MASH, H.; SCHENCK, K. M. Nationwide Reconnaissance of contaminants of emerging concern in source and treated drinking waters of the United States: Pharmaceuticals. *Science of the Total Environment*, v. 579, p. 1629-1642, 2017.

GALUS, M.; KIRISCHIAN, N.; HIGGINS, S.; PURDY, J.; CHOW, J.; RANGARANJAN, S.; LI, H.; METCALFE, C.; WILSON, J. Y. Chronic, low concentration exposure to pharmaceuticals impacts multiple organ system in zebrafish. *Aquatic Toxicology*, v. 132-133, p. 200-211, 2013.

GARBUZ, D. G. Regulation of heat shock gene expression in response to stress. *Molecular Biology (Mosk)*, v. 51, n. 3, p. 400-417, 2017.

GARRIDO, C. et al. Heat Shock Proteins: Endogenous Modulators of Apoptotic Cell Death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 286, n. 3, p.433-442, ago. 2001.

GÓMEZ-ABELLÁN, V.; SEPULCRE, M. P. The role of prostaglandins in the regulation of fish immunity. *Molecular Immunology*, v. 69, p.139-145, 2016.

GÓMEZ, M. J.; MARTÍNEZ BUENO, M. J.; LACORTE, S.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R.; AGÜERA, A. Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere*, v. 66, n. 6, p.993-1002, 2007.

GROS, M.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatograph-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta*, v. 70, p. 678 – 690, 2006.

GRUJIĆ, S.; VASILJEVIĆ, T.; LAUSEVIĆ, M. Determination of multiple pharmaceutical classes in surface and ground waters by liquid chromatography-ion trap-tandem mass spectrometry. *Journal Chromatography A.*, v. 1216, n. 25, p. 4989-5000, 2009.

GUILHERMINO, L.; BARROS, P.; SILVA, M. C.; SOARES, A. M. V. M.; Should the use of inhibition of cholinesterases as a specific biomarker for organophosphate and carbamate pesticides be questioned? *Biomarkers*, v. 3, p. 157–163, 1996.

GUILOSKI, I. C.; RIBAS, J. L. C.; PIANCINI, L. D. S.; DAGOSTIM, A. C.; CIRIO, S. M.; FÁVARO, L. F.; BOSCHEN, S. L.; CESTARI, M. M.; CUNHA, C. da; ASSIS, H. C. S. de. Paracetamol causes endocrine disruption and hepatotoxicity in male fish *Rhamdia quelen* after subchronic exposure. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 53, p.111-120, 2017.

GUNNARSSON, L.; JAUHAINEN, A.; KRISTIANSSON, E.; NERMAN, O.; LARSSON, D. G. J. Evolutionary Conservation of Human Drug Targets in Organisms used for Environmental Risk Assessments. *Environmental Science & Technology*, v. 42, n. 15, p.5807-5813, 2008.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione-S-transferases — The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal Biological Chemistry*, v. 249, p. 7130-7139, 1974.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Role of Free Radicals and Catalytic Metal Ions in Human Disease: An Overview. *Methods in Enzymology*, v. 186, p. 1-85, 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. *Oxford University Press*, New York, 1999.

HALLIWELL, Barry. Free radicals and antioxidants – quo vadis? *Trends In Pharmacological Sciences*, v. 32, n. 3, p.125-130, 2011.

HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. R. Glutathione Transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 45, p. 51-88, 2005.

HORVÁTH, I.; MULTHOFF, G; SONNLEITNER, A.; VÍGH, L. Membrane-associated stress proteins: More than simply chaperones. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. v. 1778, n. 7–8, p. 1653-1664, 2008.

HUBER, P. C.; AMEIDA, W. P.; FÁTIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova*, v. 31, p. 1170-1179, 2008.

HUGGETT, D. B.; KHAN, I. A.; FORAN, C. M.; SCHLENK, D. Determination of beta-adrenergic receptor blocking pharmaceuticals in United States wastewater effluent. *Environmental Pollution*, v. 121, p. 199-205, 2003.

IBÁÑEZ, M.; GRACIA-LOR, E.; BIJLSMA, L.; MORALES, E.; PASTOR, L.; HERNÁNDEZ, F. Removal of emerging contaminants in sewage water subjected to advanced oxidation with ozone. *Journal of Hazardous Materials*, v. 260, p. 389-398, 2013.

IGNARRO, L. J.; CIRINO, G.; CASINI, A.; NAPOLI, C. Nitric Oxide as Signaling Molecule in the Vascular System: An Overview. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, v. 34, n. 6, p. 879-886, 1999.

IWAMA, G. K.; THOMAS, P. T.; FORSYTH, R. B.; VIJAYAN, M. M. Heat Shock Protein Expression in Fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v. 8, p. 35-56, 1998.

JEE, H. Size Dependent Classification of Heat Shock Proteins: A mini-review. *Journal of Exercise Rehabilitation*, v. 12, n.4, p. 255- 259, 2016.

JOLY, C. A. Preservação da Serra do Japi. In: MARELLATO, L. P. C. (ed.). *História Natural da Serra do Japi – Ecologia e preservação de uma área florestal do sudeste do Brasil*. Campinas: Unicamp/FAPESP, p. 310-321, 1992.

KASPRZYK-HORDERN, B.; DINSDALE, R. M.; GUWY, A. J. Multiresidue methods for the analysis of pharmaceuticals, personal care products and illicit drugs in surface water and wastewater by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, v. 391, p. 1293-1308, 2008.

KAVITHA, P.; RAMESH, R.; BUPESH, G.; STALIN, A.; SUBRAMANIAN, P. Hepatoprotective activity of *Tribulus terrestris* extract against acetaminophen-induced toxicity in a freshwater fish (*Oreochromis mossambicus*). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal – Springer*, v. 47, p. 698-706, 2011.

KIM, J. W.; JANG, H. S.; KIM, J. G.; ISHIBASHI, H.; HIRANO, M.; NASU, K.; ICHIKAWA, N.; TAKAO, Y.; SHINOHARA, R.; ARIZONO, K. Occurrence of Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs) in Surface Water from Mankyung River, South Korea. *Journal of Health Science*, v. 55, n.2, p. 249-258, 2009.

KLOČIČ, I.; POBERŽNIK, M.; MAVRI, J.; DOLENC, M. S. A quantum chemical study of the reactivity of acetaminophen (paracetamol) toxic metabolite N-acetyl-p-benzoquinone imine with deoxyguanosine and glutathione. *Chemico-Biological Interactions*, v. 242, p. 407-414, 2015.

KNOCKAERT, L.; DESCATOIRE, V.; VADROT, N.; FROMENTY, B.; ROBIN, M. A. Mitochondrial CYP2E1 is sufficient to mediate oxidative stress and cytotoxicity induced by ethanol and acetaminophen. *Toxicology In Vitro*, v. 25, n. 2, p. 475-84, 2011.

KOLPIN, D. W.; FURLONG, E. T.; MEYER, M. T.; THURMAN, E. M. ZAUGG, S. D.; BARBER, L. B.; BUXTON, H. T. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environmental Science and Technology*, v. 36, p. 1202 – 1211, 2002.

KROON, F.; STRETEN, C.; HARRIES, S. A protocol for identifying suitable biomarkers to assess fish health: Systematic review. *Plos one*, v. 12, n. 4, e 0174762, 2017.

LETICIA, A.-G.; GERARDO, G.-B. Determination of esterase activity and characterization of cholinesterases in the reef fish *Haemulon plumieri*. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, v. 71, n. 3, p.787-797, 2008.

LIN, A. Y.; TSAI, Y. Occurrence of pharmaceuticals in Taiwan's surface waters: Impact of waste streams from hospitals and pharmaceutical production facilities. *Science Of The Total Environment*, v. 407, n. 12, p.3793-3802, 2009.

LINDQUIST, S; CRAIG, A. E. The Heat-Shock Proteins. *Annual Review of Genetics*, v. 22, n. 1, p.631-677, dez. 1988.

LYTTLE, M. H.; SATYAM, A.; HOCKER, M. D.; BAUER, K. E.; CALDWELL, C. G.; HUI, H. C.; MORGAN, A. S.; MERGIA, A.; KAUVAR, L. M. Glutathione-S-transferase Activates Novel Alkylating Agents. *Journal Of Medicinal Chemistry*, v. 37, n. 10, p.1501-1507, 1994.

LUCINDA, P. H. F. Systematics and Biogeography of the poeciliid fishes genus *Phallocerus* with the descriptions of twenty-one new species. *Neotropical Ichthyology*, v. 6, p. 113-158, 2008.

MACHADO, G.; GIARETTA, A. A. & FACURE, K. G. Reproductive Cycle of a Population of the Guaru, *Phallocerus caudimaculatus* (Poeciliidae), in Southeastern Brasil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, v. 36, n. 36, p. 1-4, 2001.

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

MAYER, M. P.; BUKAU, B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Science*, v. 62, p. 670-684, 2005.

MEHVAR, R.; BROCKS, D. R. Stereospecific pharmacokinetics and pharmacodynamics of beta-adrenergic blockers in humans. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*. v. 4, n. 2, p. 185-200, 2001.

MENDONÇA, A.; ABELHA, M. C. F.; BATISTA-SILVA, V. F.; KASHIWAQUI, E. A. L.; BAYLLI, D.; FERNANDES, C. A. Population parameters of Poeceline in streams of Mato Grosso do Sul state, Brazil. *Boletim Instituto de Pesca*, v. 40, n. 4, p. 557-567, 2014.

MENEZES, N.A.; WEITZMAN, S.H.; OYAKAWA, O.T.; DE LIMA, F.C.T.; E CASTRO, R. M. C., & WEITZMAN, M. J. *Peixes de água doce da Mata Atlântica: lista preliminar das espécies e comentários sobre conservação de peixes de água doce neotropicais*. Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 2007.

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.

MONTEIRO, M.; QUINTANEIRO, C. MORGADO, F.; SOARES, A. M. V. M.; GUILHERMINO, F. Characterization of the cholinesterases present in head tissues of the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Application to biomonitoring. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, v. 62, n. 3, p.341-347, 2005.

NADEAU, S. I., LANDRY, J. Mechanisms of activation and regulation of the heat shock-sensitive signaling pathways. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 594, p. 100-113, 2007.

NAVA-ÁLVAREZ, R.; RAZO-ESTRADA, A. C.; GARCÍA-MEDINA, S.; GÓMEZ-OLIVAN, L. M.; GALAR-MARTÍNEZ, M. Oxidative Stress Induced by Mixture of Diclofenac and Acetaminophen on Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 225, n. 2, p.1-9, 2014.

NIFOROU, K.; CHEIMONIDOU, C.; TROUGAKOS, I. P. Molecular chaperones and proteostasis regulation during redox imbalance. *Redox Biology*, v. 2, p.323-332, 2014.

NIKINMAA, M. Bioindicators and Biomarkers. In: NIKINMAA, M. *An Introduction to Aquatic Toxicology*. Elsevier, 2014. Cap. 12. p. 147-155.

NUNES, B.; CARVALHO, F.; GUILHERMINO, L.; Acute and chronic effects of clofibrate and clofibric acid on the enzymes acetylcholinesterase, lactate dehydrogenase and catalase of the mosquitofish, *Gambusia holbrooki*. *Chemosphere*, v. 57, p. 1581-1589, 2004.

NUNES, B.; GAIO, A. R.; CARVALHO, F.; GUILHERMINO, L.; Behaviour and biomarkers of oxidative stress in *Gambusia holbrooki* after acute exposure to widely used pharmaceuticals and a detergent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 71, p. 341-354, 2008.

NUNES, B. The Use of cholinesterases in ecotoxicology. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 212, p.29-59, 2011

NUNES, B.; ANTUNES, S. C.; SANTOS, J.; MARTINS, L.; CASTRO, B. B. Toxic Potential of Paracetamol to Freshwater Organisms: A headache to environmental regulators?. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 107, p. 178-185, 2014a.

NUNES, B.; PINTO, G.; MARTINS, L.; GONÇALVES, F. ANTUNES, S. C. Biochemical and standard toxic effects of acetaminophen on the macrophyte species *Lemna minor* and *Lemna gibba*. *Environmental Science and Pollution Research International*, v. 18, p. 10815-10822, 2014b.

NUNES, B.; VERDE, M. F.; SOARES, A. M. V. M. Biochemical effects of the pharmaceutical drug paracetamol on *Anguilla anguilla*. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 22, n. 15, p. 11574-11584, 2015.

NUNES, B.; NUNES, J.; SOAREA, A. M. V. M.; FIGUEIRA, E.; FREITAS, R. Toxicological effects of paracetamol on the clam *Ruditapes philippinarum*: exposure vs recovery. *Aquatic Toxicology*, v. 192, p. 198-206, 2017.

OCDE. OECD Guideline for testing of chemicals. Test 203: Fish, acute toxicity test, 1992.

OCDE. OECD Guideline for testing of chemicals. Test 215: Fish, juvenile growth test, 2000.

OERTEL, N.; SALÁNKI, J. Biomonitoring and Bioindicators in Aquatic Ecosystems. In: AMBASHT, R. S.; AMBASHT, Navin K. *Modern Trends in Applied Aquatic Ecology: Springer Us*, 2003. Cap. 10. p. 219-246.

OLAITAN, O. J.; ANYAKORA, C.; BAMIRO, T.; TELLA, A. T. Determination of pharmaceuticals compounds in surface and underground water by solid phase extracyion-liquid chromatography. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, v. 6, n. 3, p. 20-26, 2014.

OLIVEIRA, L. L. D.; ANTUNES, S. C.; GONÇALVEZ, S.; ROCHA, O.; NUNES, B. Evaluation of ecotoxicological effects of drugs on *Daphnia magna* using different enzymatic biomarkers. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 119, p. 123-131, 2015.

OMIECINSKI, C. J.; HEUVEL, J. P. V.; PERDEW, G. H.; PETERS, J. M. Xenobiotic Metabolism, Disposition, and Regulation by Receptors: From Biochemical Phenomenon to Predictors of Major Toxicities. *Toxicological Sciences*, v. 120, n. S1, p. S49-S75, 2011.

OTT, M.; GOGVADZE, V.; ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*, v. 12, p. 913-922, 2007.

OWEN, S. F.; GILTROW, E.; HUGGET, D. B.; HUTCHINSON, T. H.; SAYE, J.; WINTER, M. J.; SUMPTER, J. P. Comparative physiology, pharmacology and toxicology of β -blockers: Mammals versus fish. *Aquatic Toxicology*, v. 82, p. 145 – 162, 2007.

OWEN, S. F.; HUGGETT, D. B.; HUTCHINSON, T. H.; HETHERIDGE, M. J.; KINTER, L. B.; ERICSON, J. F.; SUMPTER, J. P. Uptake of propranolol, a cardiovascular

pharmaceutical, from water into fish plasma and its effects on growth and organ biometry. *Aquatic Toxicology*, v. 93, p. 217-224, 2009.

PAROLINI, M.; BINELLI, A.; COGNI, D.; PROVINI, A. Multi-biomarker approach for the evaluation of the cyto-genotoxicity of paracetamol on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere*, v. 79, n. 5, p.489-498, 2010.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The Role of Antioxidants in the Chemistry of Oxidative Stress: A Review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 97, p. 55-74, 2015.

PETROVIĆ, M., GONZALEZ, S., BARCELÓ, D.; Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 22, p. 685-696, 2003.

POMERAI, D. Review: Heat-shock proteins as biomarkers of pollution. *Human & Experimental Toxicology*, v. 15, n. 4, p.279-285, abr. 1996.

PRADO, M. A. M.; REIS, R. A. M.; PRADO, V.F.; MELLO, M. C.; GOMEZ, M. V.; MELLO, F. G. Regulation of acetylcholine synthesis and storage. *Neurochemistry International*, v. 41, p. 291-299, 2002.

PRADO, R. B.; NOVO, E. M. L. M. Modeling pollution input from the drainage basin into Barra Bonita reservoir, São Paulo – Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, v. 75, n. 2, p. 314 – 323, 2015.

RABIET, M.; TOGOLA, A.; BRISSAUD, F.; SEIDEL, J. L.; BUDZISKI, H.; ELBAZ-POULICHET, F. Consequences of Treated Water Recycling as Regards Pharmaceuticals and Drugs in Surface and Ground Waters of a Medium-sized Mediterranean Catchment. *Environmental Science and Technology*, v. 40, n. 17, p.5282-5288, 2006.

RAHAL, A.; KUMAR, A.; SINGH, V.; YADAV, B.; TIWARI, R.; CHAKRABORTY, S.; DHAMA, K. Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. *BioMed Research International*, v. 2014, p. 1-19, 2014.

RAMOS, A. S.; CORREIA, A. T.; ANTUNES, S. C.; GONÇALVES, F.; NUNE, B. Effect of acetaminophen exposure in *Oncorhynchus mykiss* gills and liver: Detoxification mechanisms, oxidative defence system and peroxidative damage. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 37, n. 3, p.1221-1228, 2014.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. HENDERSEN, G. *Pharmacology*. 7ª edição. Churchill Livingstone – Elsevier, 2012. 778 p.

RAZA, H. Dual localization of glutathione S-transferase in the cytosol and mitochondria: implications in oxidative stress, toxicity and disease. *Febs Journal*, v. 278, n. 22, p. 4243-4251, 2012.

RICHTER, K.; HASLBECK, M.; BUCHNER, J. The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death. *Molecular Cell*, v. 40, n. 2, p.253-266, 2010.

RITOSSA, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Experientia*, v. 18, n. 12, p.571-573, 1962.

ROBERT, P. H.; THOMAS, K. V. The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. *Science of the Total Environment*, v. 356, p. 143-153, 2006.

ROBERTSON, D. BIAGGIONI, I. Fármacos antagonistas de adrenoreceptores. In: KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. *Farmacologia Básica e Clínica*. Tradução de Ademar Valadares Fonseca et al. 12^o edição. Porto Alegre: AMGH, 2014, p. 151 – 168.

RODRIGUES, S.; CORREIA, A. T.; ANTUNES, S. C.; NUNES, B. Alterations in gills of *Lepomis gibbosus*, after acute exposure to several xenobiotics (pesticide, detergent and pharmaceuticals): morphometric and biochemical evaluation. *Drug and Chemical Toxicology*, p. 1-7, 2014.

SAUVÉ, S.; DESROSIERS, M.; A review of what is an emerging contaminant. *Chemistry Central Journal*, v. 8, p.1-15, 2014.

ŚCIBIOR, D.; CZECZOT, H. Catalase: structure, properties, functions. *Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej*, v. 60, p. 170-180, 2006.

SCHEIBMEIR, H. D.; CHRISTENSEN, K.; WHITAKER, S. H.; JEGAETHESAN, J.; CLANCY, R.; PIERCE, J. D. A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intensive and Critical Care Nursing*, v. 21, n. 1, p.24-28, 2005.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current Biology*, v 24, p. R453-R462, 2014.

SCHINONI, M. I. Fisiologia Hepática. *Gazeta Médica da Bahia*, n. 4, p. 5 - 9, 2006.

SHANKAR, K.; MEHENDALE, H. M. Acetaminophen. *Encyclopedia of Toxicology*, v. 1, p. 26-29, 2014.

SIES, H. Biochemistry of Oxidative Stress. *Angewandte Chemie – International Edition in English*, v. 25, p. 1058–1071, 1986.

SINGH, M. K.; SHARMA, J. G.; CHAKRABARTI, R.. Simulation study of natural UV-B radiation on *Catla catla* and its impact on physiology, oxidative stress, Hsp 70 and DNA fragmentation. *Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology*, v. 149, p.156-163, 2015.

SILVA, A. S.; SANTURIO, J. M.; ROZA, L. F.; BOTTARI, N. B.; GALLI, G. M.; MORSCH, V. M.; SCHETINGER, M. R. C.; BALDISSERA, M. D.; STEFANI, L. M.; RADAVELLI, W. M.; TOMASI, T.; BOIAGO, M. M. Aflatoxins produced by *Aspergillus parasiticus* present in the diet of quails increase the activities of cholinesterase and adenosine deaminase. *Microbial Pathogenesis*, v. 107, p.309-312, 2017.

SILVA-ZACARIN, E. C. M.; CHAUZAT, M. P.; ZEGGANE, S.; DRAJNUDEL, P.; SCHURR, F.; FAUCON, J. P.; MALASPINA, O.; ENGLER, J. A. Protocol for optimization of histological, histochemical and immunohistochemical analyses of larval tissues: application in histopathology of honey bee. *Current microscopy contributions to advances in science and technology*. 5ed. Badajoz: Formatex Research Center, v. 1, p. 696-703, 2012.

SHAND, D. G. Propranolol. *The New English Journal of Medicine*, v. 293, n. 6, p. 280-285, 1975.

SMALL, D. H.; MICHAELSON, S.; SBERNA, G. Non-classical actions of cholinesterases: Role in cellular differentiation, tumorigenesis and Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, v. 28, n. 5-6, p.453-483, 1996.

SODRÉ, F. F.; MONTAGNER, C. C.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W. F. Ocorrência de Interferentes Endócrinos e Produtos Farmacêuticos em Águas Superficiais da Região de Campinas (SP, Brasil). *Journal of the Brazilian Society Ecotoxicology*, v. 2, n. 2, p. 187-196, 2007.

SOLÉ, M.; SHAW, J. P.; FRICKERS, P. E.; READMAN, J. W.; HUTCHINSON, T. H. Effects on feeding rate and biomarker responses of marine mussels experimentally exposed to propranolol and acetaminophen. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, v. 396, p. 649-656, 2009.

SÕTI, C.; SREEDHAR, A. S.; CSERMERLY, P. Apoptosis, necrosis and cellular senescence: chaperone occupancy as a potential switch. *Aging Cell*, v. 2, p. 39-45, 2003.

SOUZA, M. M.; LIMA-JÚNIOR, S. E.; SÚAREZ, Y. R. Ecologia trófica de *Phalloceros horpagos* (Lucinda,2008) no Córregp Guiraí, Bacia do Alto Rio Paraná, MS. Anais do Encontro de Iniciação Científica-ENIC, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2009.

STANKOV-JOVANOVIĆ, V. P.; MITIĆ, V. D.; ILIĆ, M. D.; MANDIĆ, L. M.; NIKOLČ-MANDIĆ, S. D. Enzymatic kinetic method for determination of propranolol hydrochloride in pharmaceuticals based on its inhibitory effect on cholinesterase. *Chemical Industry*, v. 66, n. 5, p.677-684, 2012.

STEENEN, S. A.; van WIJK, A. J.; van der HEIJDEN, G. J. M. G.; van WESTRHENEN, R.; de LANGE, J.; de JONGH, A. D. Propranolol for the treatment of anxiety disorders: Systematic review and meta-analysis. *Journal of Psychopharmacology*, v. 30, n. 2, p. 128-139, 2015.

STEINBACH, C.; BURKINA, V.; FEDOROVA, G.; GRABICOVA, K.; STARA, A.; VELISEK, J.; ZLABEK, V.; SCHMIDT-POSTHAUS, H.; GRABIC, R.; KROUPOVA, H. K. The sub-letaleffects and tissue concentration of the human pharmaceutical atenolol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Science of the Total Environment*, v. 497, p. 209-218, 2014.

SUMIOKA, I.; MATSURA, T.; KAI, M.; YAMADA, K. Potential roles of hepatic heat shock protein 25 and 70i in protection of mice against acetaminophen-induced liver injury. *Life Science*, n. 74, p. 2551-2561, 2004.

SUN, L.; LIU, F.; CHEN, H.; WANG, S.; LIN, X.; CHI, J.; ZHU, Q.; FU, ZU. Transcriptional Responses in Adult Zebrafish (*Danio rerio*) Exposed to Propranolol and Metoprolol. *Ecotoxicology*, v. 24, n. 6, p. 1352-1361, 2015.

TERNES, T. A. Occurrence of drugs in German Sewage Treatment Plants and Rivers. *Water Research*, v. 32, n. 11, p. 3245-3260, 1998.

TERRA, B. F.; HUGHES, R. M.; FRANCELINO, M. R.; ARAÚJO, F. G. Assessment of biotic condition of Atlantic Rain Forest streams: A fish-based multimetric approach. *Ecological Indicators*, v. 34, p. 136 – 148, 2013.

TIMBRELL, J. A. Biomarkers in toxicology. *Toxicology*, v. 129, p. 1-12, 1998

THOMAS, K. V.; FELIPE, M. A. S.; LANGFORD, K. H.; SOUZA, A. D. L.; NIZZETO, L.; WAICHMAN, A. V. Screening for Selected Human Pharmaceuticals and Cocaine in the Urban Streams of Manaus, Amazonas, Brazil. *Jawra Journal of the American Water Resources Association*, v. 50, n. 2, p.302-308, 2014.

TOLSON, J. K.; DIX, D. J.; VOELLMY, R. W.; ROBERTS, S. M. Increased Hepatotoxicity of Acetaminophen in HSP70i knockout mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 210, p. 157-162, 2006.

TRUHAUT, R. Ecotoxicology: Objectives, Principles and Perspectives. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 1, p. 151-173, 1977.

VALAVANIDIS, A.; VLAHOGIANNI, T.; DASSENAKIS, M.; SCOULLOS, M. Molecular Biomarkers of Oxidative Stress in Aquatic Organisms in Relation to Toxic Environmental Pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 64, p. 178-189, 2006.

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

VAN GESTEL, C. A. M; VAN BRUMMELEN, T. C. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology*, v. 5, n. 4, p. 217-225, 1996.

VENTURA, A. L. M.; ABREU, P. A.; FREITAS, R. C. C.; SATHLER, P. C.; LOUREIRO, N.; CASTRO, H. C. Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulação e relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo. *Revista de Psiquiatria Clínica*, v. 37, n. 2, p. 66-72, 2010.

XU, J. J.; HENDRIKS, B. S.; ZHAO, J.; GRAAF, D. Multiple effects of acetaminophen and p38 inhibitors: towards pathway toxicology. *FEBS Letters*, v. 582, p. 1276–1282, 2008.

WASHINGTON, H. G. Diversity, biotic and similarity indices: A review with special relevance to aquatic ecosystems. *Water Research*, v. 18, n. 6, p. 653-694, 1984.

WEPENER, V. et al. Active biomonitoring in freshwater environments: early warning signals from biomarkers in assessing biological effects of diffuse sources of pollutants. *Physics And Chemistry Of The Earth, Parts A/b/c*, v. 30, n. 11-16, p.751-761, 2005.

YAMAMOTO, H., NAKAMURA, Y., NAKAMURA, Y., KITANI, C., IMARI, T., SEKIZAWA, J., TAKAO, Y., YAMASHITA, N., HIRAI, N., ODA, S., TATARAZAKO, N.; Initial ecological risk assessment of eight selected human pharmaceuticals in Japan. *Environmental Sciences*, v. 14, p. 177–193, 2007.

YOSHIDA, C. E.; UIEDA, V. S. Índices bióticos mono e multimétricos de avaliação da qualidade da água em riachos de Mata Atlântica. *Bioikos - Ecologia e Meio Ambiente*, Campinas, v. 27, n. 2, p. 79-88, 2014.

YOSHIMOTO, K.; ECHIZEN, H.; CHIBA, K.; TANI, M.; ISHIZAKI, T. Identification of human CYP isoforms involved in the metabolism of propranolol enantiomers – N-desisopropylation is mediated mainly by CYP1A2. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 39, p. 421-431, 1995.

ZHOU, J. L., ZHANG, Z. L., BANKS, E., GROVER, D., JIANG, J. Q. Pharmaceutical residues in wastewater treatment works effluents and their impact on receiving river water. *Journal of Hazardous Materials*, v.166, n. 2-3, p. 655-661, 2009.

ZHOU, C. et al. Effects of dietary soybean isoflavones on non-specific immune responses and hepatic antioxidant abilities and mRNA expression of two heat shock proteins (HSPs) in juvenile golden pompano *Trachinotus ovatus* under pH stress. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 47, n. 2, p.1043-1053, 2015.

ANEXO A

Pró Reitoria
Pesquisa

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



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "PROPOSIÇÃO DE UTILIZAÇÃO DE UMA ESPÉCIE DE PEIXE TELEÓSTEO AUTÓCTONE BRASILEIRA (*Phalloceros harpagos*) PARA A AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DAS DROGAS TERAPÊUTICAS PARACETAMOL E PROPRANOLOL", protocolado sob o CEUA nº 2730071215, sob a responsabilidade de **Elaine Cristina Mathias Da Silva Zacarin** e equipe; *Prof. Dr. André Cordeiro Alves Dos Santos*; *Prof. Dr. Bruno Nunes*; *Profa. Dra. Monica Jones Costa*; *George Mattox*; *Gregorio Nolzco* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) em reunião de 04/02/2016.

We certify that the proposal "PROPOSAL OF USE OF A BRAZILIAN TELEOST AUTOCTONE FISH (*Phalloceros harpagos*) FOR THE EVALUATION OF ECOTOXICOLOGICAL EFFECTS OF PARACETAMOL AND PROPRANOLOL THERAPEUTIC DRUGS", utilizing 800 Fishes (males and females), protocol number CEUA 2730071215, under the responsibility of **Elaine Cristina Mathias Da Silva Zacarin** and team; *Prof. Dr. André Cordeiro Alves Dos Santos*; *Prof. Dr. Bruno Nunes*; *Profa. Dra. Monica Jones Costa*; *George Mattox*; *Gregorio Nolzco* - 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) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, 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 02/04/2016.

Vigência da Proposta: de 01/2016 a 01/2019

Laboratório: Departamento De Biologia Dbio

Procedência: Não aplicável

Espécie: Peixes

Gênero: Machos e Fêmeas

idade: 3 a 6 meses N: 800

Linhagem: *Phalloceros harpagos*

Peso: 50 a 100 g

Nota: Há mais de 40 anos a contaminação de xenobióticos no meio ambiente tem sido investigada, mas somente na década de 90 iniciaram-se discussões na Europa sobre drogas terapêuticas como contaminantes ambientais. Tem se tornado preocupante o aumento no nível de resíduos de fármacos humanos e veterinários no ambiente aquático, uma vez que os mesmos têm sido encontrados em concentrações significantes nesse ecossistema. Essas substâncias terapêuticas têm sido detectadas na faixa de ng L⁻¹, µg L⁻¹ e mg L⁻¹ em diferentes corpos d'água. No ambiente aquático, o paracetamol tem sido apontado como um fármaco com potencial impacto negativo na biota. Sendo assim, é de extrema importância avaliar seus efeitos em organismos não-alvos no meio ambiente, sendo um fármaco amplamente utilizado como analgésico e antipirético e, portanto, presente em efluentes urbanos. Outro fármaco encontrado em ecossistemas aquáticos é o propranolol, uma droga terapêutica utilizada extensivamente no tratamento de cardiopatias. Sabe-se que a utilização de uma espécie-modelo responsiva a diferentes biomarcadores é apropriada para quantificar efeitos biológicos de múltiplos estressores. Devido à sua relevância biológica e socioeconômica, peixes têm sido amplamente utilizados como bioindicadores de qualidade ambiental. Pertencente à família Poeciliidae, o gênero *Phalloceros*, que abrange peixes pequenos e amplamente distribuídos na América do Sul. No presente estudo, uma espécie nativa brasileira, o guaru (*Phalloceros harpagos*), será utilizada em ensaios de ecotoxicidade aguda (96 horas) em resposta à exposição aos fármacos propranolol e paracetamol.

São Carlos, 04 de fevereiro de 2016

Prof. Dr. Luiz Fernando Takase
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos

ANEXO B

Artigo aceito para publicação na revista “Environmental Science and Pollution Research”

Environmental Science and Pollution Research
<https://doi.org/10.1007/s11356-018-1699-6>

RESEARCH ARTICLE



Assessment of biochemical alterations in the neotropical fish species *Phalloceros harpagos* after acute and chronic exposure to the drugs paracetamol and propranolol

Beatriz V. R. Pereira¹ · Gregorio Nolazco Matus¹ · Monica Jones Costa^{1,2} · André Cordeiro Alves Dos Santos² · Elaine C. M. Silva-Zacarin^{1,2} · Janaina Braga do Carmo^{1,3} · Bruno Nunes⁴

Received: 9 November 2017 / Accepted: 5 March 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

Over time, many pollutants of anthropogenic origin have caused the contamination of aquatic ecosystems. Among several characteristics, these compounds can reach the trophic chain, causing deleterious interactions with the biota. Pharmaceutical substances can be included in this scenario as emerging contaminants that reach the aquatic environment because of direct human and veterinary usage, and release by industrial effluents, as well as through domestic dumping of surplus drugs. The effects of these compounds on exposed organisms have been studied since the 1990s, but ecotoxicological data for such chemicals are still scarce especially concerning aquatic organisms from tropical regions. Paracetamol and propranolol were selected for this study since they are frequently found in surface waters. Paracetamol is a drug used as analgesic and antipyretic, while propranolol, a β -blocker, is used in the treatment of hypertension. The objective of this study was to assess the toxic effects of these substances on the neotropical freshwater fish *Phalloceros harpagos* after acute (96 h) and chronic (28 days) exposures. In order to understand the effects of these drugs on *P. harpagos*, biochemical markers were selected, including the enzymes involved in oxidative stress, xenobiotic metabolism, and neurotransmission (catalase, glutathione-S-transferase, and cholinesterase activities, respectively). After acute exposure, no significant alterations were observed for catalase activity, suggesting the absence of oxidative stress. On the contrary, significant alterations in glutathione-S-transferases activity were described for the higher concentrations of both pharmaceuticals after acute exposure. In addition, acute exposure to paracetamol caused a significant increase of cholinesterase activity. None of the tested pharmaceuticals caused significant changes in catalase or cholinesterase activities after chronic exposure. Glutathione S-transferases activity was significantly increased for propranolol following chronic exposure, indicating the potential involvement of phase II detoxification pathway.

Keywords Oxidative stress · Emerging contaminants · Ecotoxicology · Biomarkers · Tropical species · Pharmaceuticals

APÊNDICE A

Síntese dos resultados obtidos para os biomarcadores. CAT – Catalase; GSTs – Glutathione-S-Transferases; ChEs – Colinesterases; HSP70 – Heat Shock Protein. As concentrações estão representadas da menor para a maior descritas nos materiais e métodos.

Biomarcadores	C1	C2	C3	C4	C5
Exposição Aguda ao Paracetamol					
CAT	-	-	-	-	-
GSTs	-	↑	↑	↑	↑
ChEs	-	↑	-	-	-
HSP70	↑	↑	↑	↑	↑
Exposição Crônica ao Paracetamol					
CAT	-	-	-	-	-
GSTs	-	-	-	-	-
ChEs	-	-	-	-	-
HSP70	↓	↓	↓	↓	↓
Exposição Aguda ao Propranolol					
CAT	-	-	-	-	-
GSTs	-	↑	↑	↑	↑
ChEs	-	-	-	-	-
HSP70	-	↑	↑	-	↑
Exposição Crônica ao Propranolol					
CAT	-	-	-	-	-
GSTs	-	-	↑	↑	-
ChEs	-	-	-	-	-
HSP70	↑	↑	↑	↑	-