

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA HELENA PAMPLONA

Avaliação dos Efeitos Tóxicos da Dipirona Sódica em Peixe *Rhamdia Quelen*:
Estudo Bioquímico, Hematológico e Histopatológico

CURITIBA
2009

JULIANA HELENA PAMPLONA

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS DA DIPIRONA SÓDICA EM PEIXE
RHAMDIA QUELEN: ESTUDO BIOQUÍMICO, HEMATOLÓGICO E
HISTOPATOLÓGICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Departamento de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção de título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Helena Cristina da Silva de Assis
Co-Orientador: Prof^o. Dr. Aleksander Roberto Zampronio

CURITIBA
2009

Ao meu pai Tadeu (*in memoriam*) e à
minha mãe Patrícia, pelos maiores
presentes: amor e base sólida, que me
permitiram e permitirão trilhar meus
caminhos acreditando em quem sou.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, pelo amor, pelos valores e pelo exemplo de força que terei para a vida,

Ao meu pai, por ter permanecido comigo como um guia...pelo auxílio e ensinamentos que, mesmo de longe, nunca falharam,

À minha avó e meus irmãos, pela força, carinho e por serem companheiros íntimos dessa caminhada evolutiva,

Ao Daniel Silva, pelo ser iluminado que é, e por dividir sua luz,

À Tina, pelo compartilhamento de sua experiência acadêmica,

À Professora Helena Cristina da Silva de Assis, pela orientação, confiança, amizade e acolhimento em seu laboratório,

Ao Professor Aleksander Roberto Zampronio, pelos ensinamentos e sugestões,

Ao Professor Luiz Pereira Ramos e Thiago Alessandre, do departamento de Química da UFPR, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e pelos ensinamentos da área,

À Wanessa Ramsdorf e ao laboratório da Professora Margarete Cestari, do departamento de Genética da UFPR, pela prontidão com que sempre me ajudaram, desde a parte experimental ao fornecimento de material,

Ao Professor Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro e a todos do seu laboratório, do departamento de Biologia Celular da UFPR, pela paciência, orientação, e amizade com os quais sempre me receberam em seu laboratório, e possibilitaram a realização da histologia deste trabalho com êxito,

À todos os amigos do laboratório de Toxicologia Ambiental, Zaira, Flávio, Cris, Fábio, Halina, César, Stéfani, cada um com sua participação especial nesse projeto,

À Eliane, pelos ensinamentos de hematologia e práticas laboratoriais, além das boas risadas,

À Professora Flávia Rios do departamento de Biologia Celular da UFPR, pelos ensinamentos de Hematologia e empréstimo de material, sempre com tanta gentileza,

À Professora Cláudia Pimpão e à Luciana Galeb, por sua receptividade e por terem mantido as portas da PUC abertas para nós,

Aos amigos Elisa, Alex, Grace, Caroline, Daniele, Ana Márcia, Clécio, Michele, Maria Cláudia, Jonas, Bruno, Fernanda Barros, Anderson, Fernanda Castelhana e Marina, pelos momentos de filosofia, diversão, pela bela amizade que torna meu caminho mais colorido,

A todos os amigos do departamento de Farmacologia, pelas boas conversas regadas a café; por terem tornado meus momentos no departamento muito agradáveis,

À Universidade Federal do Paraná, ao Setor de Ciências Biológicas e Departamento de Farmacologia, por tornarem possível a colheita de bons frutos com esse trabalho,

Àqueles que de maneira invisível aos meus olhos, mas muito sensível ao meu coração, trabalham a cada momento no auxílio da minha evolução espiritual.

*Se as coisas são inatingíveis... Ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora a
presença distante das estrelas!*

Mário Quintana

RESUMO

Fármacos de uso humano e veterinário, como principais representantes antiinflamatórios, analgésicos, antibióticos, hormônios esteróides vêm sendo detectados em efluentes de estações de tratamento de esgoto, águas superficiais e subterrâneas, solo, sedimentos e alguns organismos em todo mundo. Apesar de haver pouca informação disponível sobre seu destino no ambiente e seus efeitos tóxicos para a fauna e flora, aquática e terrestre, os riscos potenciais associados à sua liberação vêm se tornando alvo de grande preocupação nos dias atuais. Os antiinflamatórios não esteroidais estão entre as classes de fármacos mais amplamente utilizados no mundo inteiro. A dipirona sódica é parte desta classe terapêutica. Este composto utilizado principalmente como analgésico e antitérmico foi proibido em muitos países, por sua associação com diversas discrasias sanguíneas. Entretanto, devido ao seu potente efeito analgésico, disponível formulação parenteral e baixo custo, a dipirona é largamente utilizada na Europa e América do Sul. Esta droga e seus metabólitos vêm sendo encontrados em efluentes e águas superficiais. O objetivo deste trabalho foi avaliar os potenciais efeitos tóxicos da dipirona para o ambiente aquático, a partir de um bioensaio com uma espécie de peixe nativo, *Rhamdia quelen*. Os animais foram expostos a três concentrações de dipirona: 0,5; 5 e 50 µg/L em água filtrada por 15 dias, e parâmetros hematológicos, biomarcador de biotransformação (atividade da Glutathione S-transferase, GST), biomarcadores de estresse oxidativo (lipoperoxidação e atividade da catalase), biomarcador de genotoxicidade (ensaio cometa) e biomarcador morfológico foram avaliados. A atividade da GST esteve diminuída na maior concentração de dipirona. Hematócrito, contagem de eritrócitos e trombócitos diminuíram em relação ao grupo controle. O ensaio cometa mostrou dano de DNA na menor concentração de dipirona. A histologia do rim posterior apontou danos graves no tecido dos animais, como necrose, vacuolização e alteração do parênquima. Esses resultados sugerem que, nas concentrações encontradas no ambiente, a dipirona é potencialmente tóxica aos organismos expostos.

Palavras - chave: Biomarcadores. Fármacos. *Rhamdia quelen*.

ABSTRACT

Pharmaceuticals used in both human and veterinary medicine, such as anti-inflammatory drugs, analgesics, antibiotics, steroid hormones have been detected in sewage-treatment-plant effluents, surface water, seawater, groundwater, soil, sediments and fish all over the world. There is little information about their fate in the environment and their toxic effects to organisms. The potential risks associated to their release are a matter of concern. The use of non-steroidal anti-inflammatory drugs is worldwide widespread. Dipyron is part of this drugs group. This mild analgesic has been banned in many countries since some studies have shown that it can be associated to many blood discrasias. However, due to its potent analgesic effect, availability of parenteral formulation and low cost, dipyron is widely used in Europe and South America. This drug and its metabolites have been detected in effluents and surface water. The aim of this study was to evaluate the potential toxic effects of dipyron sodium to the aquatic environment, using bioassay with a native species of fish, *Rhamdia quelen*. Fish were exposed to three concentrations of dipyron: 0.5, 5 and 50 µg/L in the water for 15 days, and hematological parameters, biotransformation biomarkers (Glutathione S-transferase activity, GST), oxidative stress biomarkers (catalase activity and lipoperoxidation), a genotoxicity biomarker (comet assay) and morphological biomarkers were evaluated. GST activity decreased in the highest concentration in relation to the control group. In addition, hematocrit, red blood cells and thrombocytes counts decreased in all three exposed groups in relation to the control group. The comet assay showed DNA damage at the dipyron lowest concentration. The histological parameters showed important tissue damage in the fish kidneys, such as necrosis. Those results suggest that, at the concentrations found at the environment, the constant exposure of the aquatic organisms to dipyron may have potential toxic effects.

Keywords: Dipyron. Pharmaceuticals. Biomarkers. *Rhamdia quelen*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| FIGURA 1- Cinética Dipirona Sódica em água filtrada..... | 35 |
| FIGURA 2 - Cinética Dipirona Sódica em água filtrada com peixes..... | 35 |
| FIGURA 3 - Cinética Dipirona Sódica em água filtrada com peixes e reposição. | 36 |
| FIGURA 4: Biomarcadores Bioquímicos em <i>Rhamdia quelen</i> | 37 |
| FIGURA 5: Nucleóides de eritrócitos de <i>Rhamdia quelen</i> visualizados no ensaio Cometa..... | 38 |
| FIGURA 6 - Escores de dano genético obtidos através do Ensaio Cometa em eritrócitos de <i>Rhamdia quelen</i> | 39 |
| FIGURA 7 - Cortes histológicos de rim posterior de <i>Rhamdia quelen</i> , grupo controle..... | 42 |
| FIGURA 8 - Cortes histológicos de rim posterior de <i>Rhamdia quelen</i> , grupo exposto à concentração de 0,5 µg/L de dipirona..... | 43 |
| FIGURA 9 - Cortes histológicos de rim posterior de <i>Rhamdia quelen</i> , grupo exposto à concentração de 5 µg/L de dipirona | 44 |
| FIGURA 10 - Cortes histológicos de rim posterior de <i>Rhamdia quelen</i> , grupo exposto à concentração de 50 µg/L de dipirona..... | 45 |
| FIGURA 11 - Contagem de novos néfrons..... | 46 |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 11 |
| 2. ESTADO-DA-ARTE | 12 |
| 2.1 FÁRMACOS EM MATRIZES AMBIENTAIS | 12 |
| 2.2 DAPIRONA SÓDICA | 17 |
| 2.3 BIOMARCADORES | 19 |
| 2.4 ANIMAL DE ESTUDO | 26 |
| 3. OBJETIVOS | 27 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL | 27 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 27 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 28 |
| 4.1 ANÁLISE QUÍMICA | 28 |
| 4.2 ANIMAIS E DESENHO EXPERIMENTAL | 29 |
| 4.3 BIOMARCADORES HEMATOLÓGICOS | 29 |
| 4.4 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS | 30 |
| 4.4.1 Preparo das amostras | 30 |
| 4.4.2 Glutathione S-transferase..... | 30 |
| 4.4.3 Catalase | 31 |
| 4.4.4 LPO | 31 |
| 4.4.5 Concentração protéica | 31 |
| 4.5 BIOMARCADORES GENÉTICOS | 32 |
| 4.5.1. Ensaio Cometa..... | 32 |
| 4.6. BIOMARCADOR MORFOLÓGICO – HISTOPATOLOGIA..... | 33 |
| 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 33 |
| 5. RESULTADOS | 34 |
| 5.1. ANÁLISE QUÍMICA..... | 34 |
| 5.2. BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS | 36 |
| 5.3. BIOMARCADOR GENÉTICO..... | 38 |
| 5.4. HEMATOLOGIA | 39 |
| 5.5. BIOMARCADORES MORFOLOGICOS | 41 |
| 6. DISCUSSÃO | 47 |
| 7. CONCLUSÕES | 56 |
| REFERÊNCIAS | 57 |

1. INTRODUÇÃO

A ocorrência de fármacos de uso humano e veterinário vem sendo detectada em águas superficiais, sedimentos e esgotos domésticos no mundo todo. São representados por diversas substâncias, como antiinflamatórios, analgésicos, antibióticos, hormônios esteróides, compostos neuroativos, etc. Embora tenham sido submetidos a estudos farmacocinéticos, pouca informação se tem sobre o seu destino no ambiente e seus efeitos tóxicos em diversos organismos da fauna e flora aquáticas, certamente afetados (STUMPF *et al.*, 1999; FENT *et al.* 2006).

Os riscos potenciais associados a liberação desses produtos vêm se tornando alvo de grande preocupação. Os fármacos e seus metabólitos alcançam o meio ambiente via excreção humana ou depósito em águas superficiais e devido à eliminação incompleta em estações de tratamento de água, alcançam as águas superficiais (NIKOLAOU *et al.*, 2007). Alguns podem ser degradados completa ou parcialmente enquanto outros são persistentes (FENT *et al.*, 2006).

Os antiinflamatórios não-esteroidais (AINE's) fazem parte dos medicamentos mais utilizados no mundo. Muitos, como ibuprofeno, diclofenaco, acetaminofeno (Gómez *et al.*, 2007) são encontrados em muitos corpos d'água, além do ácido salicílico (derivado do ácido acetilsalicílico) e naproxeno (Fent *et al.*, 2006). A dipirona sódica pertence à família dos antiinflamatórios não-esteroidais e é utilizada como antipirético e analgésico. Sua utilização foi proibida em muitos países por estar associada a diversas discrasias sanguíneas (GOMEZ *et al.* 2007). Porém, devido ao seu forte efeito analgésico, formulação parenteral e baixo custo, é ainda extremamente utilizada na Europa (Alemanha, Itália e Espanha) e América do Sul, e vendida sem prescrição médica no Brasil e na Turquia.

Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar os potenciais efeitos tóxicos da dipirona sódica para o ambiente aquático, em um bioensaio com um peixe de distribuição neotropical, *Rhamdia quelen* (jundiá) como modelo animal. Para tanto, foram avaliados diversos parâmetros hematológicos, além de biomarcadores de biotransformação, como a atividade da enzima GST (glutathioneS-transferase), biomarcadores de estresse oxidativo como lipoperoxidação e atividade da catalase, biomarcadores de genotoxicidade, como o ensaio cometa e biomarcadores morfológicos (avaliação histopatológica). Os dados obtidos poderão servir de advertência nesta recente problemática dos fármacos em matrizes ambientais, e

contribuir para a elucidação de algumas questões relacionadas aos riscos potenciais de sua liberação no ambiente.

2. ESTADO-DA-ARTE

2.1 FÁRMACOS EM MATRIZES AMBIENTAIS

Fármacos representam uma classe de contaminantes ambientais emergentes que vêm sendo extensiva e crescentemente utilizada na medicina humana e veterinária. Estes agentes químicos têm um modo de ação específico e muitos deles, por sua persistência no organismo, possuem características que fazem com que sejam avaliados por seus efeitos potenciais na flora e fauna aquáticas (FENT *et al.* 2006). Na União Européia, aproximadamente 3000 substâncias diferentes são usadas na medicina humana, como analgésicos e antiinflamatórios, contraceptivos, antibióticos, beta-bloqueadores, reguladores lipídicos, compostos neuroativos e outros. Ainda que estas drogas aprovadas pelo governo tenham sido submetidas a estudos farmacocinéticos, há uma considerável falta de informação sobre o seu destino no ambiente (STUMPF *et al.*, 1999; FENT *et al.* 2006).

Enquanto outros poluentes conhecidos por sua toxicidade crônica ou persistência no ambiente, os *Pharmaceutical and Personal Care Products* (PPCPs) não necessitam ser persistentes para apresentarem toxicidade, tendo em vista que são liberados de maneira contínua para os ecossistemas aquáticos (MUÑOZ *et al.*, 2008). Ainda assim, a persistência de alguns compostos em organismos pode ser demonstrada, como o triclosan, antibacteriano de ampla utilização, detectado em plasma de golfinhos *Tursiops truncatus* (FAIR *et al.*, 2009).

No mundo todo tem sido reportada a ocorrência de fármacos como antibióticos, hormônios, anestésicos, antilipêmicos, antidepressivos, antiinflamatórios, dentre outros, em esgotos domésticos, águas superficiais e sedimentos. O Brasil pertence a um dos maiores consumidores de fármacos do mundo, juntamente com Estados Unidos, França e Alemanha (STUMPF *et al.*, 1999). Ternes *et al.* (1999) encontraram estrogênios naturais e contraceptivos sintéticos na estação de tratamento de efluentes (ETE) da Penha, Rio de Janeiro. Em rios no Estado do Rio de Janeiro, Stumpf *et al.* (1999) detectaram a presença de

resíduos de drogas como diclofenaco, ácido clofíbrico e naproxeno. A presença dessas substâncias em águas naturais está predominantemente correlacionada à poluição de águas residuais municipais.

Compostos solúveis em água podem contaminar o lençol freático pela sua mobilidade, enquanto compostos lipofílicos podem acumular-se nos sedimentos e solo (ISIDORI *et al.*, 2005). Os fármacos e seus metabólitos podem adentrar o meio ambiente via excreção ou depósito em águas residuais (NIKOLAOU *et al.*, 2007). Devido a uma incompleta eliminação em estações de tratamento de água, resíduos de alguns compostos orgânicos tóxicos, incluindo produtos farmacêuticos, são também encontrados em águas superficiais (FENT *et al.*, 2006).

Águas residuais municipais e de hospitais são a principal fonte de compostos farmacêuticos de uso humano, com contribuições de fábricas e lixiviado de aterros, além da disposição de fármacos não utilizados no ambiente (NIKOLAOU *et al.*, 2006). A aplicação no campo, seguida de percolação e aplicação direta na aquicultura, são a principal fonte de fármacos de uso veterinário no ambiente (FENT *et al.*, 2006). Ainda assim, atualmente sabe-se que os pacientes são os principais responsáveis pela liberação de fármacos para o ambiente (ROIG *et al.*, 2009)

De acordo com Richardson *et al.* (1985, citado por Bila e Dezotti, 2003), nas ETEs há três destinos possíveis para qualquer fármaco individual:

- 1- ser biodegradável, ou seja, mineralizado a gás carbônico e água, como por exemplo, o ácido acetilsalicílico;
- 2- passar por algum processo metabólico ou ser degradado parcialmente, como as penicilinas e
- 3- ser persistente como o antilipêmico clofibrato.

Os resíduos hospitalares são causadores de grande preocupação para a questão ambiental e de saúde pública. Desinfetantes, fármacos, radionuclídeos e solventes combinam-se com os efluentes hospitalares e muitas vezes, alcançam a rede de esgoto municipal (EMMANUEL *et al.*, 2009).

Os riscos potenciais associados à liberação de fármacos no ambiente vêm se tornando alvo de preocupação crescente. Tal preocupação deve-se à ampla detecção desses compostos em amostras no ambiente como consequência de um aperfeiçoamento dos métodos analíticos e pesquisas de campo direcionadas (DAUGHTON, 2001). Muitas substâncias sofrem transformações no corpo humano,

o que resulta numa liberação significativa de vários metabólitos no ambiente aquático (NIKOLAOU *et al.*, 2007).

Os efeitos toxicológicos de drogas nos diferentes níveis da hierarquia biológica, ainda não são bem conhecidos. Apesar de a exposição a estas substâncias se dar num nível contínuo e em baixas concentrações, a maior parte dos dados publicados sobre toxicidade aquática e avaliações de risco para fármacos são baseados em estudos agudos de curta duração (DAUGHTON e TERNES, 1999; ISIDORI *et al.*, 2004). Poucos casos dos efeitos adversos sérios dos PPCPs em organismos não-alvo vêm sendo relatados, por exemplo, a feminização de peixes causada pelo etinilestradiol (JOBILING *et al.*, 1998; GROSS-SOROKIN *et al.*, 2006) e o sério decréscimo na população de abutres causada por falência renal decorrente da exposição ao diclofenaco (OAKS *et al.*, 2004; SWAN *et al.*, 2006, NAIDOO *et al.*, 2009).

Entretanto, diferentes investigações começam a ser realizadas. Winder *et al.* (2009) investigaram os efeitos da fluoxetina e encontraram alterações nos níveis de neurotransmissores de *Cyprinodon variegatus* expostos ao composto, que pode implicar em alterações comportamentais e assim, respostas ecológicas comprometidas.

Biomarcadores vêm sendo empregados na avaliação dos efeitos destas substâncias em alguns organismos. Martín-Díaz *et al.* (2009) utilizaram diversos biomarcadores de estresse oxidativo e genotóxicos no estudo dos efeitos toxicológicos de alguns contaminantes ambientais conhecidos, como carbamazepina, cafeína e metotrexato). Plantas vêm sendo utilizadas como organismo importante na avaliação de risco ecológico de diversas substâncias, que adentram os ecossistemas agrícolas (AN *et al.*, 2008).

Preocupações com os possíveis efeitos ambientais pelos baixos, porém contínuos, níveis de exposição a fármacos humanos levaram a Agência Ambiental da Inglaterra e País de Gales a desenvolver e implementar procedimentos de testes de toxicidade crônica usando organismos aquáticos. Esses dados são encontrados no documento intitulado *Position on Pharmaceuticals in the Aquatic Environment* (Environment Agency of England and Wales, 2003).

Na União Européia, testes de toxicidade para registro de fármacos foram inicialmente requeridos pela Diretiva 92/18 EEC e pela correspondente *Note for Guidance* (EMEA, 1998). De acordo com a Diretiva 2001/83/EC, a solicitação para

registro de um novo produto medicinal para tratamento de humanos deve ser acompanhada de avaliação de risco ambiental (EMEA, 2006). A agência americana *Food and Drug Administration* (FDA) exige um relatório de avaliação ambiental quando o ingrediente ativo é introduzido no ambiente aquático em concentrações maiores ou iguais a 1 µg/L (FDA-CDER, 1998).

Os hormônios esteróides têm sido amplamente relatados na literatura especializada, a exemplo do esteróide sintético 17 α -etinilestradiol (EE2), contido em pílulas contraceptivas e que causam efeitos estrogênicos em concentrações extremamente baixas, porém relevantes (FENT *et al.*, 2006). Segner *et al.* (2003) demonstraram que compostos com atividade estrogênica, como EE2, têm a capacidade de alterar, em baixas concentrações, o desenvolvimento e reprodução de peixe *Danio rerio*, bem como outros parâmetros de desenvolvimento e reprodução de invertebrados aquáticos. Outros estrógenos e o andrógeno metiltestosterona também causam efeitos em baixas concentrações. Na Baía de Xiamen, China, foram detectados 7 compostos estrogênicos, contaminação esta que provoca comprovadamente risco para os organismos bênticos (ZHANG *et al.*, 2009).

Isidori *et al.* (2005) avaliaram os efeitos tóxicos e genotóxicos de antibióticos amplamente utilizados – eritromicina, oxitetraciclina, sulfametoxazol, ofloxacina, lincomicina e claritromicina - em organismos não-alvo e encontraram uma toxicidade crônica mais elevada que a toxicidade aguda. Alguns destes compostos demonstraram ser genotóxicos, outros mutagênicos.

A principal preocupação com antibióticos diz respeito ao desenvolvimento de resistência antimicrobiana e o seu efeito na saúde pública. Ash *et al.* (2002) encontraram evidência de resistência a alguns antibióticos em culturas de bactérias tratadas com amostras de água coletadas de rios dos Estados Unidos. Na Austrália, 27 antibióticos foram detectados em efluentes de hospitais, estações de tratamento de esgotos e rios (WATKINSON *et al.*, 2009). Alguns antibióticos têm sua toxicidade comprovada em testes toxicológicos com *Daphnia magna*, em estudos onde os autores concluem que, considerando que estas substâncias são administradas em altas doses e excretados na forma inalterada, mais avaliações do seu impacto para os ecossistemas aquáticos são providenciais (LIGUORO *et al.*, 2009).

Os fármacos antineoplásicos são quimioterápicos utilizados no tratamento de algumas patologias, dentre elas o câncer, cujo emprego vem aumentando devido ao crescente número de casos de neoplasias (MARTINS *et al.*, 2004). São encontrados

principalmente em efluentes de hospitais, na ordem de $\mu\text{g/L}$ e em efluentes municipais na ordem de ng/L , como a ciclofosfamida e iofosfamida, que apresentam potencial mutagênico e carcinogênico (STEGGER-HARTMANN *et al.*, 1996). Roberts e Thomas (2006) reportaram a presença do tamoxifeno em águas residuais e estuarinas no Reino Unido, por não ter sido degradado nas estações de tratamento. Esta droga é amplamente utilizada na terapia contra o câncer de mama e apresenta atividade antiestrogênica. Os efeitos do tamoxifeno foram estudados no desenvolvimento e reprodução de peixes por Sun *et al.* (2007). Esta substância alterou a capacidade reprodutiva, os níveis de vitelogenina em ambos os sexos além de causar efeitos na prole.

Os beta-bloqueadores como metoprolol, compostos neuroativos como carbamazepina, e agentes reguladores lipídicos como ácido clofíbrico são amplamente encontrados em águas residuais, de superfície, subterrâneas e até de consumo humano (TERNES, 1999; STUMPF *et al.*, 1999).

Os fibratos constituem uma classe de medicamentos que baixam os níveis de triglicerídeos sanguíneos. Um exemplo desta classe de medicamentos, o bezafibrato, foi encontrado no Brasil em concentrações superiores a $1,2\mu\text{g/L}$, bem como em outros países e tidos como persistentes, por Stumpf *et al.*, (1999). Em uma avaliação de risco para os principais fibratos encontrados no ambiente e os produtos de sua fotodegradação Isidori, *et al.* (2007) não encontraram efeitos agudos adversos; porém, atentam para a ameaça que estas drogas representam ao DNA.

Os antiinflamatórios não-esteroidais (AINE's) fazem parte dos medicamentos mais utilizados no mundo. Muitos, como ibuprofeno, diclofenaco, acetaminofeno (GÓMEZ *et al.*, 2007) são encontrados em muitos corpos d'água, além do ácido salicílico (derivado do ácido acetilsalicílico) e naproxeno (Fent *et al.*, 2006).

Um estudo dos efeitos ultra-estruturais da carbamazepina, ácido clofíbrico, metoprolol e diclofenaco em fígado, rins e brânquias de peixes mostrou que a qualidade e severidade das lesões nesses órgãos foram poluente-específicas. Ao comparar-se as LOECs (menor concentração em que se observa um efeito) para estes efeitos crônicos com as concentrações máximas ambientais encontradas em águas de superfície, fica claro que esses fármacos de uso humano têm efeitos em organismos não-alvo em concentrações baixas e ambientalmente relevantes. Ainda, aponta-se para a necessidade de mais testes crônicos, e não somente os estudos

de toxicidade aguda tradicionais, na avaliação de risco para fármacos (TRIEBSKORN *et al.*, 2007).

2.2 DIPIRONA SÓDICA

A dipirona sódica, ou metamizol sódico, pertencente à família dos AINE's, é utilizada como antiinflamatório, antipirético e analgésico. A dipirona é uma pró-droga e, após ingestão oral, é rapidamente hidrolizada em seu principal metabólito, 4-metilaminoantipirina (4-MAA), a partir do qual muitos outros são produzidos por reações enzimáticas (ERGÜN *et al.*, 2004). Quando administrada por via intravenosa, a hidrólise não é tão rápida e esse fármaco pode ser detectado na forma original. Na hidrólise, a dipirona perde seu grupamento sulfônico funcional. Ela é provavelmente metabolizada por enzimas do complexo do citocromo p-450, CYP3A-4 (GEISLINGER *et al.*, 1996) e então por N-acetiltransferases (PIERSON e WIENKERS, 2008).

O uso em hospitais é de grande relevância: a dipirona é a droga presente em maiores concentrações em águas residuais de efluentes de hospitais. Em estudo em uma estação de tratamento de efluentes no sul da Espanha, o fármaco esteve presente na concentração de 4,9 µg/L (GOMEZ *et al.*, 2007). Com exceção destes dados, são escassas as informações sobre a concentração de dipirona em estações de tratamento. Entretanto, a presença de alguns metabólitos como a N-acetil-4-aminoantipirina (AAA) e N-formil-4-aminoantipirina (FAA) foram relatados em uma estação de tratamento na Alemanha e no rio Elbe em altas concentrações, de 20 a 939 ng/L (WEIGEL *et al.*, 2004).

Galati *et al.* (2002) hipotetizaram que antiinflamatórios não-esteroidais, incluindo a dipirona, são oxidados por peroxidases para formar radicais prooxidantes, que oxidam glutatona, ascorbato ou NADH, gerando, assim, espécies reativas de oxigênio. Assim, a toxicidade gastrointestinal e a injúria de medula óssea e fígado podem ser iniciadas por esses radicais ou estresse oxidativo causados pelo metabolismo dessas drogas, catalisados pela peroxidase.

A agranulocitose induzida por medicamentos é uma reação a estas drogas idiossincrática de base imunológica (HEDENMALM e SPIGSET, 2002). É uma reação adversa grave que pode ser produzida por inúmeros fármacos

(BRANCHERO e GIACHETTO, 2002), incluindo dipirona (IBAÑEZ *et al.*, 2002). A definição pode variar de acordo com o autor; um estudo multidisciplinar do tipo caso-controle em Boston (1980-1984) definiu agranulocitose como uma contagem de granulócitos inferior a 500 elementos/mm³ e/ou uma contagem de leucócitos inferior ou igual a 3000 elementos/mm³ em dois hemogramas consecutivos de pacientes maiores de dois anos. Se excluem doenças sistêmicas auto-imunes, neoplasias e tratamento com radioquimioterapia. (BRANCHERO e GIACHETTO, 2002).

São escassas as informações sobre a toxicidade da dipirona em organismos aquáticos. Arkhipchuk *et al.* (2004) realizaram uma avaliação da toxicidade, genotoxicidade e citotoxicidade do metamizol sódico e ácido acetilsalicílico em organismos-teste pertencentes a diferentes grupos sistemáticos: plantas (*Allium cepa*), invertebrados (*Ceriodaphnia affinis*, *Hydra attenuata*) e vertebrados (*Carassius auratus gibelio*). A dipirona apresentou toxicidade aguda, 100% de mortalidade em 24 horas de observação para todos os organismos e danos estruturais nucleares relevantes, como observado através de biomarcadores genéticos utilizados. No estudo, a avaliação dos efeitos genotóxicos em células de peixe não foi possível pela rápida mortalidade das mesmas na presença da droga. O crescimento da raiz da planta estudada foi completamente inibido (índice mitótico igual a zero).

Há também a hipótese de que a dipirona sofra transformação endógena ao composto nitroso (NOC) denominado N-nitrosodimetilamina (NDMA), considerado genotóxico (Brambilla e Martelli, 2007). Os compostos nitrosos são N-nitrosaminas e N-nitrosamidas, produtos da reação do nitrito com aminas secundárias e amidas N-substituídas sob condições ácidas. A maioria destes compostos é carcinogênica (MIRVISH, 1994). A dipirona é considerada por alguns autores como uma droga causadora de dano ao DNA (Alexander *et al.*, 2001). Segundo Brambilla e Martelli (2009) NDMA e outras nitrosaminas podem ser ativadas a intermediários que se ligam ao DNA via transformação P-450 dependente a radicais α -nitrosaminos, que podem se combinar com HO \cdot para formar α -hidroxinitrosaminas ou se decompor em óxido nítrico e N-metilformaldimina. Este composto, NDMA é inclusive utilizado como controle positivo no ensaio cometa, por ser um agente indutor de quebras da molécula de DNA (Wilson *et al.*, 1998) A dipirona mostrou-se mutagênica em várias linhagens de *Salmonella*, além de induzir um aumento de trocas entre cromátides-

irmãs (indicador de possíveis lesões na molécula de DNA) em células de medula óssea de camundongo (GIRI *et al.*, 1998).

2.3 BIOMARCADORES

Diversos estudos empregam biomarcadores na avaliação dos efeitos de substâncias tóxicas no ambiente aquático. Biomarcadores são definidos como alterações a respostas biológicas, que passam de respostas moleculares, celulares, fisiológicas até mudanças comportamentais, e que podem ser relacionadas à exposição ou efeitos tóxicos de agentes químicos ambientais (PEAKALL, 1994).

Alterações nos níveis e atividade de enzimas de biotransformação são consideradas muito sensíveis e são empregadas como biomarcadores de biotransformação. De acordo com Van der Oost (2003) dois principais tipos de enzimas envolvidas na biotransformação de xenobióticos são as de fase I e de fase II. As enzimas do citocromo P450 (ou CYP450) são proteínas do grupo heme, pertencentes à fase I do metabolismo que oxidam, hidrolizam ou reduzem, não apenas xenobióticos, mas também substâncias endógenas, que passam de compostos lipofílicos a hidrofílicos.

Estas reações são o primeiro passo para excreção e detoxificação, mas muitas vezes liberam intermediários reativos e tóxicos. Estas enzimas localizam-se, principalmente, no retículo endoplasmático liso e mitocôndrias de células hepáticas, renais, cérebro e outros órgãos. As reações catalisadas por essas enzimas são geralmente referidas como oxidase de função mista (MFO) ou reações de monooxigenases, (BUCELLI e FENT, 1995). A oxidação pelo sistema da monooxigenase P450 exige a presença da substância (substrato), da enzima P450, de oxigênio molecular, NADPH e uma flavoproteína (NADPH-P450 redutase). A indução de isoenzimas P450 é uma sensível resposta à exposição de organismos a certos tipos de compostos antropogênicos.

As glutathione S-transferases (GST) são uma superfamília de enzimas diméricas, multifuncionais e primariamente solúveis, que catalisam a conjugação de compostos eletrofílicos (ou metabólitos de fase I) com a glutathione reduzida (GSH). Essa reação faz parte do metabolismo de fase II, que envolve a conjugação de um composto xenobiótico ou seu metabólito a um ligante endógeno. As enzimas dessa

fase têm um importante papel na homeostase, detoxificação e eliminação de diversas substâncias exógenas e os níveis de cofatores de fase II podem ser afetados após exposição a poluentes ambientais.

Além de seu papel no transporte intracelular e biossíntese de leucotrienos e prostaglandinas, o papel crítico das GSTs é a defesa do DNA e lipídios contra o dano oxidativo e produtos peroxidativos (VAN DER OOST, 2003). Ligando-se covalentemente a compostos eletrofílicos, GSTs reduzem a probabilidade desses compostos se ligarem a outras moléculas celulares, como o DNA (HUGGETT *et al.*, 1992). Assim, a toxicidade de muitos compostos exógenos pode ser modulada pela indução da atividade da GST (VAN DER OOST; 2003).

Algumas isoformas de GST podem também combater o dano por estresse oxidativo pela atividade peroxidase dependente de GSH, enquanto outras isoformas conjugam aldeídos α - β insaturados reativos produzidos durante peroxidação de lipídios de membrana (LIEBLER e REED, 1997; TRUTE *et al.*, 2007).

A GST parece estar presente em muitas espécies animais, senão todas. O fígado é a maior fonte de GST em vertebrados. Apesar de algumas isoformas microsossomais de GST terem sido descritas, a atividade de GST é principalmente localizada no citosol (CNUBBEN *et al.*, 2001).

O aumento na atividade da GST hepática foi relatada em muitos estudos após exposição de peixes a fungicidas, formulação comercial de glifosato, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), bifenilas policloradas (PCBs), organoclorados (OCP) (ALMLI *et al.*, 2002; BAGNYUKOVA *et al.*, 2005; YING *et al.*, 2007; LU; *et al.*, 2008; CONTARDO-JARA *et al.*, 2009), mas a maioria dos estudos não mostraram nenhuma alteração significativa. Por outro lado, redução significativa da atividade da GST também foi observada em peixes expostos a dibenzodioxinas policloradas, pesticidas ou hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, e em algumas espécies de peixes em ambientes poluídos (VAN DER OOST *et al.*, 2003). Pimpão *et al.* (2006) encontraram diminuída a atividade da GST em peixes expostos à deltametrina.

O destino da maioria do oxigênio molecular consumido pelos animais é a redução à água ligada à oxidação de alimentos e produção de energia. A redução parcial resulta na liberação de EROs - espécies reativas de oxigênio. Os radicais livres são definidos como moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados. As formas de EROs incluem radical ânion superóxido (O_2^-), radical

hidroxil (OH), radical peroxil (RO₂), radical alcóxil (RO) e radical hidroperóxil (HO₂), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (NORDBERG e ARNÉR, 2001; LIVINGSTONE, 2001). De 1 a 3% do O₂ consumido é convertido em EROs, por diversas fontes e processos endógenos, incluindo certas enzimas, auto-oxidação e transporte de elétrons da membrana nuclear; porém, essa taxa de produção pode ser alterada pela presença de diversos xenobióticos.

Esses compostos são detoxificados dos organismos por defesas antioxidantes, que podem ser hidrossolúveis (ex. vitamina C e glutatona reduzida), lipossolúveis (ex. vitaminas A e E) e enzimas antioxidantes específicas (ex. superóxido-dismutase, catalase e glutatona-peroxidase). Uma prevalência de processos pró-oxidativos leva a um aumento de danos oxidativos, situação esta denominada estresse oxidativo. Dentre esses danos estão a lipoperoxidação, oxidação de proteínas e o dano ao DNA (LIVINGSTONE, 2001). Diversas moléculas podem alterar o balanço pró-oxidantes/antioxidantes, tornando o organismo suscetível ao estresse oxidativo (MONTSERRAT *et al.*, 2007). As medidas em sistemas biológicos expostos a poluentes, geralmente detectam decréscimo nos níveis de enzimas antioxidantes, mas alguns aumentos podem ocorrer sob certas condições (LIVINGSTONE, 2001; VALAVANIDIS *et al.*, 2006).

O processo de lipoperoxidação (LPO), ou oxidação de lipídios tem grande potencial como biomarcador de estresse oxidativo. Ele ocorre por uma cadeia de reações, iniciada pela abstração de um átomo de hidrogênio de um grupo metil (-CH₂) de um ácido graxo polinsaturado. Oxiradicais, particularmente ·OH, podem realizar essa abstração (VAN DER OOST, 2003). A peroxidação lipídica ocorre da seguinte forma:



LH = lipídeo polinsaturado

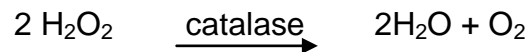
Propagação da lipoperoxidação:



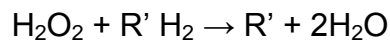
O término da peroxidação lipídica é o resultado da interação de radicais lipídicos e/ou formação de espécies não radicais por radicais lipídicos peroxil. O

LOOH resultante pode facilmente se decompor em espécies reativas, sendo muitos desses agentes tóxicos e mutagênicos. As membranas lipídicas peroxidadas tornam-se rígidas e perdem sua permeabilidade e integridade (SEVANIAN e MCLEOD, 1997; VALAVANIDIS *et al.*, 2006).

As catalases (CAT) são enzimas que catalisam a eliminação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), liberando como produtos água e oxigênio molecular, pela seguinte reação:



As catalases também atuam na detoxificação de diferentes substratos, como fenóis e álcoois, via redução acoplada de peróxido de hidrogênio:



Um dos papéis antioxidantes da catalase é reduzir o risco da formação do radical hidroxil a partir da H_2O_2 via reação de Fenton, catalizada por íons de cobre e ferro (NORDBERG e ARNÉR, 2001).

São também utilizadas como biomarcadores, embora estejam localizadas nos peroxissomos de muitas células e envolvidas no metabolismo de ácidos graxos, mudanças na sua atividade possam ser difíceis de interpretar (FASHIMI e CAJARAVILLE, 1995; VAN DER OOST, 2003).

Uma extensa gama de xenobióticos, incluindo drogas hipolipídicas, herbicidas, inseticidas, lubrificantes, etc, são conhecidos como indutores da proliferação de peroxissomos no fígado de mamíferos. Entretanto, a proliferação de peroxissomos pode mostrar diferentes efeitos sobre cada enzima encontrada nessa organela, podendo suas atividades estar ou não elevadas (FASHIMI; CAJARAVILLE, 1995).

Substâncias genotóxicas produzem modificações químicas ou físicas do DNA, comumente medidas como adutos ou quebras de DNA, respectivamente (NACCI; *et al.*, 1996). A exposição de um organismo a substâncias genotóxicas pode induzir uma cascata de eventos. Inicialmente pode ocorrer uma alteração estrutural do DNA, e conseqüentemente, o processamento e expressão do dano do DNA através de produtos modificados. Dessa maneira, pode-se desencadear conseqüências biológicas em células, órgãos, organismo e finalmente em nível de comunidade e população (LEE e STEINERT, 2003; VAN DER OOST *et al.*, 2003).

Exposição de organismos aquáticos a substâncias e processos genotóxicos, podem produzir efeitos como câncer, teratogênese e embriotoxicidade (NACCI *et al.*, 1996; VALKO *et al.*, 2006). O dano de DNA é constantemente induzido e reparado em animais, permitindo um equilíbrio. Assim, a observação de danos genéticos indica que tal equilíbrio foi alterado. Diversas substâncias foram relacionadas a danos em DNA de organismos aquáticos, tecidos isolados ou tipos celulares, podendo ser agrupados em quatro classes (LEE e STEINERT, 2003):

- 1) que agem diretamente no DNA
- 2) cujos metabólitos causam danos no DNA
- 3) que causam produção de EROs que podem danificar o DNA.
- 4) que inibem a síntese e reparo do DNA.

Muitas substâncias como bifenilas policloradas, PAHs, pentaclorfenol, deltametrina, monocrotofos e a formulação comercial de glifosato, tem sido relacionadas com genotoxicidade em animais aquáticos (PEITL JR *et al.*, 1996; LEE e STEINERT, 2003; ANSARI *et al.*, 2008; POLETTA *et al.*, 2008).

A detecção e quantificação de vários eventos nessas seqüências podem ser empregadas como biomarcadores de exposição e efeito, como o teste do micronúcleo e o ensaio cometa (VAN DER OOST, 2003).

O ensaio cometa, também conhecido como SCGE (Single Cell Gel Eletrophoresis) vem sendo proposto para estudos de toxicogenética devido a suas peculiaridades e vantagens quando comparado a outros testes para detecção de substâncias genotóxicas, pois se mostrou rápido e sensível para detectar quebras de DNA e locais lábeis por álcalis (LEE e STEINERT, 2003). O teste de cometa não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação (GONTIJO e TICE, 2003).

O princípio desta técnica se baseia no fato de que o DNA da célula que não tiver dano migrará em conjunto formando um círculo. Caso ocorra dano ao DNA, serão formados fragmentos de diversos tamanhos. Os fragmentos menores tendem a migrar mais rapidamente do que os fragmentos maiores. Ocorrendo um dano muito intenso, em uma célula, muitos fragmentos de diversos tamanhos serão formados e migrarão em velocidades diferentes, formando-se então uma figura semelhante a um cometa.

Muitos parâmetros hematológicos em peixes são biomarcadores de efeito potenciais, como enzimas, hematócrito, hemoglobina, proteínas e glicose, que

podem ser sensíveis a certos poluentes (VAN DER OOST, 2003). Os métodos utilizados em hematologia incluem testes de avaliação de eritrócitos, leucócitos e trombócitos. A avaliação de eritrócitos inclui contagem total de eritrócitos, concentração de hemoglobina. A avaliação de leucócitos inclui a contagem total e diferencial. A avaliação adequada de vários parâmetros do hemograma depende de intervalos de referência, diferentes para cada espécie e escassos para muitas delas. Ainda assim, a avaliação desses parâmetros hematológicos pode fornecer importantes inferências sobre o processo de patologia que afeta o peixe estudado (STOSKOPF, 1988).

Os estudos hematológicos das diferentes espécies de peixe são de interesse ecológico e fisiológico uma vez que auxiliam na compreensão da relação entre as características sanguíneas, a filogenia, a atividade física, o habitat e a adaptabilidade dos peixes no ambiente. Os valores hematológicos podem ser influenciados não apenas pelo crescimento, mas também pelas condições ecofisiológicas (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004). Assim, a fisiologia do sangue é utilizada cada vez mais freqüentemente como um índice do status da saúde geral de diversas espécies de peixes. Alterações nas variáveis hematológicas são usadas na determinação de efeitos de estressores externos (KORI-SIAKPERE *et al.*, 2006). Muitos parâmetros sanguíneos podem estar alterados após exposição a certos poluentes, como o cádmio (KORI-SIAKPERE *et al.*, 2006) e o mercúrio (ELAHEE e BHAGWANT, 2007), além de outros fatores, como parasitas (SINDERMAN, 2004) e privação de alimentação (RIOS *et al.*, 2005).

Deve-se tomar cuidado na análise hematológica, pois vários fatores podem ser causadores de alterações, como idade, gênero, qualidade da água e a estação do ano. Ainda, a captura, manipulação e até mesmo anestésicos empregados na obtenção de uma amostra de sangue de peixes podem afetar profundamente o hemograma (BOLASINA, 2006).

Desordens hematológicas são marcadas por aberrações na estrutura e função das células sanguíneas ou mecanismos de coagulação. Ainda que outras doenças sejam refletidas pelo sangue, a anomalia de eritrócitos, leucócitos, trombócitos e fatores de coagulação são consideradas desordens sanguíneas primárias (CLAUSS *et al.*, 2008).

Biomarcadores morfológicos/histopatológicos são lesões que sinalizam efeitos de exposições, anteriores ou em andamento, a um ou mais agentes tóxicos.

(HUGGETT *et al.*, 1992). Mudanças teciduais agudas são vistas quando os níveis de contaminantes são suficientemente altos. Quando a concentração do agente tóxico é suficiente para gerar apenas injúria celular, mas não a morte, mudanças subletais (adaptativas) podem ser observadas nas células afetadas – é o caso das exposições crônicas (VAN DER OOST, 2003).

A infiltração leucocitária representa um sinal de processo inflamatório, sendo associado a múltiplas causas (BERNET *et al.*, 1999). Centros de melanomacrófagos (CMM), também conhecidos como agregados de macrófagos, são grupos de células pigmentadas encontradas em tecidos de vertebrados heterotérmicos, sendo os pigmentos mais comuns a melanina, lipofuscina ou hemosiderina. Muitos autores sugerem que a análise histopatológica de CMM pode ser indicador sensível da saúde dos peixes ou condições ambientais estressantes (LEKNES, 2007; CAMARGO e MARTINEZ, 2007; HINTON *et al.*, 2008).

O rim de teleósteos está dividido em rim anterior e posterior. O rim anterior está integrado ao sistema endócrino e é muito importante na resposta ao estresse, mediada pelo eixo hipotálamo-hipófise-célula interrenal e pelo eixo hipotálamo-sistema nervoso simpático-tecido cromafim (BONGA, 1997).

Em teleósteos, o rim posterior é, juntamente com o intestino e brânquias, responsável pela excreção e manutenção da homeostasia dos fluidos corporais (EVANS, 1993). Além disso, produzindo urina, atua fornecendo uma rota excretória para metabólitos de diversos xenobióticos aos quais os peixes são frequentemente expostos. Tendo em vista que um grande volume de sangue flui através do rim, lesões encontrada nesse órgão podem ser úteis como indicadores de poluição (SILVA e MARTINEZ, 2007).

Em diversos peixes, o rim posterior possui inúmeros néfrons, sua unidade funcional excretória. Cada néfron é composto por um túbulo renal e um corpúsculo renal; este último é composto por um glomérulo envolto por uma cápsula de Bowmann. As regiões do túbulo são túbulo proximal e distal e ducto coletor. Há ainda um tecido hematopoiético que ocupa o espaço intertubular (BANERJEE e BHATTACHARYA, 1994).

Os rins de teleósteos são um dos primeiros órgãos a serem afetados por contaminantes (THOPHON *et al.*, 2003). Por ser um órgão altamente dinâmico, qualquer substância na circulação sistêmica alcança, em taxa relativamente alta este órgão. Assim, uma substância não-tóxica no plasma, pode se tornar tóxica no rim

(BANERJEE e BHATTACHARYA, 1994). As alterações mais comumente encontradas em rins de teleósteos são degenerações tubulares, e alterações no corpúsculo, como dilatação dos capilares no glomérulo e redução do espaço de Bowman (TAKASHIMA e HIBIYA, 1995).

Assim como mamíferos, o rim de peixes tem a capacidade de reparar danos em néfrons, a chamada regeneração renal. Além disso, peixes possuem a habilidade de responder à injúria renal com a neogênese de novos néfrons (REIMSCHUESSE, 2001).

Alterações no nível estrutural refletem um impacto gradual no metabolismo e levam a respostas adaptativas ou degenerativas, com conseqüências importantes na sobrevivência do animal. Em peixes, os órgãos mais utilizados nesses estudos são brânquias, fígado e rins, mas por serem afetados também por bactérias, vírus e parasitas, uma avaliação da saúde do animal é importante para diferenciar danos induzidos por agentes tóxicos e doenças (CHOVANEC *et al.*, 2003).

2.4 ANIMAL DE ESTUDO

Rhamdia quelen, ou jundiá, é um peixe que tem distribuição neotropical, sendo encontrado desde o centro da Argentina até o sul do México, e cujo cultivo está aumentando no sul do Brasil. Pertence à seguinte divisão taxonômica: Classe Osteichthyes, Série Teleostei, Ordem Siluriformes e Família Heptapteridae (GOMES *et al.*, 2000). Vivem em lagos e rios, e preferem os ambientes de águas mais calmas, com fundo de areia e lama. Podem atingir 50 cm de comprimento e 3 kg de peso; possuem hábito noturno e são euritérmicos. A maturidade sexual da espécie é atingida no primeiro ano de vida; possui dois picos reprodutivos por ano (verão e primavera). Os adultos da espécie são onívoros no ambiente natural, alimentam-se de peixes, crustáceos, insetos, restos vegetais e detritos orgânicos. São generalistas no que diz respeito à escolha do alimento (GOMES *et al.*, 2000). Essa característica contribui para sua adaptação ao alimento artificial, e assim, para sua domesticação.

É uma espécie de grande aceitação no mercado consumidor, especialmente por sua carne agradável ao paladar e ausência de espinhos intramusculares; de fácil domesticação e adaptação às condições de cultivo. Desta maneira, atrai a atenção de pesquisadores e produtores, por suas características que vêm permitindo sua

inclusão na lista de espécies de peixes criadas comercialmente no Brasil (CARNEIRO e MIKOS, 2005).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da exposição sub-crônica de dipirona em uma espécie de peixe.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Após exposição sub-crônica dos peixes à dipirona:

- Avaliar os parâmetros hematológicos;
- Avaliar danos morfológicos em rim posterior;
- Avaliar a biotransformação e o estresse oxidativo em fígado;
- Avaliar danos genotóxicos;
- Gerar informações que possam servir como parâmetros norteadores para o tratamento da água dado aos efluentes que alcançam as matrizes ambientais e estimular a pesquisa sobre fármacos no meio ambiente.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANÁLISE QUÍMICA

Análises químicas da dipirona na água foram realizadas para a avaliação da sua degradação. Com esse resultado foi possível saber o tempo de meia vida da dipirona sódica na água que serviu como base para a reposição da concentração da mesma nos bioensaios com os peixes. Foram realizados 3 experimentos em aquário para avaliação da cinética de degradação da Dipirona Sódica, partindo-se de uma concentração inicial de 50 mg/L, maior do que as concentrações utilizadas no bioensaio, devido à sensibilidade do método analítico. Foram utilizados aquários com capacidade de 25 litros. No primeiro experimento foi avaliado somente a degradação do composto em água, sem a presença de peixes. Neste experimento, um terço da água foi reposta a cada 24 horas, e as amostras foram coletadas e congeladas em -80°C nos tempos 0, 6, 12, 24, 36 e 48 horas. No segundo, o mesmo procedimento de reposição de água e coleta foi adotado, porém, foi colocado um animal de aproximadamente 30 gramas a cada litro de água. No terceiro experimento, foi adotado o mesmo procedimento de coleta e armazenamento das amostras, foi mantida a mesma relação de massa de indivíduos por volume de água, porém, foram realizadas reposições da mesma concentração inicial de dipirona sódica (50 mg/L) a cada 24 horas.

As amostras contendo dipirona foram analisadas em sistema cromatográfico Shimadzu modelo LC10AD, com detecção por UV em detector modelo SPD-10A com injeções em válvula sistema Rheodyne com alça de 20 µL. A coluna para análise foi uma C8, Hypersil ODS (5 µ, 150 x 4,6 mm) tendo como fase móvel uma mistura de metanol:água (80:20) a uma vazão de 1,0 mL/min. A quantificação foi efetuada por padronização externa, com base em curvas de calibração construídas para o componente monitorado.

4.2 ANIMAIS E DESENHO EXPERIMENTAL

Os peixes *Rhamdia quelen* foram fornecidos pela Piscicultura Panamá, Paulo Lopes, Santa Catarina, em novembro de 2008. Os indivíduos estavam em estágio juvenil. Dos animais, foram coletados:

- Rim posterior para histopatologia;
- fígado para análise de biomarcadores bioquímicos;
- sangue para análise de parâmetros hematológicos e de biomarcadores genéticos.

Os animais foram mantidos no Laboratório de Toxicologia Ambiental do Departamento de Farmacologia da UFPR. Formaram cada grupo experimental 14 animais e foram mantidos em aquário, durante 15 dias para aclimação, alimentados com ração comercial para peixes, fornecida 1 vez ao dia e mantidos sob um ciclo claro-escuro de 12 horas e com água filtrada e desclorada mantida a 27° C. A concentração de dipirona que foi utilizada como referência para o bioensaio foi de 5 µg/L, próxima daquela encontrada em matrizes ambientais, conforme relatado na literatura por Gomez *et al.* (2007), de 4,9 µg/L.

Quatro grupos experimentais foram formados: um grupo foi exposto a uma concentração de dipirona de 5 µg/L (concentração referência), outros dois às concentrações de 0,5 e 50 µg/L (concentrações 10 vezes menor e maior), e o grupo controle. Esta exposição teve duração de 15 dias. Nesse período, os animais não foram alimentados. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná com número 317. Os animais foram anestesiados com benzocaína 2%, pesados, medidos e sacrificados por secção medular. Os indivíduos apresentaram peso médio de 18,93 g, comprimento total de 13,31 cm e comprimento padrão de 11,09 cm.

4.3 BIOMARCADORES HEMATOLÓGICOS

O sangue foi coletado a partir da veia caudal, com seringa e agulha hipodérmica contendo EDTA 3%. A contagem total de células sanguíneas foram realizadas de acordo com metodologias e nomenclaturas descritas por TAVARES-

DIAS *et al.* (1999; 2000). O sangue foi diluído em formol citrato e a contagem total de eritrócitos realizada sob microscópio óptico em câmara de Neubauer. Foram também verificados espectrofotometricamente a taxa de hemoglobina (5 mL de reagente de Drabkin + 20 μ L de sangue, segundo método de cianometahemoglobina), segundo Collier (1944) e a taxa de hematócrito utilizando tubos de microhematócrito heparinizados (HINE, 1992).

As células sanguíneas de defesa orgânica foram classificadas em trombócitos e leucócitos (TAVARES-DIAS *et al.*, 2002) após contagem em extensões sanguíneas coradas segundo método de Rosenfeld (1947).

4.4 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

4.4.1 Preparo das amostras

As amostras de fígados de cada animal foram coletadas, pesadas e homogeneizada na proporção de 100 mg em 1 mL de tampão fosfato 0,1M, pH 6,5, com auxílio de homogeneizador Potter-Elvehjem. Os homogeneizados foram transferidos a microtubos de 2 mL e centrifugados por 20 min a 4°C a 10.000x g. Amostras de sobrenadante (fração S9) foram alíquotadas em tubos eppendorfs e armazenadas a -80° C para posterior realização das análises bioquímicas. Alíquotas foram guardadas para os testes de catalase, lipoperoxidação, glutathiona S-transferase, além de dosagem de proteína para normalização dos resultados.

4.4.2 Glutathiona S-transferase

As alíquotas de fração S9 do fígado destinadas a este teste foram diluídas 1:20 em tampão fosfato 0,1M, pH 6,5 e pipetadas em 4 réplicas de 100 μ L na microplaca de leitura em espectrofotômetro, onde foram acrescentados 200 μ L de solução reação. A solução reação foi composta por CDNB (1 cloro 2, 4 dinitrobenzeno) a 3mM e GSH 3mM, em solução tampão 0,1M, pH 6,5.

O método é baseado no trabalho de Keen *et al.* (1976). As GSTs catalisam a reação de conjugação do substrato CDNB com a GSH, formando um tioéter que pode ser monitorado pelo aumento de absorbância em espectrofotômetro em

comprimento de onda de 340 nm. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 340nm, durante 2 min e a atividade enzimática foi expressa em μmol de CDNB conjugado/min/mg proteína.

4.4.3 Catalase

Alíquotas de fração S9 do fígado foram diluídas 1:5 em tampão fosfato 0,1M, pH 6,5 e pipetados 10 μL em cubetas de quartzo para leitura em espectrofotômetro com 990 μL de solução reação. Essa solução reação é composta por peróxido de hidrogênio 30mM, em solução tampão (TRIS-HCl 1M, EDTA 5mM, pH 7,6-8).

O método consiste em mensurar a atividade da catalase através do consumo de peróxido de hidrogênio exógeno, gerando oxigênio e água, através de espectrofotometria (AEBI, 1984). A leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 240nm, por 1 min e 30 segundos e a atividade enzimática foi expressa em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ consumido/min/mg proteína.

4.4.4 LPO

Alíquotas de fração S9 do fígado foram diluídas 1:2 em metanol e centrifugadas por 10 minutos a 4 $^\circ$ C a 10.000x g. O sobrenadante foi pipetado em 4 réplicas de 30 μL na microplaca de leitura em espectrofotômetro, seguido de 270 μL de solução reação. A solução reação é composta por metanol 90%, BHT (butil hidroxitolueno – 4mM na solução reação final), H₂SO₄, sulfato ferroso amoniacal e alaranjado de xilenol. A lipoperoxidação é dada indiretamente pela concentração de hidroperóxido. O método é baseado na oxidação do Fe⁺² mediada por peróxidos sob condições ácidas e posterior formação do complexo Fe⁺³ - laranja de xilenol (fonte de absorção de luz) na presença do estabilizador hidroxitolueno butilado (JIANG; *et al.*, 1992). A leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 560 nm.

4.4.5 Concentração protéica

Para a normalização dos dados nos diferentes ensaios bioquímicos, foi quantificada as proteínas totais nas amostras. Para análise de proteína na fração S9

do tecido (fígado) foi utilizado o teste de Bradford (1976) utilizando-se uma curva padrão de soro albumina bovina. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 620nm.

4.5 BIOMARCADORES GENÉTICOS

4.5.1. Ensaio Cometa

O método seguido foi o proposto por Singh *et al.* (1988). Uma amostra de sangue de peixes do grupo controle foi coletada com o auxílio de um tubo de microhematócrito heparinizado e adicionado 1ml de soro fetal bovino. O material foi refrigerado no escuro por 24h. Um volume de 20 µl desta solução foi misturado com 120 µl de agarose de baixo ponto de fusão. Desta mistura, 15 µl foram depositados sobre uma lâmina previamente preparada com uma camada de agarose normal e então cobriu-se a lâmina com lamínula. Após 10 minutos a 4°C a lamínula foi retirada cuidadosamente e as lâminas foram colocadas em uma cubeta com solução de lise e mantidas em geladeira e no escuro por 7 dias. Após este tempo as lâminas foram transferidas para a cuba de eletroforese e cobertas com solução para eletroforese (pH>13) por 30 min antes de ser iniciada a eletroforese.

A eletroforese foi realizada em 25 V com 300 mA por 25 min a uma temperatura de 4 °C. Concluída a eletroforese, colocou-se sobre as lâminas tampão de neutralização (0,4M Tris, pH 7,5), durante 5 min, 3 vezes. As lâminas secaram em temperatura ambiente e depois foram fixadas em etanol 95% por 5 minutos. Nesta condição as lâminas puderam ser estocadas em geladeira até o momento da análise, sendo coradas com 20µl de Brometo de Etídeo (10 µl/ml) e cobertas com lamínula.

Para a visualização dos danos do DNA, as lâminas foram observadas em aumento de 400x usando microscópio de epifluorescência Leica DMLS2 equipado com filtro de excitação de 515 – 560 nm e um filtro de barreira de 590 nm. Foram analisadas 100 células (nucleóides) de cada indivíduo/lâmina, sendo o dano em cada nucleóide classificado de acordo com o comprimento da cauda formada após a corrida eletroforética: 0 – sem dano; 1 – dano pequeno; 2 – dano médio; 3 – dano máximo; 4 – núcleo destruído ou em apoptose. Multiplicando-se o número de

cometas encontrados em cada classe pelo valor da classe, calculou-se um escore de dano genético para cada indivíduo (KOBAYASHI *et al.*, 1995).

4.6. BIOMARCADOR MORFOLÓGICO – HISTOPATOLOGIA

Um fragmento de rim posterior dos peixes foi coletado para estudo histopatológico e fixado em ALFAC (álcool 80%, formol 40% e ácido acético glacial) por 16 horas, estocado em álcool 70% a 4°C, desidratado em bateria de concentrações crescentes de etanol, diafanizado em xilol e incluído em Paraplast Plus (SIGMA), conforme protocolo de rotina do laboratório. Para a microtomia os cortes histológicos foram de 5 µm de espessura, em Micrótomo LEICA RM 2145. Os cortes foram corados com Hematoxilina de Harris e Eosina e analisados em microscópio de luz Leica DME.

Os novos néfrons foram contados através de um sistema-teste quadriculado acoplado a uma das oculares do microscópio, cuja área era de 1 mm², com 100 subdivisões de 0,01 mm² cada. Estas estruturas são caracterizadas como agrupamentos pequenos de células basofílicas. Foram analisados, em objetiva de 10x, 15 campos escolhidos aleatoriamente de cada lâmina de rim posterior (cada lâmina corresponde a um animal) corada em Hematoxilina-Eosina. Os resultados da contagem foram expressos em novos néfrons por mm².

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das análise de biomarcadores bioquímicos e hematológicos foram expressos como média ± erro padrão da média. A normalidade dos dados foi testada através do teste de Kolmogorov–Smirnov. Utilizou-se análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Tukey para analisar os biomarcadores bioquímicos e hematológicos, a contagem de novos néfrons e o comprimento total, padrão e peso dos peixes. Os dados do ensaio Cometa, os índices de lesão histopatológica foram analisados usando o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn. Todos os dados foram estatisticamente analisados pelo programa GraphPad Prism v5.00.288 (GraphPad Software, Inc.). A regra de decisão (α) foi de 0,05 em todas as análises.

5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISE QUÍMICA

Os resultados da análise da cinética de degradação da dipirona sódica em água sem a presença de animais estão mostrados nas figuras 1, 2 e 3. Observa-se uma degradação de 47,3% da substância nas primeiras 24 horas; em 48 horas, a diminuição da concentração foi de 56,24% (Figura 1) .

Com os animais presentes no aquário, a degradação correspondente às primeiras 24 horas foi de 72,94%. Em 48 horas, esse valor correspondeu a 76,98%, onde parece haver um equilíbrio estabelecido dessa concentração (Figura 2).

No terceiro experimento, 24 horas após o início da cinética, onde a mesma concentração foi repostada, observou-se um aumento de 17% em relação à concentração inicial. Este aumento, de acordo com os experimentos iniciais realizados, pode ser devido à concentração de dipirona sódica remanescente, no momento do equilíbrio químico estabelecido. Em 48 horas, nota-se um aumento de aproximadamente 13% em relação às 24 horas anteriores, em que o mesmo fenômeno parece estar presente (Figura 3). De acordo com esses resultados, para o experimento definitivo foi utilizada reposição de um terço da água dos aquários a cada 24 horas e reposição de cada concentração correspondente de dipirona logo após a troca de água. Esta metodologia permite, embora com alguma variação, manter uma concentração do composto constante.

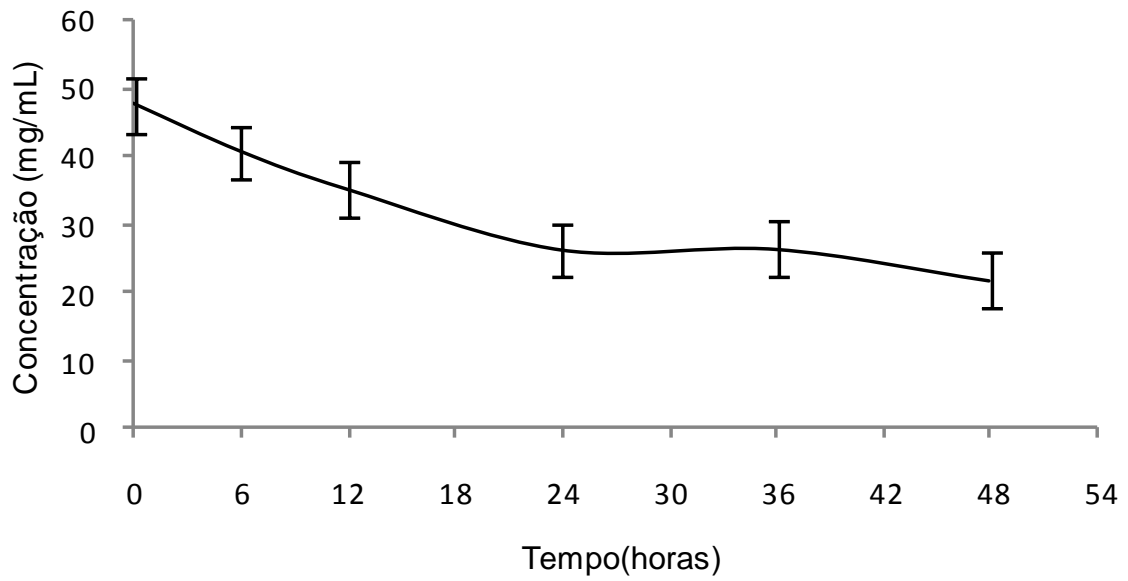


Figura 1: Cinética Dipirona Sódica em água filtrada. Pontos do gráfico representam média \pm erro padrão das amostras coletadas em tempos indicados na figura.

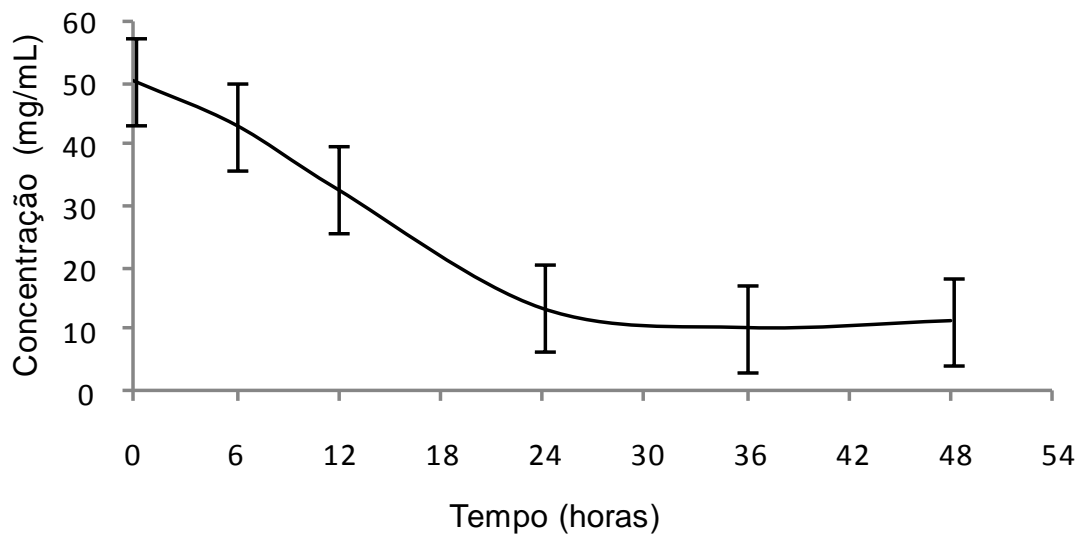


Figura 2: Cinética Dipirona Sódica em água filtrada com a presença de peixes . Indivíduos colocados na proporção de 30 g por litro. Pontos do gráfico representam média \pm erro padrão das amostras coletadas em tempos indicados na figura.

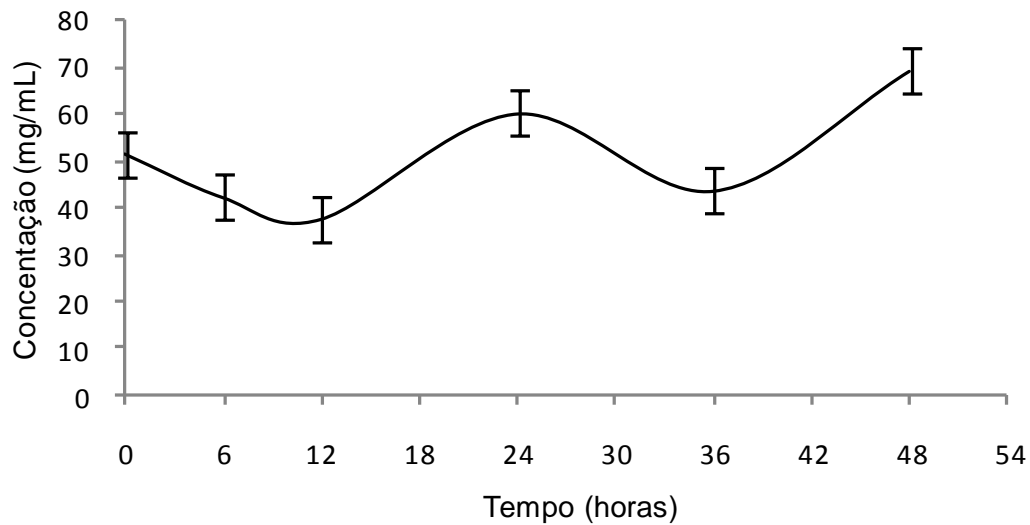


Figura 3: Cinética Dipirona Sódica em água filtrada. Indivíduos colocados na proporção de 30 g por litro. Reposição da concentração inicial de dipirona a cada 24 horas. Pontos do gráfico representam média \pm erro padrão das amostras coletadas em tempos indicados na figura.

5.2. BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

A atividade da GST do grupo exposto à concentração de 50 μ g/L de dipirona sódica mostrou-se significativamente diminuída em comparação ao grupo controle (Figura 4-A). Não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos para a atividade da catalase (Figura 4-B). Igualmente não houve diferença para a taxa de lipoperoxidação entre os grupos expostos à dipirona sódica e o grupo controle (Figura 4-C).

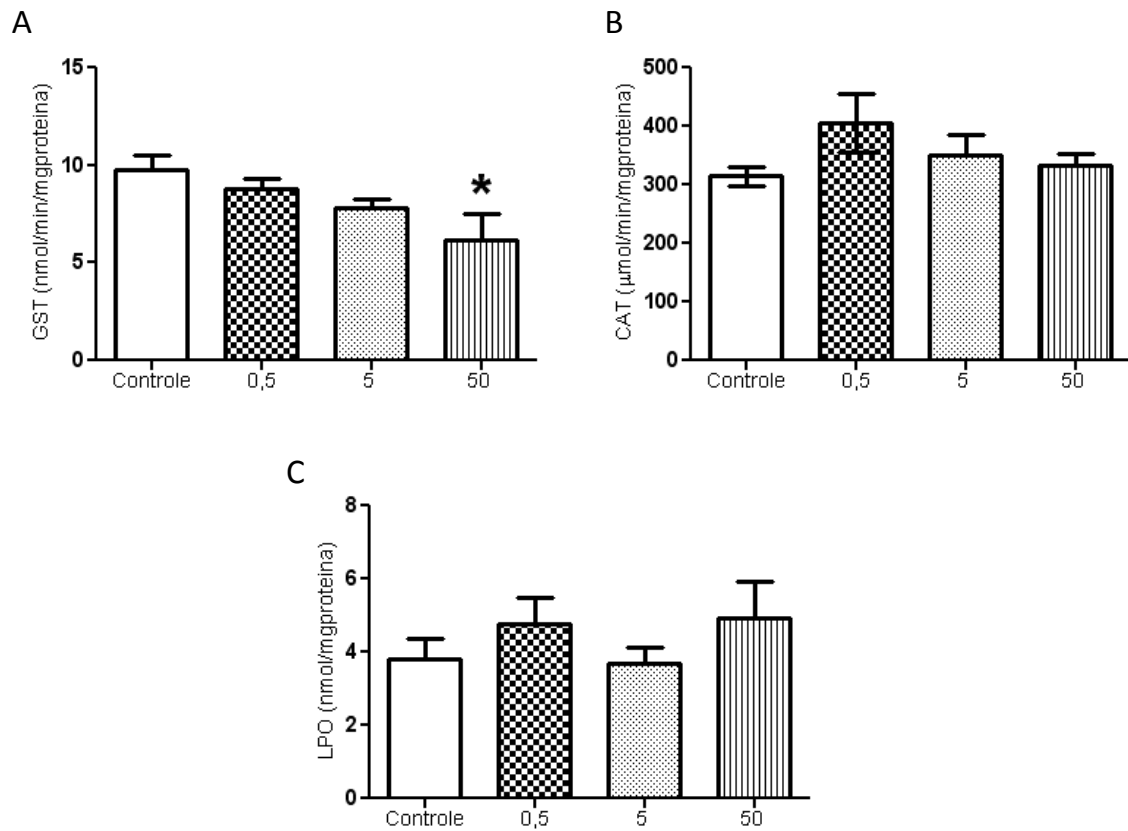


Figura 4: Biomarcadores Bioquímicos em *Rhamdia quelen*. Os resultados são expressos em média \pm erro padrão. Asteriscos indicam diferença significativa ($p < 0,05$) na comparação entre grupos. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. A - Atividade em micromoles do tioéter GSH-CDNB formado por minuto por miligrama de proteínas totais. B - Atividade em milimoles de peróxido de hidrogênio degradado por minuto por miligrama de proteínas totais. C - Concentração em nanomoles de hidroperóxidos por miligrama de proteínas totais.

5.3. BIOMARCADOR GENÉTICO

Para o ensaio cometa, os nucleóides (núcleos desprovidos de membranas) foram classificados pela atribuição de um valor numérico arbitrário, conforme o comprimento dos “rastros de DNA” (Figura 5) e um escore de dano foi calculado. Os resultados obtidos com o ensaio cometa evidenciam dano genético na menor concentração de dipirona (0,5µg/L), escore de dano superior ao do grupo controle (Figura 6).

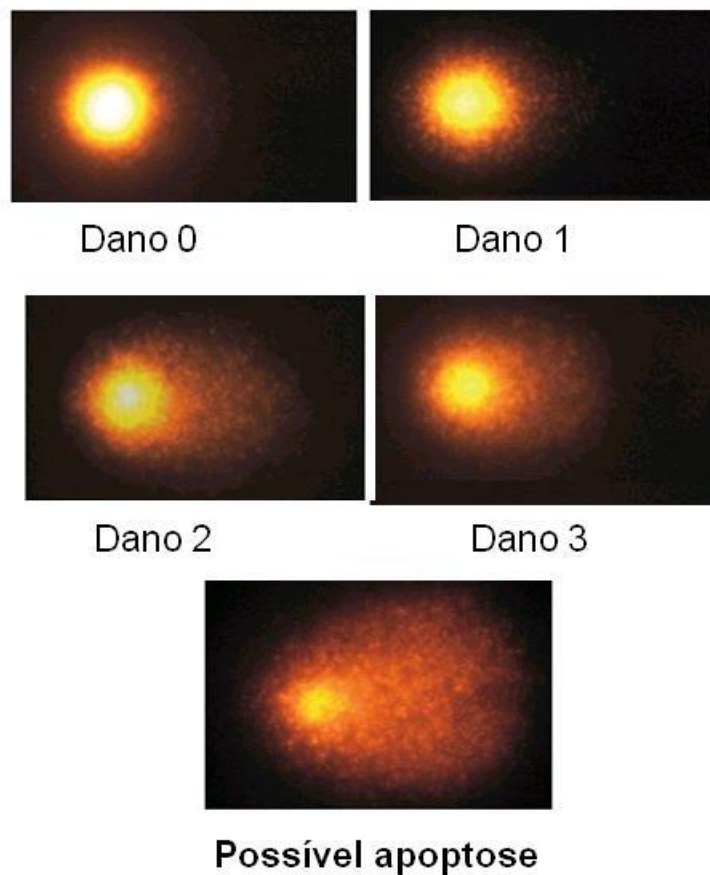


Figura 5: Nucleóides de eritrócitos de *Rhamdia quelen* visualizados no ensaio Cometa.

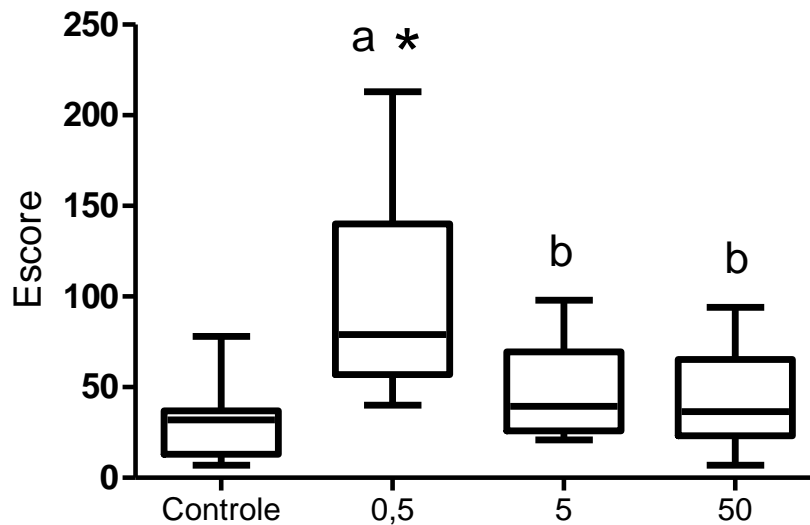


FIGURA 6 - Escores de dano genético obtidos através do Ensaio Cometa em eritrócitos de *Rhamdia quelen*. Os resultados são apresentados em mediana \pm erro padrão. Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn. * diferença significativa ($p < 0,05$) na comparação dos grupos. Letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos.

5.4. HEMATOLOGIA

Os tipos celulares avaliados no sangue periférico de *R. quelen* foram eritrócitos (RBC ou *Red blood cells*), trombócitos e leucócitos (WBC ou *White blood cells*). Em números absolutos, eritrócitos e trombócitos diminuíram após 15 dias de exposição à dipirona, e nenhuma diferença observada para leucócitos (Tabela 1). As taxas de hematócritos (Ht) também estiveram diminuídos nos três grupos em comparação ao grupo controle, enquanto nenhuma alteração foi observada nos outros parâmetros hematológicos (Tabela 2). Os seguintes dados apresentados nas tabelas 1 e 2 estão expressos em Média \pm erro padrão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Tabela 1: Células sanguíneas de *R. quelen* em números absolutos após exposição à dipirona e grupo controle

| | Concentração dipirona sódica ($\mu\text{g/L}$) | | | |
|---|--|----------------|---------------|---------------|
| | Controle | 0,5 | 5 | 50 |
| RBC ($10^6 \mu\text{L}^{-1}$) | 2.52 (0.16) | 1.74 (0.09)*** | 1.69 (0.1)*** | 1.77 (0.1)*** |
| Trombócitos ($10^4 \mu\text{L}^{-1}$) | 3.8 (0.38) | 1.6 (0.3)*** | 1.6 (0.2)*** | 2.0 (0.4)** |
| WBC ($10^4 \mu\text{L}^{-1}$) | 5.6 (0.9) | 5.3 (0.8) | 4.2 (0.6) | 5.0 (0.8) |

Tabela 2: Índices hematológicos de *R. quelen* após exposição à dipirona e grupo controle

| | Concentração dipirona sódica ($\mu\text{g/L}$) | | | |
|---------------------------------|--|----------------|---------------|----------------|
| | Controle | 0,5 | 5 | 50 |
| Hematócrito (%) | 35,50 (1,72) | 28,69 (1,09)** | 30,05 (0,89)* | 28,64 (1,16)** |
| Hemoglobina (g/100mL) | 4,91 (0,22) | 4,33 (0,35) | 3,95 (0,42) | 4,38 (0,31) |
| RBC ($10^6 \mu\text{L}^{-1}$) | 2,52 (0,16) | 1,74 (0,09)*** | 1,69 (0,1)*** | 1,77 (0,1)*** |
| MCV (μL) | 144,2 (6,96) | 158,9 (9,27) | 164,9 (17,01) | 149,7 (15,28) |
| MCH (pg.cell ⁻¹) | 20,05 (1,08) | 25,35 (1,96) | 22,81 (1,51) | 25,38 (2,06) |
| MCHC (g/100mL) | 14,05 (0,64) | 16,38 (1,64) | 13,79 (1,28) | 14,89 (0,91) |

5.5. BIOMARCADORES MORFOLOGICOS

Alterações histológicas importantes foram encontradas nos rins posteriores de *Rhamdia quelen* expostos à dipirona, em todas as concentrações avaliadas. Os animais do grupo controle apresentaram túbulos renais e glomérulos (capilares e espaço de Bowmann) com estrutura normal (Figura 7). Em organismos desse mesmo grupo foram observadas invasão leucocitária (Figura 7B). Centros de melanomacrófagos foram igualmente evidenciados neste grupo e considerados normais.

No grupo exposto à concentração de 0,5 µg/L de dipirona, foram constatadas alterações teciduais como necrose crônica com deposição fibrosa, vacuolização dos capilares e constrição dos mesmos dentro do glomérulo (Figura 8), além de um aumento significativo da produção de novos néfrons (Figura 8c) em comparação ao grupo controle e aos demais grupos (Figura 11).

No grupo exposto a 5 µg/L de dipirona, observou-se alteração do parênquima renal, alterações na estrutura do glomérulo (aumento do espaço de Bowmann), necrose crônica com deposição fibrosa (Figura 9).

Os animais expostos à maior concentração do fármaco apresentaram igualmente necrose crônica com deposição fibrosa, alteração dos capilares do glomérulo (dilatação), necrose de vasos de grande calibre e do glomérulo (Figura 10).

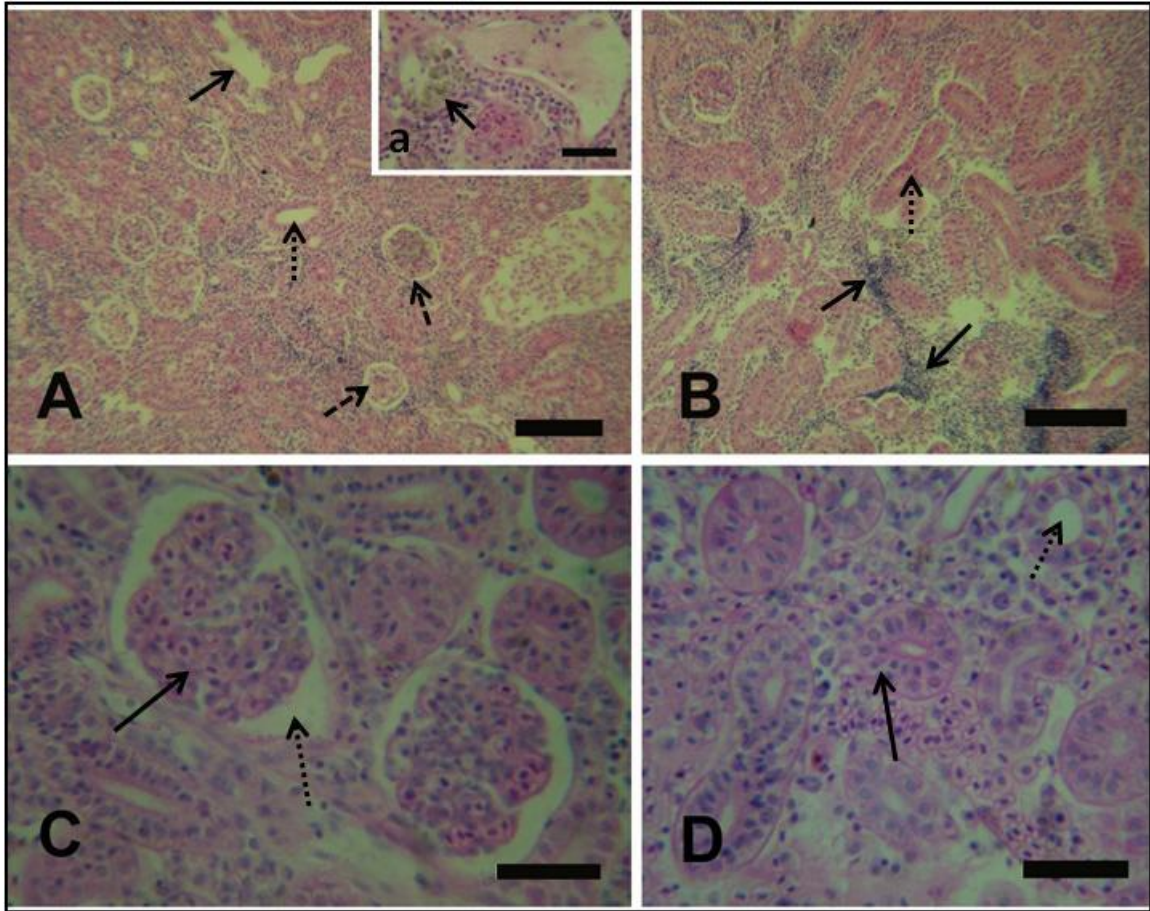


Figura 7: Cortes histológicos de rim posterior de *Rhamdia quelen*, grupo controle. Coloração hematoxilina-eosina. A) Visão panorâmica do tecido. Na imagem são indicados glomérulos (seta tracejada), túbulos (seta pontilhada) e vaso sanguíneos (seta tracejada). Escala = 100 μm . a) Centro de melanomacrófagos. Escala 30 μm . a) Detalhe de centro de melanomacrófago. B) Invasão leucocitária (seta cheia), túbulos renais (seta pontilhada). Escala = 100 μm . C) Detalhe da estrutura do glomérulo. Cápsula de Bowmann (seta cheia) e espaço de Bowmann (seta pontilhada). Escala = 30 μm . D) Detalhe da estrutura dos túbulos renais. Tecido epitelial (seta cheia) e luz do túbulo (seta pontilhada). Escala = 30 μm .

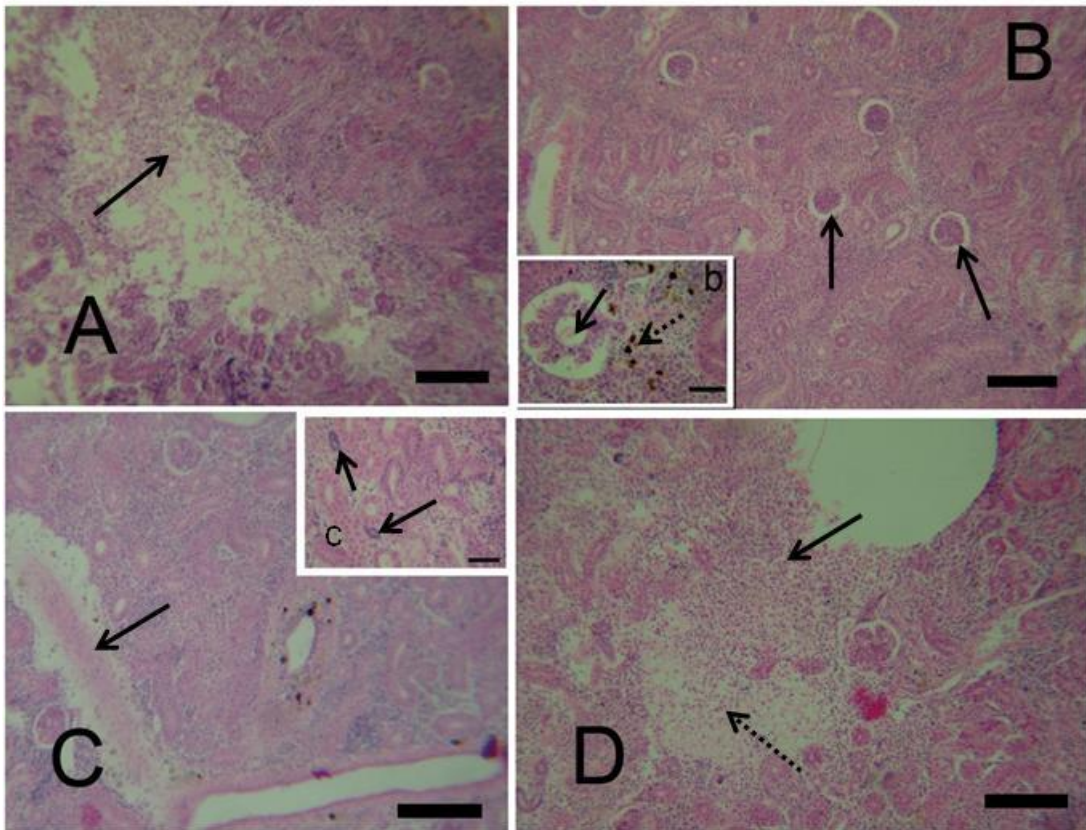


Figura 8: Cortes histológicas de rim posterior de *Rhamdia quelen*, grupo exposto à concentração de 0,5 µg/L de dipirona. Coloração hematoxilina-eosina. A) Região de necrose. Escala = 100 µm. B) Glomérulos apresentando capilares condensados. Escala = 100 µm. b) detalhe da vacuolização dos capilares do glomérulo (seta cheia) e melanomacrófagos livres (seta pontilhada). Escala = 30 µm. C) Necrose crônica com deposição fibrosa. Escala = 100 µm. c) Detalhe de novos néfrons. Escala = 30 µm. D) Alteração no parênquima (seta cheia) e necrose (seta pontilhada). Escala = 100 µm

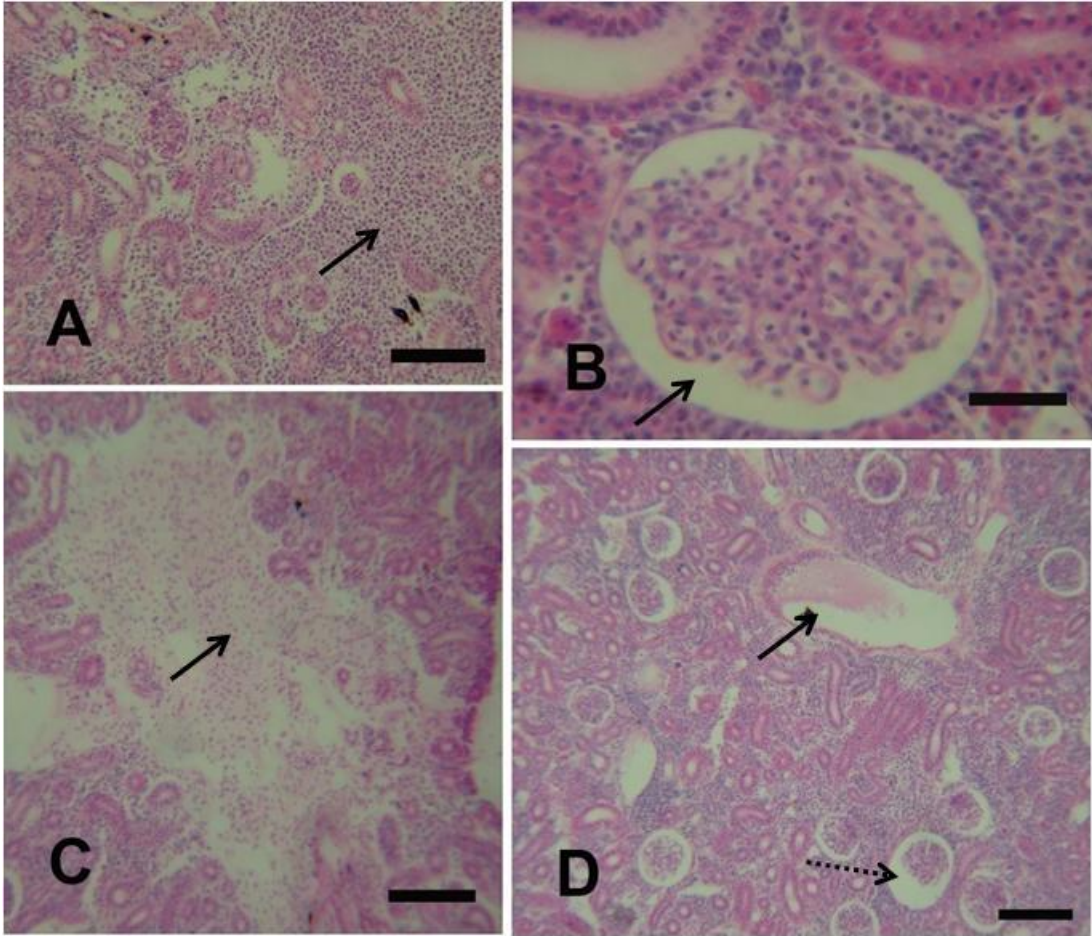


Figura 9: Cortes histológicos de rim posterior de *Rhamdia quelen*, grupo exposto à concentração de 5 $\mu\text{g/L}$ de dipirona. Coloração hematoxilina-eosina. A) Região com alteração do parênquima. Escala = 100 μm . B) Glomérulos apresentando aumento do espaço de Bowmann. Escala = 30 μm . C) Necrose crônica com deposição fibrosa. Escala = 100 μm . D) Vaso sanguíneo (seta cheia) e aumento do espaço de Bowmann (seta pontilhada). Escala = 100 μm .

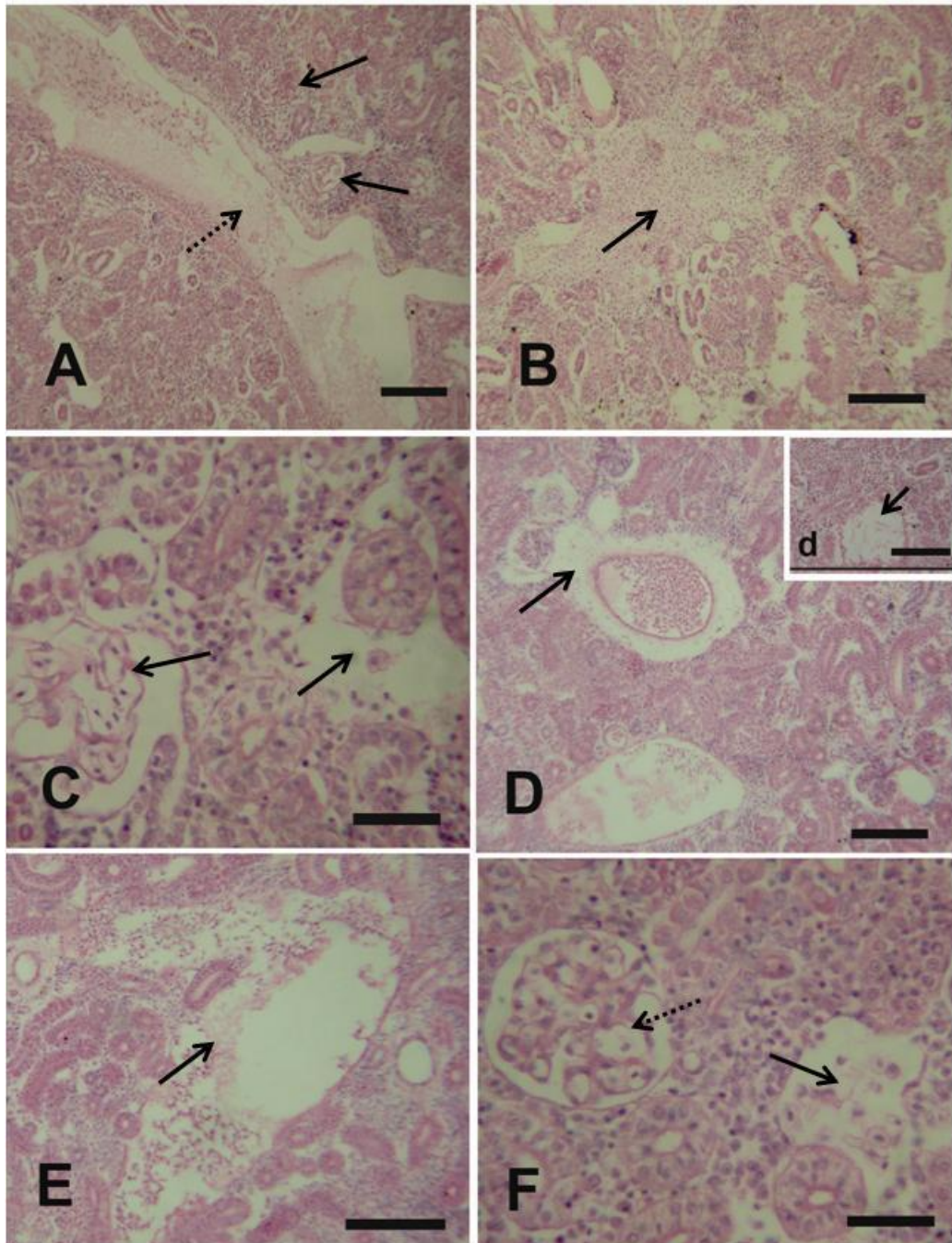


Figura 10: Cortes histológicas de rim posterior de *Rhamdia quelen*, grupo exposto à concentração de 50 µg/L de dipirona. Coloração hematoxilina-eosina. A) Estrutura dos glomérulos danificadas (seta cheia) e vaso sanguíneo (seta pontilhada). Escala = 100 µm. B) Necrose crônica com deposição fibrosa. Escala = 100 µm. C) Detalhe da alteração dos capilares no glomérulo. Escala = 30 µm. D) Periferia de vaso sanguíneo de grande calibre com necrose. Escala = 100 µm. d) Detalhe de necrose em glomérulo. Escala = 30 µm. E) Vaso sanguíneo de grande calibre com necrose. Escala = 100 µm. F) Dilatação dos capilares do glomérulo (seta pontilhada) e glomérulo danificado (seta cheia). Escala = 30 µm.

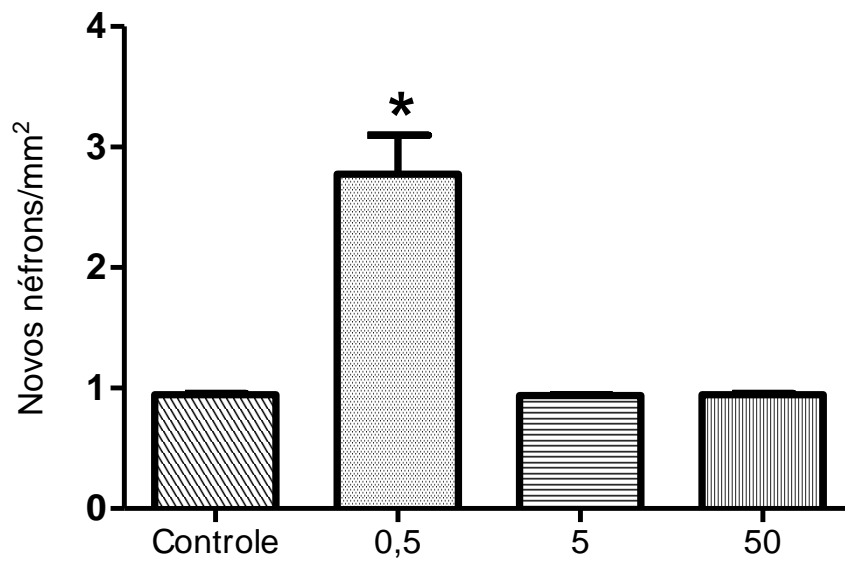


Figura11: Contagem de novos néfrons. Resultado expresso em novos néfrons por mm². Asterisco indica diferença significativa ($p < 0,05$) na comparação dos grupos expostos com os grupos controle, 5 e 50 $\mu\text{g/L}$ de dipirona.

6. DISCUSSÃO

As análises da cinética de degradação da dipirona sódica por cromatografia líquida de alta eficiência efetuadas nessa pesquisa mostraram que há uma instabilidade da dipirona em solução aquosa, que sofre uma hidrólise relativamente rápida. Observou-se uma queda da concentração inicial e, ao final de 48 horas, foi atingido o equilíbrio. Com reposição de dipirona a cada 24 horas (figura 3), observou-se um aumento de 17% em relação à concentração inicial, que representa a quantidade remanescente de dipirona no momento do equilíbrio químico estabelecido, somada à nova concentração repostada na sequência. Em 48 horas, notou-se um aumento de aproximadamente 13% em relação às 24 horas anteriores, novamente pela mesma quantidade de dipirona remanescente. Com estes resultados foi possível observar que os animais têm uma capacidade de eliminar o composto com uma velocidade constante, pois quando estão presentes no experimento, o desaparecimento do composto é 48,65% maior do que na sua ausência. Assim, pode-se hipotetizar que o composto está sendo absorvido pelos peixes. Ao se repor a mesma concentração inicial (50 µg/mL), a mesma taxa foi proporcionalmente eliminada. Nesse mesmo experimento (figura 3), a concentração aumenta na água nos tempos de 24 e 48 horas.

Há uma transformação do composto, pois as análises em HPLC mostram um segundo componente (degradado), possivelmente resultado da hidrólise da substância inicial. Não foi possível nesse trabalho identificar esse componente, nem calcular sua concentração. Entretanto, de acordo com Ergun *et al.* (2004), que apresentam um cromatograma típico da hidrólise da dipirona, o segundo pico é o seu metabólito principal, 4-MAA. Considerando que o método de separação utilizado foi uma cromatografia líquida de fase reversa, onde quanto maior o tempo de retenção, mais hidrofóbica é a substância, a perda do grupamento sulfônico altamente polar da dipirona por hidrólise diminuiria sua polaridade, originando um metabólito com tempo de retenção maior.

A conclusão, com importante implicação ambiental que fornece esse resultado, reside no fato de que, ao ser eliminada continuamente e em uma velocidade constante no ambiente aquático, como mostrado por diversos autores já mencionados nessa pesquisa, a dipirona sódica e os produtos de sua hidrólise estão sendo absorvidos por organismos aquáticos e não estão sendo eliminados em

tempo suficiente no mesmo ambiente. Por exemplo, Feldmann *et al.* (2008) encontraram resíduos de metamizol sódico e seus metabólitos aminoantipirina, 4-acetilaminoantipirina e 4-formil-aminoantipirina em efluentes de hospital, esgotos municipais e estação de tratamento de esgoto em Berlim. Wiegel *et al.* (2004) encontraram metabólitos do metamizol sódico no rio Elbe, Alemanha. A dipirona sódica foi encontrada na concentração de 4,9 µg/L em estação de tratamento de esgoto em região da costa do Mediterrâneo (GÓMEZ *et al.*, 2007).

Além disso, pode-se observar pelas análises aqui desenvolvidas a presença de um composto degradado, possivelmente ainda mais tóxico e reativo. Alguns autores comprovam a toxicidade crescente dos subprodutos da dipirona sódica (GÓMEZ *et al.*, 2008).

No presente estudo, foram utilizados biomarcadores bioquímicos, genéticos e hematológicos e morfológicos. Com relação aos biomarcadores bioquímicos utilizados, inicialmente, a atividade da enzima GST mostrou uma diminuição na concentração mais alta de dipirona à qual os organismos foram expostos. Devido ao papel das enzimas GST na conjugação de espécies reativas e outros eletrófilos, sua indução pode ser considerada benéfica.

Um aumento na atividade das GSTs hepáticas foi relatado em diversos estudos após exposição a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, polifenilas bicloradas e outros compostos, mas a maioria dos estudos não demonstram nenhuma alteração significativa. Por outro lado, um significativo decréscimo em sua atividade foi observado em truta arco-íris e outras espécies de peixes expostos a diversos pesticidas, e expostos a ambientes contaminados (VAN DER OOST, 2003). Pimpão *et al.* (2007) relataram um decréscimo da atividade da GST em peixes expostos à deltametrina.

Diversos inibidores têm sido relatados: ácido etacrínico, antibiótico ácido calvático, curcumina, dissulfiram etc. (EATON e BAMMLER, 1999). Decréscimo nas enzimas de fase I e aumento nas enzimas de fase II sugerem uma resposta adaptativa a um ambiente tóxico. Entretanto, em alguns estudos com peixes, envolvendo dano genético, níveis de GST estiveram tanto diminuídos quanto inalterados (STEGEMAN *et al.*, 1992).

Quando ocorre o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e sua eliminação através dos sistemas antioxidantes, é estabelecido o que chamamos de estresse oxidativo, condição esta em que o ambiente celular torna-se mais oxidante

podendo causar danos nas diferentes biomoléculas como o DNA, podendo levar à formação de micronúcleos, oxidação de proteínas e lipídios de membranas. No presente estudo, não foram observadas diferenças nas concentrações de hidroperóxidos entre os grupos expostos à dipirona e o grupo controle.

O processo de peroxidação lipídica é considerado uma das maiores causas de injúria e morte celular, com as quais muitas patologias estão conectadas. A lipoperoxidação pode ocorrer na membrana celular ou em muitas organelas, levando à degradação de enzimas, membranas e DNA (HERMES-LIMA, 2004). A integridade física das membranas biológicas é um pré-requisito indispensável para a regulação de muitos processos celulares. A alteração de importantes parâmetros celulares como a fluidez, a permeabilidade, o potencial elétrico e o transporte controlado através da membrana, são comuns danos devido à peroxidação lipídica (FILIPAK NETO, 2007).

Vários estudos têm demonstrado aumento nos níveis de peroxidação lipídica em vários tecidos de peixes expostos a xenobiontes (ROMEIO *et al.*, 2000; PLOCH *et al.*, 1999). Vinagre *et al.* (2003) consideram como sendo uma resposta adaptativa haver um aumento das defesas antioxidantes contra o radical peróxido e nenhum dano oxidativo ser observado, em termos de peroxidação lipídica.

Alterações na atividade da catalase não foram observadas entre os grupos expostos e o grupo controle. As CAT compõem uma família de hemoproteínas (GAO *et al.*, 2003) envolvidas na dismutação do peróxido de hidrogênio e na detoxificação de alguns substratos, como fenol, alcoóis, ácido fórmico e formaldeído. Um dos papéis antioxidantes das CAT é reduzir o risco de formação do radical hidroxila ($\text{HO}\cdot$) a partir do H_2O_2 via reação de Fenton (NORDBERG e ARNÉR, 2001) ou por reação com ânion superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$). Esta redução é importante, tendo em vista que as membranas biológicas são extremamente permeáveis a espécie reativa H_2O_2 . O radical hidroxila é capaz de causar danos importantes aos sistemas biológicos (BETTERIDGE, 2000).

Entretanto, as catalases são enzimas que podem reduzir apenas o peróxido de hidrogênio. Aumentos na atividade hepática da catalase foram observados em experimentos com peixes expostos a alguns pesticidas, mas a maioria dos trabalhos em laboratórios não pode demonstrar nenhuma alteração significativa. Do mesmo modo que para a superóxido-dismutase, para a catalase são observadas mais alterações em trabalhos de campo do que de laboratório (VAN DER OOST, 2003).

Há diferenças entre as espécies no que diz respeito a suas defesas anti-oxidantes. Alguns dos sistemas de defesa capazes de inibir a formação de oxirradicais incluem enzimas anti-oxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPX), e glutaciona redutase (GRED) (VAN DER OOST, 2003). As pesquisas devem considerar o fato de que, a peroxidação lipídica e outros danos são modulados por outros sistemas antioxidantes e metalotioneínas (VALAVANIDIS *et al.*, 2006). Segundo Livingstone (2001) o dano oxidativo pode ser o principal mecanismo da toxicidade de poluentes. Neste trabalho, não foi observado aumento de estresse oxidativo através dos biomarcadores utilizados. Outros biomarcadores poderiam ser analisados com o objetivo de se quantificar espécies radicais livres totais.

Avaliação da atividade das GPX seria igualmente necessária nesse estudo, já que essas enzimas reduzem uma grande variedade de peróxidos através do emprego de GSH como cofator. A principal peroxidase em peixes é citosólica, e apresenta um papel consideravelmente importante na proteção da membrana contra a lipoperoxidação (VAN DER OOST, 2003). Atividade de GPX aumentada foi observada em experimentos com peixes expostos a diversos poluentes, assim como também foi observado seu decréscimo.

Além disso, peixes parecem ter uma menor atividade basal de SOD e CAT, ao lado de uma atividade basal maior de GPX (WDZIECZAK *et al.*, 1982). Além disso, o GSH participa na redução do próprio H_2O_2 nas reações catalisadas pelas glutaciona peroxidases (GPX) e reage prontamente com $HO\cdot$. Deve-se atentar para a susceptibilidade diferenciada do DNA, ácidos graxos e proteínas ao dano oxidativo. Embora existam vários fatores que possam fragmentar o DNA, a peroxidação de lipídios é quase sempre relacionada com um excesso de agentes oxidantes, sejam EROs ou não.

O dano genético mostrado pelo ensaio cometa ocorreu na menor concentração de dipirona. A fragmentação do DNA sob condições em que há aumento da produção de espécies reativas pode ocorrer por dois mecanismos:

Primeiro, radicais livres lipídicos produzidos a partir dos ácidos graxos poliinsaturados (tanto na membrana plasmática quanto nuclear) podem diretamente atacar o DNA presente na cromatina do núcleo. Segundo, a lipoperoxidação em uma célula causa a perda da integridade da membrana celular e pode tornar o ambiente favorável ao ataque ao DNA por outros tipos de radicais de oxigênio (HIGUCHI,

2003).

O ensaio cometa tem sido amplamente utilizado para medir dano ao DNA em organismos aquáticos. As quebras da molécula do DNA foram induzidas por compostos nitroaromáticos e benzopireno (MITCHELMORE *et al.*, 1998) e quebras nas fitas de DNA e apoptose de eritrócitos em *Anguilla anguilla* após exposição a benzopireno, arochlor 1254 e dioxinas (MITCHELMORE *et al.*, 1996). Sabe-se que estes compostos agem através da via dos radicais livres de oxigênio (NIGRO *et al.*, 2002).

A hipótese proposta a partir de nossos dados explicaria o dano genético encontrado na menor concentração de dipirona pelo fato de que a dipirona sofre transformação endógena ao composto nitroso (NOC) denominado N-nitrosodimetilamina (NDMA), compostos esses considerados genotóxicos (BRAMBILLA e MARTELLI, 2007). A dipirona é considerada por alguns autores como uma droga causadora de dano ao DNA (ALEXANDER *et al.*, 2001).

Segundo Brambilla e Martelli (2009) NDMA e outras nitrosaminas podem ser ativadas a intermediários que se ligam ao DNA via transformação P-450 dependente a radicais α -nitrosaminos, que podem se combinar com HO \cdot para formar α -hidroxinitrosaminas ou se decompor em óxido nítrico e N-metilformaldimina. Este composto, NDMA é inclusive utilizado como controle positivo no ensaio cometa, por ser um agente indutor de quebras da molécula de DNA, como demonstrado em experimento que teve como objetivo testar as propriedades antioxidantes da vitamina E (WILSON *et al.*, 1998). A glutathiona é um dos compostos que podem agir como inibidor da nitrosação. Alguns estudos vêm demonstrando que espécies eletrofílicas geradas por NOC pró-mutagênicos são conjugadas com a glutathiona reduzida (BRAMBILLA e MARTELLI, 2007). Dessa forma, a quantificação dos níveis de GSH poderia aportar informações importantes em posteriores pesquisas envolvendo esse xenobiótico.

A dipirona pode ser considerada mutagênica, como demonstrado a partir de experimentos com linhagens de *Salmonella*, além de ter induzido um aumento na troca de cromátides irmãs em células de medula óssea de camundongos (GIRI *et al.*, 1998). Arkhipchuk *et al.* (2004) avaliaram a mesma droga como tóxica e genotóxica em três organismos pertencentes a diferentes grupos sistemáticos: *Allium cepa*, *Ceriodaphnia affinis*, *Hydra attenuata* e *Carassius auratus gibelio*.

Galati *et al.* (2002) hipotetizam que os AINEs, incluindo dipirona, são oxidados por peroxidases para formar radicais prooxidantes, que oxidam glutationa, ascorbato ou NADH, produzindo assim, espécies reativas de oxigênio.

Nesse trabalho de pesquisa, foram observadas alterações importantes no perfil hematológico. Muitas patologias estão normalmente relacionadas com alterações no hemograma em diversos animais, incluindo seres humanos e peixes. Por essa razão, perfis hematológicos de diferentes peixes têm sido estudados. A pesquisa hematológica em peixes é importante para a compreensão de muitos aspectos ecológicos (TAVARES-DIAS *et al.*, 2000).

Alterações na função e estrutura das células sanguíneas e mecanismos de coagulação podem ser considerados desordens hematológicas; muitas dessas desordens podem ser o resultado de doenças nesses animais. As alterações de ordem primária são anemias, leucopenias, leucocitose e trombocitopenia. Hematócritos inferiores a 20% em peixes são geralmente associados com anemias (CLAUSS *et al.*, 2008).

Nesse estudo, os três grupos expostos a diferentes concentrações de dipirona apresentaram hematócritos e contagem total de eritrócitos diminuídos em comparação ao grupo controle (Tabelas 1 e 2). O menor valor de hematócrito foi de 28.69, diferença estatisticamente significativa quando comparado ao valor de 35.50 do grupo controle. Não se pode afirmar que se trate de um quadro de anemia, porém, o fato de todos os três grupos expostos ao fármaco avaliado apresentarem hematócritos e valores de eritrócitos diminuídos pode sugerir uma situação próxima daquela considerada anemia. Os valores de hematócrito podem estar relacionados com a atividade em peixes; os eritrócitos maduros têm por função o transporte de oxigênio e gás carbônico, desempenhado por seu componente principal, a hemoglobina (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004).

Clauss *et al.*(2008) descreveram três tipos de anemia: hemorrágica (perda de sangue), hemolítica (destruição de eritrócitos) e hipoplástica (baixa eritropoiese). Uma das causas mais comuns de anemias é a destruição do tecido hematopoiético. Em peixes, a anemia hemorrágica pode ser causada por trauma, parasitismo, etc e é geralmente acompanhada por perda de ferro; anemias hipoplásticas são geralmente associadas com doenças inflamatórias, toxinas e doenças com destruição dos mesmos tecidos. Anemias hemolíticas podem ser associadas com toxinas ambientais, deficiências nutricionais seletivas e outros fatores.

Não existem na literatura informações sobre os efeitos hematológicos da dipirona em peixes. No presente estudo, pode-se hipotetizar que o contaminante avaliado possa ter iniciado uma indução de anemia hemolítica. Em 1981, a mesma droga, juntamente com outras, já foram tidas como prováveis responsáveis por diversas alterações sanguíneas, como anemia aplástica, anemia hemolítica, agranulocitose e trombocitopenia, em estudo populacional com pacientes apresentando todos esses quadros de citopenias (BOTTIGER e BOTTIGER, 1981).

No mesmo ano, um caso clínico de anemia hemolítica imune seguida de falência renal induzida por dipirona foi relatado na Europa. Nesse caso, houve o desenvolvimento de anticorpos contra a dipirona, o que desencadeou a hemólise (RIBERA *et al.*, 1981). Os mesmos autores citam outros casos de anemia hemolítica imune induzida por derivados pirazolônicos. Um caso de anemia hemolítica foi reportado em uma criança que fez uso de dipirona contra a febre. Nesse caso, levanta-se a hipótese de uma relação da anemia com a deficiência da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (SANSONE *et al.* 1984).

Nesse trabalho, os três grupos expostos à dipirona apresentaram contagem de trombócitos diminuídas. Estas células estão principalmente envolvidas na resposta de coagulação e devem ainda possuir outras funções em peixes: além de homeostasia e hemostasia, a resposta na prevenção a infecções, tendo em vista que essas células são, juntamente com leucócitos, denominadas células sanguíneas de defesa orgânica (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004). A trombocitopenia pode, assim, ter efeitos críticos em peixes, não somente pelo fato de os trombócitos serem parte responsável por essa via dos mecanismos de defesa, mas também por serem grandes responsáveis no controle da perda de fluidos a partir de cicatrizes superficiais. Altos níveis de glicocorticóides e deficiência de vitamina K estão normalmente relacionados com respostas de coagulação (CAMPBELL, 2007). Rios *et al.* (2005) encontraram trombocitopenia em *Hoplias malabaricus* como resposta à privação de alimento. Assim, alguns autores supracitados formulam uma possível relação entre o desenvolvimento de algumas citopenias em humanos com o uso de fármacos.

A avaliação histológica do rim posterior de *Rhamdia quelen* mostrou alterações teciduais nos grupos expostos à dipirona. Os cortes histológicos do grupo controle mostram uma estrutura normal do tecido dos animais, com túbulos renais, glomérulos e capilares apresentando estrutura típica. Além disso, foi observada

região de centros de melanomacrófagos e de resposta inflamatória, resposta provavelmente normal do tecido à algum estímulo, evidenciando uma reação esperada de um sistema imunológico atuando dentro do padrão.

Nos três grupos expostos ao fármaco foram encontradas áreas de necrose crônica com deposição fibrosa e alteração do parênquima renal. Nos grupos expostos às concentrações de 5 e 50 µg/L de dipirona, é possível visualizar um aumento do espaço de Bowmann, e na maior concentração uma alteração da estrutura dos glomérulos, que varia de dilatação dos capilares à destruição total da estrutura. Banerjee e Bhattacharya (1994) evidenciaram alterações semelhantes, degeneração do glomérulo e cápsula de Bowmann, após exposição a mercúrio e amônia. Handy e Penrice (1993) encontraram inchaço da estrutura da cápsula de Bowmann em *Salmo trutta* (truta) e *Oreochromis mossambicus* (tilápia) após exposição a cloreto de mercúrio. Cooley *et al.*, (2000) tratam de uma alteração denominada hialinização do glomérulo, em peixes expostos ao urânio, que possivelmente seria a mesma deformação encontrada no presente estudo. Os mesmos autores encontram necrose do glomérulo.

Nos mesmos animais (grupos 5 e 50 µg/L de dipirona), notou-se ainda necrose dos vasos de grande calibre, fato que corrobora os achados dos dados hematológicos, nos quais foram apresentadas diminuições de células sanguíneas da série vermelha e trombócitos. Estes dados em conjunto fortalecem a hipótese de que o fármaco estudado pode afetar o sistema hematológico. Além disso, observou-se alteração do parênquima renal, que como já mencionado anteriormente, pode ter atividade hematopoiética. A alteração do tecido hematopoiético foi igualmente verificada por Cooley *et al.* (2000), Morris *et al.*, (2003).

No grupo exposto à menor concentração de dipirona (0,5 µg/L), observou-se vacuolização dos capilares dos glomérulos, além de um aumento significativo da produção de novos néfrons, aumento este que não é observado nos outros grupos. Esta produção exacerbada pode ser uma tentativa do organismo de reparar os danos causados pela substância, tentativa fracassada nas doses subsequentes, onde de fato, já se notam alterações histológicas graves. Durante a recomposição do rim danificado de alguns peixes, alguns autores relataram o aumento da frequência de novos néfrons (CORMIER *et al.*, 1995). Estas mesmas observações foram feitas por outros autores para outras espécies, como *Microgadus tomcod* (CORMIER *et al.*, 1995), *Carassius auratus*, *Oncorhynchus mykiss*, *Brachidanio rerio*

e *Oreochromis mossambicus*, expostos a contaminantes como mercúrio, antibióticos e solventes, conhecidos por causarem necrose e vacuolização (REIMSCHUESSEL, 2001).

A regeneração renal em peixes, é possível mesmo na fase adulta, diferentemente de mamíferos, e esta regeneração pode se dar pela produção de novos néfrons, e já foi observada por diversos autores. Salice *et al.* (2001) demonstram neogênese de néfrons seguida da exposição à gentamicina, um antibiótico aminoglicosídeo sabidamente causador de dano nefrítico. A mesma regeneração foi relatada por outros autores para diversos peixes (REIMSCHUESSEL *et al.* 1996; REIMSCHUESSEL, 2001).

Desta forma, na maior concentração, além de as alterações teciduais serem mais acentuadas, e não haver mais a produção de novos néfrons, a atividade da GST apresentou-se diminuída, o que corrobora a possibilidade do organismo, nessa concentração, ter perdido a capacidade de proteger-se das alterações impostas pela exposição à dipirona. O fato de o grupo controle apresentar alguma resposta inflamatória basal e os outros grupos não vai de encontro aos achados de necrose crônica nestes últimos grupos, o que indica que podem estar com seu sistema imunológico alterado e incapazes de defesa contra injúrias.

De modo geral, os danos apresentados no estudo histopatológico comprovam a hipótese de que a dipirona origina produtos de hidrólise e metabolismo ainda mais tóxicos, como já mostrado por outros autores anteriormente citados nesse trabalho. Esses metabólitos, ao passarem por um órgão de alta atividade excretora em peixes, como o rim posterior (EVANS, 1993; SILVA e MARTINEZ, 2007), apresentam toxicidade para o mesmo, representada por necrose, alteração do parênquima renal, e de outras unidades, como o glomérulo e vasos sanguíneos.

7. CONCLUSÕES

Nas condições apresentadas, a exposição à dipirona causou dano genético, como evidenciado pelo ensaio cometa; alterações hematológicas, principalmente em eritrócitos e trombócitos; danos estruturais, visualizados em um importante órgão excretor, como o rim posterior, além de uma provável alteração na biotransformação, embora nenhum desequilíbrio no estresse oxidativo tenha sido observado.

Assim, os resultados revelam que a constante liberação de dipirona para o ambiente aquático apresenta efeitos tóxicos para os organismos aquáticos. Estes efeitos estão relacionados com danos genéticos, discrasias sanguíneas e com o processo de biotransformação de xenobióticos, e alcança o nível tecidual. Essas alterações incluem necrose com deposição fibrosa, alteração do parênquima e tecido hematopoiético e alteração das estruturas excretoras do órgão avaliado.

Segue a necessidade de se continuar pesquisando os efeitos da liberação de fármacos sobre a fauna e flora aquáticas e sobre seres humanos, no intuito de advertir para a recente problemática desta classe de poluentes em matrizes ambientais.

REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Academic Press**, v.105, p. 121-126, 1984.

ALEXANDER, F.E., PATHEAL, S.L., BIONDI, A., BRANDALISE, S., KAMEL, A.M. Transplacental Chemical Exposure and Risk of Infant Leukemia with *MLL*. Gene Fusion1. **Cancer Research**, v. 61, p. 2542–2546, 2001.

ALMLI, B. EGAAS, E.; LODE, O. Effects of three fungicides alone and in combination on glutathione S-transferase activity (GST) and cytochrome P-450 (CYP 1A1) in the liver and gill of brown trout (*Salmo trutta*). **Marine Environmental Research**, v. 54, (3-5), p. 237-240, 2002.

AN, J.; SUN, F. Ecotoxicological effects of paracetamol on seed germination and seedling development of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal of Hazardous materials**, v. 169, n.1-3, p. 751-757, 2009.

ANSARI, R.A., KAUR, M., AHMAD, F., RAHMAN, S., RASHID, H., ISLAM, F., RAISUDDIN, S. Genotoxic and oxidative stress-inducing effects of deltamethrin in the erythrocytes of a freshwater biomarker fish species, *Channa punctata* Bloch. **Environmental Toxicology**. Publicado online: 20/10/2008. 1:28 p.m. Disponível em: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/117893500/issue>. Acesso em: 11/06/2009.

ARKHIPCHUK, V. V.; GONCHARUK, V.V.; CHERNYKH, V.P.; MALOSHTAN, L.N.; GRITSENKO, I.S. Use of a complex approach for assessment of metamizole sodium and acetylsalicylic acid toxicity, genotoxicity and cytotoxicity. **Journal of Applied Toxicology**, v. 24, p. 401-407, 2004.

ASH, R.J.; MAUCK, B. Antibiotic resistanc of gram-negative bacteria in rivers, United States. **Emerging Infectious Disease**, v. 8, p. 713-717, 2002.

BAGNYUKOVA, T. V.; STOREY, K. B.; LUSHCHAK, V. I. Adaptive response of antioxidant enzymes to catalase inhibition by aminotriazole in goldfish liver and kidney. **Comparative Biochemistry and Physiology**, part B, v. 142, n. 3, p. 335-341, 2005.

BANERJEE, S.; BHATTACHARYA, S. Histopathology of Kidney of *Channa punctatus* Exposed to Chronic Nonlethal Level of Elsan, Mercury, and Ammonia. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 29, p. 265-275, 1994.

BERNET, D., SCHIMIDT, H., MEIER, W., BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, v. 22, 25-34, 1999.

BETTERIDGE, D.J. What is oxidative stress? **Metabolism**, v.49, p.3-8, 2000.

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

BOLASINA, S.N. Cortisol and hematological response in Brazilian codling, *Urophycis brasiliensis* (Pisces, Phycidae) subjected to anesthetic treatment. *Aquaculture International*, v. 14, p. 569–575, 2006.

BOTTIGER, L.E.; BOTTIGER, B. Incidence and cause of aplastic anemia, hemolytic anemia, agranulocytosis and thrombocytopenia. **Acta Medica Scandinavica**, v. 210, p. 475-479, 1981.

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

BRAMBILLA, G., MARTELLI, A. Genotoxic and carcinogenic risk to humans of drug-nitrite interaction products. **Mutation Research**. 635, 17–52, 2007.

BRAMBILLA,G., MARTELLI, A. Genotoxicity and carcinogenicity studies of analgesics, anti-inflammatory, drugs and antipyretics. **Pharmacological Research**, v. 60, p.1-17, 2009.

BRANCHERO, P.; GIACHETTO,G. Agranulocytosis inducida por medicamentos. **Archivos de pediatría del Uruguay**, v.73, n.2, p. 74-77, 2002.

BUHELLI, T. D.; FENT, K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 25, p. 201-268, 1995.

CAMARGO, M. M. P.; MARTINEZ, C. B. R. Histopathology of gills, kidney and liver of a neotropical fish caged in an urban stream. **Neotropical Ichthyology**, v. 5, n. 3, p. 327-336, 2007.

CARNEIRO, P. C. F.; MIKOS, J. D. Frequência alimentar de alevinos de jundiá, *Rhamdia quelen*. **Ciência Rural Santa Maria**, v. 35, n.1, p. 187 – 191, 2005.

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

CHOVANEC, A.; HOFER, R.; SCHIEMER, F. Fish as bioindicators. In: MARKERT, B.A.; BREURE, A. M.; ZECHMEISTER, H.G. (eds.) **Bioindicators and Biomonitoring**. Elsevier. p. 639-671. 2003.

CLAUSS, T.M., DOVE, A.D.M., ARNOLD, J.E. Hematologic Disorders of Fish. **Veterinary clinics of North America: Exotic animal practice**, v. 11, p. 445–462, 2008.

CNUBBEN, N. H. P. The interplay of glutathione-related process in antioxidant defense. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.10, p. 141-152, 2001.

COLLIER, H. B. The standardization of blood haemoglobin determinations. **Canadian Medical Association Journal**, v. 50, p. 550-552, 1944.

CORMIER, S.M.; NEIHEISEL, T.W. WERSING, P.; RACINE, R.N.; REIMSCHUESSELI, R. New nephron development in fish from polluted waters: a possible biomarker. **Ecotoxicology**, v. 4, p. 157-168, 1995.

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

COOLEY, H.M.; EVANS, R.E.; KLAVERKAMP, J.F. Toxicology of dietary uranium in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). **Aquatic Toxicology**, v. 48, p.495–515, 2000.

DAUGHTON, C. G. Pharmaceuticals in the environment: overarching issues and overview. In: Daughton CG, Jones-Lepp T. Pharmaceuticals and Personal Care

Products in the Environment: Scientific and Regulatory Issues. Symposium Series Washington, DC, USA. **American Chemical Society**, p. 2–38, 2001.

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

EATON, D.L.; BAMMLER, T.K. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. **Toxicological sciences**. 49, p.156-164,1999.

ELAHEE, K.B.; BHAGWANT, S. Hematological and gill histopathological parameters of three tropical fish species from a polluted lagoon on the west coast of Mauritius. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 68, n. 3, p. 361–71, 2007.

EMMANUEL, E. ; PIERRE, M.G. ; PERRODIN, Y. Groundwater contamination by microbiological and chemical substances released from hospital wastewater: Health risk assessment for drinking water consumers. **Environment International**, v. 35, p. 718–726, 2009.

ENVIRONMENT AGENCY. Human Pharmaceuticals: Position Statement. Disponível em: <http://www.environment-agency.gov.uk/aboutus/512398/289428/698017/?version=1&lang=e>. Acesso em: 25 Novembro 2007.

ERGÜN, H.; FRATTARELLI, D. A. C.; ARANDA, J. V. Characterization of the role of physicochemical factors on the hydrolysis of dipyrone. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, p. 479-487, 2004.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA) Note for guidance: environment risk assessment of medicinal products for human use. Disponível em: <http://www.emea.europa.eu/pdfs/vet/regaffair/005596en.pdf>. Acesso em 08 Setembro 2007.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use. 2006. Disponível: <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/swp/444700en.pdf>. Acesso: 25 Novembro 2007.

EVANS, D.H. **The Physiology of Fish**. 2 ed. CRC Press, FL, BocaRaton, 592 pp. 1993.

FAIR, P.A.; LEE, H.B; ADAMS, J.; DARLING, C. PACEPAVICIUS, G. Occurrence of triclosan in plasma of wild Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) and in their environment. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 8-9, p. 2248-2254, 2009.

FELDMANN, D. F.; ZUEHLKE, S. HEBERER, T. Occurrence, fate and assessment of polar metamizole (dipyrone) residues in hospital and municipal wastewater. **Chemosphere**, v.71, n.9,p.1754-1764, 2008.

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

FILIPAK NETO, F. **Avaliação citotóxica em hepatócitos de *Holipias malbaricus* expostos a misturas complexas de pesticidas, MeHg e DDT.** 123 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular) – Departamento de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2007.

GALATI, G.; TAFAZOLI, S.; SABZEVARI, O.; CHAN, T.S.; O'BRIEN, P.J. Idiosyncratic NSAID drug induced oxidative stress. **Chemico-Biological Interactions**, v. 142, p. 25-41, 2002.

GAO, Z.; XU, H.; CHEN, X.; CHEN, H. Antioxidant status and mineral contents in tissues of rutin and baicalin fed rats. **Life Science**, v.73, p.1599-1607, 2003.

GEISSLINGER, G., BOCKER, R., LEVY, M. High-Performance liquid chromatographic analysis of Dipyrone metabolites to study their formation in human liver microsomes. **Pharmacological Research**, v. 13, p.1272-1275, 1996.

GIRI, A.K., MUKHOPADHYAY, A. Mutagenicity assay in Salmonella and in vivo sister chromatid exchange in bone marrow cells of mice for four pyrazolone derivatives. **Mutation Research**, v. 420, p. 15-25, 1998.

GOMES, L. C.; GOLOMBIESKI, J. I.; GOMES, A. R. C.; BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 179 – 185, 2000.

GOMEZ, M. J.; MARTINEZ BUENO, M. J.; LACORTE, S.; FERNANDEZ-ALBA, A. R.; AGUERA, A. Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. **Chemosphere**, v. 66, p. 993-1002, 2007.

GOMEZ, M.J., SIRTORI, C.; MEZCUA, M.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R.; AGUERA, A. Photodegradation study of three dipyrone metabolites in various water systems: Identification and toxicity of their photodegradation products. **Water Research**, v. 42, n. 10-11, p. 2698-2706, 2008.

GONTIJO, A.M.M.C., TICE, R. Teste de cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L.R., SALVATORE, D.M.F., MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Editora da ULBRA. 2003, p.247-279.

GROSS-SOROKIN, M.Y.; ROAST, S.D.; BRIGHTY, G.C. Assessment of feminization of male fish in English rivers by the Environment Agency of England and Wales. **Environmental Health Perspectives**, v.114, p.147–151, 2006.

HANDY, R. D.; W. S. PENRICE. The influence of high oral doses of mercuric chloride on organ toxicant concentrations and histopathology in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Comparative Biochemistry and Physiology (C)**, v. 106, p. 717-724, 1993.

HEDENMMALM, K.; SPIGSET, O. Agranulocytosis and other blood dyscrasias associated with dipyrone (metamizole). **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 58, p. 265-274, 2002.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in Biology and Biochemistry: role of free radicals. In.: **Functional metabolism: regulation and adaptation**. Ed: Kenneth B. Storey. 2004. 594 p.

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

HINE, P. M. The granulocytes of fish. **Fish Shellfish Immunology**, v. 2, p. 79-98, 1992.

HINTON, D. E. Liver toxicity. In: DI GIULIO, R. T.; HINTON, D. E. (Eds). **Toxicology of fishes**. D.E. USA: CRC press, 2008. p. 327-400.

HUGGETT, R. J. **Biomarkers**: biochemical, physiological, and histological marker of antropogenic stress. USA: Lewis Publishers, 1992.

IBAÑEZ, L., BALLARÍN, E., LAPORTE, J-R. Agranulocytosis associated with dipyrone (metamizol). **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 60, p. 821-829, 2005.

ISIDORI, M.; LAVORGNA, M.; NARDELLI, A.; PASCARELLA, L.; PARRELLA, A. Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. **Science of the Total Environment**, v. 346, p. 86 - 98, 2005.

ISIDORI, M.; NARDELLI, A.; PASCARELLA, L.; RUBINO, M.; PARRELLA, A. Toxic and Genotoxic impact of fibrates and their photoproducts on non-target organisms. **Environment International**, v.33, p. 635- 641, 2007.

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

JOBLING, S.; NOLAN, M.; TYLER, C.R.; BRIGHTY, G.; SUMPTER, J.P. Widespread sexual disruption in wild fish. **Environmental Science and Technology**, v. 32, p. 2498–2506, 1998.

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

KOBAYASHI, H. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. **MMS Communication**, v. 3, p. 103-115, 1995.

KORI-SIAKPERE, O.; AKE, J.E.G.; AVWORO, U.M. Sublethal effects of cadmium on some selected haematological parameters of *Heterobranchius bidorsalis* (a hybrid of *heterobranchus bidorsalis* and *Clarias gariepinus*). **International journal of zoological research**, v. 2, n.1, p. 77-83, 2006.

LEE, F. R.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutation Research**, v. 544, p. 43-64, 2003.

LEKNES, I. L. Melano-macrophage centres and endocytic cells in kidney and spleen of pearl gouramy and platyfish (*Anabantidae*, *Poeciliidae*: *Teleostei*). **Acta Histochemica**, v. 109, p. 164-168, 2007.

LEMAIRE, P.; LIVINGSTONE, D.R. Aromatic hydrocarbon quinine-mediated reactive oxygen species production in hepatic microsomes of the flounder (*Platichthys flesus* L.). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 1117C, p. 131-139, 1997.

LIEBLER, D. C.; REED, D. J. Free-radical defense and repair mechanisms. In: WALLACE, K. B. **Free Radical Toxicology**. Washington: Taylor & Francis, 1997. p. 141- 171.

LIGUORO, M.; BARBARA FIORETTO, B.; POLTRONIERI, C.; GALLINA, G. The toxicity of sulfamethazine to *Daphnia magna* and its additivity to other veterinary sulfonamides and trimethoprim. **Chemosphere**, v. 75, p.1519–1524, 2009.

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

LU, G. H.; WANG, C.; ZHU, Z. The dose-response relationships for EROD and GST induced by polyaromatic hydrocarbons in *Carassius auratus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 82, n. 2, p. 194-199, 2008.

MARTÍN-DÍAZ, M.L., GAGNÉ, F., BLAISE, C., The use of biochemical responses to assess ecotoxicological effects of Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs) after injection in the mussel *Elliptio complanata*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 28, n. 2, p.237-242, 2009.

MARTINS, I.; DELLA ROSA, H. V. Considerações toxicológicas da exposição ocupacional aos fármacos antineoplásicos. **Revista Brasileira de Medicina do Trabalho**, v.2, p. 118-125, 2004.

MONTSERRAT, J. M. *et al.* Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. **Comparative Biochemistry and Physiology C**, v. 146, p. 221-234, 2007.

MORRIS, D.J.; ADAMS, A.; SMITH, P.; RICHARDS, R.H. Effects of oral treatment with TNP-470 on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected with *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Malacosporea), the causative agent of proliferative kidney disease. **Aquaculture**, v. 221, p. 51–64, 2003.

MIRVISH, S.S. Experimental Evidence for Inhibition of N-Nitroso Compound Formation as a Factor in the Negative Correlation between Vitamin C Consumption and the Incidence of Certain Cancers. **Cancer Research (Suppl.)** v. 54, 1948s-1951s, 1994.

MITCHELMORE, C.L.; CHIPMAN, J.K.; GARCIA MARTÍNEZ, P. Normal status of hepatic 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity, antioxidant enzymes and DNA oxidation in turbot (*Scophthalmus maximus*) and other flatfish species following

exposure to nitroaromatic compounds. **Marine Environmental research**, v. 42, p. 329-333, 1996.

MITCHELMORE, C.L.; BIRMELIN, C. Detection of Dna strand breaks in isolated mussel (*Mytilus edulis* L.) digestive gland cells using the "comet assay". **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 41, p. 51-58, 1998.

MUÑOZ,I.; GÓMEZ, M.J.; ANTONIO MOLINA-DÍAZ, A.; GARCÍA-CALVO, E. Ranking potential impacts of priority and emerging pollutants in urban wastewater through life cycle impact assessment. **Chemosphere**, v. 74, p. 37-44, 2008.

NACCI, D. E.; CAYULAB, S.; JACKIM, E. Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. **Aquatic Toxicology**, v. 35, p. 197-210, 1996.

NAIDOO, V.; WOLTER, K.; CUTHBERT, R. DUNCAN, N. Veterinary diclofenac threatens Africa's endangered vulture species. **Regulatory Toxicology and Pharmacology** v. 53, p. 205-208, 2009.

NIKOLAOU, A.; MERIC, S.; FATTA, D. Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, p. 1225-1234, 2007.

NIGRO, M.; FRENZILLI, G.; REGOLI,F. Induction of Dna strand breakage and apoptosis in the eel *Anguilla anguilla*. *Marine Environmental research*, v. 54, p. 517-520, 2002.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free radical biology and medicine**, v. 31, n.11, p. 1287-1311, 2001.

OAKS, J.L.; GILBERT, M.; VIRANI, M.Z.; WATSON, R.T.; METEYER, C.U.; RIDEOUT, B.A. Diclofenac residues as a cause of population decline of white-backed vultures in Pakistan. **Nature**, v. 427, p. 630-633, 2004.

PEAKALL, D. W. Biomarkers: the way forward in environmental assessment. **Ecotoxicology**, v. 3, p. 173-179, 1994.

PEITL JR, P., SAKAMOTO-HOJO, E.T., SYLLOS CÓLUS, I.M. Genotoxicity activity of the insecticide nuvacron (monocrotophos) detected by the micronucleus test in

bone marrow erythrocytes of mice and in CHO cells. **Brazilian Journals of Genetics**, v.19 n.4, p. 571-576, 1996.

PIERSON, P.G., WIENKERS, L.C. 2008. **Handbook of drug metabolism**. 2 ed. Informa Healthcare. 616p.

PIMPÃO, C.T.; ZAMPRONIO, A.R.; SILVA DE ASSIS, H.C.. Effects of deltamethrin on hematological parameters and enzymatic activity in *Ancistrus multispinis* (Pisces, Teleostei). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, p.122–127, 2007.

PLOCH, S.A., LEE, Y.P., MACLEAN, E., DI GIULIO, R.T. Oxidative stress in liver of brown bullhead and channel catfish following exposure to tert -butyl hydroperoxide. **Aquatic Toxicology**. v. 46, 231- 240, 1999.

POLETTA, G.L.; LARRIERA, A.; KLEINSORGE, E.; MUDRY, M.D. Genotoxicity of the herbicide formulation Roundup((R)) (glyphosate) in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) evidenced by the comet assay and the micronucleus test. **Mutation Research**, v. 672, n.2, p. 95-102, 2008.

REIMSCHUESSEL, R. A fish model of renal regeneration and development. **Ilar Journal**, v. 42, p. 285–291, 2001.

REIMSCHUESSEL, R.; CHAMIE, S.J.; KINNEL, M. Evaluation of gentamicin-induced nephrotoxicosis in toadfish. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 209, p. 137–139, 1996.

RIBERA, A.; MONASTERIO, J.; MARTIN, C. Drug-induced immune haemolytic anemia. **Vox sanguinis**, v. 41, p. 32-35, 1981.

RIOS, F.S. OBA, E.T. FERNANDES, M.N., KALININA, A.L. RANTIN, F.T. Erythrocyte senescence and haematological changes induced by starvation in the neotropical fish trayra, *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 140, p. 281– 287, 2005.

ROBERTS, 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.

ROIG, B.; GREENWOOD, R.; BARCELO, D. An international conference on “Pharmaceuticals in the Environment” in a frame of EU Knappe project. **Environment International**, v. 35, n. 9, p. 763-765, 2009.

ROMEO, M., BENNANI, N., GNASSIA-BARELLI, M., LAFAURIE, M., GIRARD, J.P. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. **Aquatic Toxicology**, v. 48, p. 185- 194, 2000.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grunwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Memorial do Instituto Butantan**, v. 20, p. 329-334, 1947.

SALICE, C. J., ROKOUS, J. S., KANE, A. S. & REIMSCHUESSEL, R. New nephron development in goldfish (*Carassius auratus*) kidneys following repeated gentamicin-induced nephrotoxicosis. **Journal of Complementary Medicine**, v. 51, p. 56–59, 2001.

SANSONE,G; REALI, S.; SANSONE,R.; ALLEGRANZA ,F. Acute hemolytic anemia induced by a pyrazolonic drug in a child with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. **Acta haematologica**, v. 72, p. 285-287, 1984.

SEGNER, H.; CAROLL, K.; FENSKE, M.; JANSSEN, C.R.; MAACK, G. PASCOE, D.; SCHÄFERS, C.; VANDENBERGH, G. F.; WATTS, M. WENZELD, A. Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 54, p. 302–314, 2003.

SEVANIAN, A.; MCLEOD, L. Formation and biological reactivity of lipid peroxidation products. In: WALLACE, K. B. **Free Radical Toxicology**. Washington: Taylor & Francis, 1997. 442 p.

SILVA, A.G.; MARTINEZ, C.B.R. Morphological changes in the kidney of a fish living in an urban stream. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 23, p.185–192, 2007.

SIMIC, M.G. DNA Markers of Oxidative Processes in Vivo: Relevance to Carcinogenesis and Anticarcinogenesis. **Cancer Research (Suppl.)** v. 54, 1918s-1923s, 1994.

SINDERMANN, C.J. **Principal diseases of marine fish and shellfish**. 2 ed. San Diego (CA): Academic Press; 1990. 521 p.

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

STEGER-HARTMANN, T.; KÜMMERER, SCHECKER, J. Trace analysis of the ifosfamide and cyclophosphamide in sewage water by two-step solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 726, p. 179-184, 1996.

STEGEMAN, J.J.; BROUWER, M. **Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect.** In: HUGGETT, R. J. Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological markers of anthropogenic stress. Lewis publishers, Chelsea, MI, USA. 1992. p. 235-335.

STOSKOPF, M.K. **The Veterinary Clinics of North America.** V. 18, n.2, Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1988. 473 p.

STUMPF, M.; TERNES, T.A.; WILKEN, R-D; RODRIGUES, S.V.; BAUMANN,W. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **The Science of the Total Environment**, v. 225, p. 135-141, 1999.

SUN, L.; ZHA, J.; SPEAR, P., A; WANG, Z. Tamoxifen effects on the early life stages and reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 24, p. 23- 29, 2007.

SWAN, G.E.; CUTHBERT, R.; QUEVEDO, M.; GREEN, R.E.; PAIN, D.J.; BARTELS, P. Toxicity of diclofenac to Gyps vultures. **Biology Letters**, v. 2, p. 279–282, 2006.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. **Hematologia de peixes teleósteos.** Ed. Eletrônica e Arte Final. Ribeirão Preto. SP. 144p., 2004.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, G.; MELO, J. F. B.; MORAES, F. R. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV. Variáveis do jundiá *Rhamdia quelen* (Pimelodidae). **Ciência Rural**, v. 32, n. 4, p. 693-698, 2002.

TAVARES-DIAS, M.; SCHALCH, S. H. C.; MARTINS, M. L.; ONAKA, E. M.; MORAES, F. R. Haematological characteristics of Brazilian Teleosts. III. Parameters of the hybrid tambacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg x *Colossima macropomum* Cuvier) (Osteichthyes, Characidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 17, n.4, p. 899-906, 2000.

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

mesopotamicus Holmberg (Osteichthyes, Characidae) em policultivo intensivo. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 16, n. 2, p. 423 – 431, 1999.

TERNES, T.A.; STUMPF, M.; MUELLER, J.; HABERER, K.; WILKEN, R.-D.; SERVOS, M. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. investigations in Germany, Canada and Brazil. **The Science of the Total Environment**, v. 225, p. 81- 90, 1999.

THOPHON, S. M.; KRUAETRACHUE, E. S.; UPATHAN, P.; POKETHITIYOOK, S.; SAHAPHONG, JARIKHUAN, S. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer* in acute and subchronic cadmium exposure. **Environmental Pollution**, v. 121, p. 307-320, 2003.

TRIEBSKORN, R.; CASPER, H.; SCHEIL, V.; SCHWAIGER, J. Ultrastructural effects of pharmaceuticals (carbamazepine, clofibrac acid, metoprolol, diclofenac) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and common carp (*Cyprinus carpio*). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.387, p. 1405- 1416, 2007.

TRUTE, M. *et al.* Characterization of hepatic glutathione S-transferases in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Aquatic Toxicology**, v. 81, p. 126-136, 2007.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH (FDA – CDER). Guidance for industry-environmental assessment of human drugs and biologics applications, Revision 1, FDA center for drug evaluation and research, Rockville. 1998. Disponível em <http://www.fda.gov/cber/gdlns/envirn.pdf>. Acesso em: 02 Dezembro 2007.

VALAVANIDIS, A. *et al.* Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.64, p.178- 189, 2006.

VALKO, M. *et al.* Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 1–40, 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**, [S.l.], v. 13, p. 57-/149, 2003.

VINAGRE, T.M.; MONTSERRAT, J.M. Effects of heptotoxins (microcystin) on ion-regulation and antioxidant system in gills of *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Grapsidae). **Comparative Biochemistry Physiology, part C.: toxicology and Pharmacology**, v. 135, p. 65-75, 2003.

ZHANG, X.; LI, Q.; LI, G.; ZAOSHENG WANG, Z.; YAN, C. Levels of estrogenic compounds in Xiamen Bay sediment, China. **Marine pollution bulletin**, v. 58, n. 8, p. 1210-1216, 2009.

WATKINSON, A.J.; MURBYD, E.J.; KOLPINE, D.W.; COSTANZO, S.D. The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water. **Science of the total environment**, v. 407, p.2711-2723, 2009.

WDZIECZAK,J.; PERES,G. Comparative studies on superoxide dismutase, catalase and peroxidase levels in erythrocytes and livers of different freshwater and marine fish species. **Comparative Biochemistry and Physiology B**. v. 73, p. 62-69, 1982.

WEIGEL, S.; AULINGER, A.; BROCKMEYER, R.; HARMS, H; LOFFLER, J.; REINCKE, H.; SCHMIDT, R., STACHEL, B.; TUMPLING, W. von.; WANKE, A. Pharmaceuticals in the river Elbe and its tributaries. **Chemosphere**, v. 57, p. 107-126, 2004.

WILSON, J.T.; PASCOE, P.L.; PARRY, J.M.; DIXON, D.R. Evaluation of the comet assay as a method for the detection of DNA damage in the cells of a marine invertebrate, *Mytilus edulis* L. Mollusca: Pelecypoda. **Mutation Research**, 399, 87–95, 1998.

WENDELAAR, S.E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v. 77, p. 591–620, 1997.

WINDER, V.L.; SAPOZHNIKOVA, Y.; PENNINGTON, P.L.; WIRTH, E.F. Effects of fluoxetine exposure on serotonin-related activity in the sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*) using LC/MS/MS detection and quantitation. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 149, p. 559–565, 2009.