

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ARIANE GHELFI

Efeitos toxicológicos do diclofenaco em peixes *Rhamdia quelen*

CURITIBA

2014

ARIANE GHELFI

Efeitos toxicológicos do diclofenaco em peixes *Rhamdia quelen*

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Helena Cristina da Silva de Assis.

CURITIBA

2014



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO



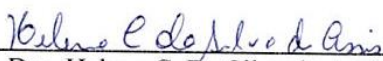
PARECER

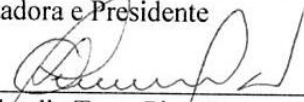
Os abaixo-assinados, membros da banca examinadora da defesa da dissertação de mestrado, a que se submeteu **Ariane Ghelfi** para fins de adquirir o título de Mestre em Ecologia e Conservação, são de parecer favorável à **APROVAÇÃO** do trabalho de conclusão da candidata.


Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação.

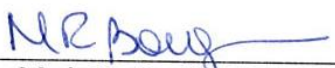
Curitiba, 21 de fevereiro de 2014.

BANCA EXAMINADORA:


Prof.^a. Dra. Helena C. Da Silva de Assis
Orientadora e Presidente


Prof.^a. Dra. Claudia Turra Pimpão
Membro


Prof.^a. Dra. Viviane Prodocimo
Membro

Visto: 
Prof.^a. Dra. Maria Regina Torres Boeger
Coordenadora do PPG-ECO

*À minha mãe Margarida e às minhas filhas
Alexandra e Lorenza, e através delas todos
os meus que antes vieram e os que ainda
virão, com infinito amor...*

AGRADECIMENTOS

Às minhas gêmeas que me dão força para seguir sempre em frente.

À minha mãe Margarida pelo grande apoio e meu irmão Juarez pelo carinho de sempre.

À professora Helena Cristina da Silva de Assis por ter dedicado seu tempo em me orientar, por ter sido sempre atenciosa, generosa e ética, por ser um exemplo de profissional e de ser humano.

Ao colegas de laboratório Juliana, Letícia, Ana Paula, Sabrina, Camila e Telma. Todas auxiliaram de alguma forma neste trabalho.

Além da Franciele pela grande ajuda e por ser uma pessoa sempre muito gentil e prestativa.

Ao João Luiz, com que muito aprendi, por dedicar seu tempo para me passar um pouco de seus muitos conhecimentos e por todo o auxílio nos experimentos.

E a Cris por toda a grande ajuda no trabalho e pelas conversas sobre a vida, sou muito grata por ter encontrado nessa caminhada uma pessoa tão especial!

Ao Laercio pelo auxílio nas análises no laboratório de genética.

E não posso deixar de agradecer à pessoas muito especiais em minha vida, que por tudo que aprendi com elas sem dúvida alguma fizeram parte desta jornada: Os professores do programa de pós-graduação em Ecologia e Conservação da UNEMAT! Em especial ao professor Cesar Enrique de Melo que me dedicou muito do seu tempo.

À todos vocês o meu profundo obrigada!

"Mais um sonho impossível... sonhar
Quem é que não tem uma louca ilusão
E um Quixote no seu coração."

União da ilha 2010

RESUMO

Entre os contaminantes emergentes que vem impactando os corpos d'água estão os fármacos. A presença de medicamentos tem sido detectada em diversos países não só na água como no solo e em sedimentos. Muitas vezes, os tratamentos de efluentes tradicionais não são eficazes na eliminação dessas substâncias, e desta forma elas ficam disponíveis no ambiente, oferecendo risco a organismos aquáticos e terrestres por serem potencialmente tóxicos. Entre esses fármacos está o diclofenaco, um anti-inflamatório amplamente prescrito mundialmente, que possui ação analgésica, anti-inflamatória e antipirética. Este trabalho objetivou avaliar os potenciais efeitos agudos tóxicos deste medicamento para o ambiente aquático, através de um bioensaio com peixes *Rhamdia quelen*, uma espécie nativa da América do Sul. Organismos juvenis foram expostos nas concentrações de 0,2, 2 e 20 µg/L de diclofenaco sódico em água. Após 96 horas de exposição os animais foram anestesiados para a coleta de sangue e posteriormente eutanasiados. No fígado e rim posterior foram avaliados os biomarcadores bioquímicos de estresse oxidativo CAT, SOD, GPX, GSH, GST e LPO e para avaliar a genotoxicidade foi utilizado o ensaio cometa. No sangue foram avaliados biomarcadores hematológicos e o genotóxico. No fígado não foi evidenciada nenhuma alteração nos biomarcadores bioquímicos e na genotoxicidade. No rim foi observado aumento na atividade da SOD nas concentrações de 2 e 20 µg/L, diminuição da LPO e de dano genético na maior concentração de diclofenaco testada. Nos resultados dos ensaios hematológicos o número de eritrócitos diminuiu nas concentrações de 0,2 e 2 µg/L, o número de neutrófilos aumentou na maior concentração e o de monócitos apresentou aumento na concentração de 2 µg/L. O número de linfócitos e mononucleares diminuiu nas concentrações de 2 e 20 µg/L. Esses resultados sugerem que a exposição aguda ao diclofenaco provoca alterações hematológicas e renais em *R. quelen*, apresentando risco potencial de afetar essa espécie e conseqüentemente o ecossistema no qual encontra-se inserida.

Palavras- chave: Toxicologia ambiental, diclofenaco, *Rhamdia quelen*, hematologia, biomarcadores.

ABSTRACT

The pharmaceuticals are among the emerging contaminants that are impacting water bodies. Drugs have been detected in water, soil and sediment of different countries. Sometimes conventional methods of sewage treatment do not remove these substances, that become available in the environment and can cause risks to aquatic and terrestrial organisms, because are potentially toxic. The non-steroidal inflammatory drug diclofenac represents one of the detected compounds in the environment and it has analgesic, anti-inflammatory and antipyretic action. The aim of this study was to evaluate the potential toxic effects of diclofenac to the aquatic environment, using bioassay with a native fish species of the South America, *Rhamdia quelen*. Juveniles were exposed to three concentrations of diclofenac: 0.2, 2 and 20 µg/L in the water. After 96 hours of exposure, the animals were anesthetized, the blood was taken and they were submitted to euthanasia. The oxidative stress biomarker CAT, SOD, GPX, GSH, GST e LPO and genotoxicity biomarker single-cell gel electrophoresis, were evaluated in liver and posterior kidney. In the blood was evaluated genotoxicity and hematological biomarkers. In the liver was not observed alterations in the biochemical biomarkers and genotoxicity. In the fish kidney was observed an activity increasing of superoxide dismutase at 2 and 20 µg/L, a decrease in liperoxidation and DNA damage in the highest concentration in relation to the control group. In the hematology the red blood cells number decreased at 0.2 and 2 µg/L, the number of neutrophils increased in the highest concentration, and the number of monocytes increased at 2 µg/L. The lymphocytes and mononuclear counts decreased in concentrations 2 and 20 µg/L. These results suggest that acute exposure to diclofenac causes renal and hematological changes in fish *R. quelen*, with potential to affect this species and consequently its ecosystem.

Keywords: environmental toxicology, diclofenac, *Rhamdia quelen*, hematology, biomarkers.

LISTA DE ABREVIATURAS

LPO- Lipoperoxidação

SOD- Superóxido dismutase

CAT- Catalase

GSH- Glutathiona reduzida

GST- Glutathiona S-transferase

GPx- Glutathiona peroxidase

AINE- Anti-inflamatório não-esteroidal

ERO'S- Espécies reativas de oxigênio

-OH- Íon Hidroxila

-SH- Íon Sulfidrila

-COOH- Íon Carboxila

O₂•⁻ - Ânion Superóxido

H₂O₂- Peróxido de Hidrogênio

OH•- Radical Hidroxil

LH- Ácido Graxo Insaturado

L•- Radical Lipídico

LOO• - Radical Peroxila

LOOH- Hidroperóxido Lipídico

RBC- Red blood cells

WBC- White blood cells

MCV- Volume Corpuscular Médio

HCM- Hemoglobina Corpuscular Média

CHCM- Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

ETE- Estação de tratamento de efluentes

P.A. – Para análise

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: ESTRUTURA QUÍMICA DO DICLOFENACO.	17
FIGURA 2: REAÇÕES DO PROCESSO DE LIPOPEROXIDAÇÃO.	21
FIGURA 3: REAÇÃO DE DISMUTAÇÃO DO O ₂ ^{•-}	22
FIGURA 4: REAÇÃO CATALISADA PELA CATALASE.	22
FIGURA 5: FÓRMULA DA GLUTATIONA REDUZIDA.	23
FIGURA 6: FÓRMULA DA GLUTATIONA OXIDADA.	23
FIGURA 7: EXEMPLARES DE JUNDIÁ (<i>RHAMDIA QUELEN</i>).	30
FIGURA 8: COLETA DE SANGUE.	32
FIGURA 9: FÍGADO COLETADO.	33
FIGURA 10: FÓRMULAS DOS ÍNDICES HEMATIMÉTRICOS.	36
FIGURA 11: CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DO DICLOFENACO EM ÁGUA SEM PEIXES. ...	40
FIGURA 12: CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DO DICLOFENACO EM ÁGUA COM PEIXES. ..	40
FIGURA 13: BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS NO FÍGADO	41
FIGURA 14: BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS NO RIM POSTERIOR	43
FIGURA 15: ESCORES DE DANO GENÉTICO OBTIDOS ATRAVÉS DO ENSAIO COMETA .	46

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE <i>RHAMDIA QUELEN</i> APÓS EXPOSIÇÃO AO DICLOFENACO POR UM PERÍODO DE 96 HORAS.....	45
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 Fármacos e o meio ambiente.....	14
2.2 Diclofenaco.....	16
2.3 Biomarcadores bioquímicos.....	19
2.3.1 Biotransformação.....	19
2.3.2 Estresse oxidativo.....	20
2.4 Biomarcadores hematológicos.....	24
2.5 Biomarcadores genéticos.....	25
2.6 Organismo de estudo.....	26
3. HIPÓTESE.....	28
4 OBJETIVOS.....	29
4.1 Objetivos gerais.....	29
4.2 Objetivos específicos.....	29
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
5.1 Animais.....	30
5.2 Experimento.....	30
5.2.1 Cinética de degradação do diclofenaco na água.....	30
5.2.4 Bioensaio.....	31
5.3 Coleta de material.....	32
5.4 Processamento das amostras.....	33
5.4.1 Biomarcadores bioquímicos.....	33
5.4.2 Biomarcadores hematológicos.....	35

5.4.3 Biomarcador genético.....	37
5.5 Análise estatística.....	38
6 RESULTADOS.....	39
6.1 Cinética de degradação do diclofenaco na água.....	39
6.2 Biomarcadores bioquímicos.....	40
6.3 Biomarcadores hematológicos.....	44
6.4 Biomarcadores genéticos.....	45
7 DISCUSSÃO.....	47
8 CONCLUSÕES.....	56
9 REFERÊNCIAS.....	57

1 INTRODUÇÃO

A água é um recurso natural imprescindível para todas as formas de vida do planeta. Sua preservação é essencial para o futuro da sobrevivência dos diversos organismos, no entanto, a interação dos recursos hídricos naturais com a evolução das atividades humanas comprometem esses sistemas (GIUPPONI & SGOBBI, 2013).

Os produtos farmacêuticos estão cada vez mais sendo investigados enquanto poluentes ambientais, por sua crescente disponibilidade no ambiente e os potenciais riscos à biota dos ecossistemas onde estão sendo inseridos (VERLICCHI *et al.*, 2012). Essas substâncias são disponibilizadas para ambiente por diversas vias, sendo que podem ser eliminadas, na forma inalterada ou metabolizada, por humanos e animais, ou descartadas inadequadamente em aterros e lixões sendo em seguida lixiviado, contaminando o solo e os lençóis freáticos (CHAPMA *et al.*, 2006). Estudos têm demonstrado que, muitas vezes, os fármacos não são completamente eliminados nas estações de tratamento de efluentes, sendo assim lançados nos corpos d'água superficiais, isso porque as ETE's (Estação de tratamento de efluentes) geralmente são projetadas para tratar compostos orgânicos e microbiológicos e não produtos farmacêuticos complexos (VERLICCHI *et al.*, 2012). Pesquisas recentes visam desenvolver tecnologias pra eficaz remoção desses contaminantes (KYZAS *et al.*, 2013).

Uma vez disponíveis no ambiente, os fármacos podem dar origem a uma série de efeitos adversos em organismos aquáticos e terrestres, sendo que estes efeitos podem ocorrer em qualquer nível da hierarquia biológica, podendo haver danos desde o nível celular até o comprometimento de um ecossistema inteiro (BILA & DEZOTTI, 2003). Estudos têm observado a presença produtos farmacêuticos de diversas classes, como anti-inflamatórios e hormônios, em ambientes aquáticos em diversos países como Alemanha, Canadá, Inglaterra, Holanda, Suécia, Estado Unidos, Itália e Brasil, normalmente em concentrações entre ng/L e µg/L (BILA & DEZOTTI, 2003; KOLPIN *et al.*, 2002).

O diclofenaco pertence à classe dos anti-inflamatórios não-esteroidais, e é um dos medicamentos mais vendidos no Brasil, sendo amplamente comercializado devido a sua grande diversidade de aplicações. Segundo MEMMRET *et al.* (2013) o consumo mundial do diclofenaco como droga farmacêutica é estimado em mais de 1000 toneladas por ano. Esse princípio ativo vem sendo detectado no ambiente em várias partes do mundo em concentrações variadas.

Para testar os potenciais efeitos causados a organismos pela exposição a fármacos têm sido cada vez mais utilizados ensaios toxicológicos. Estes caracterizam as amostras analisadas pelos efeitos biológicos dos compostos químicos presentes, dando informações além das análises químicas, que apresentam apenas quantificações, as consequências da presença daquela substância no ambiente (GUSTAVSON *et al.*, 2000). Neste tipo de análise são utilizados biomarcadores, que são respostas precoces do organismo que podem ser de natureza bioquímica, fisiológica, morfológica ou comportamental, apresentadas por um organismo após sua exposição a uma substância xenobionte (MELANCON, 1995).

Entre os organismos mais utilizados em pesquisas toxicológicas estão diversas espécies de peixes, entre elas o jundiá, *Rhamdia quelen*, que é um peixe endêmico da América do Sul, distribuído da Argentina até o México, que pode chegar a cerca de 50cm de comprimento e pesar cerca de 3 kg. Possui hábito noturno e preferência por locais calmos e profundos de rios (GOMES *et al.*, 2000). Por ser de fácil adaptação às condições de cultivo essa espécie vem sendo utilizada para consumo humano e para pesquisas científicas (BARCELLOS *et al.*, 2004).

Com base nisso, este trabalho teve por objetivo realizar um bioensaio utilizando *Rhamdia quelen*, para determinar possíveis efeitos tóxicos agudos do diclofenaco através de biomarcadores, desta forma, evidenciando o risco potencial desta substância no ambiente.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fármacos e o meio ambiente

Nos últimos anos os fármacos passaram a ser detectados, figurando entre os poluentes, em diversas matrizes ambientais, tais como águas superficiais, solo e lençóis freáticos (VERLICCHI *et al.*, 2012). Este fato pode ser atribuído ao uso crescente de medicamentos devido ao desenvolvimento da indústria farmacêutica e o aumento da expectativa de vida da população, pois as pessoas estão vivendo mais e usando mais fármacos a medida que envelhecem (VAN DER AA *et al.*, 2011). Além disso, o desenvolvimento de técnicas analíticas passou a possibilitar a quantificação de fármacos, entre outros micropoluentes, presentes em baixas concentrações em águas tratadas (KÜMERER, 2010).

O surgimento de novos fármacos é crescente, segundo GIGER (2002) mais 4.000 substâncias químicas já estavam sendo utilizadas com fins farmacêuticos. Entre os maiores produtores de medicamento no mundo estão a União Europeia, em primeiro lugar, seguida pelos Estados Unidos, Ásia, Japão e Brasil em quinto lugar (BINIECKA *et al.*, 2005).

Produtos de higiene pessoal, agrotóxicos, produtos de uso veterinário, fármacos, embalagens de alimentos e micro-organismos, são exemplos dos denominados contaminantes emergentes, que são contaminantes que apesar de encontrados no ambiente, normalmente não são monitorados no ambiente, no entanto, oferecem risco potencial a saúde e ao meio ambiente (SILVA *et al.*, 2011). Muitos deles vêm sendo detectados com frequência nos últimos anos em águas naturais, oriundos principalmente de efluentes domésticos e industriais, cujos tratamentos convencionais, muitas vezes, não são capazes de eliminá-los (REIS FILHO *et al.*, 2007; SODRÉ *et al.*, 2010).

O fato de que os fármacos são desenvolvidos para serem mais persistentes nas prateleiras dos estabelecimentos comerciais, com a finalidade de conservar suas propriedades químicas mantendo sua eficácia para o uso terapêutico, faz com

que uma alta quantidade seja excretada de forma inalterada no ambiente, além de seus metabólitos (JHONSON *et al.*, 2013). Uma vez disponíveis no ambiente, os fármacos podem dar origem a uma série de efeitos adversos em organismos aquáticos e terrestres, e estes efeitos podem ocorrer em qualquer nível da hierarquia biológica, ou seja, pode haver danos desde o nível celular até o comprometimento de um ecossistema inteiro (BILA & DEZOTTI, 2003).

As substâncias farmacêuticas podem ser disponibilizadas no ambiente de diversas formas, entre elas através do descarte direto de remédios, que não são utilizados por completo e/ou muitas vezes excedem o prazo de vencimento, e acabam posteriormente sendo depositados no lixo doméstico ou no esgoto comum (CHIEN *et al.*, 2013). Outra forma é através da excreção, pois no organismo o medicamento é biotransformado total ou parcialmente, e as substâncias que são originadas nesse processo, são os denominados metabólitos, podendo ser excretados pelos pulmões, trato gastrointestinal, rins e secreções corporais (BIJLSMA *et al.*, 2013).

Segundo a lei da Política Nacional de Resíduos Sólidos nº 12.305/ 2010, deve ser observada a responsabilidade compartilhada pelos resíduos sólidos gerados entre os diferentes setores, na qual fabricantes, importadores, distribuidores, comerciantes e consumidores tem responsabilidade sobre a destinação dos resíduos, os quais estão incluídos os medicamentos em desuso. A Lei estadual de nº17.211/ 2012 que dispõe sobre a responsabilidade da destinação dos medicamentos vencidos ou sobras, oriundos dos domicílios, trata da destinação adequada desses produtos no estado do Paraná. No Paraná os estabelecimentos que produzem ou comercializam medicamentos devem ter pontos de coleta, onde a população deve dispor esses produtos.

Segundo COMORETTO & CHIRON (2005), entre os principais locais onde ocorrem a presença de fármacos residuais estão o rios, devido ao despejo do esgoto doméstico, industrial, hospitalar e rural; os lençóis freáticos, pela ocorrência de infiltração de efluentes contaminados; os sedimentos, pela deposição de substâncias; o solo, pelo despejo inadequado e os oceanos, através de esgotos ou rios contaminados.

Um fato preocupante é que os processos convencionais de tratamentos de efluentes, muitas vezes não são capazes de eliminar os fármacos, fazendo com que esses químicos sejam lançados, contaminando águas superficiais (VERLICCHI *et al.*, 2012) Os fármacos residuais podem oferecer uma série de riscos potenciais. Diversos estudos vêm sendo realizados com antibióticos, por sua característica de selecionar microrganismos resistentes e por ser amplamente utilizado, e também com estrógenos, devido ao seu potencial de afetar o sistema reprodutivo dos organismos aquáticos, podendo causar a feminização de algumas espécies de peixes em rios contaminados (FERNANDES *et al.*, 2011).

REIS FILHO *et al.* (2007) apontam que entre os principais medicamentos que são potencialmente nocivos aos organismo aquáticos estão os antibióticos amoxicilina, tetraciclina, azitromicina, ciprofloxacina e eritromicina; os anti-inflamatórios diclofenaco e ibuprofeno; os hormônios 17α -etinilestradiol, 17β -estradiol, dietilbestrol, levonorgestrel, testosterona e tiroxina; o anti-hipertensivo reserpina; os antiulceroso omeprazol e ranitidina, os analgésicos paracetamol, dipirona sódica, codeína, ácido acetilsalicílico e tramadol; os cardiovasculares captopril, propranolol, diltiazem, verapamil e lisinopril; e os antidepressivos fluoxetina e citalopram.

No Brasil vários fármacos já foram identificados. No Rio de Janeiro encontrou-se no esgoto bruto o estrogênio 17β -estradiol na concentração de $0,021\ \mu\text{g/L}$ e estrona na concentração $0,04\ \mu\text{g/L}$ (TERNES *et al.*, 1998). Em rios do Estado de São Paulo foi detectado o hormônio estriol em concentrações em ng/L em águas superficiais (JARDIM *et al.*, 2012).

2.2 Diclofenaco

O diclofenaco (Fig. 1) é um fármaco pertencente a classe dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) (MEMMERT *et al.*, 2013). Os AINES estão entre os medicamentos mais amplamente prescritos em todo o mundo, além de serem utilizados muitas vezes sem prescrição (HANG *et al.*, 2004). Estes fármacos possuem atividade analgésica, antipirética e anti-inflamatória (MEMMERT *et al.*,

2013; TAGIROVA & MUKHUTDINOVA, 2005). O mecanismo de ação do diclofenaco está associado à inibição da síntese das prostaglandinas através da inibição da ciclo-oxigenase, mais precisamente das isoenzimas COX-1 e COX-2, que por sua ação catalítica promovem a formação de prostaglandinas (GELLER *et al.*, 2012). Como essa classe de medicamento é bastante utilizada em doenças articulares, o seu uso é realizado em altas doses ou por período continuado, o que pode resultar em diversos efeitos colaterais como comprometimento do fígado, rim, baço e medula (RAINSFORD & VELO, 1992) e principalmente no trato gastrointestinal, como irritação, sangramento e ulceração (MULLER *et al.*, 2004).

A estrutura química do diclofenaco está representada figura 1. O hidrogênio da hidroxila pode ser substituído por Na, K, resultando em diclofenaco sódico ou potássico ou ainda por resina. O diclofenaco de potássio é comercializado como Cataflan® e o de sódio como Voltaren®, entre outras (RIGOBELLO, 2012). Essa substância possui fracas propriedades ácidas, e sua solubilidade depende do pH do meio, sendo por exemplo insolúvel em ácido clorídrico, ligeiramente solúvel em água e bastante solúvel em tampão fosfato pH 6,8. Os principais metabólitos do diclofenaco são os 4'-hidroxi, que são excretados pela urina e pela bile, sendo que a quantidade eliminada sem nenhuma alteração é bastante pequena (BRUNTON *et al.*, 2007).

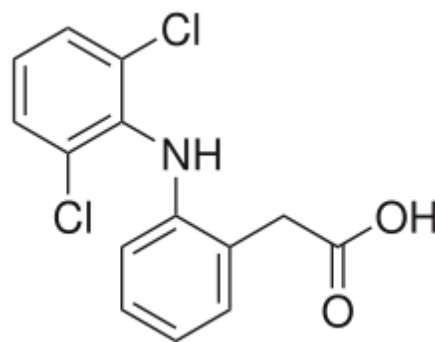


FIGURA 1: Estrutura química do diclofenaco.
Fonte: ZHANG *et al.*, 2012.

A presença do diclofenaco vem sendo identificada em águas superficiais em diversos países nos últimos anos. Segundo levantamento realizado por ISLAS-

FLORES *et al.* (2013) em diversos países europeus este fármaco foi detectado em concentrações entre 10 a 2200 ng/L e no México de 0,25 a 0,50 mg/L. No Brasil as concentrações de diclofenaco observadas em corpos d'água remetem sempre a faixa de ng a µg/L, GHISELLI (2006) encontrou em rios até 6,0 µg/L e em esgoto bruto 2,87 µg/L dessa substância.

O diclofenaco está presente em um clássico estudo de caso da área de ecologia envolvendo decréscimo de população. Na década de 90 na Índia e Paquistão começou-se a observar um grande declínio na população de abutres da espécie *Gyps bengalensis*, ao calcular as “taxas de crescimento populacional”, ecólogos verificaram que esta era de cerca de 0,50, o que significa uma taxa de declínio da população de cerca de 50% ao ano, o que era extremamente alarmante, uma vez que os abutres desempenham um importante papel no ecossistema daquela região, para remoção de cadáveres de grandes animais e até de humanos, acelerando o processo de ciclagem de nutrientes. Os pesquisadores demoraram anos até encontrar a causa das mortes, que era exatamente a contaminação por diclofenaco. Os abutres foram contaminados pela ingestão de animais domésticos tratados com diclofenaco, e após essa ingestão sofriam falência renal (TOWNSEND *et al.*, 2006).

Segundo SOUZA & FERRÃO (2006) o diclofenaco é utilizado em 120 países, sendo o AINE mais utilizado e a droga mais vendida no mundo. No entanto, apesar dos benefícios terapêuticos, os AINES são responsáveis por uma grande porcentagem das reações adversas causadas por medicamentos, além de estarem presentes em relatórios de óbitos relacionados a drogas. O diclofenaco de sódio tem sido associado a quadros graves de hepatotoxicidade (VAN LEEUWEN *et al.*, 2011).

Estudos toxicológicos, envolvendo exposição de peixes ao diclofenaco, indicaram que carpas expostas as concentrações de 1, 10 e 100 mg/L apresentam alterações hematológicas e bioquímicas (SARAVANAN *et al.*, 2011), além de, nas fases iniciais do ciclo de vida dos peixes, causar estresse oxidativo e mortalidade (STEPANOVA *et al.*, 2013).

2.3 Biomarcadores bioquímicos

A poluição dos corpos d'água pode causar diversos efeitos nocivos aos organismos presentes nestes sistemas. É comum substâncias poluentes estarem presentes em pequenas concentrações, muitas vezes resultando em danos subletais não aparentes, ou seja, que não causam a morte, mas podem gerar uma série de consequências deletérias ao organismo (HANG *et al.*, 2004). Para avaliar esses efeitos tem sido utilizados biomarcadores, ou marcadores biológicos, que podem ser definidos como variações induzidas em um organismo pela exposição à compostos xenobióticos em componentes celulares, bioquímicos, estruturais ou em alguma função, que podem ser mensurados em uma amostra (JEBALI *et al.*, 2012).

2.3.1 Biotransformação

Segundo HEATH (1987) os teleósteos podem absorver os poluentes disponíveis no ambiente aquático através da alimentação, da ingestão da água, das brânquias, e da pele, sendo que uma parte do contaminante pode ser bioacumulada no organismo e grande parte é transferida para o fígado e rim, onde ocorre a biotransformação pela ação de enzimas, tornando as substâncias mais hidrossolúveis e para dessa forma serem eliminadas pelas diversas formas de excretas.

A biotransformação é um processo no qual os compostos xenobióticos lipofílicos são metabolizados de forma a originar substâncias finais mais hidrossolúveis que serão mais facilmente eliminadas pelo organismo. Se não fosse realizada a biotransformação os xenobióticos lipofílicos seriam excretados muito lentamente e desta forma haveria acumulação, o que poderia comprometer a saúde e a vida do organismo. Como na maioria das vezes a biotransformação resulta na diminuição do efeito tóxico dos xenobióticos, ela é considerado um processo de desintoxicação (ABASS *et al.*, 2012).

Nesse mecanismo estão envolvidas diversas enzimas, que apesar de serem encontradas na maioria dos tecidos a maior atividade ocorre no fígado e em tecidos como trato gastrointestinal, pele, pulmão, muco nasal, e em órgãos como rins, pâncreas, coração, cérebro e gônadas (PARKINSON, 2001).

O processo de biotransformação ocorre em duas etapas, geralmente denominadas de fase I e II. Na fase I ocorrem as reações catabólicas, como oxidação, redução e hidrólise, na qual fica exposto um grupo químico reativo como -OH, -SH e -COOH, desta forma a substância originada apresenta grupos funcionais que possibilitam as reações da fase seguinte, ou seja de conjugação a um composto endógeno (PARKINSON, 2001).

Na fase II ocorrem as reações anabólicas, envolvendo conjugações que normalmente resultam em substâncias inativas. Nesta etapa o metabólito originado na fase I é ligado covalentemente a uma molécula endógena como ácido glicurônico, glutathione, sulfatos orgânicos e aminoácidos, resultando em um conjugado hidrossolúvel (GIBSON & SKETT, 1994). A enzima glutathione S-transferase age na fase II, sendo responsável pela conjugação da glutathione reduzida (GSH) com o metabólito, formando uma molécula mais fácil de ser eliminada (JEBALI *et al.*, 2012).

2.3.2 Estresse oxidativo

Os organismos aeróbios consomem oxigênio e utilizam-no para a oxidação dos alimentos consumidos com a finalidade de obter energia (ALBERTS *et al.*, 1997). Nesse metabolismo são gerados uma série de compostos com oxigênio que são altamente reativos denominados EROS (espécies reativas de oxigênio), entre eles o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($HO\cdot$) (LUSHCHAK, 2011). Cerca de 2% do oxigênio consumido pelos organismos é transformado em EROS, sendo que possuem uma série de defesas para desintoxicação desses compostos. Porém quando ocorre o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e sua eliminação ou neutralização ocorre o chamado estresse oxidativo, que pode ser oriundo da presença de xenobióticos (MONTEIRO *et al.*, 2013).

Entre os biomarcadores de estresse oxidativo estão a lipoperoxidação ou peroxidação de lipídios (LPO). As EROS reagem com os lipídios das membranas celulares iniciando o processo de lipoperoxidação, no qual se realiza uma cadeia de reações gerando diversos compostos, alguns deles bastante tóxicos (LIPPMAN, 1983). Nesse processo o radical livre interage com um ácido graxo da membrana celular sequestrando um átomo de hidrogênio, o que resulta na formação de um radical lipídico que reage com O_2 originando um radical peroxila, este também irá sequestrar um outro hidrogênio de um outro ácido graxo, formando um hidroperóxido e um novo radical lipídico, continuando assim a reação em cadeia da lipoperoxidação (Figura 2).

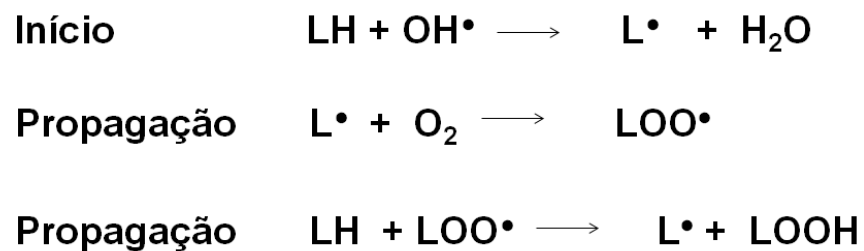


FIGURA 2: Reações do processo de lipoperoxidação. LH: ácido graxo insaturado; OH^{\bullet} : radical livre; L^{\bullet} : radical lipídico; LOO^{\bullet} : radical peroxila e LOOH: hidroperóxido lipídico. Fonte: GUARATINI *et al.*, 2007.

Como consequência ocorre dano na função das membranas celulares e organelas (MEAGHER & FITZGERALD, 2000), sendo que as membranas podem tornar-se rígidas, perder sua permeabilidade e ainda ter sua estrutura comprometida (SEVANI & MCLEOD, 1997).

Entre as defesas que o organismo possui para eliminação dos EROS, estão as defesas antioxidantes enzimáticas. Para que as concentrações das espécies reativas na célula sejam mantidas reduzidas á a ação combinada de três enzimas SOD, CAT e GPX (MONTEIRO *et al.*, 2013; CHANCE *et al.*, 1979).

As Superóxido dismutase (SOD) são metaloenzimas que podem apresentar como grupo prostéticos Mn, Fe ou Cu/Zn (FRIDOVICH, 1986). Desempenham uma

das funções mais importantes no organismo no combate aos radicais livres, realiza a função de catalisar a dismutação do superóxido em peróxido e oxigênio (Figura 3) (ZHENG *et al.*, 2010). A SOD tem sido considerada um excelente biomarcador de estresse oxidativo, sendo sua atividade inibida quando o organismo é exposto a determinados compostos (CHANDRAN *et al.*, 2005).



FIGURA 3: Reação de dismutação do $\text{O}_2^{\bullet-}$ catalisada pela SOD, onde $\text{O}_2^{\bullet-}$ é o radical superóxido e H_2O_2 é o peróxido de hidrogênio. Fonte: GUARATINI *et al.*, 2007.

A catalase (CAT) é uma enzima que atua na metabolização de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Figura 4) (VAN DER OOST *et al.*, 2002). Essa enzima localiza-se nos peroxissomos (organelas celulares), estando presente na maioria dos tecidos principalmente no fígado e eritrócitos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Além de atuar na decomposição do peróxido de hidrogênio, atua na oxidação de compostos hidrogenados como metanol, etanol, ácido fórmico e fenóis (AEBI, 1984). Essa enzima apresenta uma elevada atividade quando o organismo encontra-se em estresse oxidativo (CHANDRAN *et al.*, 2005).



FIGURA 4: Reação catalisada pela Catalase.
Fonte: GUARATINI *et al.*, 2007.

A glutathione é um tripeptídeo que possui em sua estrutura um radical sulfidrila. Na forma reduzida de tiol denomina-se GSH (Figura 5) e na forma oxidada GSSH, onde dois tripeptídeos estão ligados através de uma ponte de dissulfeto (Figura 6).

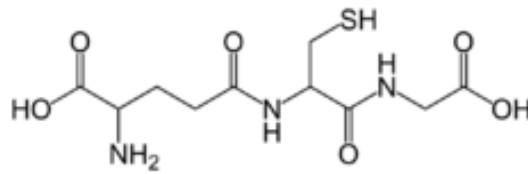


FIGURA 5: Fórmula da glutathiona reduzida.
Fonte: Adaptado de HUBER *et al.*, 2008.

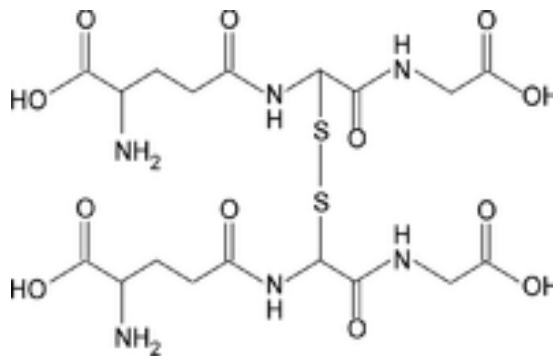


FIGURA 6: Fórmula da glutathiona oxidada.
Fonte: Adaptado de HUBER *et al.*, 2008.

Na reação de redução de GSSH a GSH atua a enzima glutathiona redutase (GR) e a enzima responsável pela oxidação de GSH a GSSH é a glutathiona peroxidase (GPx). A glutathiona S-transferase é uma enzima que catalisa a conjugação da GSH tanto com compostos endógenos, como com substâncias exógenas, a fim de torná-las menos tóxicas, mais hidrossolúveis, e mais facilmente excretadas (TEKMAN *et al.*, 2008).

A GSH está presente em altas concentrações dentro das células de todos os organismos aeróbios e está associado a diversas funções como a síntese de proteína e DNA, integridade do citoesqueleto e defesa contra moléculas oxidantes e compostos xenobióticos, atuando contra as EROS (PEÑA-LLOPIS *et al.*, 2002). A GPX atua na redução do peróxido de hidrogênio a água e oxigênio, utilizando como doador de elétrons a glutathiona reduzida (GSH), além de estar envolvida na redução de peróxidos orgânicos, como os lipoperóxidos gerados na lipoperoxidação (DI

GIULIO *et al.*, 1995). Na fase II do processo de biotransformação de xenobióticos ocorre a transferência da GSH para grupamentos bioativos pela ação da enzima GST, a GSH atua então como um co-substrato endógeno de destoxificação (JEBALI *et al.*, 2012; MONKS *et al.*, 1990).

2.4 Biomarcadores hematológicos

Estudos hematológicos visam investigar os padrões e as alterações das células do sangue, sendo de interesse ecológico, uma vez que há relação entre as características sanguíneas e a adaptabilidade dos peixes ao ambiente (LOPES *et al.*, 2010). Portanto, a análise das características hematológicas é de grande importância em animais expostos a produtos químicos (OMOREGIE, 1998). Diversas alterações hematológicas foram verificadas em peixes, quando expostos ao lindano e à metais pesados verificou-se diminuição no número de eritrócitos, ao herbicida clomazone ocorreu diminuição da hemoglobina, e à fármacos, como o diclofenaco, o número de eritrócitos diminuiu e o de leucócitos apresentou aumento após as exposições (KANDEMIR *et al.*, 2010; MEDHI & HAZARIKA, 2013; PEREIRA *et al.*, 2013; SARAVANAN *et al.*, 2011).

Os testes hematológicos normalmente avaliam os componentes da porção figurada do sangue, formada por eritrócitos, hemácias ou glóbulos vermelhos, que são responsáveis pelo transporte de oxigênio, leucócitos, que são responsáveis pela defesa dos organismos e trombócitos ou plaquetas, que assim como em mamíferos, em peixes atuam na coagulação sanguínea, além de auxiliarem na defesa do organismo (TAVARES-DIAS & MORAES, 2004).

A análise das células vermelhas inclui a contagem total de eritrócitos, a concentração de hemoglobina e taxa de hematócrito, e os índices hematimétricos absolutos. Os índices hematimétricos utilizados são o volume corpuscular médio (VCM), que expressa o volume médio dos eritrócitos, a hemoglobina corpuscular média (HCM), que indica o peso médio de hemoglobina por eritrócito, e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), indica o valor médio da porcentagem em peso da hemoglobina por eritrócito (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2004).

Para a avaliação dos glóbulos brancos é realizada a contagem total e diferencial de leucócitos, sendo que esta avalia as variedades morfológicas leucocitárias e as expressa de forma percentual, ou relativa e absoluta, em mm^3 . Os leucócitos estão divididos em polinucleares e mononucleares. Entre os mononucleares estão os linfócitos, relacionados aos processos de rejeição realizados pelo organismo e também aos processos inflamatórios (FINN & NIELSON, 1971) e os monócitos, que agem no foco inflamatório realizando a função de macrófagos (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2004). Entre os principais polinucleares estão os neutrófilos, que representam a primeira reação de defesa contra infecções bacterianas, tratando-se também células fagocíticas (THUVANDER *et al.*, 1987).

É importante ressaltar que ocorrem variações nos componentes do sangue tanto de acordo com as condições patológicas, quanto entre animais de diferentes tamanhos e em diferentes fases do ciclo de vida, havendo ainda interferência de outros fatores como dieta nutricional e sazonalidade (AZEVEDO *et al.*, 2006).

2.5 Biomarcadores genéticos

Entre os danos que a exposição a fármacos pode causar aos organismos estão os danos na estrutura do DNA. Uma série de substâncias foram apontadas como responsáveis por danos genéticos em organismos aquáticos, sendo que algumas agem diretamente sobre o DNA, outras geram metabólitos ou EROS que irão causar os danos ou ainda inibem sua síntese ou reparo (LEE & STEINERT, 2003).

Entre os biomarcadores mais utilizados na avaliação de danos genéticos após a exposição do organismo a substâncias xenobióticas estão o teste de micronúcleo e o ensaio cometa (VAN DER OOST, 2002). O ensaio cometa, também conhecido como SCGE (Single Cell Gel Eletrophoresis), tem como objetivo identificar lesões genômicas (GONTIJO *et al.*, 2003), trata-se de uma técnica de eletroforese em microgel, na qual as células com mais danos migram a partir do núcleo formando uma imagem semelhante a um cometa, de acordo com o comprimento que os fragmentos migraram é possível estabelecer diferentes níveis de dano e caso a

imagem permaneça circular, sem migração, conclui-se que a célula não apresenta dano em seu DNA (COLLINS & AZQUETA, 2012).

2.6 Organismo de estudo

Devido à facilidade de sua criação comercial no país, o Jundiá (*R. quelen*) é uma espécie de bagre que tem recebido grande atenção entre os cientistas brasileiros, sendo essa espécie utilizada em pesquisas recentes na investigação de aspectos ecológicos, de dieta alimentar, fisiologia reprodutiva, efeitos de exposição à contaminantes, entre outros (BARCELLOS *et al.*, 2004; COLDEBELLA *et al.*, 2013; TYSKA *et al.*, 2013; MELA *et al.*, 2013; OLAYA-NIETO *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2011).

Os peixes da espécie *Rhamdia quelen* são conhecidos no Brasil por várias denominações populares, entre elas jundiá, mandi, sapipoca e bagre sul americano, esse último devido ao fato de ocorrer do centro da Argentina até o sul do México. *R. quelen* está entre as 11 espécies conhecidas do gênero *Rhamdia*, e pertence a seguinte divisão taxonômica: Classe- *Osteichthyes*; Série- *Teleostei*; Ordem- *Siluriformes*; Família- *Pimelodidae*; Gênero- *Rhamdia*; Espécie- *Rhamdia quelen* (SILFVERGRIP, 1996).

Esses animais chegam a cerca de 50 cm de comprimento, sendo que as fêmeas podem viver até 21 e os machos até 11 anos. Os alevinos chegam a 5 cm em 30 dias e os juvenis medem em torno de 13cm, porém há uma grande variabilidade no tamanho de jundiás criados em tanques (CARNEIRO *et al.*, 2003). Por volta de um ano de idade atingem a maturação sexual ao atingirem 13,4 cm e 16,5cm de comprimento macho e fêmea respectivamente, e seu período reprodutivo é de agosto a fevereiro (GOMES *et al.*, 2000).

O jundiá habita lagos e fundo de rios, tendo preferência por ambientes de águas calmas, com fundo de lama ou areia e ainda por margens junto à vegetação. Possui hábitos noturnos e esconde-se em pedras e troncos apodrecidos (GOMES *et*

al., 2000). Experimentos demonstraram que *R. quelen* evita a luz, buscando refúgio em locais escuros (PIAIA *et al.*, 1999), e o próprio crescimento é comprometido com a luminosidade (GOMES *et al.*, 2000).

Apesar de ser um peixe de água doce, suporta uma concentração de até 9,0 g/L de NaCl por 96 horas, por isso o sal comum é muito utilizado para tratar algumas doenças nessa espécie (CAMARGO *et al.*, 2006). Os indivíduos adultos são onívoros e generalistas, com preferência por peixes, insetos, crustáceos, folhas caídas e detritos orgânicos (GOMES *et al.*, 2000). Como a maioria dos peixes tropicais, sua temperatura ideal está incluída na faixa de 25 a 28°C (FRASCÁ-SCORVO *et al.*, 2001).

O cultivo do *R. quelen* no Brasil, principalmente no sul, vem crescendo em virtude de possuir carne saborosa, sendo bem aceito para consumo e ser de fácil domesticação e condicionável às condições de cultivo (CARNEIRO *et al.*, 2003), motivo também pelo qual vem sido utilizado em pesquisas científicas. Os peixes são organismos extremamente sensíveis a muitos poluentes aquáticos. Segundo HINTON & COUCH (1998), os teleósteos são um modelo importante de vertebrados para serem utilizados *in vivo* para experimentos de contaminação ambiental. Vários estudos vêm sendo realizados para avaliar a toxicidade de agroquímicos para *R. quelen*, como o de GLUSCZACK *et al.* (2007), que expondo os animais ao herbicida glifosato observou diversas alterações em suas atividades metabólicas. Alterações nos componentes envolvidos na defesa enzimática de jundiás foram também observados após a exposição ao cádmio (PRETTO *et al.*, 2011) e a dipirona sódica (PAMPLONA *et al.*, 2011).

3. HIPÓTESE

A hipótese geral deste trabalho é que a exposição aguda ao diclofenaco em baixas concentrações pode causar em peixes da espécie *Rhamdia quelen* alterações bioquímicas em decorrência de estresse oxidativo, alterações hematológicas e danos ao DNA.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivos gerais

Avaliar os efeitos tóxicos agudos causados pela exposição ao diclofenaco em concentrações semelhantes às encontradas no ambiente no peixe *Rhamdia quelen*, através de biomarcadores bioquímicos, hematológicos e genéticos.

4.2 Objetivos específicos

Avaliar o estresse oxidativo, após a exposição ao diclofenaco, no fígado e rim posterior de *Rhamdia quelen*, através dos biomarcadores bioquímicos CAT, GPX, SOD, GST, GSH e LPO.

Avaliar alterações nos parâmetros hematológicos dos peixes após a exposição ao diclofenaco.

Avaliar a ocorrência de dano no DNA no sangue, fígado e rim posterior dos animais após a exposição ao diclofenaco.

Gerar informações sobre os efeitos em peixes da presença do diclofenaco em meios hídricos.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Os peixes foram adquiridos no estabelecimento “Peixes & Peixes” localizada no CEASA de Curitiba, foram transportados, dentro de sacos plásticos aerados, ao Laboratório de Toxicologia Ambiental da UFPR, onde passaram por um período de aclimação. Os animais estavam em estágio juvenil e pesavam em média $8,80 \pm 2,23$ g e apresentavam comprimento médio de $10,11 \pm 3,17$ cm.

No período de aclimação e durante o experimento, os animais permaneceram em aquários com aeração constante, a uma temperatura média de 23°C, em um ciclo de claro/escuro de 12 horas, alimentados uma vez ao dia com ração.



FIGURA 7: Exemplos de Jundiá (*Rhamdia quelen*) nos aquários utilizados no experimento.
Fonte: A autora.

5.2 Experimento

5.2.1 Cinética de degradação do diclofenaco na água

Para definição da periodicidade de reposição do fármaco nos aquários do bioensaio foi realizado um teste para avaliação da degradação do diclofenaco sódico em meio aquoso. O teste consistiu em dois experimentos distintos, realizados em aquários com capacidade para 25 litros. Com o primeiro experimento definiu-se a meia vida do diclofenaco de sódio em água, o aquário desse experimento continha o fármaco diluído em água filtrada em uma concentração de 20 µg/L, não havendo presença de peixes. As amostras deste aquário foram coletas e congeladas a -80°C nos seguintes intervalos de tempo: 0, 6, 12, 24, 36 e 48 horas após a adição do fármaco. O segundo experimento ocorreu de forma semelhante ao anterior, porém ao aquário foram adicionados ainda exemplares juvenis de peixes *Rhamdia quelen*, considerando a proporção de 30g de peixe para cada litro de água.

A análise da água foi realizada de acordo com a metodologia descrita por SCHWAIGER (2004). Após a extração do fármaco utilizando como solvente o diclorometano e concentração da amostra em rotaevaporador, as concentrações de diclofenaco nas amostras foram determinadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). Com os resultados foi possível estimar o tempo de meia vida do composto na água.

5.2.4 Bioensaio

Os peixes foram dispostos em quatro aquários de 30L, cada um contendo 12 animais, que compuseram cada grupo do experimento. Um aquário permaneceu durante todo o período apenas com água e peixes para ser utilizado como grupo controle, nos três outros foram mantidas as concentrações de 0,2 µg/L, 2 µg/L e 20 µg/L de diclofenaco de sódio em água filtrada. A escolha das concentrações foi baseada nas médias encontradas em águas superficiais no Brasil (GHISELLI, 2006). O bioensaio foi semi-estático, com reposição do fármaco a cada 12 horas. Essa exposição teve a duração de 96 horas.

Esse projeto teve a aprovação do Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná com o certificado de número 646.

5.3 Coleta de material

Após o período de exposição os peixes foram anestesiados com uma solução do anestésico benzocaína 0,001%. O sangue de cada indivíduo foi coletado através da veia caudal com seringas heparinizadas (Figura 8), sendo que uma parte foi destinada aos ensaios hematológicos e outra para o ensaio cometa.

Em seguida o peixe foi submetido a eutanásia, através de secção medular, e foram retirados seu fígado (Figura 9) e o rim posterior, sendo que uma parte desses dois tecidos foi destinada ao ensaio cometa e outra permaneceu conservada em freezer -80°C até a realização das análises bioquímicas.



FIGURA 8: Coleta de sangue.
Fonte: A autora.



FIGURA 9: Fígado coletado.
Fonte: A autora.

5.4 Processamento das amostras

5.4.1 Biomarcadores bioquímicos

As amostras de fígado e rim posterior foram descongeladas em gelo moído, pesadas e homogeneizadas com o homogeneizador Potter- Elvehjem na proporção de 20 mg de amostra em 200 $\mu\text{g/L}$ de tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 7,0 para todas as análises bioquímicas exceto para a LPO, na qual o solvente foi o metanol p.a. Esse material foi centrifugado por 30 minutos a uma rotação de 12600 rpm a temperatura de 4°C, e o sobrenadante foi utilizado para realização das análises das enzimas e dos biomarcadores.

Para a atividade da catalase (CAT) foram diluídos 50 μL de amostra em 250 μL de tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 7,0, resultando em uma diluição na proporção de 1:5, 10 μL dessa mistura foram adicionados em uma cubeta de quartzo contendo 990 μL de uma solução reação composta por peróxido de hidrogênio 30%, em solução tampão (TRIS-HCl 1M, EDTA 5mM, pH 8). Em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 240nm, por 1 minuto e 30 segundos. As leituras foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em μmol de H_2O_2 consumido. $\text{min}^{-1}.\text{mg}$ de proteína $^{-1}$ quantificam a atividade da catalase através do consumo de peróxido de hidrogênio resultando em O_2 e água, esse método foi baseado em AEBI (1984).

A atividade da enzima glutiona S-transferase (GST) foi analisada diluindo 10 μL de amostra em 200 μL de tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 7,0, resultando em uma diluição de 1:20. Um volume de 100 μL desse material foi pipetado em triplicata em microplaca de leitura em espectrofotômetro, e sobre ele acrescentados 200 μL de solução reação, que é composta por CDNB (1-cloro 2,4- dinitrobenzeno) 3mM e GSH 3mM, em solução tampão 0,1M, pH 7,0. Em seguida a leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 340nm, durante 2 minutos e a atividade enzimática expressa em $\text{nmol de CDNB conjugado}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg de proteína}^{-1}$ quantifica a atividade da GST através da reação de conjugação do substrato CDNB com a GSH, formando um tioéter que ocorrerá pela ação desta enzima, esse método é baseado em KEEN *et al.* (1976).

Para a quantificação da concentração da glutiona reduzida (GSH) 50 μL do sobrenadante dos tecidos coletados, e 40 μL de ATC (ácido tricloroacético) 12% foram misturados a amostra agitada e centrifugados por 15 minutos a 3000 rpm. Do sobrenadante 10 μL foi pipetado em microplaca seguido da adição de 290 μL de tampão TRIS 0,4M (pH 8,9). A reação foi iniciada com a adição de 5 μL de DTNB (5,5-ditiobis 2-ácido nitrobenzóico) 0,01 M, e 5 min após foi iniciada a leitura espectrofotométrica com comprimento de onda de 415 nm. O resultado está expresso em $\mu\text{g de GSH}\cdot\text{mg de proteína}^{-1}$, esse método é baseado em SEDLAK & LINDSAY (1968).

A Atividade da SOD foi quantificada através do método de CROUCH (1981) para o fígado e de GAO *et al.* (1998) para o rim, baseado na capacidade da SOD de inibir a redução do NBT, sendo que a redução do NBT medida espectrofotometricamente. Uma alíquota de 200 μL do sobrenadante do fígado e rim, seguida da adição de etanol e centrifugados a 12000 xg e em microplaca de leitura em espectrofotômetro foram aliquoteados 20 μl do sobrenadante de cada amostra, e sobre ele adicionados 70 μL da mistura de NBT 285mM e EDTA 0,05 mM, 110 μl de tampão de carbonato de sódio 182 mM, pH 10,2 e hidroxilamina 67mM para iniciar a reação. A leitura foi realizada em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 560nm durante uma hora em cinco intervalos de 5 minutos e o resultado expresso em $\mu\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$.

A análise da lipoperoxidação (LPO) foi realizada através do método baseado em JIANG *et al.* (1992), que consiste na oxidação do Fe^{+2} mediada por peróxidos em meio ácido e posterior formação do complexo Fe^{+3} - laranja de xilenol na presença hidroxitolueno butilado que atua como estabilizador. As alíquotas de fração sobrenadante dos tecidos foram homogeneizadas em metanol, que foram diluídas na proporção 1:2 em metanol e centrifugadas por 10 minutos a 4° C a 12600 rpm. Em seguida, 30 μL do sobrenadante foram pipetados em triplicata em microplaca de leitura em espectrofotômetro, e sobre ele foram adicionados 270 μL de solução reação, que é composta por metanol p.a., BHT (butil-hidroxitolueno), ácido sulfúrico, sulfato ferroso amoniacal e alaranjado de xilenol. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 560 nm, e o resultado expresso em μmol de hidroperóxido.mg proteína⁻¹.

A Atividade da glutathione peroxidase (GPX) foi quantificada através do método baseado em SIES (1979) e os valores de GPx são expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹. Uma alíquota de 10 μL do extrato enzimático adicionados em microplaca de leitura em espectrofotômetro, em seguida foram acrescentados 130 μL de meio de reação composto por tampão fosfato de sódio (0,1 mM, pH 7,0), azida sódica (NaN_3 , 0,2 mM), NADPH (0,2 mM), GR (1 U/mL) e GSH (2 mM), após 2 minutos foi acrescentado 60 μL de um segundo meio de reação composto por uma solução de H_2O_2 (1,5 mM de H_2O_2 + tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0) e a leitura foi então iniciada. Foram realizadas leituras a cada 10 segundos por dois minutos a 340 nm, sendo medido o decréscimo da absorbância devido à redução de GSSG em GSH, catalisada pela GR, em presença de NADPH.

Através do método de BRADFORD (1976) foi quantificada a concentração proteica na fração sobrenadante do tecido do fígado e do rim, com o objetivo de normalizar os dados dos ensaios bioquímicos. Utilizou-se uma curva padrão de soro albumina bovina e a leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 620nm e o resultado expresso em $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.

5.4.2 Biomarcadores hematológicos

Imediatamente após a coleta do sangue foram avaliados os parâmetros hematológicos. A metodologia de contagem das células sanguíneas foi realizada segundo descrito por TAVARES-DIAS & MORAES (2004).

A contagem de eritrócitos (RBC- Red blood cells) foi realizada em microscópio óptico em câmara de Neubauer. Os eritrócitos foram diluídos previamente para a contagem em formol citrato de acordo com OLIVEIRA-JUNIOR (2008) e a quantidade total foi expressa em eritrócitos. μL^{-1} .

Para determinação da taxa de hemoglobina espectrofotometricamente foi utilizado o método de cianometahemoglobina, descrito por COLLIER (1944) e DRABKIN (1996). O valor da hemoglobina foi expresso em g.dL^{-1} de sangue.

O hematócrito percentual foi verificado utilizando tubos de microhematócrito heparinizados, segundo a metodologia de NELSON & MORRIS, (1989) e HINE (1992), os resultados foram expressos em v/v (%).

Com os dados do número total de eritrócitos, da concentração da hemoglobina e do percentual do hematócrito, foi possível determinar os índices hematimétricos Volume corpuscular médio (VCM) expresso em femtolitro (fL), Hemoglobina Corpuscular média (HCM) expressa em picograma (pg) e Concentração de Hemoglobina Cospuscular Média (CHCM) expressa em g.dL^{-1} . Todos os índices hematimétricos foram calculados com fórmulas padrão (Figura 10).

$$\text{VCM (fL)} = \frac{\text{Hematócrito (\%)} \times 10}{\text{Hemácias } 10^6 \mu\text{L}^{-1}}$$

$$\text{HCM (pg)} = \frac{\text{Hemoglobina (g/dL)} \times 10}{\text{Hemácias } 10^6 \mu\text{L}^{-1}}$$

$$\text{CHCM (g.dL}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Hemoglobina (g/dL)} \times 100}{\text{Hematócrito (\%)}}$$

FIGURA 10: Fórmulas dos índices hematimétricos.
Fonte: Adaptado de ABALAKA, 2013.

A contagem de leucócitos (WBC- White blood cells) foi realizada de acordo com através de extensões sanguíneas coradas previamente, conforme modificação do método de TAVARES-DIAS & MORAIS (2003). Os resultados da contagem total de leucócitos foram expressos em leucócitos. μL^{-1} . Da mesma forma foi realizado a contagem do número de trombócitos. Para diferenciação entre eritrócitos, leucócitos e trombócitos e para a contagem dos trombócitos foi utilizado a forma descrita por TAVARES-DIAS 1999 e 2002.

5.4.3 Biomarcador genético

O ensaio cometa com eritrócitos foi feito de acordo com SPEIT & HARTMANN (1999), com alterações conforme FERRARO *et al.* (2004) e CESTARI *et al.* (2004), e para tecidos segundo RAMSDORF *et al.* (2009). Uma gota de sangue foi misturada a 1 mL de soro fetal bovino e para o fígado e rim uma pequena porção destes foi colocado em um microtubo contendo 0,5 mL de soro fetal bovino, seguido da homogeneização à 1.500 rpm. Foram aliqüotadas 10 μL da suspensão celular que foram então misturadas a 120 μL de agarose baixo ponto de fusão, a mistura foi colocada em uma lâmina de microscopia previamente preparada com um fina cobertura de agarose normal 1,5% (300 mg em 20 mL de PBS), coberta com uma lamínula e refrigerada por cerca de 15 minutos. Após isso, as lâminas foram colocadas em solução de lise (solução de lise estoque: NaCl, 2.5M; EDTA, 100 mM; Tris, 10 mM; NaOH, 0.8%; N-lauryl-sarcocinate, 1%; solução de lise uso: 1 ml Triton X100; 10 ml DMSO; e 89 ml de solução de lise estoque) por pelo menos 24 horas a 4°C. Passado esse intervalo, as lâminas foram transferidas para a cuba eletroforese ficando imersas no tampão de eletroforese (NaOH 300 mM e EDTA 1mM) com pH >13 por 25 minutos. A eletroforese foi realizada por 25 minutos a 300 mA, 25V, seguido da neutralização das lâminas com 0,4 M de Tris, pH 7,5, fixação em etanol por 5 minutos, sendo elas então coradas com brometo de etídio. As formas (cometas) foram enfim classificadas de forma visual com o auxílio de um microscópio de epifluorescência. Para cada peixe foram analisados 100 nucleóides

(KOBAYASHI *et al.*, 1995), usando a classificação visual baseada na migração de fragmentos de DNA da seguinte forma: classe 0 (sem dano aparente), classe 1 (dano pequeno), classe 2 (dano médio), classe 3 (dano extenso) e classe 4 (dano máximo). Os escores foram calculados pela multiplicação do número de nucleóides encontrados em cada classe pelo número da classe.

5.5 Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente pelo programa GraphPad Prism 5.0. Através do teste de Kolmogorov-Smirnov foi testada a normalidade dos dados. Para análise dos resultados dos biomarcadores hematológicos e bioquímicos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) a um critério, seguido da realização do teste Tukey para comparação entre médias dos resultados dos testes bioquímicos e teste de Bonferroni para os hematológicos. Os dados do ensaio cometa foram analisados através do teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's. Os resultados dos parâmetros bioquímicos e hematológicos foram expressos em média e erro padrão da média e mediana para o ensaio cometa. Foi considerado o nível de significância 0,05% para todos os testes aplicados.

6 RESULTADOS

6.1 Cinética de degradação do diclofenaco na água

Os resultados das análises da cinética de degradação do diclofenaco de sódio em água, sem a presença de peixes, estão apresentados na figura 11. Nas primeiras 12 horas a concentração do fármaco decaiu de 20 µg/L para $11,42 \pm 0,38$ µg/L, representando uma degradação de 42,92%. Após 48 horas não foi detectada a presença de fármaco na amostra (Figura 11).

A degradação do diclofenaco no experimento dos aquários contendo peixes foi de 50,89% nas primeiras 12 horas, quando a concentração detectada foi de $9,82 \pm 0,67$ µg/L. Após 48 horas, de forma semelhante ao experimento sem peixes, a degradação do fármaco foi de 100% (Figura 12).

Baseado nesses resultados, no experimento de exposição dos peixes ao diclofenaco foi utilizada troca de água e reposição do fármaco a cada 12 horas para que a concentração do composto fosse mantida constante. Com a realização da troca da água foram eliminados subprodutos originados da degradação do fármaco e metabólitos dos animais, que poderiam interferir nos resultados.

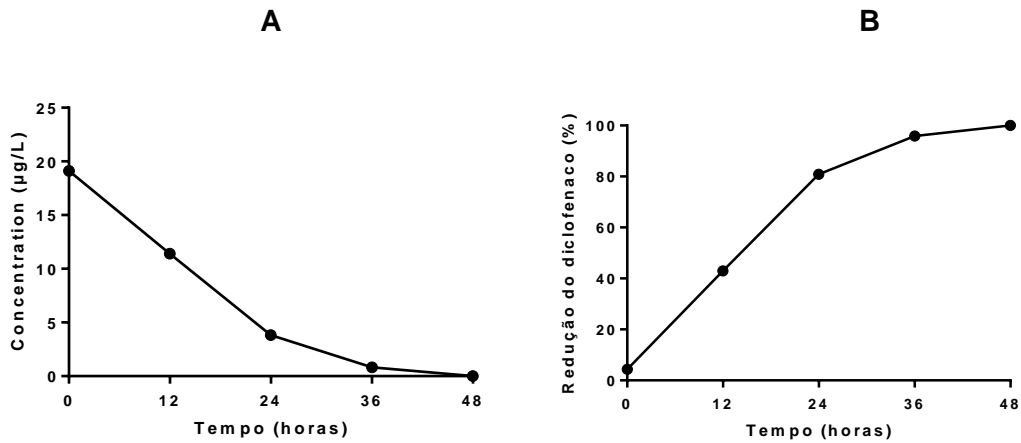


FIGURA 11: Cinética de degradação do diclofenaco em água sem peixes. (A) Variação da concentração do diclofenaco com o tempo. (B) Porcentagem de redução do diclofenaco com o tempo.

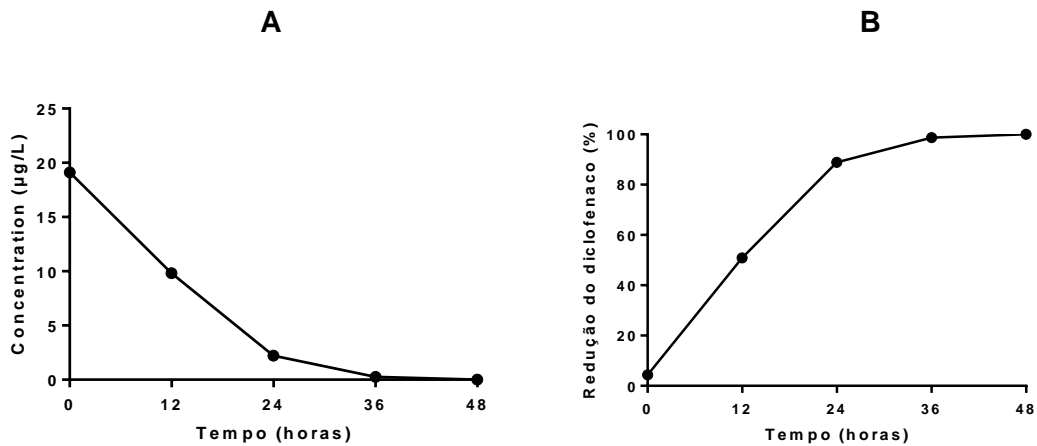


FIGURA 12: Cinética de degradação do diclofenaco em água com peixes. (A) Variação da concentração do diclofenaco com o tempo. (B) Porcentagem de redução do diclofenaco com o tempo.

6.2 Biomarcadores bioquímicos

As atividades enzimáticas de catalase, glutathione S-transferase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase, além da glutathione reduzida e lipoperoxidação foram analisadas no fígado e rim posterior dos peixes após a exposição ao diclofenaco.

No fígado, em todas as concentrações testadas, após 96 horas de exposição não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os animais do grupo

controle e os animais expostos a nenhuma das concentrações do diclofenaco (Figura 13).

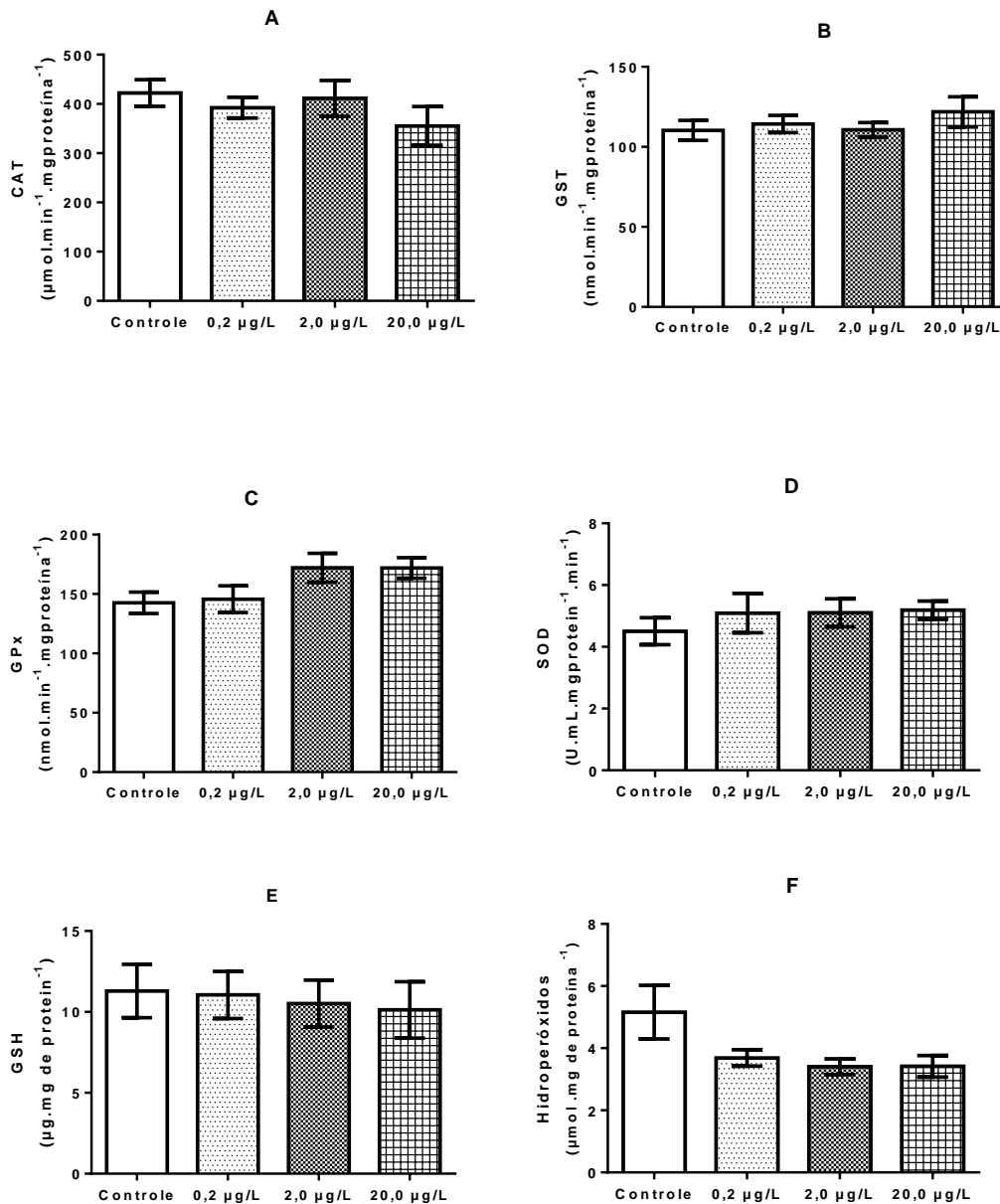


FIGURA 13: Biomarcadores bioquímicos no fígado de *Rhamdia quelen* expostos por 96 horas às concentrações de 0,2, 2 e 20 µg/L de diclofenaco de sódio. ANOVA seguida de Tukey. As barras indicam média \pm erro padrão da média. (A) Atividade da catalase. (B) Atividade da glutathione S-transferase. (C) Atividade da glutathione peroxidase. (D) Atividade da superóxido dismutase. (E) glutathione reduzida. (F) Lipoperoxidação. * indica diferença significativa ($p < 0,05$) com relação ao grupo controle.

No rim posterior a atividade da catalase aumentou na concentração de 0,2 $\mu\text{g/L}$, e a da SOD apresentou aumento significativo, em relação ao controle, nas concentrações de 2 $\mu\text{g/L}$ e 20 $\mu\text{g/L}$. A lipoperoxidação diminuiu na maior concentração de diclofenaco utilizada no experimento em comparação ao grupo controle. Nos demais parâmetros bioquímicos analisados não foram observadas alterações (Figura 14).

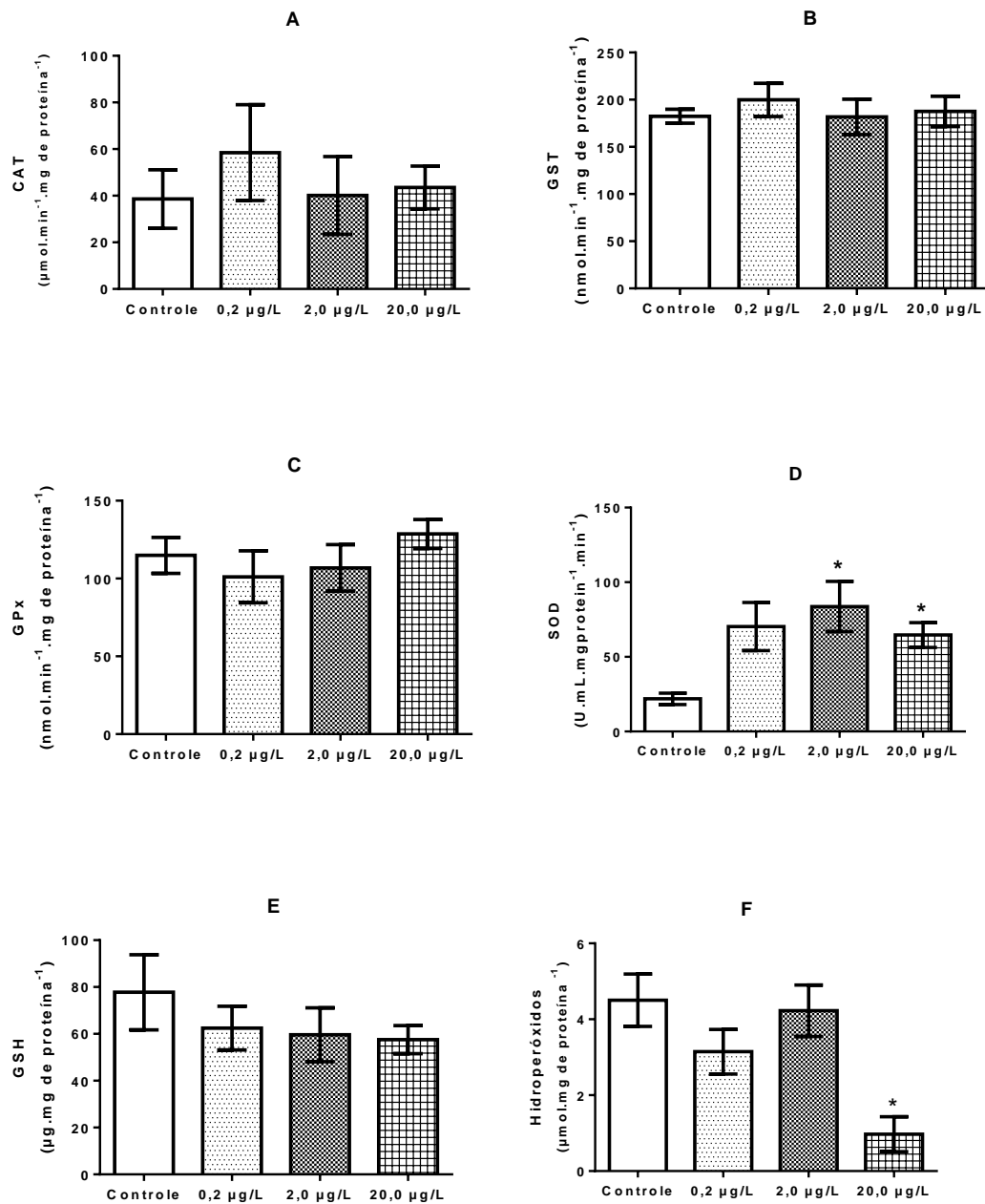


FIGURA 14: Biomarcadores bioquímicos no rim posterior de *R. quelen* expostos por 96 horas às concentrações de 0,2, 2 e 20 $\mu\text{g/L}$ de diclofenaco de sódio. ANOVA seguida de Tukey. As barras indicam média \pm erro padrão da média. (A) Atividade da catalase. (B) Atividade da Glutaciona S-transferase. (C) Atividade da Glutaciona Peroxidase. (D) Atividade da superóxido dismutase. (E) Glutaciona Reduzida. (F) Lipoperoxidação. * indica diferença significativa ($p < 0,05$) com relação ao grupo controle.

6.3 Biomarcadores hematológicos

Foram avaliados no sangue dos animais o número de eritrócitos, trombócitos e leucócitos. Com relação a série vermelha, o número de eritrócitos diminuiu após as 96 horas de exposição nas concentrações de 0,2 e 2 µg/L de diclofenaco. A hemoglobina também esteve diminuída da concentração de 0,2 µg/L.

Na série branca monócitos na contagem absoluta estiveram aumentados na concentração de 2 µg/L. Também ocorreu aumento significativo nos neutrófilo na concentração de 20 µg/L.

No número total de trombócitos e em outros parâmetros hematológicos não foram observadas alterações significativas em relação ao grupo controle para nenhuma das concentrações. Todos os resultados estão apresentados na Tabela 1, expressos em média ± erro padrão da média, o (*) indica $p < 0,05$.

TABELA 1: PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE *Rhamdia quelen* APÓS EXPOSIÇÃO AO DICLOFENACO POR UM PERÍODO DE 96 HORAS

Parâmetros Hematológicos	Concentração de Diclofenaco (µg/L)			
	Controle	0,2	2	20
Eritrócitos ($10^6 \mu\text{L}^{-1}$)	1,02 ± 0,04	*0,87 ± 0,03	*0,83 ± 0,02	1,01 ± 0,04
Hemoglobina (g.dL ⁻¹)	3,48 ± 0,22	*2,84 ± 0,10	3,48 ± 0,31	3,68 ± 0,13
Hematócrito (%)	20,02 ± 1,45	18,49 ± 1,99	17,65 ± 0,90	18,85 ± 1,15
VCM (fL)	198,5 ± 14,45	213,0 ± 23,54	213,2 ± 12,21	190,0 ± 14,63
HCM (pg.células ⁻¹)	34,29 ± 1,76	32,69 ± 0,81	41,87 ± 3,63	37,19 ± 2,30
CHCM (g.dL ⁻¹)	17,64 ± 0,79	16,94 ± 1,80	20,07 ± 2,04	20,15 ± 1,30
Leucócito ($10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	60,25 ± 3,24	59,37 ± 2,30	62,77 ± 3,37	68,44 ± 4,42
Trombócitos ($10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	31,04 ± 2,92	28,02 ± 6,70	23,34 ± 8,02	28,00 ± 6,61
Monócito ($10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	6,09 ± 0,71	7,43 ± 0,67	*10,25 ± 0,87	8,20 ± 0,98
Linfócito ($10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	50,37 ± 3,50	47,62 ± 1,96	47,23 ± 2,86	53,54 ± 3,41
Neutrófilo ($10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	3,79 ± 0,32	4,32 ± 0,47	5,30 ± 0,52	*6,69 ± 0,39
Mononucleares ($10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	56,46 ± 3,35	55,05 ± 2,35	57,48 ± 3,04	61,74 ± 4,13

Média ± erro padrão da média, o (*) indica $p < 0,05$.

6.4 Biomarcadores genéticos

Através dos escores calculados no ensaio cometa não foi observado dano genético em nenhuma das concentrações testadas, em relação ao grupo controle, no sangue e fígado. No rim posterior ocorreu diminuição significativa de dano na maior concentração (Figura 15).

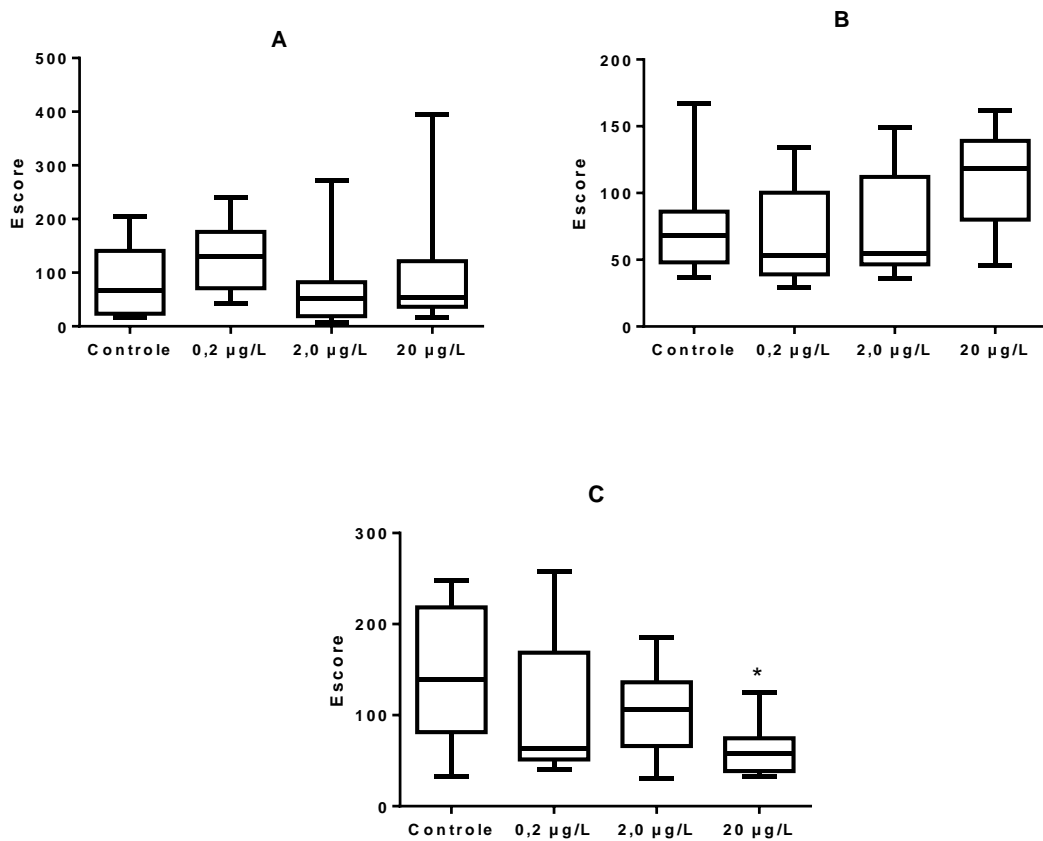


FIGURA 15: Escores de dano genético obtidos através do Ensaio Cometa de *Rhamdia quelen* expostos por 96 horas às concentrações de 0,2, 2 e 20 µg/L de diclofenaco de sódio. (A) Fígado. (B) Sangue. (C) Rim posterior. Os resultados estão apresentados em mediana/ quartil 1 (25%) e 3 (75%). Foi realizado o Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's. * indica diferença significativa ($p < 0,05$) com relação ao grupo controle.

7 DISCUSSÃO

O diclofenaco sódico tem sido foco de pesquisas na área ambiental. É um medicamento que tem figurado entre os poluentes mais encontrados em matrizes ambientais em todo mundo, sendo que diversos estudos evidenciam sua capacidade de causar danos à saúde geral de peixes e outros organismos aquáticos.

Através dos resultados da cinética de degradação do diclofenaco sódico foi possível constatar que seu tempo de meia-vida é de cerca de 12 horas. Tendo em vista as concentrações em que tem sido detectado no ambiente, é possível deduzir que esse fármaco é constantemente disponibilizado para o ambiente, haja vista, que em 24 horas grande parte do diclofenaco na água é degradado. Além disso, estudos demonstraram que os tratamentos utilizados nas ETE's são capazes de remover apenas 20% do diclofenaco presente no esgoto bruto (GHISELLI, 2001), e que essa substância é minimamente adsorvida por sedimentos (BUSER *et al.*, 1998), o que contribui com sua disponibilização em águas superficiais.

A utilização de biomarcadores enzimáticos vem sendo foco em estudos de monitoramento de ambientes aquáticos, devido ao fato das substâncias poluentes possuírem grande afinidade com os elétrons dos aminoácidos que compõe as enzimas, como no caso do grupamento sulfidríla (SH) da cisteína (BERTIN & AVERBECK, 2006). Nesse estudo foram analisadas possíveis alterações na atividade de quatro enzimas envolvidas no estresse oxidativo: CAT, SOD, GPx, e GST.

Diversos estudos demonstraram aumento na atividade da catalase em organismos expostos a contaminantes como petróleo, pesticidas e metais pesados (JOSE *et al.*, 2011; LÜ *et al.*, 2009). Na pesquisa realizada por PAROLINI *et al.* (2010), expondo bivalves de água doce a diferentes concentrações de paracetamol pelo período de 96 horas, com base em seus resultados, o autor observou nesse fármaco uma elevada capacidade de aumento da atividade da catalase causado por indicando estresse oxidativo. O entanto, neste estudo a atividade da catalase não apresentou nenhuma alteração significativa em relação ao grupo controle em

nenhuma das concentrações testadas para as amostra de fígado e rim posterior. Portanto, através dos resultados desta enzima não foi evidenciado estresse oxidativo nos organismos.

Durante o processo de oxidação em organismos aeróbicos uma outra espécie reativa formada é o radical livre superóxido (O_2^-). A enzima superóxido dismutase atua de forma a ser reduzida (receber elétron) pelo superóxido oxidando o mesmo a oxigênio molecular. A SOD reduzida reagirá com outro superóxido formando então peróxido de hidrogênio que será dismutado pela catalase ou pela GPx (BERG *et al.*, 2004). Por esse motivo a atividade da SOD é um importante biomarcador de estresse oxidativo.

Neste estudo não foi observada alteração na SOD no fígado dos peixes, porém no rim posterior observou-se aumento de sua atividade nas concentrações de 2 $\mu\text{g/L}$ e 20 $\mu\text{g/L}$, sugerindo que a exposição ao diclofenaco aumenta a produção do íon superóxido e da enzima responsável por sua metabolização. Esses resultados são conflitantes com os resultados das enzimas responsáveis pela eliminação do peróxido de hidrogênio (CAT e GPx), pois seria esperado que com o aumento da atividade da SOD ocorreria também o aumento da atividades de uma dessas enzimas. Em um estudo expondo mexilhões *Mytilus galloprovincialis* ao anti-inflamatório ibuprofeno observou-se também aumento na atividade da SOD acompanhada pelo aumento da atividade da catalase. Embora, mexilhões possuam as enzimas capazes de biotransformar xenobióticos, porém, não o fazem com tanta eficiência como o dos vertebrados (GONZALEZ-REY & BEBIANNO, 2012).

A GPx é uma enzima bastante utilizada como biomarcador de estresse oxidativo, e também foi avaliada neste estudo. Sua utilização, enquanto biomarcador bioquímico, consiste no fato de agir na desintoxicação de metabólitos de xenobióticos oxidando peróxidos (TEKMAN *et al.*, 2008). Esta enzima atua de forma que o peróxido é reduzido a álcool pela presença do átomo de selênio da estrutura da GPx, o álcool formado oxida o composto enzima-SeOH, sendo que a enzima irá reagir com a glutiona reduzida formando o complexo enzima-Se-S-glutaciona, que ao reagir com uma nova glutaciona reduzida forma a GSSG, e a forma ativa da enzima é então regenerada (BERG *et al.*, 2004). Porém, nos jundiás expostos ao

diclofenaco não foi observada alterações na atividade dessa enzima em nenhum dos tecidos analisados. É possível que o fato de a CAT e a SOD não apresentarem elevação em sua atividade deva-se a questão do pouco tempo de experimento, ou seja, em 96 horas a atividades dessas enzimas não seria induzida com o objetivo de metabolizar os peróxidos, o que poderia ocorrer em um tempo de exposição maior.

Também avaliada, porém sem nenhuma alteração em sua atividade, foi a glutathione-S-transferase, responsável pela conjugação da GSH com compostos xenobióticos, além de compostos endógenos, com a finalidade de diminuir sua toxicidade e torná-los mais solúveis em água, para dessa forma serem mais facilmente eliminados. Geralmente, em presença de poluentes sua atividade é inibida em função do estresse oxidativo (REGOLI *et al.*, 1998). No entanto, segundo FERRARI *et al.* (2007) a atividade da GST pode ser induzida devido a uma resposta antioxidante, o que seria altamente benéfico para as células. Em estudos em peixes com o AINE dipirona sódica a atividade da GST apresentou-se diminuída em maiores concentrações do fármaco (PAMPLONA *et al.*, 2011), o que sugere que mesmo tratando-se de uma mesma classe de fármacos os resultados podem variar de acordo com cada substância.

Uma outra importante ferramenta utilizada na avaliação do estresse oxidativo é a análise das possíveis variações nas concentrações das enzimas e dos substratos envolvidos no ciclo catalítico da glutathione. Esse ciclo tem como uma de suas funções controlar os níveis de hidroperóxidos nas células, evitando danos causados por ataques radicalares. Alterações nos níveis intracelulares de glutathione reduzida (GSH) podem estar associadas à resistência das células contra o estresse oxidativo, sendo que este pode causar mudanças no estado redox da glutathione, resultando no aumento da glutathione oxidada no organismo (ROVER-JÚNIOR, 2001).

Ao ser avaliada nesse estudo a GSH não apresentou alteração em seu níveis em nenhuma concentração de diclofenaco testada, em relação ao controle no fígado e nem no rim posterior. A redução nas concentrações dessa forma da glutathione poderia ser diminuída em função da conjugação da GSH com xenobiótico para a ação catalítica da GST, desta forma agiria como um agente celular redutor que

protegeria a célula contra os radicais livres. Por outro lado, o aumento da GSH pode estar relacionado com uma reação adaptativa do organismo ao estresse oxidativo, no qual seria sintetizada uma maior quantidade dessa espécie (YIN *et al.*, 2007).

Quando ocorre estresse oxidativo os radicais livres, em grande quantidade, desencadeiam o processo de lipoperoxidação que causa danos na estrutura da membrana celular (ORUÇ & ÜNER, 2000). Diversos estudos realizados com poluentes ambientais demonstraram que essas substâncias exercem esse efeito (GUTTERIDGE, 1995).

Não foi observada a peroxidação lipídica no fígado dos animais avaliados. O que pode ser explicado pelo fato das concentrações testadas não causarem estresse oxidativo, ou causarem em taxas muito reduzidas. Entretanto, no rim a LPO esteve diminuída na maior concentração de diclofenaco.

Apesar do enfoque deste estudo de considerar o diclofenaco como um contaminante ambiental, é importante ressaltar que trata-se de um fármaco, e como tal possui características terapêuticas, desta forma em alguns casos sendo passível de contribuir com a melhora do estado clínico do organismo estudado. Alguns fármacos apresentam a capacidade de diminuir a concentração de hidroperóxidos nos organismos, como exemplo oalopurinol testado em ratos para diminuir o estresse oxidativo, que diminuiu a LPO no rim por inibir a enzima xantina-oxidase, que utiliza oxigênio molecular (O_2) formando radical superóxido (RHODEN *et al.*, 1998).

É possível que a atividade de alguma enzima não estudada nesta pesquisa, que da mesma forma que a xantina-oxidase, utilize o O_2 como acceptor final de elétrons gerando EROS, tenha sido inibida pela ação do diclofenaco, de forma a diminuir a quantidade de hidroperóxidos nas células com relação ao grupo controle.

O estudo dos parâmetros sanguíneos auxiliam na determinação da influência de condições que afetam a homeostase de um organismo, sendo possível estabelecer uma relação entre esses parâmetros, a saúde dos peixes e o meio ambiente (TAVARES-DIAS & MORAES, 2004). Apesar dos peixes apresentarem no sangue periférico células com morfologia e função fisiológica semelhante a de

mamíferos, o estabelecimento de valores de referência que definam faixas de um considerado estado de saúde dentro da normalidade é inviável. Isso porque há variabilidade no número de células entre as diferentes espécies, e mesmo dentro da mesma espécie os parâmetros hematológicos podem variar com a idade, alimentação, características físicas e químicas da água, entre outros (AZEVEDO *et al.*, 2006; PIMPÃO *et al.*, 2007). Por esse motivo os valores considerados normais foram os obtidos através dos organismos do grupo controle.

Na série vermelha o número de eritrócitos estiveram significativamente diminuídos ($P < 0,01$) nas concentrações de 0,2 e 2 µg/L, assim como a hemoglobina nos peixes expostos a menor concentração de diclofenaco testada.

Ao estudar os efeitos do AINE dipirona sódica em *Rhamdia quelen* PAMPLONA *et al.* (2011) também observou diminuição do número de eritrócitos nas concentrações testadas, sugerindo uma situação próxima da considerada como anemia. A anemia, redução das hemácias, pode ter três diferentes origens. Na hemorrágica essa baixa é causada devido à perda de sangue pelo organismo, na hipoplástica esse efeito é decorrente de baixa na eritropoiese, produção de eritrócitos, e na hemolítica pela destruição de eritrócitos (CLAUSS *et al.*, 2008).

Segundo ADHIKARI *et al.* (2004) a anemia apresentada por peixes após a exposição a xenobióticos deve-se a hemólise, a inibição da eritropoiese (o processo de produção de eritrócitos) e da elevação da taxa de destruição de eritrócitos em órgão hematopoiéticos, que são responsáveis pela formação, desenvolvimento e maturação das células sanguíneas. Existem relatos de que AINES, como o cetoprofeno, causam efeito hemolítico, inclusive levando à pesquisas para algumas modificações na estrutura química desses fármacos para combater esse efeito (MANENTE *et al.*, 2011). Porém, segundo DELFINO *et al.* (1995) um fator associado à esse quadro é que os AINES causam um aumento de sódio, pois reduzem as taxas de excreção do sódio pelo organismo, o fato do número de hemácias apresentar-se diminuído poderia ser atribuído a uma hemodiluição.

Outro fator que também poderia explicar a diminuição do número dessas células, é que os eritrócitos podem ser células-alvo do estresse oxidativo, sendo que a hemácia apresenta grupamentos sulfidríla (-SH) e os radicais livres podem

converter o grupo tiol (R-SH) a dissulfetos (R-SSG), o que resulta na desnaturação das proteínas da membrana (GILBERT & MC LEAN, 1990). É possível que ocorra então lesão intracelular com a oxidação da hemoglobina à meta-hemoglobina, que então precipita e forma os denominados corpos de Heinz, formados pela hemácia desnaturada (WINTERBOURN, 1990). Porém, nesse estudo não foram identificados corpos de Heinz nas lâminas observadas.

No trabalho de GARCIA *et al.* (2012) ficou evidenciado que o estresse causa diminuição no número de eritrócitos. Estudos também evidenciam esse efeito em peixes expostos a alguns outros anti-inflamatórios como o ibuprofeno em carpas (SARAVANAN *et al.*, 2012) e em medicamentos pertencentes a outras classes de fármacos, como o verapamil, em trutas arco-íris (LI *et al.*, 2011).

Ainda considerando a série vermelha, não foram verificadas alterações significativas no hematócrito, no tamanho das hemácias, na concentração de hemoglobina em cada hemácia (CHCM) e nas hemácias em geral (HCM). Em um estudo com girinos expostos por 21 dias a agrotóxicos FRANÇA *et al.* (2013) observaram aumentos no VCM, HCM e CHCM, e atribui essa alteração ao fato de que células vermelhas jovens, que apresentam maior volume, são recrutadas ao sistema sanguíneo, e relacionam a queda de número de eritrócitos observada a possibilidade das células maduras terem sido removidas do organismo de maneira mais rápida com a predominância de células jovens. É possível atribuir a não alteração dos índices hematimétricos ao curto tempo de exposição (96 horas), pois em uma exposição crônica haveria maior probabilidade de alterações, como ocorreu no estudo do autor anteriormente citado.

Alterações leucocitárias são apontadas como um indicador sensível de estresse em peixes (BARTON & IWAMA, 1991). Na série branca observou-se aumento nos neutrófilos na maior concentração, e dos monócitos na concentração de 2 µg/L. Entre as alterações hematológicas que podem ocorrer devido ao uso de AINES está a leucopenia, que é a redução do número de leucócitos no sangue, e a granulocitopenia, que é a redução de leucócitos polinucleares, ou granulócitos (neutrófilos, basófilos e eosinófilos). No entanto, na maior concentração observa-se a tendência de aumento dos leucócitos, e ainda o aumento significativo na contagem de neutrófilos e monócitos, o que pode ter ocorrido devido a uma reação inicial do

organismo frente ao fármaco, sendo possível que posteriormente haja uma depleção nos neutrófilos, figurando um quadro de imunossupressão relativa, que torna os indivíduos mais susceptíveis a infecção por microrganismos gerando doenças e mortalidade entre os animais (RAMOS-BARBOSA *et al.*, 2004).

Esta depleção deve ocorrer, pois o aumento de neutrófilos é drástico e rápido no foco infeccioso, por tratar-se de um leucócito que apresenta citotoxicidade e deve ser eliminado para que não cause danos no próprio organismo. Então é esperado que ocorra a apoptose, morte celular programada (COHEN & DUKE, 1992). O aumento de neutrófilos está relacionado a lesões hepáticas em peixes (TAKASHIMA & HIBIYA, 1995).

O aumento do número de neutrófilos apresentado através dos resultados é considerada a resposta mais comum à infecções em peixes (AFONSO *et al.*, 1998). O quadro apresentado pelos organismos expostos ao diclofenaco em concentrações baixas, conforme este estudo, é de neutrofilia e monocitose, semelhante ao apresentado em resposta à inflamação aguda (SUZIKI *et al.*, 1992).

Os resultados encontrados estão de acordo com CUNHA *et al.* (2009), segundo o qual, ao se referir a espécies de mamíferos, a contagem absoluta e relativa de neutrófilos segmentados tende a apresentar um aumento durante o estresse agudo do organismo. Isso ocorre com o propósito de que o organismo apresente, nesse momento, maior resistência a infecções bacterianas. No estudo realizado por SARAVANAN *et al.* (2012) expondo carpas ao anti-inflamatório ibuprofeno observou-se também aumento nos leucócitos.

É possível que a exposição a um poluente acarrete no aumento nas defesas do organismo, com o um aumento de leucócitos para que ocorra aumento na diapedese, ou seja, a passagem dos glóbulos brancos armazenados para a circulação central e para os tecidos periféricos (DHABHAR *et al.*, 1997).

Não foram verificadas alterações na contagem de trombócitos. Porém, o uso de AINES está associado a trombocitopenia, ou seja, redução do número de plaquetas (LAMONT & MATHEWS, 2007), fato esse evidenciado na exposição de *Rhamdia quelen* ao AINE dipirona sódica (PAMPLONA *et al.*, 2011). Segundo GELLER *et al.* (2012) o uso do diclofenaco, em pacientes susceptíveis, pode

aumentar em até dez vezes a trombocitopenia, além da leucopenia, neutropenia e agranulocitose.

Os danos genotóxicos foram avaliados através do ensaio cometa, um teste que tem sido amplamente aplicado em pesquisas de contaminação ambiental envolvendo organismos aquáticos, tratando-se de uma técnica bastante sensível (NACCI *et al.*, 1992). Não foram observados danos ao DNA no ensaio realizado com sangue e fígado, entretanto, no rim o ensaio cometa apontou uma diminuição significativa no dano na maior concentração.

A exposição à xenobióticos pode resultar em fragmentação do DNA, uma vez que ocorrendo o processo de lipoperoxidação a estrutura da membrana celular será comprometida, e dessa forma o DNA se tornará mais susceptível ao ataque de radicais de oxigênio, além da possibilidade de ser diretamente atacado pelos radicais livres lipídicos gerados na oxidação dos ácidos graxos das membranas plasmática e nuclear (HIGUCHI, 2003).

Assim como não foi evidenciada lipoperoxidação não ocorreu também dano ao DNA, e a diminuição na LPO na maior concentração está coerente com a diminuição no dano genético na concentração de 20 µg/L no rim, o que pode ser explicado pela possibilidade de uma enzima que atua na fase I da biotransformação ter sido inibida.

No estudo realizado por HICKEY *et al.* (2001) realizado com ratos com o objetivo de investigar estresse oxidativo, nefrotoxicidade e danos genéticos causados pelo diclofenaco, foram evidenciados graves danos ao DNA nos rins, e mortalidade celular programada, todos causados pelo estresse oxidativo. Porém, foram utilizadas doses bastante elevadas: 100, 200 e 300 mg/kg, mas o tempo de exposição foi apenas 24 horas.

SCHWAIGER *et al.* (2004) realizaram um estudo com trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) expostas ao diclofenaco em doses que variaram de 1 a 500g/L por um período de 28 dias com posterior avaliações histopatológicas, onde foi possível observar danos no fígado, rins, brânquias e trato gastro-intestinal. Concluindo então que o diclofenaco causa a diminuição do estado geral de saúde dos peixes, porém em concentrações mais elevadas.

No estudo de HONG *et al.* (2007) foram analisados os efeitos do diclofenaco em peixes Medaka japonês (*Oryzias latipes*) em concentrações que variaram de 1 µg/L a 8 mg/L ao longo de quatro dias, ficando evidenciado que este fármaco causa toxicidade celular e genotoxicidade. Os autores salientam que o diclofenaco tem o potencial de causar efeitos tóxicos mesmo em concentrações semelhantes às encontradas no ambiente.

Em teste de toxicidade aguda, realizados com organismos aquáticos como algas verdes, rotíferos e crustáceos, ficou demonstrado que o diclofenaco é potencialmente tóxico a esses organismos, inibindo seu crescimento ou mesmo causando mortalidade, apresentando para as algas e crustáceos uma $EC_{50} < 100$ mg/L, o que segundo o sistema utilizado pela União Europeia encaixa-se na classificação de potencialmente prejudicial aos organismos aquáticos (KHETAN & COLLINS, 2007).

Na presente pesquisa foram evidenciadas alterações hematológicas e bioquímicas no rim. O curto tempo de exposição, uma vez que trata-se de um bioensaio agudo, e o fato de as concentrações de diclofenaco utilizadas no experimento serem baixas pode explicar os resultados encontrados. No entanto, as concentrações utilizadas são semelhantes as encontradas no ambiente e em 96 horas foram capazes de causar alterações significativas, sugerindo que uma contínua exposição ao fármaco poderá acarretar efeitos mais drásticos, sobretudo nefrotóxicos.

8 CONCLUSÕES

- O diclofenaco nas concentrações e no tempo de exposição testado não causou alteração hepática nos biomarcadores bioquímicos e genético dos animais.

- No rim posterior foi observado aumento da atividade da SOD, e diminuição da lipoperoxidação e do dano genético, sugerindo alterações no sistema de biotransformação dos organismos, causadas pelo fármaco.

- O diclofenaco causou diminuição no número de eritrócitos e a concentração de hemoglobina, e aumentou o número de neutrófilos e monócitos no sangue dos jundiás, evidenciando que esses animais desenvolvem uma série de alterações hematológicas imediatas como reação inicial de defesa frente a este fármaco enquanto poluente ambiental.

Esses resultados indicam que o diclofenaco causa alterações bioquímicas e hematológicas em *R. quelen*. Tratando-se de um fármaco amplamente detectado no ambiente que afeta determinadas espécies, como o organismo de estudo deste trabalho, pode em exposições contínuas a longo prazo desencadear um desequilíbrio ambiental por ser uma substância que ameaça uma espécie, e conseqüentemente seu ecossistema.

9 REFERÊNCIAS

ABALAKA, S. E. Evaluation of the hematology and biochemistry of *Clarias gariepinus* as biomarkers of environmental pollution in Tiga dam, Nigeria. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n.3, p. 371-376, 2013.

ABASS, K.; TURPEINEN, M.; RAUTIO, A.; HAKKOLA, J.; PELKONEN, O. Metabolism of pesticides by human cytochrome P450 enzymes in vitro—a survey. **Insecticides—advances in integrated pest management**. New York: InTech, 2012, p. 165-195.

ADHIKARI, S.; SARKAR B.; CHATTERJEE, A.; MAHAPATRA, C.T.; AYYAPPAN, S. Effects of cypermethrin and carbofuran on certain hematological parameters and prediction of their recovery in a freshwater teleost. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 58, n. 2, p. 220-226, 2004.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v.105, p. 121-126, 1984.

AFONSO, A.; LOUSADA, S.; SILVA, J.; ELLIS, A. E.; SILVA, M. T. Neutrophil and macrophage responses to inflammation in the peritoneal cavity of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A light and electron microscopic cytochemical study. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 34, n.1, p. 27, 1998.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J. **Biologia Molecular da Célula**. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.

ALVES, S.R.C.; SEVERINO, P.C.; IBBOTSON, D.P.; SILVA, A.Z.; LOPES, F.R.A.S.; SÁENZ, L.A.; BAINY, A.C.D. Effects of furadan in the brown mussel *Perna perna* and in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*. **Marine Environmental Research**, v.54, p.241-245, 2012.

AVILEZ, I.M.; HORI, T.S.F.; ALMEIDA, L.C.; HACKBARTH, A.; BASTOS NETO, J.C.; BASTOS, V.L.F.C. & MORAES, G. Effects of phenol in antioxidant metabolism in matrinxã, *Brycon amazonicus* (Teleostei; Characidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 148, p.136-142, 2008.

AZEVEDO, T.D.; MARTINS, M.L.; YAMASHITA, M.M.; FRANCISCO, C.J. Hematologia de *Oreochromis niloticus*: comparação entre peixes mantidos em piscicultura consorciada com suínos e em pesque-pague no vale do rio Tijucas, Santa Catarina, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.32, n.1, p.41-49, 2006.

BANTU, N.; VAKITA, V. R.; KARRA, S. Effect of chlorantraniliprole on biochemical and certain biomarkers in various tissues of freshwater fish *Labeo rohita* (Hamilton). **Environment and Ecology Research**, v.1, n.4, p.205-215, 2013.

BARCELLOS, L.J.G.; KREUTZ, L.C.; QUEVEDO, R.M.; FIOREZE, I.; CERICATO, L.; SOSO, A.B.; RITTER, F. Nursery rearing of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard) in cages: cage type, stocking density and stress response to confinement. **Aquaculture**, v.232, n.1, p.383-394, 2004.

BAINY, A.C.D.; SAITO, E.; CARVALHO, P.S.M.; JUNQUEIRA, V.B.C. Oxidative stress in Gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. **Aquatic Toxicology**, v. 34, p.151-162, 1996.

BARTON, B.A. & IWAMA, G.K. Physiological changes in Wsh from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroid. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 1, p. 3-26. 1991.

BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

BERTIN, G. & AVERBECK, D. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). **Biochimie**, v. 88, n. 11, p. 1549-1559, 2006.

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

BIJLSMA, L.; EMKE, E.; HERNÁNDEZ, F.; DE VOOGT, P. Performance of the linear ion trap Orbitrap mass analyzer for qualitative and quantitative analysis of drugs of abuse and relevant metabolites in sewage water. **Analytica Chimica Acta**, v.768, p. 102-110, 2013.

BINIECKA, M.; CAMPANA, P.; IANNILLI, I. The technological and economic management of the environmental variable in the pharmaceutical-chemical industry. **Microchemical Journal**, v.79, p.325-329, 2005.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Lei nº 12.305 de 02 de Agosto de 2010. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos; altera a Lei no 9.605, de 12 de fevereiro de 1998; e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 3 de agosto de 2010. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2010/Lei/L12305.htm>. Acesso em: 24/02/2014.

BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2007.

BUSER, H. R.; POIGER, T.; MÜLLER, M. D. Occurrence and fate of the pharmaceutical drug diclofenac in surface waters: rapid photodegradation in a lake. **Environmental Science & Technology**, v. 32, n. 22, p.3449-3456, 1998.

CAMARGO, S.G.O.; POUEY, J.L.; VAZ, B.S. Efeito da salinidade nos parâmetros hematológicos do jundiá (*Rhamdia quelen*–Quoy & Gaimard, 1824). **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 12, n. 4, p. 453-460, 2006.

CARNEIRO, P.; MIKOS, J.D.; BENDHACK, F. Processamento: O Jundiá como matéria-prima. **Panorama da Aqüicultura**, v.13, n.78, p. 17-21, 2003.

CESTARI, M. M.; LEMOS, P. M.M.; RIBEIRO, C.A.D.O.; COSTA, J.R.M.A., PELLETIER, E., FERRARO, M. V., FENOCCHIO, A. S. Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 2, p. 270-274, 2004.

CHANCE, B.; KAKINUMA, K.; CADENAS, E.; BOVERIS, A. Low level chemiluminescence of intact polymorphonuclear leukocytes. **FEBS Letters**, v.102, n. 1, p. 38-42, 1979.

CHANDRAN, R.; SIVAKUMAR, A.A.; MOHANDAS, S. S.; ARUCHAMI M. Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod, *Achatina fulica*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 140, p.422-426, 2005.

CHAPMAN, P.M. Emerging substances - Emerging problems? **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.25, n.6, p.1445-1447, 2006.

CHIEN, H.Y.; KO, J.J.; CHEN, Y.C.; WENG, S.H.; YANG, W.C.; CHANG, Y.C.; LIU, H.P. Study of Medication Waste in Taiwan. **Journal of Experimental & Clinical Medicine**, 2013.

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.

COLDEBELLA, I.J.; EMANUELLI, T.; VEIVERBERG, C.A.; PRETTO, A.; ROSSATO, S.; FERREIRA, D.; NETO, J.R. Effect of different dietary lipid levels on the reproduction of *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, 1824). **Aquaculture Nutrition**, v. 19, n.5, p.751-764, 2013.

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

COLLINS, A.R. & AZQUETA, A. Single-cell gel electrophoresis combined with lesion-specific enzymes to measure oxidative damage to DNA. **Methods in Cell Biology**, v. 112, p. 69-92, 2012.

COMORETTO, L. & CHIRON, S. Comparing pharmaceutical and pesticide loads into a small Mediterranean river. **Science of the Total Environment**, v. 349, n. 1, p. 201-210, 2005.

COHEN, J.J. & DUKE, V. Apoptoses and programmed cell death in immunity. **Annual Review of Immunology**, v. 10, p. 267-293, 1992.

CUNHA, M.S.; LOPES, D.R.; SOUSA, M. B. C. Variação na contagem de leucócitos em *Callithrix jacchus* (Linnaeus, 1758) submetidos a uma situação de estresse agudo. **Revista Brasileira de Zootecias**, v. 7, n. 2, 2009.

CROUCH R.K.; GANDY S.E.; KIMSEY G. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**, v.35, 1981.

DELFINO, V.D.; GUEMBAROVSKI, A.L.; SOARES, A. E.; GORDAN, P. A.; MATNI, A.M.; MOCELIN, A.J. Loss of renal allograft function caused by *Histoplasma capsulatum*. In **Transplantation Proceedings**, v. 27, n. 2, p. 1817, 1995.

DHABHAR, F.S. Stress-induced augmentation of immune function: The role of stress hormones, leukocyte trafficking and cytokines. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 16, p. 785-798, 2002.

DI GIULIO, R.T.; BENSON, W.H.; SANDERS, B.M.; VAN VELD, P.A. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. In: RAND, G.M. **Fundamentals of Aquatic Toxicology – Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment**. 2. ed. London: Taylor & Francis, 1995. P. 523-561.

DRABKIN, D.L. Spectrometric studies, XIV: the crystallographic and optimal properties of the hemoglobin of man in comparison with those of other species. **Journal of Biological Chemistry**, v. 164, n.2, p.703–723, 1946.

FRANÇA-SALGUEIRO, F.M. Avaliação da toxicidade de agrotóxicos utilizados na cultura do arroz irrigado para girinos de *Lithobates catesbeianus*. **Tese Doutorado em Biotecnologia**, Universidade de São Paulo, USP, Brasil, 2012.

FRASCÁ-SCORVO, C.M.D.; CARNEIRO, D.J.; MALHEIROS, E.B. Comportamento alimentar do matrinxã (*Brycon cephalus*) no período de temperaturas mais baixas. **Boletim Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 27, n.1, p. 1-5, 2001.

FERNANDES, A.N.; ALMEIDA, C.A P.; ESTEVES, V.I.; SIERRA, M.; GRASSI, M.T. Remoção dos hormônios 17beta-estradiol e 17alfa-etinilestradiol de soluções aquosas empregando turfa decomposta como material adsorvente. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1526-1533, 2011.

FERRARI, A.; VENTURINO, A.; PECHÉN DE D'ANGELO, A.M. Effects of carbaryl and azinphos methyl on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) detoxifying enzymes. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.88, n.2, p.134-142, 2007.

FERRARO, M.V., FENOCCHIO, A.S., MANTOVANI, M.S., OLIVEIRA-RIBEIRO, C.A., CESTARI, M.M. Mutagenic effects of tributyltin (TBT) and inorganic lead (PbII) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the Comet Assay, Piscine Micronucleus and Chromosome Aberrations tests. **Genetics and Molecular Biology**, v.27, n.1, p.103-107, 2004.

FINN, J.P. & NIELSON, N.O. The inflammatory response of rainbow trout. **Journal of Fish Biology**, v. 3, n. 4, p. 463-478, 1971.

FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases. In: MEISTER, A. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**. New York: John Wiley & Sons, 1986. p.61-97.

GAO, R.; YUAN, Z.; ZHAO, Z.; GAO, X..Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 45, p. 41–45, 1998.

GARCIA, F.; SCHALCH, S.H.C.; ONAKA, E.M.; FONSECA, F.S.; BATISTA, M.P. Hematology of Nile tilapia fed supplementation with algae challenged by acute and chronic stress. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.1, p.198-204, 2012.

GELLER, M.; KRYMCHANTOWSKI, A.V.; STEINBRUCH, M.; CUNHA, K. S.; GONÇALVES, M.; RIBEIRO, L.O.; DAHER, J P.L. Utilização do diclofenaco na prática clínica: revisão das evidências terapêuticas e ações farmacológicas. **Revista Brasileirade Clínica Medica**, v.10, n.1, p.29-38, 2012.

GIBSON, G. & SKETT, P. **Introduction to drug metabolism**. 2.ed. New York: Academic & Professional Publishers, 1994.

GIGER, W. Produits chimiques: Facteurs de risque pour l'environnement et la santé. **EAWAG news**, v.53, p.3-5, 2002.

GILBERT, H.F. & MC LEAN, V.M. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v. 63, p. 69, 1993.

GIUPPONI, C. & SGOBBI, A. Decision Support Systems for Water Resources Management in Developing Countries: Learning from Experiences in Africa. **Water**, v.5, n.2, p. 798-818, 2013.

GHISELLI, G. Avaliação da qualidade das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: ocorrência e determinação dos interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP). **Tese de Doutorado em Química Analítica**, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Brasil, 2011.

GLUSCZAK, L., MIRON, D. D. S., MORAES, B. S., SIMÕES, R. R., SCHETINGER, M. R. C., MORSCH, V. M.; LORO, V. L. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish *Rhamdia quelen*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.146, n.4, p. 519-524, 2007.

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

GONTIJO, C.M.; BARRETO, R.E.; SPEIT, G.; VALENZUELA REYES, V.A.; VOLPATO, G.L.; FAVERO SALVADORI, D.M. Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 534, n.1, p.165-172, 2003.

GONZALEZ-REY, M. & BEBIANNO, M.J. Does non-steroidal anti-inflammatory (NSAID) ibuprofen induce antioxidant stress and endocrine disruption in mussel *Mytilus galloprovincialis*? **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.33, n.2, p.361-371, 2012.

GUARATINI, T; MEDEIROS, M.H.G.; COLEPICOLO, P. Antioxidants in the skin: applications and evaluation of their efficacy. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 206-213, 2007.

GUSTAVSON, K.E.; SONSTHAGEN, K.S.A.; CRUNKILTON, R.A.; HARKIN, J.M. Groundwater toxicity assessment using bioassay, chemical, and toxicity identification evaluation analyses. **Environmental Toxicology**, v.15, n.5, p.421-430, 2000.

GUTTERIDGE, J. M. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clinical Chemistry**, v. 41, n.12, p. 1819-1828, 1995.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3.ed. Oxford: Oxford University Press, 1999.

HANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

HEATH, A. G. **Water Pollution and Fish Physiology**. 2.ed. New York: C.R.C. Press, 1987.

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

HICKEY, E. J.; RAJE, R. R.; REID, V. E.; GROSS, S. M.; RAY, S. D. Diclofenac induced in vivo nephrotoxicity may involve oxidative stress-mediated massive genomic DNA fragmentation and apoptotic cell death. **Free Radical Biology and Medicine**, v.31, n. 2, p. 139-152, 2001.

HINE, P.M. The granulocytes of fish. **Fish Shellfish Immunology**, v.2, p.79-88, 1992.

HINTON, D. E. & COUCH, J. A. Architectural pattern, tissue and cellular morphology in livers of fishes: Relationship to experimentally-induced neoplastic responses. In: BRAUNBECK, T.; HINTON, D.E.; STREIT, B. **Fish Ecotoxicology**. Berlin: Birkhauser Verlag, 1998. p. 141-164.

HONG, H. N.; KIM, H. N.; PARK, K. S.; LEE, S. K.; GU, M. B. Analysis of the effects diclofenac has on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using real-time PCR. **Chemosphere**, v.67, n.11, p.2115-2121, 2007.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, A. D. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n.5, p. 1170-1179, 2008.

ISLAS-FLORES, H.; GÓMEZ-OLIVÁN, L. M.; GALAR-MARTÍNEZ, M.; COLÍN-CRUZ, A.; NERI-CRUZ, N.; GARCÍA-MEDINA, S. Diclofenac-induced oxidative stress in brain, liver, gill and blood of common carp (*Cyprinus carpio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2013.

JARDIM, W.F.; MONTAGNER, C.C.; PESCARA, I.C.; UMBUZEIRO, G.A.; DI DEA BERGAMASCO, A. M.; ELDRIDGE, M. L.; SODRÉ, F.F. An integrated approach to evaluate emerging contaminants in drinking water. **Separation and Purification Technology**, v. 84, p. 3-8, 2012.

JEBALI, J.; SABBAGH, M.; BANNI, M.; KAMEL, N.; BEN-KHEDHER, S.; M'HAMDI, N.; BOUSSETTA, H. Multiple biomarkers of pollution effects in *Solea solea* fish on the Tunisia coastline. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-10, 2012.

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.

JHONSON, A.C.; OLDENKAMP, R.; DUMONT, E.; SUMPTER, J.P. Predicting concentrations of the cytostatic drugs cyclophosphamide, carboplatin, 5-fluorouracil, and capecitabine throughout the sewage effluents and surface waters of Europe. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.32, n.9, p. 1954-1961, 2013.

JOSE, J.; GIRIDHAR, R.; ANAS, A.; LOKA BHARATHI, P.A.; NAIR, S. Heavy metal pollution exerts reduction/adaptation in the diversity and enzyme expression profile of heterotrophic bacteria in Cochin estuary, India. **Environmental Pollution**, v.159, n.10, p. 2775-2780, 2011.

KANDEMIR, S.; DOGRU, M. I.; ORUN, I.; DOGRU, A.; ALTAS, L.; ERDOGAN, K.; POLAT, N. Determination of heavy metal levels, oxidative status, biochemical and

hematological parameters in *Cyprinus carpio* L., 1758 from Bafra (Samsun) fish lakes. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.9, n.3, p.617-622, 2010.

KEEN, J.H.; HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. Mechanism for several activities of the glutathione Stransferases. **Journal of Biological Chemistry**, v.25, n.1, 1976.

KHETAN, S. K. & COLLINS, T. J. Human pharmaceuticals in the aquatic environment: n.a challenge to green chemistry. **Chemical Reviews**, v.107, n.6, p. 2319-2364, 2007.

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAWA, Y. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. **Mammalian Mutagenicity Study Group Communications**, v. 3, p. 103–115, 1995.

KOLPIN, D. W.; FURLOG, E. T.; MEYER, M. T.; THURMAN, E. M.; ZAUGG, S. D.; BARBER, L. B.; BUXTON, H. T. **Environmental Science & Technology**, v.36, p.1202, 2002.

KUMAR, A.; SHARMA, B.; PANDEY, R.S. Assessment of stress in effect to pyrethroid insecticides, λ -cyhalothrin and cypermethrin in a freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch). **Cell and Molecular Biology**, v.58, n.1, p.153-159, 2012.

KÜMMERER, K. Pharmaceuticals in the Environment. **Annual Review of Environment and Resources**, v.35, p.57–75, 2010.

KYZAS, G.Z.; KOSTOGLU, M.; LAZARIDIS, N.K.; LAMBROPOULOU, D.A.; BIKIARIS, D.N. Environmental friendly technology for the removal of pharmaceutical contaminants from wastewaters using modified chitosan adsorbents. **Chemical Engineering Journal**, v.222, p. 248-258, 2013.

LAMONT, L.A. & MATHEWS, K.A. Opioids, nonsteroidal antiinflammatories, and analgesics adjuvants. In: TRANQUILLI, W.J. **Veterinary anesthesia and analgesia**. 4.ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2007. p.241-272.

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.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 2.ed. São Paulo: Savier, 1995.

LEUSCH, F.D.; KHAN, S. J.; GAGNON, M.M.; QUAYLE, P.; TRINH, T.; COLEMAN, H.; REITSEMA, T. Assessment of wastewater and recycled water quality: A comparison of lines of evidence from *in vitro*, *in vivo* and chemical analyses. **Water Research**, v.50, p. 420-431, 2013.

LI, Z.H.; VELISEK, J.; ZLABEK, V.; GRABIC, R.; MACHOVA, J.; KOLAROVA, J.; RANDAK, T. Chronic toxicity of verapamil on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on morphological indices, hematological parameters and antioxidant responses. **Journal of Hazardous Materials**, v.185, n.2, p.870-880, 2011.

LIPPMAN, R.D. Lipid peroxidation and metabolism in aging. In: Rothstein, M. **Review of Biological Research in Aging**, v.1. Alan R. Liss, NY, p. 315-342, 1983.

LOPES, P.R.S.; POUHEY, L.F.O.; ENKE, D.B.S.; CAMARGO, S.G.O.; CORREA, G.F.; RIBEIRO, C.L.G.; MALLMANN, C.A.; PORTLENINHA, M.K.; SANTIAGO, M.F.; SOQUETTA, M. Efeitos das aflatoxinas sobre os parâmetros eritrocitários de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*). **Revista da FZVA. Uruguaiana**, v.17, n.1, p. 1-13, 2010.

LÜ, Z.; SANG, L.; LI, Z.; MIN, H. Catalase and superoxide dismutase activities in a *Stenotrophomonas maltophilia* WZ2 resistant to herbicide pollution. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72, n.1, p. 136-143, 2009.

LUSHCHAK, V.I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, v.101, n.1, p.13-30, 2011.

MANENTE, F.A.; MELLO, L.R.D.A.; KHALIL, O.A.K.; CARVALHO, C.T.D.; BANNACH, G.; VELLOSA, J.C.R. Effect of metal complexation to anti-inflammatory over the action against oxidative and free radicals: ketoprofen action. **Eclética Química**, v.36, n.2, p.107-127. 2011.

MEAGHER, E.A & FITZGERALD, G.A. Indices of lipid peroxidation in vivo: Strengths and limitation. **Free Radical Biology and Medicine**. v.26, p. 202-226, 2000.

MEDHI, A.K. & HAZARIKA, A.K. Study on the effect of lindane on some hematological parameters of Indian fresh water catfish, *Clarias batrachus* (L.). **The Clarion**, v.2, n.2, p.42-45, 2013.

MELA, M.; GUILOSKI, I.C.; DORIA, H.B.; RANDI, M.A.F.; DE OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; PEREIRA, L.; SILVA DE ASSIS, H. C. Effects of the herbicide atrazine in neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.93, p. 13-21, 2013.

MELANCON, M.J. Bioindicators used in aquatic and terrestrial monitoring. In: HOFFMAN, D.; RATTNER, B.A.; BURTON, G.A.; CAIRNS, J. **Handbook of Ecotoxicology**. Boca Raton: Lewis, 1995.

MELO, S.A.S.; TROVÓ, A.G.; BAUTITZ, I.R.; NOGUEIRA, R.F.P. Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. **Química Nova**, v.32, n.1, p. 188-197, 2009.

MEMMERT, U.; PEITHER, A.; BURRI, R.; WEBER, K.; SCHMIDT, T.; SUMPTER, J. P.; HARTMANN, A. Diclofenac: New data on chronic toxicity and bioconcentration in fish. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.32, n.2, p.442-452, 2013.

MONKS, T.J.; ANDERS, M.W.; DEKANT, W. Glutathione conjugate mediated toxicities. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 106, p. 1-19, 1990.

MONTEIRO, D.A.; RANTIN, F.T.; KALININ, A.L. Dietary intake of inorganic mercury: bioaccumulation and oxidative stress parameters in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. **Ecotoxicology**, p.1-11, 2013.

MULLER, C.R.; HAAS, S.E.; BASSANI, V.L.; GUTERRES, S.S.; FESSI, H., DO CARMO RPERALBA, M.; POHLMANN, A.R. Degradação e estabilização do diclofenaco em nanocápsulas poliméricas. **Química Nova**, v.27, n.4, p.555-560, 2004.

NACCI, D.; NELSON, S.; NELSON, W. & JACKIM, E. Application of the DNA alkaline unwinding assay to detect DNA strandbreaks in marine bivalves. **Marine Environmental Research**, v.33, p.83–100, 1992.

NELSON, D.A. & MORRIS, M.W. Basic methodology. Hematology and coagulation, part IV. In: Nelson, D.A., Henry, J.B. (Eds.), **Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**, p.578–625, 1989.

OLAYA-NIETO, C. W.; PACHECO-OROZCO, L.; OCHOA-ARTEAGA, J. Trophic ecology of Liso (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard, 1824) in the Sinu river, Colombia. **Revista MVZ Córdoba**, v.17, n.3, p.3217-3223, 2012.

OLIVEIRA-JUNIOR, A. A; TAVARES-DIAS, M.; MARCON, J. L. Biochemical and hematological reference ranges for Amazon freshwater turtle, *Podocnemis expansa* (*Reptilia: Pelomedusidae*), with morphologic assessment of blood cells. **Research in Veterinary Science**, v.86, p. 146–151, 2008.

OMOREGIE, E. Changes in the haematology of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* Trewavas under the effect of crude oil. **Acta Hydrobiologic, Kracow**, v. 40, p. 287-292, 1998.

ORUÇ, E.Ö. & ÜNER, N. Combined effects of 2,4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v.127, n.3, p. 291-296, 2000.

PAMPLONA, J.H.; OBA, E.T.; DA SILVA, T.A.; RAMOS, L.P.; RAMSDORF, W.A.; CESTARI, M.M.; SILVA DE ASSIS, H. C. Subchronic effects of dipyrone on the fish species *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.74, n.3, p.342-349, 2011.

PARANÁ. Lei nº 17.211 de 03 de julho de 2012. Dispõe sobre a responsabilidade da destinação dos medicamentos em desuso no Estado do Paraná e seus procedimentos. **Diário Oficial do Paraná**, 2012. Disponível em: <<http://www.inteligenciaambiental.com.br/sila/pdf/eleilegpr17211-12.pdf>>. Acesso em: 24/02/2014.

PARKINSON, A. Biotransformation of xenobiotics. In: **Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons**. 9.ed. New York: McGraw Hill, 2001. p. 113 – 186.

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

PAULINO, M.G.; SOUZA, N.E.S.; FERNANDES, M.N. Subchronic exposure to atrazine induces biochemical and histopathological changes in the gills of a Neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 80, p. 6-13, 2012.

PEÑA-LLOPIS, S.; FERRANDO, M.D.; PEÑA, J.B. Impaired glutathione redox status in associated with decreased survival in two organophosphate-poisoned marine bivalves, **Chemosphere**, p. 214-226, 2002.

PEREIRA, L.; FERNANDES, M.N.; MARTINEZ, C. B. Hematological and biochemical alterations in the fish *Prochilodus lineatus* caused by the herbicide clomazone. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 2013.

PIAIA, R.; TOWNSEND, C.R.; BALDISSEROTTO, B. Growth and survival of fingerlings of *Rhamdia quelen* exposed to different light regimes. **Aquaculture International** v. 7, p. 201-205, 1999.

PIMPÃO, C. T. Avaliação aguda dos efeitos toxicológicos da deltametrina em uma espécie de peixe fluvial nativo: estudo bioquímico e imunotóxico. **Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná**, 2006.

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, n.2, p.122-127, 2007.

PRETTO, A.; LORO, V. L.; BALDISSEROTTO, B.; PAVANATO, M. A.; MORAES, B. S.; MENEZES, C.; DRESSLER, V. Effects of water cadmium concentrations on bioaccumulation and various oxidative stress parameters in *Rhamdia quelen*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.60, n.2, p. 309-318, 2011.

RAINSFORD, K.D. & VELO, G.P. **Side-effects of anti-inflammatory/analgesic drugs**. Lancaster: Kluwer Academic, 1992.

RAMOS-BARBOSA, S.; GUAZZELLI, L.S.; SEVERO, L.C. *Cryptococcal mastitis* after corticosteroid therapy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 1, p. 65-66, 2004.

RAMSDORF, W A; FERRARO, M V M; OLIVEIRA-RIBEIRO, C. A; COSTA, J. R. M.; CESTARI, M M. Genotoxic evaluation of different doses of inorganic lead (PbII) in *Hoplias malabaricus*. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 158, n. 1-4, p. 77-85, 2009.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. **Sanidade de Organismos Aquáticos**. São Paulo: Varela, 2004.

REIS FILHO, R.W.; BARREIRO, J.C.; VIEIRA, E. M.; CASS, Q.B. Fármacos, ETEs e corpos hídricos. **Ambiente e água- An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 2, n.3, p.54-61, 2007.

REGOLI, F.; NIGRO, M.; ORLANDO, E. Lysosomal and antioxidant responses to metals in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. **Aquatic Toxicology**, v. 40, p.375-392, 1998.

RHODEN, E.L.; MAURI, M. ; PETTEFFI, L. ; DACANAL, F. ; PILLA, M. ; BELLO-KLEIN A. ;RHODEN, C.R. Efeitos do alopurinol sobre a lipoperoxidação de membranas celulares renais na síndrome da isquemia e reperfusão: estudo experimental em ratos. **Acta Cirurgica Brasileira**, v.13, n.2, 1998. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-86501998000200002&script=sci_arttext> Acesso em: 20/01/2014.

RIGOBELLO, E.S. **Avaliação da remoção de diclofenaco e formação de subprodutos em tratamento de água**. Tese (Doutorado em Química), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

ROVER JÚNIOR, L.; HÖEHR, N.R.; VELLASCO, A.P.; KUBOTA, L.T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p.112-119, 2001.

SANDERSON, H.; JOHNSON, D. J.; REITSMA, T.; BRAIN, R. A.; WILSON, C. J.; SOLOMON, K. R. Ranking and prioritization of environmental risks of pharmaceuticals in surfacewaters. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.39, n.2, p.158-183, 2004.

SARAVANAN, M.; KARTHIKA, S.; MALARVIZHI, A.; RAMESH, M. Ecotoxicological impacts of clofibrac acid and diclofenac in common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings: hematological, biochemical, ionoregulatory and enzymological. **Journal of Hazardous Materials**,v.195, p.188–194, 2011.

SCHWAIGER, J.; FERLING, H.; MALLOW, U.; WINTERMAYR, H.; NEGELE, R. D. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. **Aquatic Toxicology**, v.68, n.2, p.141-150, 2004.

SEDLAK, J. & LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 24, n.1, p.192-205, 1968.

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

SILFVERGRIP, A.M.C. **A sistematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae)**. Stockholm: Departament of Zoology, Stockholm University and Departement of Vertebrate Zoology, Swedish Museum of Natural History, 1996.

SILVA, E.B.D.; PICAPEDRA, P.H.; SANCHES, P.V.; REZENDE, R.E.D.; GAVIÃO, A.M.; MENDONÇA, M.M.; CONTE, R.B. Larvae occurrences of *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) (Siluriformes: Heptapteridae) in an area under dam influence in the upper Paraná River region, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v.9, n.2, p. 419-426, 2011.

SODRÉ, F.F.; LOCATELLI, M.A.F.; JARDIM, W.F. Sistema limpo em linha para extração em fase sólida de contaminantes emergentes em águas naturais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p.216-219, 2010.

SOUZA, J.S. & FERRÃO, M.F. Aplicações da espectroscopia no infravermelho no controle de qualidade de medicamentos contendo diclofenaco de potássio. Parte I: Dosagem por regressão multivariada. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 3, 2006.

STEPANOVA, S.; PRASKOVA, E.; CHROMCOVA, L., PLHALOVA, L.; PROKES, M.; BLAHOVA, J.; SVOBODOVA, Z. The effects of diclofenac on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 35, n. 3, p. 454-460, 2013.

SPEIT, G. & HARTMANN, A. The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. **Methods in Molecular Biology** (Clifton, N.J.), v. 113, p. 203-12, 1999.

SUZUKI, Y. & IIDA, T. Fish granulocytes in the process of inflammation. **Annual Review of Fish Diseases**, v.2, p.149-160, 1992.

TAGIROVA, D. R., & MUKHUTDINOVA, F. I. Effect of sodium diclofenac on microcirculation and composition of the lymph during fever reaction. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v.139, n.3, p. 287-289, 2005.

TAKASHIMA, F. & HIBIYA, T. **An Atlas of fish histology: normal and pathological features**. 2.ed. New York: Gustav Fischer Verlag, 1995.

TAVARES-DIAS, M. & MORAES, F. R. Hematological parameters for the *Brycon orbignyanus Valenciennes, 1850 (Osteichthyes: Characidae)* intensively bred. **Hidrobiológica**, v.16, p.271-274, 2006.

TAVARES-DIAS, M. & MORAES, F. R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: Eletrônica e Arte Final, 2004.

TAVARES-DIAS, M. & MORAES, F.R. Características hematológicas da Tilapia rendalli Boulenger, 1896 (*Osteichthyes: Cichlidae*) capturada em "pesque-pague" de Franca, São Paulo, Brasil. **Bioscience Journal**, v.19, p.103-110, 2003.

TAVARES-DIAS, M.; MELO J. F. B., MORAES, G.; MORAES, F. R. D. 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.

TEKMAN, B.; OZDEMIR, H.; SENTURK, M.; CIFTCI, M. Purification and characterization of glutathione reductase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and inhibition effects of metal ions on enzyme activity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v.148, n.117-121, 2008.

TERNES, T. Methods for the determination of neutral drugs as well as betablockers and alpha2-sympathomimetics in aqueous matrices using GC/MS and LC/MS/MS. **Journal of Analytical Chemistry**, v.362, n.3, p.329–340, 1998.

TOWNSEND, C. R.; BEGON, M. & HARPER, J. L. **Fundamentos em Ecologia**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

THUVANDER, A.; NORRGREN, L.; FOSSUM, C. Phagocytic cells in blood from rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Richardson), characterized by flow cytometry and electron microscopy. **Journal of Fish Biology**, v.31, p.197-208, 1987.

TYSKA, D.; MALLMANN, C.A.; CORRÊIA, V.; TAMIOSSO, C.D.; MALLMANN, A.O. & RADÜNZ NETO, J. Vegetable Protein concentrates in the diet of South American catfish *Rhamdia quelen*. **Ciência Rural**, v.43, n.7, p.1251-1257, 2013.

VAN DER AA, N.G.F.M.; KOMMER, G.J.; VAN MONTFOORT, J.E.; VERSTEEGH, J.F.M. Demographic projections of future pharmaceutical consumption in the Netherlands. **Water Science and Technology**, v.63,n. 4, p. 825–831, 2011.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 13, p. 57-149, 2002.

VAN LEEUWEN, J.S.; VREDENBURG, G.; DRAGOVIC, S.; TJONG, T.F.; VOS, J. C.;VERMEULEN, N.P. Metabolism related toxicity of diclofenac in yeast as model system. **Toxicology Letters**, v.200, n.3, p.162-168, 2011.

VERLICCHI, P.; AL AUKIDY, M.; ZAMBELLO, E. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment-a review. **Science of the Total Environment**, v. 429, p. 123-155, 2012.

WINTERBOURN, C.C. Oxidative reactions of hemoglobin. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 265, 1990.

YIN, Y.; JIA, H.; SUN, Y.; YU, H.; WANG, X., Wu, J.; XUE, Y. Bioaccumulation and ROS generation in liver of *Carassius auratus*, exposed to phenanthrene. **Comparative Biochemistry and Physiology, C**, v. 145, p.288–293, 2007.

ZANETTE J.; NUNES F.F.; MEDEIROS, I.D.; SIEBERT, M.N.; MATTOS, J.J.; LÜCHMANN, K.H.; MELO, C.M.R.; BAINY, A.C.D. Comparison of the antioxidant defense system in *Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea gigas* exposed to domestic sewage discharges. **Marine Environmental Research**, v.66, p.196-198, 2008.

ZHANG, D. Q.; HUA, T., GERSBERG, R.M.; ZHU, J.; NG, W. J.; TAN, S.K. Fate of diclofenac in wetland mesocosms planted with *Scirpus validus*. **Ecological Engineering**, v.49, p.59-64, 2012.

ZHENG, Y.; LIU, Y.; GE, J.; WANG, X.; LIU, L.; BU, Z.; LIU, P. Resveratrol protects human lens epithelial cells against H₂O₂-induced oxidative stress by increasing catalase, SOD-1, and HO-1 expression. **Molecular Vision**, v.16, p. 1467-1474 2010.