



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Gabriel de Farias Araujo

**Avaliação do estresse oxidativo de exposições unitárias e combinadas
de carbamazepina, acetamiprida e cádmio em peixes *Danio rerio***

Rio de Janeiro

2019

Gabriel de Farias Araujo

**Avaliação do estresse oxidativo de exposições unitárias e combinadas
de carbamazepina, acetamiprida e cádmio em peixes *Danio rerio***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração: Toxicologia Ambiental.

Orientadores: Prof. Dr. Enrico Mendes Saggioro
Prof. Dr. Fábio Veríssimo Correia

Rio de Janeiro

2019

Catálogo na fonte
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde
Biblioteca de Saúde Pública

A663a Araujo, Gabriel de Farias.
Avaliação do estresse oxidativo de exposições unitárias e combinadas de carbamazepina, acetamiprida e cádmio em peixes *Danio rerio* / Gabriel de Farias Araujo. -- 2019.
108 f. : il. ; tab.

Orientadores: Enrico Mendes Saggioro e Fábio Veríssimo Correia.
Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2019.

1. Ecotoxicologia. 2. Estresse Oxidativo. 3. Poluentes Químicos da Água - toxicidade. 4. Peixe-Zebra. 5. Peroxidação de Lipídeos. 6. Carbamazepina - toxicidade. 7. Cádmio - toxicidade. 8. Inseticidas - toxicidade. 9. Poluentes Ambientais. 10. Biomarcadores. 11. Metais Pesados – toxicidade. 12. Contaminantes Emergentes.

I. Título.

CDD – 23.ed. – 363.7

Gabriel de Farias Araujo

**Avaliação do estresse oxidativo de exposições unitárias e combinadas
de carbamazepina, acetamiprida e cádmio em peixes *Danio rerio***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração: Toxicologia Ambiental.

Aprovada em: 26/03/2019

Banca Examinadora

Prof. Dr. André Luís de Sá Salomão, UERJ

Prof. Dr. Jamila Alessandra Perini Machado, UEZO

Prof. Dr. Enrico Mendes Saggioro, ENSP

Prof. Dr. Fábio Veríssimo Correia, UNIRIO

Rio de Janeiro

2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, em primeiro lugar, pela graça, misericórdia, bondade, Amor e muita paciência para comigo.

À minha família, Deise, Vladimir (em memória), Leonardo, Benedicto e Daniel, sem esquecer de Ilma e Renato, por todo apoio, carinho e essencial suporte com amor ininterrupto.

À Renata, Ana Lúcia e Matheus, por todo incentivo, pelo suporte e por ajuda que me deram ao longo deste projeto.

À Priscila, por toda ajuda em um dos momentos mais importantes.

A meus colegas de laboratório e amigos de sala de aula, obrigado por toda ajuda, pela amizade e suporte (principalmente a Sidney).

Aos meus professores, em especial aos orientadores, Dr. Enrico Saggiore e Dr. Fábio Veríssimo, pela dedicação ímpar, por toda ajuda, zelo e paciência e por terem acreditado que este trabalho seria possível.

A Leandro e Lorena, por toda ajuda neste projeto - seria impossível sem eles.

Aos amigos dos setores de Indicadores de Efeito, Técnicas Ômicas e Metais do Centro de Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana da FIOCRUZ, por todo suporte.

À equipe do Departamento de Departamento de Saneamento e Saúde Ambiental da FIOCRUZ, especialmente a Denise, por todo suporte, amizade e carinho ímpar.

À minha amiga Selma (sem esquecer da Márcia), por todo incentivo, apoio e amizade.

À ENSP-FIOCRUZ, à FAPERJ e à CAPES, pelo suporte e apoio financeiro a este projeto, inclusive sob a forma de bolsa de estudos.

RESUMO

Ambientes naturais aquáticos vêm recebendo aportes de contaminantes emergentes, que podem interagir com classes de contaminantes já regulamentados, promovendo efeitos adversos aos organismos e influenciando aspectos de saúde pública. Este estudo avaliou os efeitos oxidativos do fármaco carbamazepina (CBZ) e do pesticida neonicotinóide acetamiprida (ACT), reconhecidamente contaminantes emergentes, em sistemas unitários e em misturas com o contaminante regulamentado cádmio, por meio dos biomarcadores catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), glutathione reduzida (GSH), metalotioneína (MT) e malondialdeído (MDA). Para tanto, peixes zebrafish (*Danio rerio*) foram expostos por 96 horas à concentração ambiental de $25 \mu\text{g L}^{-1}$ dos contaminantes em sistema estático para análise dos órgãos cérebro e fígado. Os resultados das exposições unitárias dos contaminantes indicaram um aumento significativo de todos os biomarcadores comparados com controle, exceto para CAT no órgão cérebro, por sua conhecida baixa atividade neste órgão. Esses aumentos, sobretudo no biomarcador MDA, foram atribuídos ao aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas a partir das exposições aos contaminantes. Destaca-se que o contaminante CBZ apresentou os maiores níveis em todos os biomarcadores, demonstrando maior possibilidade de efeitos oxidativos dentre os três contaminantes. Já o contaminante ACT, apresentou as menores respostas de biomarcadores no órgão fígado, sobretudo na atividade da enzima CAT. Além disso, ressalta-se que o contaminante Cd apresentou os menores valores de resposta dos biomarcadores estudados para o órgão cérebro. Em relação às exposições mistas, foram observados níveis de resposta dos biomarcadores acima dos observados nos controles para os órgãos cérebro (GSH e MT) e fígado (CAT, GSH), demonstrando a resposta antioxidante do organismo ante ao aumento das EROs, bem como a ocorrência de peroxidação lipídica nestas exposições para o fígado. No entanto, as exposições mistas apresentaram níveis de biomarcadores menores que a soma de seus respectivos resultados de exposição unitária, sugerindo uma interação antagônica entre os contaminantes para CAT, GST, MT e MDA. Conclui-se que os contaminantes de estudo são capazes de gerar efeitos oxidativos ao organismo modelo mesmo na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$, alertando para a possibilidade de quebra da homeostase entre resposta antioxidante e geração de EROs pelas exposições, sugerindo que efeitos semelhantes seriam observados em organismos não alvo no ambiente natural, sobretudo pelo aporte constante de cargas desses contaminantes.

Palavras-chave: Contaminantes emergentes, Ecotoxicologia aquática, Estresse oxidativo, Zebrafish, Peroxidação lipídica.

ABSTRACT

Aquatic natural environments have been receiving discharges of emergent contaminants, those can interact with already regulated contaminants, promoting adverse effects to organisms and influencing negatively public health aspects. This study evaluated the oxidative effects of the drug carbamazepine (CBZ) and the neonicotinoid pesticide acetamiprid (ACT), recognized as emerging contaminants, in unitary systems and in mixtures with the regulated contaminant cadmium, thru the biomarkers catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), reduced glutathione (GSH), metallothionein (MT) and malondialdeid (MDA). For this, zebrafish fishes (*Danio rerio*) were exposed in 96 hours assay to an environmental concentration ($25 \mu\text{g L}^{-1}$) of those contaminants in a static system to the brain and liver analysis. The unitary exposure results shown a significative elevation of all biomarkers compared to controls, except CAT in brain, explained for its low activity in this organ. These elevations, mostly in MDA, were attributed to the oxygen reactive species (ROS) elevation, generated by the contaminant exposures. It has highlighted that the contaminant CBZ demonstrated the highest biomarker levels, pointing to its greater possibility of oxidative effects than the other contaminants studied. On the other hand, ACT presented the lowest biomarkers responses in the liver, mostly in the CAT activity. In addition, it is emphasized that the contaminant Cd presented the lowest response biomarkers values studied for the brain organ. About the mixed exposures, were observed levels of biomarker responses higher than controls to brain (GSH and MT) and liver (CAT, GSH and MDA), demonstrating the organism's antioxidant response face the ROS increase, as well the lipid peroxidation occurrence. However, the mixed exposures presented lower biomarker levels than the sum of its respective unitary exposition results, suggesting an antagonistic interaction between the contaminants in CAT, GST, MT and MDA. It was concluded that the contaminants studied were capable to generate oxidative effects to the model organism at $\mu\text{g L}^{-1}$ concentrations, alerting to the possibility of homeostasis breake between antioxidant response and ROS generation by the expositions, suggesting that similar effects would be observed in non-target organisms in the natural environment, especially related with the constant discharges of these contaminants.

Keywords: Emerging contaminants, Aquatic ecotoxicology, Oxidative stress, Zebrafish, Lipid peroxidation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema geral de absorção, distribuição e excreção de cádmio em peixes (adaptado de RODRIGUES, 2007).....	31
Figura 2 - Esquema geral de respostas celulares conforme aumento do estresse oxidativo (adaptado de HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).....	37
Figura 3 - Esquema geral das etapas do processo de peroxidação lipídica (adaptado de MOSIALOU, 1993).....	38
Figura 4 - Fontes endógenas e exógenas e respostas celulares às espécies reativas (ER) de Oxigênio (ERO), de Nitrogênio (ERN), derivados de Enxofre (ERS), de Cloro (ERCl), de carbono (ERC) e metais de transição [Mn ⁺] (adaptado de VASCONCELOS <i>et al.</i> , 2007).....	39
Figura 5 - Resultados dos biomarcadores enzimáticos GST (a) e CAT (b) para os órgãos cérebro e fígado observados no controle com alimentação e controle com alimentação e controle sem alimentação. Letras diferentes acima das colunas indicam significância estatística entre as mesmas, compreendida como diferença significativa entre tratamentos ($p \leq 0,05$).....	58
Figura 6 - Resultados dos biomarcadores não enzimáticos GSH (a) e MT (b) para os órgãos cérebro e fígado observados no controle com alimentação e controle sem alimentação. Letras diferentes acima das colunas indicam significância estatística entre as mesmas, compreendida como diferença significativa entre tratamentos ($p \leq 0,05$).....	59
Figura 7 - Resultados do biomarcador MDA para os órgãos cérebro e fígado observados no controle com alimentação e controle sem alimentação. Letras diferentes acima das colunas indicam significância estatística entre as mesmas, compreendida como diferença significativa entre tratamentos ($p \leq 0,05$).....	59
Figura 8 - Níveis da atividade enzimática da catalase (CAT) nas amostras de cérebro (a) e fígado (b) de peixes expostos. Letras diferentes acima das colunas indicam significância estatística entre as mesmas, compreendida como diferença significativa entre tratamentos ($p \leq 0,05$). CTL: controle, CBZ: carbamazepina. ACT: acetamiprida, Cd: cádmio.....	61

Figura 9 - Níveis do biomarcador glutathiona-S-transferase (GST) nas amostras de cérebro (a) e fígado (b) de peixes expostos. CBZ: carbamazepina. ACT: acetamiprida. CTL: controle. Letras diferentes acima das colunas indicam significância estatística entre as mesmas, compreendida como diferença significativa entre tratamentos ($p \leq 0,05$).....66

Figura 10 - Níveis do biomarcador glutathiona reduzida (GSH) nas amostras de cérebro (a) e fígado (b) de peixes expostos. Letras diferentes acima das colunas indicam significância estatística entre as mesmas, compreendida como diferença significativa entre tratamentos ($p \leq 0,05$). CTL: controle, CBZ: carbamazepina. ACT: acetamiprida, Cd: cádmio.....70

Figura 11 - Gráfico dos níveis do biomarcador metalotioneína (MT) nas amostras de cérebro (a) e fígado (b) de peixes expostos. Letras diferentes acima das colunas indicam significância estatística entre as mesmas, compreendida como diferença significativa entre tratamentos ($p \leq 0,05$). CTL: controle, CBZ: carbamazepina. ACT: acetamiprida, Cd: cádmio. A exposição CBZ+Cd não gerou amostras de fígado para análise, devido à escassez de massa do órgão para este órgão associada ao lote de peixes.....74

Figura 12 - Gráfico dos níveis do biomarcador malondialdeído (MDA) nas amostras de cérebro e fígado de peixes expostos. Letras diferentes acima das colunas indicam significância estatística entre as mesmas, compreendida como diferença significativa entre tratamentos ($p \leq 0,05$) CTL: controle, CBZ: carbamazepina. ACT: acetamiprida, Cd: cádmio.....78

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Caracterização das principais espécies reativas de oxigênio.	36
Quadro 2 - Esquema de exposições dos peixes aos contaminantes de estudo.	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados de detecção ambiental do acetaminofeno.....	25
Tabela 2 - Dados de detecção ambiental de carbamazepina.....	29
Tabela 3 - Dados de detecção ambiental de cádmio	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABS	Absorbância
ANOVA	Análise de Variância
CAT	Catalase
CDNB	1-Cloro-2,4-Dinitrobenzeno
CESTEH	Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana
CL ₅₀	Concentração Letal capaz de matar 50% dos organismos testados
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DTNB	Ácido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiodibenzóico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (disódico)
ENSP	Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca
ERO's	Espécies Reativas de Oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GPx	Glutathione Peroxidase
GR	Glutathione Redutase
GSH	Glutathione
GSSG	Glutathione Oxidada
GST	Glutathione S-transferase
ICP-MS	Espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (<i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i>)
MDA	Malondialdeído
MT	Metalotioneína
SOD	Superóxido Dismutase
UNESCO	Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura
UV-VIS	Ultravioleta Visível

LISTA DE SÍMBOLOS

μg	Micrograma
μL	Microlitro
$\mu\text{mol L}^{-1}$	Micromols por Litro
abs	Absorbância
Ka	Constrante de acidez
log Kow	Logaritmo do coeficiente de partição n-octanol/água
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MT	Metalotioneína
nm	Nanômetro
pH	Potencial de Hidrogênio
rpm	Rotações por minuto
U	Unidade internacional de absorvância

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	17
2.	REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
2.1.	CONTAMINANTES EMERGENTES.....	21
2.1.1.	CONTAMINANTES EMERGENTES E A SAÚDE PÚBLICA.....	21
2.2.	ACETAMIPRIDA.....	22
2.3.	CARBAMAZEPINA.....	26
2.4.	CÁDMIO.....	30
2.5.	ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS COM <i>Danio rerio</i>	33
2.6.	ESTRESSE OXIDATIVO E ESPÉCIES REATIVAS.....	34
2.7.	SISTEMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTE.....	40
2.8.	BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	41
2.8.1.	ENZIMA CATALASE.....	42
2.8.2.	ENZIMA GLUTATIONA-S-TRANSFERASE.....	42
2.8.3.	TIOL GLUTATIONA REDUZIDA.....	43
2.8.4.	PROTEÍNA METALOTIONEÍNA.....	44
2.9.	ASPECTOS GERAIS.....	45
3.	OBJETIVOS.....	46
3.1.	OBJETIVO GERAL.....	46
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
4.	METODOLOGIA.....	47
4.1.	COMPOSTOS QUÍMICOS TESTADOS.....	47
4.2.	ORGANISMO TESTE.....	47
4.3.	CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.....	48
4.3.1.	ESTABELECIMENTO DO MODELO – CONTROLES NEGATIVOS.....	48
4.3.2.	EXPOSIÇÃO AOS CONTAMINANTES.....	48
4.3.3.	DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS DE QUALIDADE DA ÁGUA.....	50
4.4.	EUTANÁSIA E PREPARO DAS AMOSTRAS DE BIOMASSA.....	50
4.5.	DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS.....	51
4.6.	BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	52
4.6.1.	AValiação da atividade de catalase.....	52
4.6.2.	AValiação da atividade de glutatona-S-transferase.....	53
4.6.3.	AValiação de glutatona reduzida.....	54
4.6.4.	AValiação de metalotioneína.....	54
4.6.5.	AValiação de malondialdeído - peroxidação lipídica.....	55
4.7.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	56
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.1.	DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS DE QUALIDADE DA ÁGUA.....	57

5.1.1.	ESTABELECIMENTO DO MODELO – CONTROLES NEGATIVOS.....	58
5.2.	ENSAIOS COM OS ORGANISMOS EXPOSTOS AOS CONTAMINANTES	61
5.2.1.	BIOMARCADOR CATALASE.....	61
5.2.2.	BIOMARCADOR GLUTATIONA-S-TRANSFERASE	66
5.2.3.	BIOMARCADOR GLUTATIONA REDUZIDA	70
5.2.4.	BIOMARCADOR METALOTIONEÍNA.....	74
5.2.5.	ANÁLISES DOS NÍVEIS DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	78
6.	CONCLUSÃO.....	82
7.	RECOMENDAÇÕES FUTURAS	84
8.	REFERÊNCIAS.....	85

ANEXO I

ANEXO II

1. INTRODUÇÃO

O crescimento populacional desordenado tem promovido simultaneamente o aumento na demanda por recursos naturais e a produção e uso crescente de produtos químicos. Esse fato, somado à fragilidade das políticas públicas e à precariedade dos serviços de saneamento, tem gerado consequentemente o aumento na produção de esgoto doméstico não tratado e cargas industriais remanescentes. Todo esse contexto corrobora na geração de impactos, reversíveis e irreversíveis sobre os ecossistemas, sobretudo no agravamento da indisponibilidade de recursos hídricos (JORDAN *et al*, 2010; DIETZ e JORGENSON 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Por essas razões, os impactos sobre a diminuição da qualidade dos recursos hídricos estão diretamente relacionados à um problema de saúde pública.

A introdução de substâncias químicas decorrentes de atividade antrópica, tais como agrotóxicos, medicamentos, cosméticos, produtos de higiene pessoal e metais em um ambiente natural, pode acarretar em danos estéticos e risco à saúde, podendo gerar o fenômeno de poluição chamado contaminação (CONAMA 420/09). Embora existam elementos ou substâncias que apresentem riscos à saúde bem mais descritos na literatura, destacam-se os denominados contaminantes emergentes. Os contaminantes emergentes vêm sendo encontrados no ambiente na ordem de ng L^{-1} e $\mu\text{g L}^{-1}$, e seus limites seguros de exposição nessa ordem de concentração ainda são pouco conhecidos, razão pela qual não possuem regulamentação quanto a valores máximos permitidos no ambiente e não são monitorados regularmente em programas governamentais (KOSJEK *et al*, 2007; MATAMOROS; SALVADÓ, 2012; VERLICCHI *et al*, 2010). Entre as classes que comportam contaminantes emergentes, podem ser citados plastificantes, hormônios, drogas de abuso, nanopartículas, pesticidas (grupos como o dos neonicotinóides) e compostos farmacêuticos e seus subprodutos da biotransformação (CARLOS *et al*, 2012; GOMIS *et al*, 2014; MATAMOROS; SALVADÓ, 2012).

As consequências causadas por contaminantes emergentes ao ambiente e à saúde humana ainda não são muito bem compreendidas, e no ambiente natural estes podem agir de modo diferente, quanto à possibilidade de interações sinérgicas e antagônicas com outros compostos já regulamentados ou considerados “seguros” (CEDERGREEN, 2014;

MATAMOROS; SALVADÓ, 2012). Dentre contaminantes já regulamentados, podem ser destacados os metais, encontrados em efluentes industriais e capazes de causar efeitos deletérios mesmo em concentrações na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} (DEMIR *et al.*, 2015). O metal cádmio é atualmente classificado pela *International Agency for Research On Cancer* - IARC como carcinogênico para humanos, além de ser considerado como capaz de causar efeitos como irritações estomacais, deformidades ósseas, distúrbios renais e câncer de pulmão (IARC, 2017; ATDSR, 2012). Metais como cádmio vêm sendo encontrados com frequência no meio ambiente aquático de forma combinada com outros contaminantes, especialmente de origem farmacológica. No entanto, segundo Almeida *et al.* (2018) a maior parte dos estudos relacionados aos impactos causados pela exposição a esse metal tratam apenas da exposição unitária ao cádmio, enquanto que uma pequena parcela atenta para exposições com sistemas de misturas de contaminantes. Além disso, Lefcort *et al.* (2002) ressaltaram que a maior parte dos estudos com metais prioriza apenas os efeitos negativos diretos sobre organismos, como sintomatologia toxicológica e mortalidade. Uma menor proporção de estudos aborda a avaliação de efeitos deletérios não letais.

Dentre os contaminantes emergentes, com dados ainda incipientes quanto à seus efeitos específicos sobre o ambiente, destaca-se o acetamiprida, um agrotóxico inseticida neonicotinóide (GOMIS *et al.*, 2014), introduzido no mercado como substituto dos inseticidas organofosforados, por apresentar maior afinidade aos receptores nicotínicos dos insetos em comparação com os de mamíferos (PIRES, 2013; TOMIZAWA; CASIDA, 2005; YAO; MIN; LV, 2006). No Brasil, seu uso foi autorizado pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e classificado como classe III, medianamente tóxico (ANVISA, 2017a). Esse agrotóxico tem sido considerado o neonicotinóide mais utilizado no mundo, e apesar de seu uso generalizado, os sintomas clínicos de intoxicação por acetamiprida ainda são pouco conhecidos (XING *et al.*, 2017). Em um estudo de caso clínico de intoxicação aguda realizada por Xing *et al.* (2017), foram relatados sintomas como tonturas, náuseas, amilase sanguínea elevada, distensão abdominal e disfunção hepática. Em relação a impactos no ambiente, a *American Byrd Conservancy* (2013) relatou efeitos dos neonicotinóides em culturas de abelhas, sistemas aquáticos e mortalidade de pássaros.

Além da classe dos pesticidas, os compostos farmacêuticos têm sido considerados contaminantes emergentes potenciais (BABIĆ *et al.*, 2007; KOSJEK *et al.*, 2007; STANLEY *et al.*, 2007; SUN; ZENG; LEMLEY, 2013). Esses compostos (farmacêuticos) são

introduzidos nos ecossistemas aquáticos principalmente pelo aporte de águas residuais sem tratamento e por águas residuais de estações de tratamento, uma vez que o tratamento convencional de efluentes domésticos é ineficiente na remoção desses contaminantes (KOSJEK *et al.*, 2007; STANLEY *et al.*, 2007; SUN; ZENG; LEMLEY, 2013). Dessa forma, dentre os principais grupos de fármacos que podem aportar nesses ambientes, destaca-se o grupo dos medicamentos de ação no sistema nervoso central (segundo maior em unidades de medicamento vendidas no Brasil) e, em especial, o medicamento carbamazepina (Tigretol) (ANVISA, 2017b). A carbamazepina é um fármaco psicotrópico antiepiléptico consumido na ordem de mil toneladas ao ano no mundo (SUN; ZENG; LEMLEY, 2013). Dentre seus usos, estão o tratamento de crises epilépticas parciais complexas ou simples, síndrome de abstinência alcoólica e diabetes insípida central, além de apresentar efeitos positivos sobre sintomas de ansiedade e depressão (ANVISA, 2017c). Segundo a ANVISA (2017c), a administração da carbamazepina pode apresentar reações adversas no sistema nervoso central (como vertigem, cefaleia, ataxia, sonolência, fadiga e diplopia) e dermatológicas (como erupções e necrólise epidérmica tóxica).

Para a compreensão dos impactos de compostos emergentes sobre os seres vivos, é importante ressaltar que estudos com análises físico-químicas tradicionais são incapazes de distinguir entre substâncias inertes e substâncias que afetam sistemas biológicos (COSTA *et al.*, 2008). Dessa forma, destaca-se o papel da ecotoxicologia para a melhor compreensão do efeito de contaminantes sobre os organismos e, em especial, o da ecotoxicologia aquática, uma vez que corpos hídricos seriam os principais receptores de cargas de contaminantes, sejam por descarga direta ou indireta (COSTA *et al.*, 2008).

Dentre os organismos modelo mais utilizados em ensaios de ecotoxicologia aquática, pode ser destacado o peixe teleosteo *zebrafish* (*Danio rerio*), que vem sendo utilizado como modelo em estudos farmacêuticos, mutagênicos e toxicológicos, uma vez que apresenta homologia genética de 70-80% com roedores e humanos, baixo custo de criação e manutenção, rápido desenvolvimento e capacidade de absorver compostos adicionados à água, dispensando-se a necessidade de tratamentos invasivos (ARMILIATO, 2014; BENDER, 2011; LAWRENCE, 2007; SEIBT, 2009). Por essas razões, esses peixes são comumente utilizados como bioindicadores em testes de ecotoxicologia aquática (IGANSI, 2012). Além disso, o *Danio rerio* apresenta mecanismos de defesa antioxidante,

que visam neutralizar efeitos oxidativos de espécies reativas de oxigênio (EROS), geradas por agentes xenobióticos como contaminantes ambientais (ARMILIATO, 2014). O desequilíbrio entre EROS e a resposta do sistema antioxidante (com predomínio das EROs), caracteriza a situação de estresse oxidativo (COTIGUIBA *et al.* 2013; VASCONCELOS *et al.* 2007). Dentre os efeitos oxidativos causados pelas EROS, podem ser destacados a peroxidação lipídica e danos a componentes celulares, proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos (ARMILIATO, 2014; FERREIRA, 2010; MASSARSKY *et al.*, 2017). As semelhanças entre sistemas antioxidantes de peixes e mamíferos permitem que sejam realizados estudos realistas da avaliação do risco potencial tóxico de contaminantes (MASSARSKY *et al.*, 2017).

Diante do exposto, acentua-se a importância de estudos que expandam o conhecimento sobre efeitos deletérios não letais dos contaminantes emergentes em questão (acetamiprida e carbamazepina), em conjunto com um contaminante já regulamentado (como o metal cádmio). Sobre esse tema, ressalta-se a escassez de dados na literatura que avaliem efeitos de exposições combinadas desses contaminantes, destacando-se o estudo de Almeida *et al.* (2018) como um dos poucos estudos que apresentam a abordagem de exposições combinadas, neste caso, dos contaminantes carbamazepina e cádmio, diferenciando-se do presente estudo principalmente pelo uso do organismo aquático amêijoas. Além da escassez de dados na literatura, ressalta-se a importância de estudos que abordem concentrações ambientais dos contaminantes estudados, uma vez que estes podem compor matrizes complexas em ambientes aquáticos, devido ao uso/consumo destas substâncias no território nacional (RIBEIRO *et al.*, 2013; ALMEIDA, 2012; ALCANTARA *et al.*, 2004). Dessa forma, o presente estudo pretende avaliar, em condições de laboratório, biomarcadores do estresse oxidativo em peixes *Danio rerio* expostos a acetamiprida, carbamazepina e cádmio em sistemas individuais e de misturas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. CONTAMINANTES EMERGENTES

Segundo Farré *et al.* (2008) e Verlicchi *et al.* (2010), a preocupação com efeitos dos chamados contaminantes emergentes em águas residuais, superficiais e subterrâneas é crescente. Esses contaminantes correspondem aos poluentes que não estão inclusos em rotinas de programas de monitoramento governamentais e não possuem valores de intervenção regulamentados pela legislação, dependendo de pesquisas sobre seus efeitos potenciais tóxicos e resultados de monitoramento de ocorrência ambiental (FARRÉ *et al.*, 2008; KOSJEK *et al.*, 2007; VERLICCHI *et al.*, 2010). Além disso, os contaminantes emergentes vêm sendo associados a grupos como produtos de cuidado pessoal, esteroides e hormônios, surfactantes, retardantes de chama, aditivos industriais, aditivos de gasolina e seus produtos de biotransformação, nanopartículas, produtos de desinfecção de piscinas, compostos perfluorados, drogas de abuso e compostos farmacêuticos (FARRÉ *et al.*, 2008; VERLICCHI *et al.*, 2010).

2.1.1. CONTAMINANTES EMERGENTES E A SAÚDE PÚBLICA

Os contaminantes emergentes podem aportar nos ambientes naturais por carreamento superficial de áreas rurais, ou ainda, pelo aporte de efluentes de águas residuais tratados ou não tratados (FARRÉ *et al.*, 2008). No caso de efluentes de estações de tratamento, estes vêm sendo considerados como uma das principais fontes do aporte de contaminantes emergentes farmacológicos nos sistemas aquáticos, uma vez que os tratamentos aplicados comumente não conseguem eliminar estes contaminantes (PAL *et al.*, 2014). Já a via de acesso por carreamento superficial, estaria ligada à contaminação de águas superficiais (e subterrâneas) pelo aporte de contaminantes de origem agrícola (PAL *et al.*, 2014). Assim, uma vez que a água potável é tradicionalmente obtida a partir de águas superficiais e que, por sua vez, as águas residuais são comumente encaminhadas para corpos

hídricos à jusante, a eliminação de águas residuais sem comprometer recursos hídricos e o meio ambiente vem sendo considerada um desafio técnico, social e ecológico (PAL *et al.*, 2014). Dessa forma, a presença de substâncias químicas (como contaminantes emergentes) em recursos hídricos é tida como um problema crescente de preocupação pública, tanto para a população, quanto para autoridades reguladoras, principalmente considerando-se aspectos como usos sucessivos de um mesmo manancial ao longo da bacia hidrográfica e consequências ainda não totalmente compreendidas, como a possibilidade de interações sinérgicas entre estes contaminantes (BENSON *et al.*, 2017; CEDERGREEN, 2014; MATAMOROS; SALVADÓ, 2012).

Segundo Cedergreen (2014), os contaminantes emergentes podem ainda interagir com substâncias regulamentadas considerados “seguras”, aumentando a incerteza sobre o real risco associado à estas combinações. Além da possibilidade de combinação com outras substâncias, uma vez nos ambientes aquáticos, os contaminantes emergentes ficam sujeitos a processos de biotransformação, podendo gerar subprodutos com maior potencial tóxico que o contaminante original (FARRÉ *et al.*, 2008). Dessa forma, estudos ao redor do mundo têm detectado a ocorrência desses contaminantes em diferentes matrizes ambientais, normalmente em concentrações na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ ou ng L^{-1} (PAL *et al.*, 2014; CARLOS *et al.*, 2012; GOMIS *et al.*, 2014).

2.2. ACETAMIPRIDA

O Brasil é um dos maiores consumidores mundiais de pesticidas, apresentando uma expansão de cerca de 700 % no consumo destes produtos nos últimos quarenta anos, em contraste com um aumento de 78 % da área agrícola no mesmo período (CHIARELLO *et al.*, 2016). Pesticidas representam a segunda maior causa de contaminação de rios no Brasil, após os efluentes domésticos (CHIARELLO *et al.*, 2016). A classe dos pesticidas neonicotinóides foi a que mais cresceu no mercado desde o lançamento dos piretróides, tornando-se a mais usada na prevenção e controle de pragas (PIRES, 2013). Os neonicotinóides são facilmente absorvidos pelas plantas e atuam rapidamente, em baixas doses, em pragas de pulgões e moscas (TOMIZAWA; CASIDA, 2005). O acetamiprida

(C₁₀H₁₁ClN₄) é um inseticida neonicotinóide considerado um contaminante emergente (GOMIS *et al.*, 2014). Esse contaminante possui maior afinidade aos receptores nicotínicos dos insetos, em comparação com os de mamíferos, proporcionando efeitos secundários menores que os observados em outras classes de pesticidas, como organofosforados, metilcarbamatos e organoclorados, fato que incentiva seu largo consumo ao redor do mundo, na casa de um bilhão de dólares ao ano, correspondendo a 11-15 % do mercado total de inseticidas (PIRES, 2013; TOMIZAWA; CASIDA, 2005; YAO; MIN; LV, 2006). Segundo Xing *et al.* (2017), apesar do uso generalizado do acetamiprida na China, seus sintomas clínicos e consequências da intoxicação ainda não são bem descritos na literatura. Além disso, destaca-se que o comportamento do acetamiprida nos ambientes aquáticos estaria associado à sua elevada solubilidade em água de 2950 mg L⁻¹. Ressalta-se também seu coeficiente de partição log K_{ow} de 0,8 e pK_a de 0,70 (CHIARELLO *et al.*, 2016; RIBEIRO *et al.*, 2013; SANCHES *et al.*, 2010).

No Brasil, o acetamiprida é regulamentado pela ANVISA e previsto para utilização nas culturas de algodão, arroz, feijão, milho, soja, trigo, café, aveia, batata, uva, citros (ANVISA, 2017a). O acetamiprida é classificado pela ANVISA como classe III, medianamente tóxico, e delimitado quanto à Ingestão Diária Aceitável (IDA) em 0,024 mg kg⁻¹ p.c. A toxicidade de neonicotinóides em mamíferos apresenta sintomas semelhantes à intoxicação por nicotina (TOMIZAWA; CASIDA, 2005). Xing *et al.* (2017) apresentam um estudo de caso clínico de intoxicação aguda por acetamiprida, no qual a paciente apresentou tonturas, náuseas, distensão abdominal, disfunção hepática e amilase sanguínea elevada. Quanto aos efeitos nos ecossistemas, a *American Byrd Conservancy* (2013), menciona os impactos dos inseticidas neonicotinóides no meio ambiente, atingindo sistemas aquáticos, culturas de abelhas e provocando mortandade de pássaros. Além disso, em um estudo ecotoxicológicos, Wang *et al.* (2018) observaram que embriões de peixes zebrafish (*Danio rerio*) expostos às concentrações de 0,17 e 0,67 mg L⁻¹ de acetamiprida, foram afetados em suas expressões gênicas de mRNA ligadas à apoptose celular, desregulação endócrina, imunidade inata e estresse oxidativo (relacionado à enzima manganês superóxido dismutase). Cabe também ressaltar que, em estudo com peixes *zebrafish* expostos à acetamiprida em concentrações subletais (2,4 mg L⁻¹), Zhang e Zhao (2017) detectaram alterações na região do cérebro, soro sanguíneo e fígado, indicada pelo aumento de 0,3-3422 vezes nos níveis de aminoácidos como alanina, sarcosina e leucina.

Quanto às detecções ambientais do acetamiprida (tabela 1), Sanches-Bayo; Hyene (2014) identificaram $0,08 \mu\text{g L}^{-1}$ de acetamiprida em média em rios em torno de Sydney (Austrália), destacando-se o valor máximo encontrado de $0,38 \mu\text{g L}^{-1}$. Zheng *et al.* (2016a) encontraram acetamiprida em mais de 55 % dos trinta e cinco locais de amostragem de água do rio Jiulong na China, com concentração máxima de aproximadamente $9 \mu\text{g L}^{-1}$. Anderson *et al.* (2013) encontraram a concentração máxima de $44,1 \mu\text{g L}^{-1}$ (média de $2,2 \mu\text{g L}^{-1}$) de acetaminprida em amostras de água superficial de área rural em Playa Lakes, nos Estados Unidos. Main *et al.* (2014) detectaram concentrações de $0 - 0,0544 \mu\text{g L}^{-1}$ de acetamiprida em amostras de águas superficiais de áreas rurais em Saskatchewan, Canadá. Sadaria; Supowit; Halden (2016) analisaram amostras de água de estação de tratamento de esgoto nos Estados Unidos, observado as concentrações médias de $0,0037 \mu\text{g L}^{-1}$ nas amostras afluentes e $0,0017 \mu\text{g L}^{-1}$ nas efluentes. No Brasil, Ribeiro *et al.* (2013) realizaram um estudo com amostras de águas superficiais coletadas em área degradada na nascente do rio São Lourenço (Mato Grosso), encontrando $23,61 \mu\text{g L}^{-1}$ de acetamiprida, além de concentrações de outros sete pesticidas¹. Além disso, Carbo *et al.* (2008) realizaram um estudo de investigação em cento e dez amostras de água subterrânea de lavouras de algodão em Primavera do Leste, Mato Grosso, Brasil, encontrando até $6,31 \mu\text{g L}^{-1}$. É importante ressaltar que a União Europeia estabelece, de forma geral, valores limites de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para concentrações individuais de qualquer pesticida e níveis totais de pesticida em água potável, respectivamente (CARBO *et al.*, 2008). No entanto, seriam necessários mais estudos para a caracterização do potencial impacto ambiental dos neonicotinóides, uma vez que estes podem apresentar toxicidade sinérgica em misturas (STARNER; GOH, 2012). Em especial, destaca-se a necessidade de estudos sobre o potencial tóxico do neonicotinóide acetamiprida, inclusive sob o aspecto da possibilidade de interações com outros contaminantes no ambiente aquático, vista sua detecção ambiental no Brasil e ao redor do mundo, e seus potenciais efeitos negativos aos ecossistemas e à saúde humana.

¹ A nascente do Rio São Lourenço está localizada na região rural do estado do Mato Grosso e banha oito cidades, entre as quais estão Campo Verde, Jaciara e Dom Aquino, desaguando na região do pantanal (considerado patrimônio natural mundial pela UNESCO) (MMA, 2019; RIBEIRO *et al.*, 2013).

Tabela 1 - Dados de detecção ambiental do acetamiprida

Substância	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Matriz	Autor	Ano	Localidade
	0,0037	Afluente de ETE	Sadaria; Supowit; Halden	2016	EUA
	0,0017	Efluente de ETE	Sadaria; Supowit; Halden	2016	EUA
	0,380	Águas fluviais	Sanches <i>et al.</i>	2010	Sidney, Austrália
Acetamiprida	0,054	Águas superficiais	Main <i>et al.</i>	2014	Saskatchewan, Canadá
	9,00	Águas fluviais	Zheng <i>et al.</i>	2016a	China
	44,10	Águas superficiais	Anderson <i>et al.</i>	2013	EUA
	6,31	Água subterrânea	Carbo <i>et al.</i>	2008	Mato Grosso, Brasil
	23,61	Águas fluviais	Ribeiro <i>et al.</i>	2013	Mato Grosso, Brasil

Legenda: ETE – Estação de tratamento de esgoto.

2.3. CARBAMAZEPINA

Brasil, EUA, França e Alemanha são considerados os maiores consumidores de compostos farmacêuticos do mundo (ALMEIDA, 2012). Esses compostos têm sido considerados contaminantes emergentes, pertencendo a um grupo de interesse crescente, devido à sua atividade farmacológica e aumento de consumo (BABIĆ *et al.*, 2007; KOSJEK *et al.*, 2007; STANLEY *et al.*, 2007; SUN; ZENG; LEMLEY, 2013). Esses contaminantes são considerados pseudo persistentes, uma vez que apresentam aporte contínuo no ambiente, compensando suas taxas de remoção e transformação (KOSJEK *et al.*, 2007). Dentre as vias de aporte desses contaminantes no ambiente aquático, estão a descarga advinda de efluentes da produção de fármacos, hospitais e descarte inadequado de medicamentos (KOSJEK *et al.*, 2007). No entanto, estações de tratamento de águas residuais são consideradas a principal via de aporte desses contaminantes nos ecossistemas aquáticos (juntamente com o aporte de águas residuais não tratadas), uma vez que os tratamentos convencionais de efluentes domésticos são ineficientes na remoção dos mesmos (ALMEIDA, 2012; FARRÉ *et al.*, 2008; KOSJEK *et al.*, 2007; STANLEY *et al.*, 2007; SUN; ZENG; LEMLEY, 2013; VERLICCHI *et al.*, 2010). Compostos farmacêuticos estão presentes nos ecossistemas aquáticos em concentrações na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} , causando principalmente efeitos crônicos com exposições por longos períodos (inclusive por todo o ciclo de vida dos organismos), dependendo de sua biodisponibilidade, susceptibilidade do organismo ao composto e tempo de exposição (FARRÉ *et al.*, 2008; KOSJEK *et al.*, 2007).

Dentre os principais grupos de fármacos que podem aportar nos ambientes aquáticos, destaca-se o grupo dos medicamentos de atuação no sistema nervoso central (SNC), apontado pelo Anuário Estatístico do Mercado Farmacêutico – 2016 (ANVISA, 2017b) como o segundo maior grupo em vendas no ano de 2016 (14,4 % das vendas no território nacional) e, além disto, como o grupo de medicamentos mais rentável naquele ano. Dentre os medicamentos de atuação no SNC, destaca-se a carbamazepina ($\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$), um medicamento pertencente ao grupo farmacológico dos iminostilbenos, apresentando um núcleo tricíclico iminodibenzóico com grupo carbamoil na posição cinco, que é essencial para a atividade anticonvulsivante (ALMEIDA, 2012).

A carbamazepina é um fármaco psicotrópico antiepilético consumido na ordem de mil toneladas ao ano no mundo (SUN; ZENG; LEMLEY, 2013) e é administrada em doses diárias de 600-1200 mg (KOSJEK *et al.*, 2007). Uma vez no organismo, a carbamazepina é metabolizada predominantemente no fígado e excretada principalmente pela urina (72%), com aproximadamente 20-30% de excreção na forma inalterada (ALMEIDA, 2012). Suas propriedades farmacocinéticas sofrem influência de sua baixa solubilidade em água (17,7 mg L⁻¹) e por sua capacidade de conversão em metabólitos ativos, por meio de enzimas oxidativas hepáticas (ALMEIDA, 2012). A carbamazepina apresenta log Kow de 2,45 e pKa de 13,9 (PUBCHEM, 2017).

Dentre os efeitos adversos agudos da carbamazepina em humanos, podem ser citados efeitos no sistema nervoso central e sistema gastrointestinal, acarretando sedação, ataxia, tonturas, náuseas, constipação, diarreia, alopecia, fotossensibilidade, hepatite, erupções cutâneas e discrasia no sangue (ALMEIDA, 2012). Em relação a efeitos crônicos, podem ser observadas vertigens, sonolência, distúrbios da função cerebelar e oculomotora (ataxia, nistagmo e diplopia), arritmias cardíacas, insuficiência cardíaca congestiva, reações dermatológicas, edema e hiponatremia (ALMEIDA, 2012). A carbamazepina também pode causar reações adversas dermatológicas, como erupções e necrólise epidérmica tóxica (ANVISA, 2017c).

Estudos ecotoxicológicos têm demonstrado efeitos adversos da carbamazepina em organismos modelo como ratos, invertebrados (como daphnias) e peixes. Um exemplo disso seria o estudo de Calcagno *et al.* (2016), que demonstrou alterações no comportamento de peixes *J. multidentata* expostos à carbamazepina, como diminuição da velocidade de natação (10 e 50 µg L⁻¹) e redução no tempo despendido no fundo do tanque (10 µg L⁻¹). Segundo Santos *et al.* (2010), a carbamazepina pode causar efeitos sobre rins, fígado e brânquias de peixes, além de ser considerada letal para zebrafish (*Danio rerio*), mesmo à doses na ordem de µg L⁻¹. Em concordância, Qiang *et al.*, (2016), demonstraram que a carbamazepina pode afetar o desenvolvimento de embriões de peixes zebrafish expostos a partir da concentração de 1 µg L⁻¹ de carbamazepina, indicando diferenças na taxa de incubação, comprimento do corpo e no aspecto da bexiga natatória. Cabe ser ressaltado também o estudo realizado por Gomes *et al.* (2019), no qual foi observado estresse oxidativo significativo em fígado e em cérebro de peixes zebrafish adultos expostos por 96 horas à 75 µg L⁻¹ carbamazepina, além da constatação de desequilíbrio da homeostase metálica nestes órgãos. Destacam-se também

os trabalhos de Santos *et al.* (2018), Hammill *et al.* (2018) e de Galus *et al.* (2014), nos quais foram observados, respectivamente, efeitos adversos relacionados à viabilidade de ovos e estresse oxidativo (atividade das enzimas catalase e glutatona-S-transferase) observado em fígado e em brânquias de *zebrafish* expostos à 10 µg L⁻¹ de carbamazepina (por 63 dias), relacionados à diferenciação sexual de descendentes de *zebrafish* expostos à 10 µg L⁻¹ de carbamazepina por 6 semanas, e relacionados à produção de embriões após acasalamento de peixes *zebrafish* expostos à 10 µg L⁻¹ de carbamazepina por 6 semanas. Além disso, a carbamazepina é relatada como uma preocupação ambiental significativa, uma vez que, por seu largo uso, apresenta entrada contínua no ambiente, juntamente com seus metabólitos secundários (FARRÉ *et al.*, 2008; KOSJEK *et al.*, 2007). Esses metabólitos podem ser transformados à formas livres, por exemplo, por atividade microbiana no tratamento da água (FARRÉ *et al.*, 2008). Apenas 7-10 % da carbamazepina que aporta nas estações de tratamento de águas residuais é eliminada como resultado do tratamento (AL-HADITHI; SAAD; GROTE, 2011).

Em relação à detecção ambiental (tabela 2), a carbamazepina tem sido encontrada em afluentes e efluentes de estações de tratamento de esgoto (ETE) em estudos ao redor do mundo, como na França, onde foi detectada a faixa de concentração de 208-416 ng L⁻¹ (afluentes de ETE) e 112-258 ng L⁻¹ (efluentes de ETE). Na Suécia, foram detectados 1680 ng L⁻¹ (afluente de ETE) e 1180 ng L⁻¹ (efluente de ETE) e na Itália, foi detectada a faixa de 0-1318 ng L⁻¹ de carbamazepina em efluentes de oito estações de tratamento (LECLERCQ *et al.*, 2009; BENDZ *et al.*, 2005; CASTIGLIONI *et al.*, 2005). Além disso, Ma *et al.* (2016) detectaram 0,8-6,44 ng L⁻¹ de carbamazepina em amostras de água superficial do lago Dongting, província de Hunan (China). Loos, Locoro e Contini (2010) analisaram amostras de água do rio Danúbio (fronteiriço a dez nações europeias) encontrando carbamazepina em 100 % das amostras (com maiores valores detectados em torno de Budapest, Romênia e Bulgária), resultando em uma concentração média de 33 ng L⁻¹ (concentração máxima de 66 ng L⁻¹ de carbamazepina). Já nos afluentes do rio Danúbio, Loos, Locoro e Contini (2010) encontraram a concentração média de 29 ng L⁻¹ de carbamazepina (com um valor máximo encontrado de 945 ng L⁻¹). Além disso, Radović *et al.* (2015) detectaram concentrações de 25-30 ng L⁻¹ de carbamazepina em amostras de água de rio na Sérvia. No Brasil, Shihomatsu (2015) realizou um estudo em amostras de águas da represa Guarapiranga, São Paulo, nos anos de 2011, 2012 e 2013, detectando carbamazepina na faixa de 12-358 ng L⁻¹. Almeida (2012) detectou fármacos psicoativos (ansiolíticos e

antiepiléticos) em efluente do Hospital Universitário de Santa Maria e em efluente geral da Universidade Federal de Santa Maria, encontrando respectivamente $589,6 \pm 6,1 \text{ ng L}^{-1}$ e $460,7 \pm 9,3 \text{ ng L}^{-1}$ de carbamazepina.

Farré *et al.* (2008) destacam que os efeitos da carbamazepina no ambiente são de difícil previsibilidade, especialmente em matrizes complexas (interação com outras substâncias), podendo resultar em efeitos sinérgicos ou antagônicos. Além disso, Chen *et al.* (2019) ressaltam que a carbamazepina é um dos fármacos mais frequentemente detectados no ambiente e, por este motivo, vem sendo utilizado inclusive como marcador de contaminação de corpos hídricos por águas residuais. Segundo Al-Hadithi, Saad e Grote (2011), a presença de compostos como a carbamazepina à longo prazo em ambientes aquáticos aumentaria os riscos potenciais de efeitos adversos nas condições de vida de organismos aquáticos e ecossistemas.

Tabela 2 - Dados de detecção ambiental de carbamazepina

Substância	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Matriz	Autor	Ano	Localidade
Carbamazepina	0,0008-0,006	Águas superficiais	Ma <i>et al.</i>	2016	Hunan, China
	0,025-0,03	Águas fluviais	Radović <i>et al.</i>	2015	Sérvia
	0,033	Águas fluviais	Loos <i>et al.</i>	2010	Rio Danúbio, UE
	0,208-0,416	Afluente de ETE	Leclercq <i>et al.</i>	2009	França
	0,112-0,258	Efluente de ETE	Leclercq <i>et al.</i>	2009	França
	0-1,318	Efluente de ETE	Castiglioni <i>et al.</i>	2005	Itália
	1,18	Afluente de ETE	Bendz <i>et al.</i>	2005	Suécia
	1,68	Efluente de ETE	Bendz <i>et al.</i>	2005	Suécia
	0,012 - 0,358	Águas de represa	Shihomatsu	2015	São Paulo, Brasil
	0,589	Efluente hospitalar	Almeida	2012	Rio Grande do Sul, Brasil
0,46	Efluente geral UFSM				

Legenda: ETE – estação de tratamento de esgoto.

2.4. CÁDMIO

Metais estão entre os principais contaminantes da água, apresentando efeitos variados sobre a biota aquática e seres humanos, dependendo de sua concentração no meio de exposição e de sua forma química (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Demir *et al.* (2015) e Alcântara *et al.* (2004) informam que a contaminação da água por metais é um problema mundial, principalmente pela forte toxicidade de muitos destes elementos mesmo em concentrações na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} . Além disso, Demir *et al.* (2015) enfatizam que elementos como arsênio, mercúrio, chumbo, cromo e cádmio (Cd) são estáveis, capazes de bioacumular, promovendo efeitos tóxicos nos ambientes aquáticos. Uma vez biodisponível à biota aquática, o Cd pode ser incorporado ao sistema biológico de peixes por duas rotas principais (figura 1): ingestão e absorção branquial, bioacumulando-se nas brânquias, paredes intestinais e em órgãos como fígado e rins de peixes (RODRIGUES, 2007; IGANSI, 2012). Segundo Igansi (2012), mesmo a barreira hematoencefálica de peixes oferecendo resistência à passagem do Cd, este, uma vez em níveis crônicos, teria sua concentração aumentada no cérebro e principalmente no bulbo olfatório. Após ultrapassar canais de cálcio na membrana celular, o Cd pode ligar-se a biomoléculas, acumulando ou depositando-se em compartimentos subcelulares, onde pode sofrer transformação ou eliminação metabólica (como pela ação do tiol glutationa e da proteína metalotioneína) (DAMASCENO, 2016). Cabe ressaltar que, segundo a *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*, o Cd é encontrado predominantemente na forma iônica +2 de oxidação e em complexos orgânicos em ambientes aquáticos (ATDSR, 2012). Tanto o elemento Cd, quanto compostos de Cd são considerados resíduos perigosos (classe I) pela resolução CONAMA 23/1996 e ambos recebem a classificação de carcinogênicos para humanos (grupo I) pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC, 2017).

A exposição humana ao Cd está associada a dores reumáticas, deformidades ósseas, distúrbios renais, decréscimo da função pulmonar, doenças cerebrovasculares e comprometimento dos ossos, além de estar relacionada aos cânceres de pulmão, rim, próstata e pâncreas (IGANSI, 2012; JANEGITZ *et al.*, 2011). Já em relação aos efeitos observados em testes ecotoxicológicos de exposição ao Cd, podem ser destacados estudos com organismos modelo como o peixe zebrafish (*Danio rerio*). Dentre esses estudos, pode ser destacado o realizado por Jin *et al.* (2015), no qual foi demonstrado que a exposição à

10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Cd por 60 e 96 horas, diminuiu a capacidade de incubação dos peixes expostos. Nas larvas de zebrafish também foram detectadas induções de estresse oxidativo causadas pela exposição de 96 horas ao Cd (1, 3 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$), estas, denotadas no aumento dos níveis do biomarcador malondialdeído (MDA) e diminuição dos níveis do biomarcador glutathiona (GSH) (JIN *et al.*, 2015). Em concordância, os estudos de Yuan *et al.* (2017) demonstraram que a exposição de peixes Zebrafish, por 5 semanas, à concentração de 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ levou à redução nos níveis de crescimento dos peixes, além do desencadeamento de dano oxidativo (peroxidação lipídica) e mudanças histológicas no fígado. Zhu, Li e Zheng (2018) identificaram a ocorrência de estresse oxidativo no fígado de *zebrafish* expostos à 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cd por 15 semanas, relacionado aos níveis dos biomarcadores glutathiona reduzida (GSH) e metalotioneína (MT). Heffern, Tierney e Gallagher (2018) também relataram efeitos adversos relacionados à peixes *zebrafish* expostos à baixas concentrações (na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$) de Cd (IC_{50} : 36 $\mu\text{g L}^{-1}$), confirmando que larvas de *zebrafish* expostas por 24 horas são afetadas na resposta de seus neurônios sensoriais relacionados ao olfato. Em concordância, Yang *et al.* (2017), relataram que a exposição à Cd (cerca de 4 mg L^{-1}) pode operar a inibição de mais de 60 % da atividade cerebral da enzima acetilcolinesterase nas primeiras 2 horas de exposição.

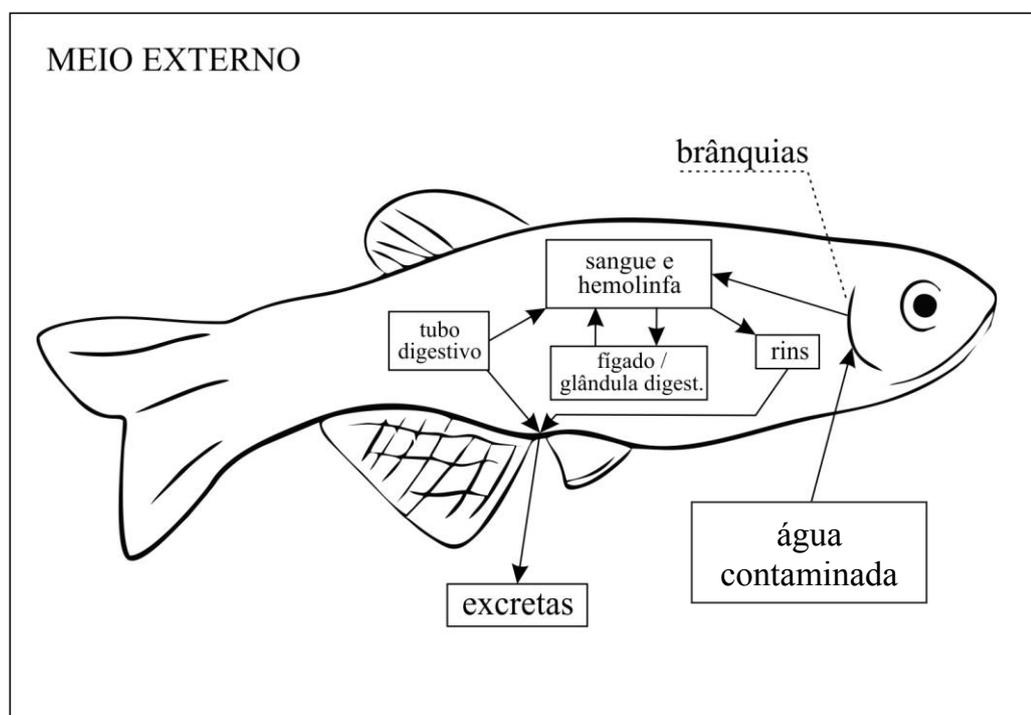


Figura 1 - Esquema geral de absorção, distribuição e excreção de cádmio em peixes (adaptado de RODRIGUES, 2007).

O Conselho Nacional do Meio Ambiente, através da Norma 357/05, determina 0,04 mg L⁻¹ como valor máximo permitido de Cd total em águas salobras ou salinas. Para águas não salinas, a Norma 357/05 indica valores de máximos de Cd 0,01 mg L⁻¹ e 0,001 mg L⁻¹ para corpos hídricos classe 1 e classe 3, respectivamente. A Norma 430/11 do CONAMA, complementar à 357/05, delimita a concentração de 0,2 mg L⁻¹ de Cd total como parâmetro para lançamento de efluentes em corpos hídricos. No caso de águas subterrâneas, a Norma CONAMA 420/09 estabelece a concentração máxima permitida de 5 µg L⁻¹ de Cd. Por fim, as Portarias do Ministério da Saúde 518/04 e 2914/11 regulamentam o padrão de potabilidade da água para consumo humano, delimitando a concentração máxima de 0,005 mg L⁻¹ de Cd.

Segundo Alcântara *et al.* (2004), em relação à detecção ambiental (tabela 3), a contaminação de Cd no ambiente geralmente ocorre à concentrações menores que 5 µg L⁻¹. No entanto, Wasana *et al.*, (2016) avaliaram a água potável no Sri Lanka, encontrando concentrações de 0,296-0,700 µg L⁻¹. Xu *et al.* (2017) encontraram concentrações de 0,08-6,28 µg L⁻¹ de Cd em amostras correspondentes a nove rios da bacia de Laizhou, na China. Demir *et al.* (2015) analisaram amostras de água potável na cidade de Tunceli (Turquia), encontrando a concentração de 0,5-2,0 µg L⁻¹ de Cd. No Brasil, Lattuada *et al.* (2009) realizaram um estudo com amostras de água e sedimentos do rio Mãe Luzia (Criciúma, Santa Catarina), no qual foram detectados 1,03-0,16 mg L⁻¹, configurando-se como acima do considerado normal para águas correntes ($3.0-4.0 \times 10^{-5}$ mg L⁻¹). Alcântara *et al.* (2004) identificaram a presença desse contaminante em mostras de água dos rios Tietê (14 µg L⁻¹), Paranapanema (9 µg L⁻¹) e Paraná (5 µg L⁻¹), São Paulo, Brasil. Além da contaminação ambiental identificada por meio de campanhas de monitoramento, o Brasil também apresenta casos de acidentes ambientais envolvendo Cd, como o do rompimento do dique de contenção da Ingá Mercantil, com as fortes chuvas do mês de fevereiro de 1996, contaminando a Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro (LINDOLFO, 2015), e o caso de Santo Amaro, Bahia, no qual resíduos de produção de uma mineradora (fechada em 1993) eram descartados de forma inadequada, contaminando os ecossistemas da região e a população local (MAGNA *et al.*, 2014). Além disso, cabe ressaltar-se que na região sul do Brasil, há minas em operação sem plantas de tratamento de efluentes e que, na mesma região, há mais de mil minas abandonadas, podendo operar agravos ambientais relacionados à drenagem ácida das minas, em conjunto com efluentes domésticos e a descarga agrícola, provocando o aumento dos níveis de

toxicidade dos rios da região, causando danos aos ecossistemas aquáticos (LATTUADA *et al.*, 2009).

Tabela 3 - Dados de detecção ambiental de cádmio

Substância	Concentração	Matriz	Autor	Ano	Localidade
	0,296-0,7 $\mu\text{g L}^{-1}$	Água potável	Wasana <i>et al.</i>	2016	Sri Lanka
	0,5-2 $\mu\text{g L}^{-1}$	Água potável	Demir <i>et al.</i>	2015	Tunceli, Turquia
	0,08-6,28 $\mu\text{g L}^{-1}$	Águas fluviais	Xu <i>et al.</i>	2017	Laizhou, China
Cádmio	5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	Águas fluviais	Alcantara <i>et al.</i>	2002	Rio Paraná, SP, Brasil
	9,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	Águas fluviais	Alcantara <i>et al.</i>	2003	Rio paranapanema, SP, Brasil
	14,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	Águas fluviais	Alcantara <i>et al.</i>	2004	Rio Tietê, SP, Brasil
	1,03-1,16 mg L^{-1}	Águas fluviais	Lattuada <i>et al.</i>	2009	Santa Catarina, Brasil

2.5. ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS COM *Danio rerio*

Uma vez que análises físico-químicas tradicionais não seriam capazes de distinguir entre substâncias que podem afetar os sistemas biológicos e substâncias inertes, fica evidenciada a importância das avaliações do risco potencial de substâncias por meio de testes de toxicidade (COSTA *et al.*, 2008). Os testes de toxicidade relacionados ao meio ambiente estão englobados pelos estudos da toxicologia ambiental. Dentre as subáreas da toxicologia ambiental, pode-se destacar a ecotoxicologia aquática, que objetiva avaliar a toxicidade de substâncias sobre organismos representativos do ecossistema aquático (COSTA *et al.*, 2008). Igansi (2012) indica que peixes são considerados excelentes bioindicadores de toxicidade aquática. Dentre os organismos utilizados nos testes de toxicidade, o *Zebrafish* (*Danio rerio*), um peixe teleosteo de água doce da família Cyprinidae, tem emergido como modelo de vertebrados preeminente e considerado um organismo modelo consolidado em

estudos farmacêuticos, terapêuticos, comportamentais, mutagênicos e toxicológicos (BENDER, 2011; IGANSI, 2012; LAWRENCE, 2007).

O *Danio rerio*, apresenta homologia genética de 70-80% com roedores e humanos, além de cérebro anatômico e funcionalmente semelhante ao de mamíferos (BENDER, 2011; IGANSI, 2012). Seibit (2008) explica que já foram observados muitos tipos de neoplasias no *Danio rerio*, estas, semelhantes genética e histologicamente às observadas em humanos. Além disso, seu uso como modelo para pesquisa é baseado em características como baixo custo de criação e manutenção, rápido desenvolvimento e ciclo biológico, fácil manipulação, pequeno tamanho (requer pouco espaço para manutenção), comportamento facilmente observado em ambientes controlados, rápido metabolismo, capacidade de absorver compostos adicionados à água (dispensa necessidade de tratamentos invasivos) e sensibilidade para drogas (BENDER, 2011; SEIBT, 2009). Além disso, semelhante ao visto em humanos, o peixe *Danio rerio* apresenta mecanismos de defesa antioxidante, que visam neutralizar efeitos oxidativos de espécies reativas de oxigênio (EROS), geradas por agentes xenobióticos, como contaminantes ambientais (ARMILIATO, 2014). Massarsky *et al.* (2016) explicam que as semelhanças entre sistemas antioxidantes de defesa em peixes e mamíferos traduzem a importância no uso de modelos de peixes para compreensão do estresse oxidativo em estudos de toxicidade de poluentes.

2.6. ESTRESSE OXIDATIVO E ESPÉCIES REATIVAS

Espécies químicas que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados em sua órbita mais externa são denominadas radicais livres (RIBEIRO *et al.*, 2005). Esses radicais podem gerar espécies reativas, uma vez que possuem alta instabilidade energética e cinética (BARBOSA, 2010). Se centrados no oxigênio, radicais livres podem gerar espécies reativas de oxigênio (EROs), que são encontradas naturalmente nos organismos aeróbios, apresentando funções biológicas como participação na fagocitose e na eliminação de agentes agressores do organismo. No entanto, as EROs também podem estar associadas à exposição a fatores exógenos como ozônio, radiações gama e ultravioleta, dieta, tabagismo, medicamentos e outros xenobióticos (VASCONCELOS *et al.*, 2007; BARBOSA, 2010;).

Cabe ressaltar que EROs incluem, tanto espécies radicais livres, quanto espécies não radicalares (como o peróxido de hidrogênio), sendo consideradas muito reativas por sua instabilidade, mesmo não possuindo elétrons desemparelhados (CARBALLAL *et al.*, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2005).

Em relação às principais espécies reativas de oxigênio (quadro 1), o radical hidroxila $\bullet\text{OH}$ é considerado de maior potencial reativo no meio biológico, tendendo reagir nas proximidades do sítio onde foi gerado, podendo resultar em reações inespecíficas com todos os tipos de moléculas biológicas, acarretando, por exemplo, na inativação ou mutação do DNA e retirada de átomos de hidrogênio de grupos metileno de ácidos graxos poli-insaturados, dando início à peroxidação lipídica (BARBOSA *et al.*, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2005). A espécie reativa oxigênio molecular singlete $^1\text{O}_2$ é considerada a segunda mais reativa e pode difundir-se a distâncias significativas a partir de seu sítio de produção, estando associada a reações com aminoácidos, tióis, ácidos nucleicos, carboidratos, proteínas e membranas lipídicas (BARBOSA *et al.*, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2005). O ânion superóxido $\text{O}_2^{\bullet-}$ é tido como moderadamente reativo e considerado instável, uma vez que possui número ímpar de elétrons (13) em sua última camada eletrônica (BARBOSA *et al.*, 2014). Dessa forma, quando protonado, o superóxido forma o radical peroxila HO_2^{\bullet} , uma espécie reativa de oxigênio considerada mais reativa que o próprio superóxido. A espécie reativa peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é considerada mais estável que o radical hidroxila e moderadamente reativa, apresentando pequeno tamanho, que lhe permite permear membranas celulares e assim possibilitar reações em alvos mais distantes, atuando como mensageira da condição de estresse (BARBOSA *et al.*, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2005). Cotinguiba *et al.* (2013) e Barbosa *et al.* (2014) acrescentam que o H_2O_2 não é considerado um radical livre verdadeiro (não apresenta elétrons desemparelhados na última camada), no entanto, apresenta ação deletéria baseada em sua participação na reação formadora da radical hidroxila (considerada a ERO mais reativa), o peróxido de hidrogênio é capaz de inativar enzimas pela oxidação de seus grupos tiol e induzir danos às moléculas de DNA. Outros exemplos de EROs seriam o radical alquila, radical peroxil, hidroperóxido de hidrogênio e carbonila excitada (COTINGUIBA *et al.*, 2013).

Quadro 1 - Caracterização das principais espécies reativas de oxigênio.

Espécie Reativa	Tempo de meia-vida	Observações de destaque
Radical Superóxido	Velocidade de decomposição enzimática de aprox. $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ à pH 7,0.	Formação: a partir da redução parcial de oxigênio molecular por 1 elétron.
Peróxido de hidrogênio	Decomposição enzimática	Formação: a partir da redução parcial de oxigênio molecular por 2 elétrons.
Radical hidroxil	10^{-9} segundos	Formação: a partir da redução parcial de oxigênio molecular por 3 elétrons em reações de Fenton e Haber-Weis, catalisada por metais.
Radical alcóxil	10^{-6} segundos	Radical orgânico centrado no oxigênio.
Radical peróxil	7 segundos	Formação: a partir de hidroperóxidos orgânicos.
Oxigênio molecular Simpleto ($^1\Delta_g\text{O}_2$)	10^{-5} segundos	Corresponde ao primeiro estado excitado do oxigênio molecular.

O estresse oxidativo causado pelas EROs a componentes celulares depende da caracterização do tipo de radical e das moléculas atingidas, podendo acarretar efeitos deletérios a componentes celulares, proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e peroxidação lipídica (VASCONCELOS *et al.*, 2007; ARMILIATO, 2014; FERREIRA, 2010; MASSARSKY *et al.*, 2017; VASCONCELOS *et al.*, 2007; COTINGUIBA *et al.*, 2013). Segundo Halliwell e Gutteridge, (2007), os principais efeitos (figura 2) do estresse oxidativo são a proliferação celular, com o aumento da taxa de divisão celular; a adaptação, entendida como aumento da atividade de sistemas de defesa celular, identificada no aumento dos níveis dos indicadores glutatona, superóxido dismutase e catalase; o dano celular, entendido como danos (reparáveis ou irreparáveis) a lipídeos, DNA, proteínas e carboidratos; a senescência, associada à debilidade do sistema de divisão celular; e a morte celular, por necrose ou apoptose, a partir de danos oxidativos a componentes celulares.

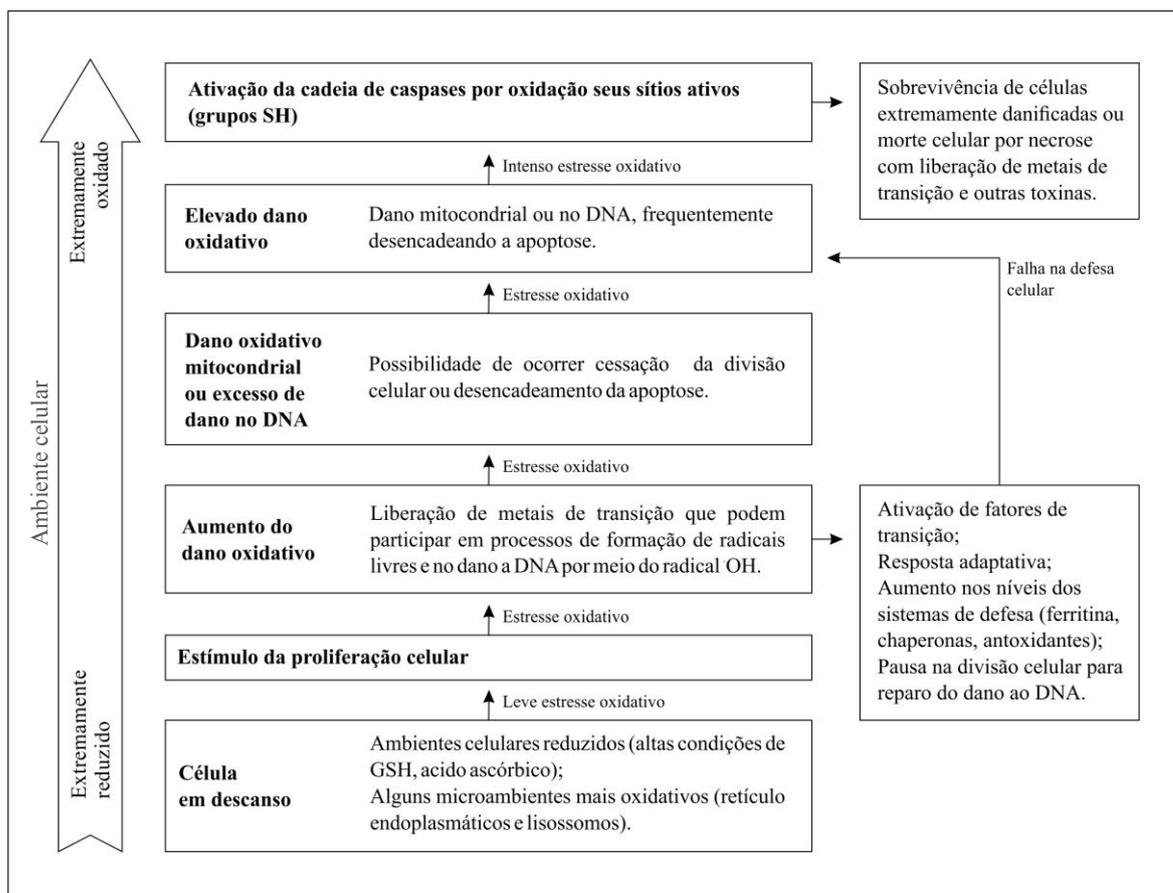


Figura 2 - Esquema geral de respostas celulares conforme aumento do estresse oxidativo (adaptado de HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

O estresse oxidativo operado na forma de peroxidação lipídica está associado à reação de um radical livre (geralmente a ERO \bullet OH) com um ácido graxo poliinsaturado, sendo compreendido nas etapas de iniciação, propagação e terminação (COTINGUIBA *et al.* 2013; VASCONCELOS *et al.*, 2007). Na etapa de iniciação, ocorre o ataque de uma molécula reativa (como ERO, metais, ou outros radicais livres) a um grupo metileno de um ácido graxo poliinsaturado, abstraindo um átomo de hidrogênio e formando um radical de carbono (VASCONCELOS *et al.*, 2007). Esse radical sofre rearranjo molecular para formar um dileno conjugado, que pode reagir com moléculas de oxigênio, formando a ERO radical peroxil (ROO \bullet). Na etapa de propagação ocorre a formação do peróxido lipídico (ROOH), por meio da capacidade do radical peroxil de abstrair átomos de hidrogênio de outros grupos metilenos de cadeias adjacentes, acarretando novos rearranjos moleculares e formação de dilenos conjugados, podendo ocorrer novas reações com moléculas de oxigênio e formação de novos radicais peroxil, gerando uma reação oxidativa em cadeia (figura 3) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). O peróxido lipídico formado é geralmente estável

sob temperatura fisiológica, no entanto, pode iniciar um novo tipo de reação em cadeia quando em presença de íons metálicos, pela quebra da ligação O-O, formando o radical alcoxil (ROH^\bullet) conforme a reação 1. Por sua vez, os radicais alcoxilas podem abstrair átomos de hidrogênio de peróxidos e de grupos metilenos de ácidos graxos poliinsaturados, continuando as reações em cadeia (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Esse processo cíclico pode ser neutralizado/terminado pelo consumo dos reagentes, formação de produtos não radiculares e pela ação de agentes antioxidantes (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Os produtos finais do processo de peroxidação lipídica são classificados em primários (hidroperóxidos lipídicos) e secundários, que derivam da β ruptura dos hidroperóxidos lipídicos, como o malondialdeído (MDA) (VASCONCELOS *et al.*, 2007). O MDA vem sendo considerado um candidato potencial como um biomarcador geral desse tipo de dano oxidativo (VASCONCELOS *et al.*, 2007; COTINGUIBA *et al.* 2013).

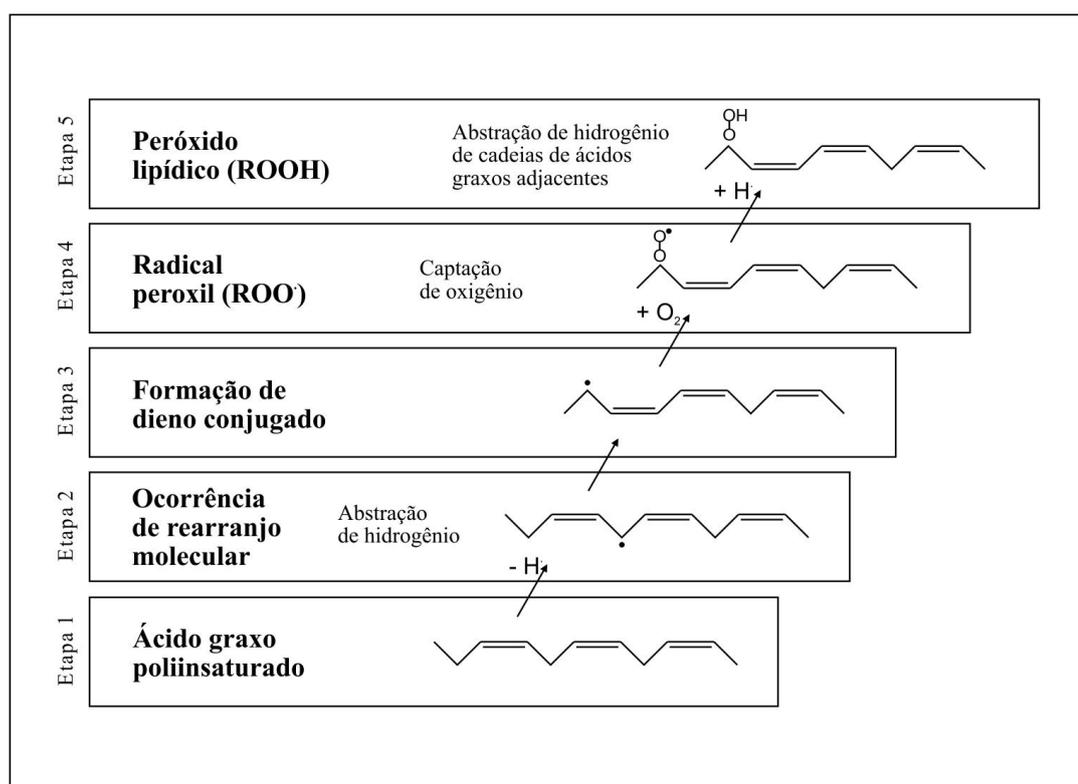


Figura 3 - Esquema geral das etapas do processo de peroxidação lipídica (adaptado de MOSIALOU, 1993).

Segundo Barbosa (2010), a cronicidade do processo de estresse oxidativo vem sendo relacionada com a etiopatogenia de enfermidades crônicas como ateroscleroses, diabetes, obesidade, transtornos neurodegenerativos e câncer. O estresse oxidativo, portanto, decorre de um desequilíbrio entre condições oxidantes e antioxidantes no organismo (figura 4), em favor das oxidantes e/ou em detrimento da velocidade de remoção operada pelos componentes antioxidantes (BARBOSA, 2010; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

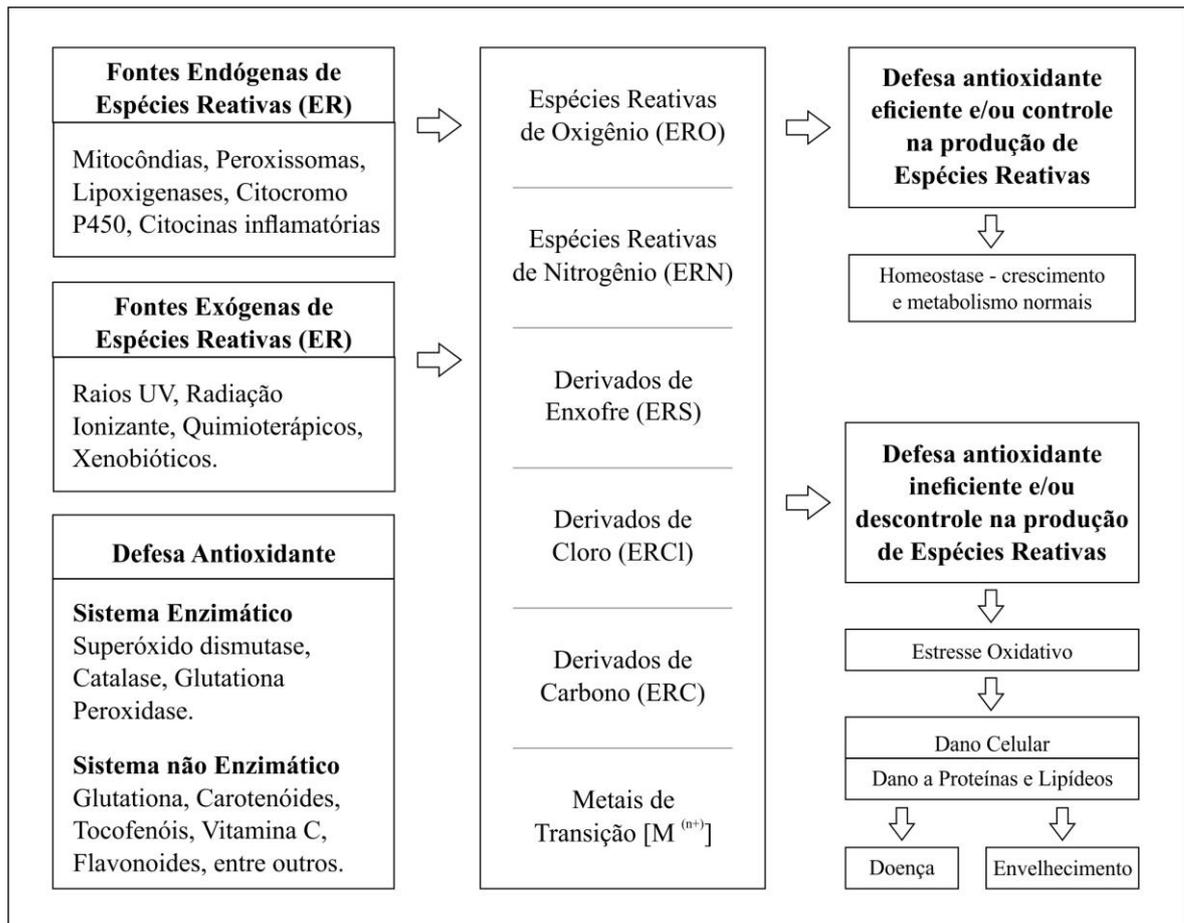


Figura 4 - Fontes endógenas e exógenas e respostas celulares às espécies reativas (ER) de Oxigênio (ERO), de Nitrogênio (ERN), derivados de Enxofre (ERS), de Cloro (ERCI), de carbono (ERC) e metais de transição [M⁽ⁿ⁺⁾] (adaptado de VASCONCELOS *et al.*, 2007).

2.7. SISTEMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTE

As condições antioxidantes correspondem a sistemas de proteção dos organismos contra o processo de estresse oxidativo, visando manter o estado redox celular, seja atrasando, removendo ou prevenindo o dano, por meio de mecanismos antioxidantes divididos em primários e secundários (modo de ação) e em enzimáticos e não enzimáticos (COTINGUIBA *et al.*, 2013). Antioxidantes primários atuam formando complexos lipídio-oxidante, ou convertendo radicais livres em produtos mais estáveis (antioxidantes doam elétrons ou hidrogênio à radicais livres). Já antioxidantes secundários atuam no sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos e complexação de metais, gerando espécies não radicais ou desativação de espécies reativas (COTINGUIBA *et al.*, 2013). O sistema antioxidante não enzimático, é composto por produtos produzidos no organismo, como pigmentos biliares, urato, proteínas de transporte de metais (como a metalotioneína) e o tripeptídeo glutatona (GSH), principal composto antioxidante intracelular; e também pode ser composto por produtos advindos da digestão, como as vitaminas C, E e A (todos atuando como captadores de radicais) (COTINGUIBA *et al.*, 2013; VASCONCELOS *et al.* 2007; DAMASCENO, 2016). Quanto ao sistema antioxidante enzimático, é composto principalmente pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase (GR) e glutatona-S-transferase (GST) (COTINGUIBA *et al.*, 2013). O sistema enzimático é subdividido em enzimas de biotransformação de fase I e fase II. Enzimas de fase I atuam na conversão de substâncias em metabólitos reativos, favorecendo sua eliminação por meio de conjugação com enzimas de fase II. As enzimas de fase II atuam, portanto, na eliminação dos produtos gerados na fase I, tornando estes produtos mais hidrofílicos e, logo, facilitando sua excreção (LEME *et al.*, 2010). Segundo Barbosa (2010), esses compostos antioxidantes vêm sendo utilizados como biomarcadores do estresse oxidativo.

2.8. BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

Segundo relatório publicado pelas agências *World Health Organization e International Programme on Chemical Safety* (2001), biomarcador é o “nome conferido a uma substância ou seu derivado, processo ou estrutura, que pode ser medida no organismo, permitindo prever ou influenciar a incidência de um acontecimento ou doença”, por meio da interação entre o sistema biológico e um ou mais contaminantes. Biomarcadores podem ser compreendidos em três subgrupos: biomarcadores de susceptibilidade, de efeito e de exposição. Biomarcadores de efeito, de modo geral, não são específicos quanto aos estressores e são caracterizados pela indução de mecanismos de defesa celular. Já biomarcadores de exposição estão relacionados com a estimativa da dose interna ou biodisponibilidade de contaminantes ou seus bioprodutos, apresentando indicadores de estresse generalizado ou específico de exposição ao contaminante (como o exemplo da indução de metalotioneína sob exposição a metais) (RODRIGUES, 2007). Segundo Cotinguiba *et al.* (2013), biomarcadores podem ser avaliados e medidos, como indicadores de processos biológicos normais ou patogênicos, ou de resposta farmacológica a intervenções terapêuticas, podendo apontar alterações relacionadas à exposição ou aos efeitos de xenobióticos. Dessa forma, o uso de biomarcadores vem sendo aplicado como ferramenta para detecção prévia de efeitos adversos de poluentes em organismos (RODRIGUES, 2007). Biomarcadores enzimáticos de estresse oxidativo, como a enzima superóxido dismutase (catalisadora da dismutação do ânion radical superóxido a peróxido de hidrogênio e O₂), a catalase (que atua na decomposição de peróxido de hidrogênio a O₂ e água) e a glutathione peroxidase (que atua sobre peróxidos em geral, com utilização de glutathione como co-fator), vêm sendo utilizados como forma de monitoramento de ambientes aquáticos (COGO *et al.*, 2009; VASCONCELOS *et al.*, 2007). Além disso, Cogo *et al.* (2009) ressaltam que a exposição a metais acarreta o aumento das EROs peróxido de hidrogênio, radical superóxido e radical hidroxil, podendo ocasionar o aumento dos biomarcadores enzimáticos de estresse oxidativo, como superóxido dismutase, catalase e glutathione-s-transferase.

2.8.1. ENZIMA CATALASE

A enzima catalase (CAT), componente de defesa antioxidante primário, apresenta elevada atividade quando o organismo se encontra sob estresse oxidativo, sendo considerada por este motivo um importante biomarcador em ações de monitoramento (COGO *et al.*, 2009). Dessa forma, ressalta-se que enzima CAT relaciona-se com os níveis da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD), uma vez que esta atua eliminando radicais superóxido, gerando peróxido de hidrogênio, que, por sua vez, é decomposto pela ação da enzima CAT (juntamente com a glutathione peroxidase - GPx), segundo a reação 2 (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; YAN *et al.*, 2015a). Além disso, a catalase atua na oxidação de compostos hidrogenados, como metanol, etanol, ácido fórmico e fenóis, com o consumo de peróxido (COGO *et al.*, 2009). Um dos modos mais comuns para estudo de sua atividade, baseia-se na geração do oxigênio na reação e medida do decaimento na concentração de peróxido de hidrogênio, realizada por espectrofotometria no ultravioleta a 240 nm (VASCONCELOS *et al.*, 2007).



2.8.2. ENZIMA GLUTATIONA-S-TRANSFERASE

A enzima glutathione-S-transferase (GST) está envolvida na correção dos efeitos deletérios de compostos xenobióticos (como poluentes ambientais), atuando por meio da catalisação da conjugação de GSH com compostos endógenos ou exógenos poluentes, tornando-os menos tóxicos, mais hidrofílicos, logo, mais facilmente excretados (COGO *et al.*, 2009). Segundo Yan *et al.*, (2015a), a GST pode atuar na inibição da peroxidação lipídica e indiretamente na indução do reparo de DNA. Dessa forma, a glutathione-S-transferase vem sendo utilizada como biomarcador, por apresentar inibição de sua atividade relacionada com a desestabilização da membrana lisossômica (causada pela exposição a metais ou a radicais livres) (COGO *et al.*, 2009).

2.8.3. TIOL GLUTATIONA REDUZIDA

A glutathiona é um tripeptídeo que se apresenta na forma oxidada (GSSG) e na forma reduzida de tiol (GSH), a qual é considerada o único tiol não protéico em espécies aeróbias (COGO *et al.*, 2009; VASCONCELOS *et al.*, 2007). A glutathiona reduzida atua sequestrando radicais na homeostase tiólica, na manutenção do balanço redox celular, dessa forma, beneficiando a desintoxicação intracelular de xenobióticos e de EROs, protegendo células contra danos oxidativos (COTINGUIBA *et al.*, 2013; REISCHL *et al.*, 2007; VASCONCELOS *et al.*, 2007). O mecanismo de ação da glutathiona é operado na redução do peróxido de hidrogênio e de hidropeptídeos orgânicos, no qual a glutathiona reduzida age como co-substrato da glutathiona peroxidase (GPx), resultando em água e em glutathiona oxidada conforme a reação 3 (COTINGUIBA *et al.*, 2013). Além disso, o tiol GSH pode atuar na proteção celular por meio de mecanismos de conjugação com espécies reativas (como o metal Cd), visando torná-las mais hidrofílicas e, assim, mais facilmente excretáveis (YAN *et al.*, 2015a; RANA; VERMA, 1996). A manutenção do ambiente redutor intracelular é garantida pela razão entre glutathiona reduzida e oxidada (GSH/GSSG), a qual é mantida em níveis altos pela ação da enzima glutathiona redutase (GR), reduzindo a glutathiona oxidada à glutathiona reduzida, com gasto de NADPH, evitando a diminuição dos níveis de glutathiona reduzida e mantendo o estado redox no interior da célula (COGO *et al.*, 2009; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; SIES; MOSS, 1978; VASCONCELOS *et al.*, 2007).



2.8.4. PROTEÍNA METALOTIONEÍNA

A metalotioneína (MT) é uma proteína citosólica com a função de transportar metais essenciais e de desintoxicação celular por meio de sua afinidade com metais traço não essenciais (como o Cd). A indução de metalotioneínas representa o primeiro sistema de defesa da célula contra a presença de metais como Zn^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} e Cd^{2+} , que se atraem pelos grupamentos sulfídricos da MT (DAMASCENO, 2016; RODRIGUES, 2007). Segundo Wu *et al.* (2007), o Cd induz a síntese de MT no fígado, a qual, portanto, serviria como biomarcador de cádmio enquanto contaminante xenobiótico, corroborando com Igansi (2012), que apontam que estudos demonstraram que peixes passam a expressar a proteína metalotioneína em resposta à contaminação com metais. Dessa forma, a MT vem sendo proposta como biomarcador da exposição por metais, conforme estudos com uso de organismos biondicadores, como moluscos, crustáceos e peixes. Além da atuação da detoxificação de metais, as metalotioneínas vêm sendo relacionadas com a proteção de células contra EROs e drogas anti-câncer eletrofílicas (DAMASCENO, 2016; RODRIGUES, 2007).

2.9. ASPECTOS GERAIS

Sabendo-se que os contaminantes estudados apresentam dados de detecção no território nacional, bem como ocorrência de acidentes ambientais e casos de má gestão de empreendimentos potencialmente poluidores (relacionados ao cádmio), ressalta-se a possibilidade de efeitos de interação destes contaminantes nos ambientes naturais aquáticos brasileiros. Interações essas, sobretudo por meio de aportes de águas residuais/carreamentos superficiais advindos de cidades e áreas rurais conectadas por rios próximos a atividades de extração e de beneficiamento de zinco associado ao cádmio, como ocorre no estado de Minas Gerais^{2,3,4} (LINDOLFO, 2015; MAGNA *et al.*, 2014; LATTUADA *et al.*, 2009).

Todos esses fatores apontam para a importância da avaliação ecotoxicológica dos possíveis efeitos sinérgicos e antagônicos destes contaminantes na biota aquática, impactando nos ecossistemas e na saúde pública. Assim, ressalta-se a importância da avaliação desses efeitos potenciais tóxicos, por meio de técnicas que detectem danos subletais provocados por contaminantes à concentrações ambientais relevantes. Dessa forma, neste trabalho serão utilizadas técnicas de determinação da concentração (ou atividade) de diferentes biomarcadores de estresse oxidativo em um organismo modelo aquático exposto laboratorialmente aos contaminantes de estudo.

² O cádmio é comumente associado ao minério/beneficiamento de zinco. Ressalta-se que a produtora Votorantim Metais Zinco S/A dispõe de duas minas de extração de zinco, nas cidades de Vazante (antiga Cia. Mineira de Metais) e Paracatu, ambas no estado de Minas Gerais. A Votorantim também dispõe de duas usinas metalúrgicas, Três Marias e Juiz de Fora, também situadas em Minas Gerais (GOUVEA, 2008).

³ No ano de 2008 foi divulgada a ordem de paralisação imediata das atividades da mina de Vazante, em nota na página do Ministério Público Federal, sob acusação de aporte de água contaminada no rio Santa Catarina, apresentando elevados índices de turbidez devido à presença de chumbo, ferro, alumínio, manganês, arsênio, zinco e cádmio acima dos parâmetros permitidos. Na ocasião, a contaminação atingiu também o lençol freático e comprometeu o abastecimento de água da cidade (pmrg.mpf.mp.br, 2008).

⁴ A cidade de Vazante-MG possui cerca de 20500 habitantes, apresenta como atividades econômicas principais, além da mineração, as culturas de feijão, soja, arroz e milho, contando também com a produção de gado de corte e leite (adaptado de portal IBGE, 2019).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar efeitos subletais relacionados ao estresse oxidativo das substâncias carbamazepina, acetamiprida e cádmio em peixes *Danio rerio*;

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar os efeitos subletais das três substâncias separadamente e em sistemas de mistura para verificar possíveis efeitos sinérgicos ou antagônicos;
- Avaliar atividade de enzimas bioindicadoras de estresse oxidativo catalase (CAT) e glutaciona-S-transferase (GST) no cérebro e fígado dos peixes expostos;
- Avaliar os níveis dos bioindicadores não enzimáticos de estresse oxidativo metalotioneína (MT) e glutaciona reduzida (GSH) no cérebro e fígado dos peixes expostos;
- Avaliar níveis de peroxidação lipídica por meio do biomarcador malondialdeído (MDA) no cérebro e fígado dos peixes expostos.

4. METODOLOGIA

4.1. COMPOSTOS QUÍMICOS TESTADOS

Acetamiprida ($C_{10}H_{11}ClN_4$): disponível em pó (cristalizado), obtido a partir de Sigma-Aldrich (Brasil) em frasco contendo 100 mg a 99 % de pureza. Carbamazepina ($C_{15}H_{12}N_2O$): disponível em pó (encapsulado em drágeas), mantido à temperatura ambiente, obtido a partir de estabelecimento comercial farmacêutico em frasco contendo 90 drágeas de 400 mg. Cádmio (Cd): Concentração de 1000 mg L^{-1} , dissolvido em água deionizada, com adição de 2 % de HNO_3 , mantido sob refrigeração e obtido a partir de Merck (Alemanha). As diluições das soluções de trabalho foram preparadas com água proveniente do aquário de manutenção de peixes, com o objetivo de serem mantidos os parâmetros da água.

4.2. ORGANISMO TESTE

Os procedimentos laboratoriais com peixes estão amparados pelo protocolo de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Fiocruz, sob a numeração CEUA P-14/2017-5 (anexo I).

Peixes adultos da espécie *Danio rerio* (aproximadamente 2 cm de comprimento), criados sem administração medicamentosa, obtidos a partir da piscicultura Terra dos Peixes, foram mantidos e aclimatados por uma semana em aquários de manutenção (100*40*40 cm) com água da rede pública de abastecimento, desclorada à evaporação natural, verificada quanto os níveis de cloro total ($Cl_2 < 0,1 \text{ mg L}^{-1}$) com colorímetro Pocket II (Hach Company, EUA). Além disso, os demais parâmetros utilizados foram pH 7-7,6, temperatura de 23-27 °C, dureza da água em 10-60 mg $CaCO_3 \text{ L}^{-1}$, alimentação pelo menos duas vezes ao dia, aeração constante, e fotoperíodo de 12-16 horas por dia (adaptado de ABNT NBR 15088/16).

4.3. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

4.3.1. ESTABELECIMENTO DO MODELO – CONTROLES NEGATIVOS

Os ensaios foram executados em duas etapas. A primeira etapa ocorreu após uma semana de aclimatação dos organismos em aquário de manutenção. Os peixes foram transferidos para aquários de “exposição” (49,5*30*24,5 cm) e mantidos nos mesmos, por 96 horas, nas condições citadas anteriormente (item 4.2), para realização dos testes de controles negativos. Dois tipos de controle negativo foram testados. O controle sem alimentação dos organismos por 96 h, conforme procedimento adotado pela ABNT 15088/16, e o controle com alimentação dos organismos, duas vezes ao dia durante as 96 horas de teste.

Os testes-controle sem alimentação e com alimentação foram realizados com 6 replicatas (seis *pools* de trinta peixes). Ambos os testes realizados observaram a densidade máxima de 0,54 g L⁻¹ (gramas de peixe:Litros de água), considerada conservadora em relação à densidade limite de 1 g L⁻¹, estabelecido pela norma ABNT supracitada. A comparação entre os dois tipos de controle nesta primeira etapa teve como objetivo avaliar os possíveis efeitos da falta de alimentação nos níveis de estresse oxidativo dos indivíduos, uma vez que, diferentemente do que é estabelecido pela norma, o presente trabalho se concentra em efeitos subletais de exposição.

4.3.2. EXPOSIÇÃO AOS CONTAMINANTES

A segunda etapa, semelhante à primeira, consistiu na exposição aos contaminantes (acetamiprida, carbamazepina e Cd) sob os mesmos parâmetros do controle sem alimentação, tamanho de aquário de exposição e tempo de exposição. Todos os ensaios de exposição foram realizados em quadruplicata, isto é, cada exposição contou com quatro aquários de exposição, resultando em quatro *pools* de cinquenta peixes por exposição, sob a densidade de 0,83 g L⁻¹ (gramas de peixe:Litros de água).

As exposições foram ministradas em sistemas unitários e em misturas de contaminantes, conforme concentração ambientalmente relevante, definida em 25 µg L⁻¹, a partir do observado por Ribeiro *et al.* (2013) em estudo com amostras de águas fluviais com contaminação mista, coletadas na nascente de rio associado à áreas rurais. Dessa forma, foi estabelecido o total de sete grupos experimentais de exposição aos contaminantes, de acordo com o quadro 2.

Quadro 2 - Esquema de exposições dos peixes aos contaminantes de estudo.

Tipo	Identificação da exposição	Substância	Concentrações (µg L ⁻¹)	Tempo de exposição (horas)	Densidade de peixes por Litros de água (g L ⁻¹)
Sistemas Unitários	1	Carbamazepina	25,00	96	0,83
	2	Acetamiprida	25,00	96	0,83
	3	Cádmio	25,00	96	0,83
Sistemas de Misturas	4	Acetamiprida	25,00	96	0,83
		Carbamazepina	25,00		
	5	Carbamazepina	25,00	96	0,83
		Cádmio	25,00		
	6	Acetamiprida	25,00	96	0,83
		Cádmio	25,00		
		Acetamiprida	25,00		
7	Carbamazepina	25,00	96	0,83	
	Cádmio	25,00			

Observações: Utilizada água desclorada naturalmente por evaporação (Cl₂<0,1 mg L⁻¹), à faixa de temperatura de 23-27 °C, pH 7-7,6, dureza de 10-60 mg CaCO₃ L⁻¹ e aeração constante da água. Os experimentos de controles negativos foram realizados sob os parâmetros definidos acima, porém sem uso de contaminantes.

Os materiais e aquários de exposição utilizados em cada ensaio foram lavados com água em abundância e sabão de coco, com auxílio de gaze descartável após cada exposição, visando garantir a eliminação de resíduos de contaminantes na superfície destes materiais.

4.3.3. DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS DE QUALIDADE DA ÁGUA

A água utilizada nos ensaios, tanto preliminar, quanto de exposição, foi monitorada no início (primeiro dia) e ao final (último dia) dos experimentos (ABNT 15088/16) para verificação dos parâmetros de pH, oxigênio dissolvido e condutividade por meio de um medidor multiparâmetros (Thermo Scientific Orion Versa Star - Massachusetts, EUA). Além disso, a dureza da água foi monitorada (sob a mesma periodicidade dos demais parâmetros), conforme método titulométrico (APHA/AWWA/WEF, 2017), de acordo com a equação 1:

$$CaCO_3(mg L^{-1}) = \frac{(Va - Vb) \times 0,01 \times 100000 \times F}{Vam} \quad (1)$$

Onde,

- Va = Volume de EDTA (mL) gasto na amostra;
- Vb = Volume de EDTA (mL) gasto no branco;
- Vam = Volume de amostra (mL);
- F = Fator de correção volumétrica de EDTA.

4.4. EUTANÁSIA E PREPARO DAS AMOSTRAS DE BIOMASSA

Após o período de exposição, foi realizada a eutanásia, por meio de decapitação seguida de inserção de agulha metálica na porção cerebral (BORSKI & HODSON, 2003; AVMA, 2013; CONCEA, 2015), seguida da dissecação dos peixes, recolhendo-se fígado e cérebro em respectivos microtubos de 2 mL. Dessa forma, cada microtubo compreendeu um *pool* de peixes expostos à densidade de 0,83 g L⁻¹ (gramas de peixe:Litros de água) em um aquário de exposição. Os órgãos foram armazenados à -80 °C até o momento da análise.

4.5. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

A determinação de proteínas totais, utilizada como fator de correção (normalização) das análises de biomarcadores enzimáticos e não enzimáticos de cada amostra, foi realizada de acordo com adaptação do método de Lowry modificado por Peterson (1977). A aplicação do método foi compreendida pelas fases de extração e de quantificação nas amostras. A fase de extração consistiu na homogeneização da amostra em tampão fosfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (à pH 6,5, contendo $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ de sacarose e 1 mmol L^{-1} de EDTA), seguida de centrifugação por 30 min à $11.000 \times g$ (à $4 \text{ }^\circ\text{C}$) em centrífuga Eppendorf Centrifuge 5430R (Hamburgo, Alemanha). Após esse procedimento, na fase de quantificação, uma alíquota de $20 \text{ }\mu\text{L}$ do sobrenadante foi misturada à $980 \text{ }\mu\text{L}$ de água ultrapura, seguida da adição de $400 \text{ }\mu\text{L}$ de reativo A, compreendido em $12,5 \text{ mL}$ água ultrapura, $12,5 \text{ mL}$ de NaOH $0,8 \text{ mol L}^{-1}$, $12,5 \text{ mL}$ de solução de SDS 10 % e $12,5 \text{ mL}$ de solução CTC ($1,25 \text{ g}$ de carbonato de sódio, $0,250 \text{ g}$ de tartarato de sódio e potássio e $0,125 \text{ g}$ de sulfato de cobre, avolumados para $12,5 \text{ mL}$ com água ultrapura). Na sequência, foram adicionados $200 \text{ }\mu\text{L}$ de reativo B (solução 20 % de Follin ciocalteu fenol 2N) à mistura, seguindo-se a incubação por 30 minutos no escuro. Por fim, a quantificação de proteínas totais foi realizada comparando-se os valores (de absorbância à 750 nm , em leitor de microplaca) da amostra com os de uma curva analítica preparada com solução de $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de BSA e água ultrapura. A análise foi realizada em leitor de microplaca Asys Expert Plus (Cambridge, Inglaterra) e as concentrações utilizadas na curva analítica corresponderam a 10, 20, 30, 40, 50, 60 e $70 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ (solução BSA 2 mg mL^{-1} :água deionizada). Resultados expressos em $\mu\text{g }\mu\text{L}^{-1}$ (proteína:lisado de tecido).

4.6. BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

4.6.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE CATALASE

A determinação da atividade da enzima catalase (CAT) foi quantificada a partir da amostra de órgão após a dissecação, conforme o protocolo de Aebi (1984). A aplicação do método foi compreendida pelas fases de extração e de quantificação do biomarcador nas amostras. A fase de extração consistiu na homogeneização da amostra em tampão fosfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (à pH 6,5, contendo $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ de sacarose e 1 mmol L^{-1} de EDTA), seguida de centrifugação por 30 min à $11.000 \times g$ (à $4 \text{ }^\circ\text{C}$) em centrífuga Eppendorf Centrifuge 5430R (Hamburgo, Alemanha). Após esse procedimento, na fase de quantificação, uma alíquota de $205 \text{ }\mu\text{L}$ do sobrenadante foi misturada à $1845 \text{ }\mu\text{L}$ de água ultrapura. A determinação da cinética enzimática da enzima catalase (CAT) foi realizada por meio da quantificação do consumo de H_2O_2 (reação 4) à absorvância de 240 nm ($\Delta\text{Abs}/\text{min}$) em espectrofotômetro Jasco V 530 (Kyoto, Japão), durante 15 segundos, em duas cubetas de quartzo, uma denominada como cubeta referência e outra como cubeta amostra.



As análises foram procedidas com a adição de $250 \text{ }\mu\text{L}$ de tampão fosfato e $500 \text{ }\mu\text{L}$ de amostra na cubeta de referência, seguindo-se à adição de $250 \text{ }\mu\text{L}$ de solução de H_2O_2 (1:299 H_2O_2 :água) e 2 mL de amostra na cubeta de amostra., respeitando-se a ordem descrita dos reagentes, visando evitar a ocorrência da reação de degradação antes do início da leitura no espectrofotômetro. Resultados expressos na unidade internacional de atividade enzimática (U) e em função da quantidade de proteína (U CAT por g de Ptn).

4.6.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE GLUTATIONA-S-TRANSFERASE

A determinação da atividade da enzima glutathiona-S-transferase (GST) foi quantificada a partir da amostra de órgão após a dissecação, conforme o protocolo de Habig, Pabst e Jacoby (1974). A aplicação do método foi compreendida pelas fases de extração e de quantificação do biomarcador nas amostras. A fase de extração consistiu na homogeneização da amostra em tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹ (à pH 6,5, contendo 0,25 mol L⁻¹ de sacarose e 1 mmol L⁻¹ de EDTA), seguida de centrifugação por 30 min à 11.000 x g (à 4 °C) em centrífuga Eppendorf Centrifuge 5430R (Hamburgo, Alemanha). Após esse procedimento, na fase de quantificação, uma alíquota de 75 µL do sobrenadante foi misturada à 75 µL de água ultrapura. A atividade da enzima foi monitorada por meio da formação do composto GS-DNB (reação 5) à absorbância de 340 nm (Δ Abs/min) em espectrofotômetro Jasco V 530 (Kyoto, Japão), durante 60 segundos, a partir da mistura de 25 µL de amostra, 675 µL de tampão fosfato de potássio 0,1 mol L⁻¹ pH 6,5, 25 µL de GSH 50 mmol L⁻¹ e 25 µL de CDNB 25 mmol L⁻¹ em uma cubeta de quartzo.



Os cálculos de atividade enzimática foram baseados na equação 2, na qual foi utilizada a unidade internacional de atividade enzimática (U), que equivale à formação de 1 µmol de GS-DNB/min. Resultados expressos em U GST por g de Ptn.

$$\frac{\Delta Abs/min}{\epsilon} \times Volume da cubeta (final) = \frac{\left(\frac{\Delta Abs}{min Am} - \frac{\Delta Abs}{min Br} \right) \times 3 mL}{9,6} \quad (2)$$

Onde,

$$U = \Delta Abs/min \times 0,3125 \rightarrow (\mu mol \text{ min}^{-1} \text{ na cubeta})$$

$$U/mL = U \times 10$$

$$U/L = (U \text{ mL}^{-1}) \times 1000$$

$$Volume de amostra = 0,1 \text{ mL}$$

4.6.3. AVALIAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA

O tiol glutaciona reduzida (GSH) foi quantificado a partir da amostra de órgão após a dissecação, conforme o protocolo de Beutler, modificado por Wilhelm-Filho e Torres (2005). A aplicação do método foi compreendida pelas fases de extração e de quantificação do biomarcador nas amostras. A fase de extração consistiu na homogeneização da amostra em tampão fosfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (à pH 6,5, contendo $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ de sacarose e 1 mmol L^{-1} de EDTA), seguida de centrifugação por 30 min à $11.000 \times g$ (à $4 \text{ }^\circ\text{C}$) em centrífuga Eppendorf Centrifuge 5430R (Hamburgo, Alemanha). Após esse procedimento, na fase de quantificação, uma alíquota de $30 \text{ }\mu\text{L}$ do sobrenadante foi misturada à $320 \text{ }\mu\text{L}$ de água ultrapura, seguida da adição de DTNB $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$ (DTNB: tampão fosfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 8), seguindo-se a incubação por 15 minutos no escuro. Por fim, a quantificação de GSH foi realizada comparando-se os valores (de absorbância à 412 nm , em leitor de microplaca) da amostra com os de uma curva analítica de solução estoque de 10 mmol L^{-1} de GSH (GSH:tampão fosfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7). A análise foi realizada em leitor de microplaca Asys Expert Plus (Cambridge, Inglaterra) e as concentrações utilizadas na curva analítica corresponderam a 30, 60, 90, 120, 180, 240 e $300 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ (GSH:tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7). Resultados expressos em μmol de GSH por grama de tecido, normalizados por grama de proteína ($\mu\text{mol g}^{-1}$ por g Ptn).

4.6.4. AVALIAÇÃO DE METALOTIONEÍNA

A proteína MT foi quantificada a partir da amostra de órgão após a dissecação, conforme adaptação dos protocolos de Erk *et al* (2002), Ellman (1959) e Kăgi (1991). A aplicação do método foi compreendida pelas fases de extração e de quantificação do biomarcador nas amostras. A fase de extração consistiu na homogeneização da amostra em tampão (consistido de Tris $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ pH 8,6, PMSF $1,5 \text{ }\mu\text{L mL}^{-1}$ e β -mercaptoetanol 0,01 %), seguida de centrifugação por 60 min à $20.000 \times g$ (à $4 \text{ }^\circ\text{C}$), aquecimento do sobrenadante à $70 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 min e nova centrifugação por 30 min à $20.000 \times g$ (à $4 \text{ }^\circ\text{C}$), em centrífuga Eppendorf Centrifuge 5430R (Hamburgo, Alemanha) . Após esse procedimento, na fase de

quantificação, alíquotas de 50 μL do sobrenadante e de 50 μL de pontos de uma curva analítica (preparada com solução de 10 mmol L^{-1} de GSH e água ultrapura) foram misturadas, respectivamente, à 50 μL de solução de EDTA 4 mmol L^{-1} acidificada com HCl (5:49,3 $\mu\text{L}:\text{mL}$). Na sequência, foram adicionados 1400 μL da mistura (1:1) de 2 mol L^{-1} de NaCl com DTNB 0,43 mM (DTNB:tampão fosfato de sódio 0,2 mol L^{-1} pH 8), seguindo-se a incubação por 30 minutos no escuro. Por fim, a quantificação de MT foi realizada comparando-se os valores (de absorbância à 412 nm, em leitor de microplaca) da amostra com os de uma curva analítica. A análise foi realizada em leitor de microplaca Asys Expert Plus (Cambridge, Inglaterra) e as concentrações utilizadas na curva analítica corresponderam a 60, 90, 120, 180, 240, 300, 500, 750, 1000 e 1500 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Resultados expressos em μmol de MT por grama de tecido, normalizados por grama de proteína ($\mu\text{mol g}^{-1}$ por g Ptn).

4.6.5. AVALIAÇÃO DE MALONDIALDEÍDO - PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

O biomarcador MDA foi quantificado a partir da amostra de órgão após a dissecação, conforme adaptação do protocolo específico descrito pelo Kit TBARS Assay, fornecido por Cayman Chemical Company (Michigan, EUA). A aplicação do método foi compreendida pelas fases de extração e de quantificação do biomarcador nas amostras. A fase de extração consistiu na homogeneização de 25 mg de amostra em 250 μL de tampão RIPA (compreendido em 0,5 mL de Triton x-100, 2,5 mL de solução de 1 mol L^{-1} de Tris pH 7,5, 2,5 mL de solução de NaCl 3 mol L^{-1} , 0,05 g de SDS e 0,5 g de desoxicolato de sódio), seguida de centrifugação por 10 min à 1600 x g (à 4 °C) em centrífuga Eppendorf Centrifuge 5430R (Hamburgo, Alemanha). Após esse procedimento, na fase de quantificação, uma alíquota de 30 μL do sobrenadante foi misturada à 120 μL de água ultrapura, seguida da adição de 150 μL de ácido tricloroacético 10 % (TCA) e de 1200 μL de solução de ácido tiobarbitúrico 0,53 % (TBA) (constituída de de TBA diluído em solução 1:1 de AcOH 20 % e NaOH 0,7 mol L^{-1}). A quantificação de MDA foi realizada comparando-se os valores (em espectrofotômetro) da amostra com os de uma curva analítica preparada com solução de MDA 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em água ultrapura (total de 150 μL de solução), seguida da adição de 150 μL de TCA 10 % e de 1200 μL de solução de TBA 0,53 %. Após preparo da amostra de da curva analítica, ambos mantidos por 1 hora em banho-maria Nova

Instruments N1040 (São Paulo, Brasil) à 100 °C, seguido de banho de gelo por 10 min e centrifugação por 10 min à 1600 x g (à 4 °C) em centrífuga Eppendorf Centrifuge 5430R (Hamburgo, Alemanha). A análise foi realizada à 535 nm de absorvância em espectrofotômetro Jasco V 530 (Kyoto, Japão) e as concentrações utilizadas na curva analítica corresponderam a 0,5, 1, 2, 4, 8, 10, 20, 30, 40 e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de MDA em água. Resultados expressos em $\mu\text{mol L}^{-1}$ de MDA, normalizados por grama de proteína ($\mu\text{mol L}^{-1}$ por g Ptn).

4.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas por meio do software R versão 3.4.2 e do software GraphPad Prism 8. Os dados obtidos nas análises de biomarcadores foram analisados após a exclusão de outliers pelo teste Rout. Após esse procedimento, foi realizada a análise entre os dois ensaios controle por meio do teste Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

Os grupos de dados foram analisados pelo teste Shapiro-Wilk de normalidade e pelos testes de homogeneidade de variância Brown-Forsythe e Bartlett, respectivamente. Em seguida, foram realizadas as análises entre os diferentes de ensaios por meio do teste Welch ANOVA ($p \leq 0,05$) corrigido pelo teste Welch T para amostras não pareadas com variâncias diferentes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS DE QUALIDADE DA ÁGUA

Os laudos de monitoramento físico-químico de água, emitidos pelo Departamento de Saneamento e Saúde Ambiental da FIOCRUZ RJ (DSSA), são apresentados no anexo II deste trabalho.

Os parâmetros físico-químicos (dureza, oxigênio dissolvido e pH) de qualidade da água, bem como a temperatura, monitorados durante os processos de exposição dos organismos aos contaminantes e de manutenção de aquários de peixes não expostos, mantiveram-se, de modo geral, dentro dos parâmetros ideais estabelecidos pela Norma ABNT 15088/16, conforme indicado na Tabela 4. Dessa forma, foi considerado que os parâmetros físico-químicos monitorados não influenciaram nos resultados dos ensaios realizados.

Tabela 4 - Resultados físico-químicos da água dos aquários

Tipo	Identificação da exposição	Substância	Dureza (CaCO ₃ mg L ⁻¹)	pH	Temperatura °C
Controle sem alimentação	0	-	23,91 ± 2,44	7,43 ± 0,20	24,69 ± 1,10
Controle com alimentação	0'	-	23,17 ± 1,62	7,34 ± 0,17	24,75 ± 0,71
Sistemas Unitários	1	Carbamazepina	32,55 ± 6,70	6,49 ± 0,22	24,54 ± 0,78
	2	Acetamiprida	40,72 ± 11,86	7,16 ± 0,10	24,56 ± 0,85
	3	Cádmio	31,25 ± 12,04	7,04 ± 0,09	24,75 ± 0,65
Sistemas de Misturas	4	Acetamiprida Carbamazepina	22,46 ± 0,72	7,53 ± 0,13	25,50 ± 1,26
	5	Carbamazepina Cádmio	22,16 ± 0,78	6,80 ± 0,45	25,75 ± 0,86
	6	Acetamiprida Cádmio	25,00 ± 1,63	6,80 ± 0,24	25,50 ± 1,00
	7	Carbamazepina Acetamiprida Cádmio	20,38 ± 0,66	6,86 ± 0,07	25,00 ± 1,00

Legenda: Valores representam a média ± desvio padrão analisados em cada ensaio.

As exceções observadas em relação à Norma ABNT supracitada, foram observadas nos valores de pH abaixo de 7,0, principalmente na exposição à carbamazepina, variando entre 6,22-6,71. No entanto, segundo a Norma ABNT 15088/16, os valores de pH que seriam capazes de influenciar na viabilidade de um ensaio estariam compreendidos fora da faixa 5,0-9,0.

5.1.1. ESTABELECIMENTO DO MODELO – CONTROLES NEGATIVOS

Os resultados referentes às análises de biomarcadores de estresse oxidativo, relacionados aos controles utilizando-se de alimentação e não alimentação dos peixes, padronizados pela concentração de proteína no lisado de tecido ($\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$), seguem apresentados nas figuras 5, 6 e 7.

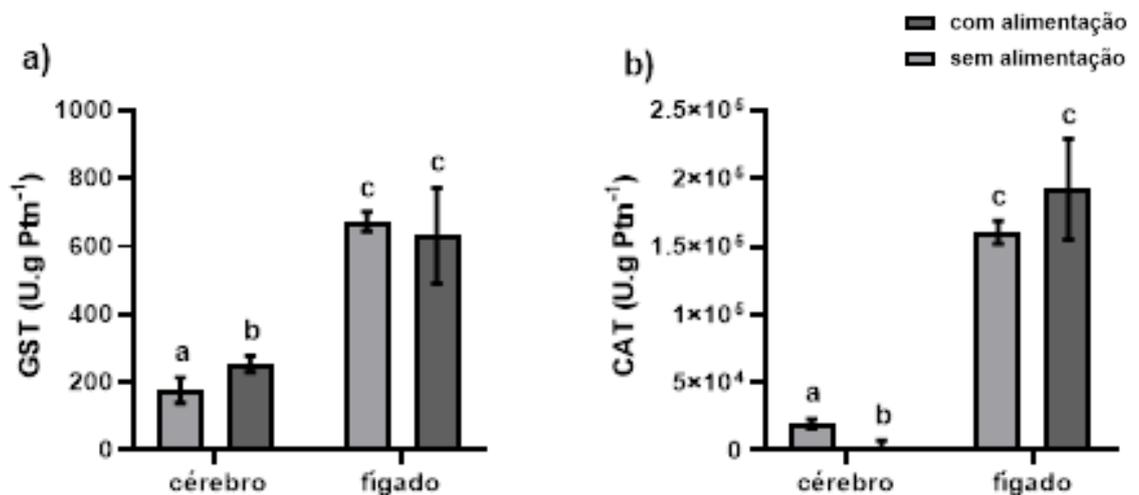


Figura 5 - Resultados dos biomarcadores enzimáticos GST (a) e CAT (b) para os órgãos cérebro e fígado observados no controle com alimentação e controle sem alimentação. Letras diferentes acima das colunas indicam significância estatística entre grupos, segundo o teste Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

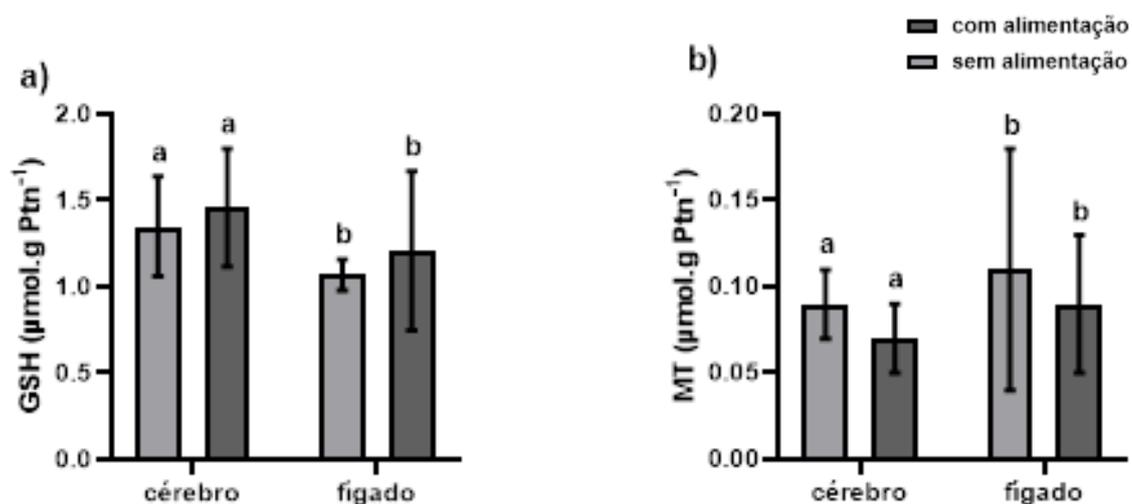


Figura 6 - Resultados dos biomarcadores não enzimáticos GSH (a) e MT (b) para os órgãos cérebro e fígado observados no controle com alimentação e controle sem alimentação. Letras diferentes acima das colunas indicam significância estatística entre grupos, segundo o teste Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

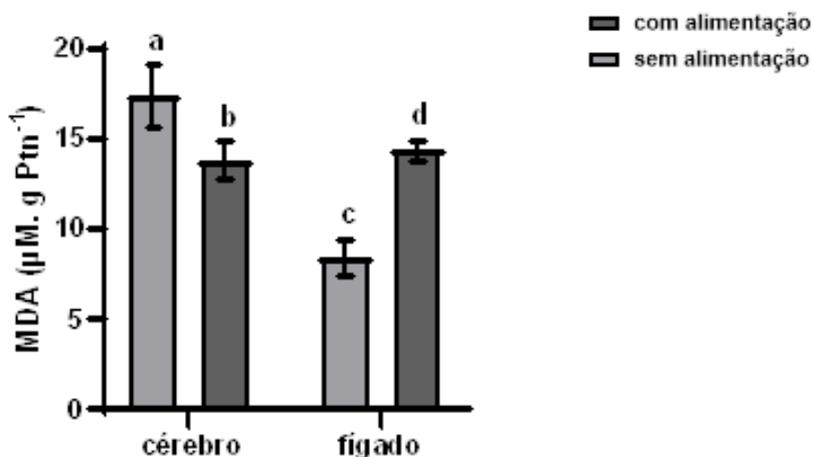


Figura 7 - Resultados do biomarcador MDA para os órgãos cérebro e fígado observados no controle com alimentação e controle sem alimentação. Letras diferentes acima das colunas indicam significância estatística entre grupos, segundo o teste Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

Nos resultados dos biomarcadores de estresse oxidativo demonstrados nas figuras 5-7, foram observadas diferenças significativas apenas entre o controle com e sem alimentação para GST e CAT (no cérebro), e para MDA (em ambos os órgãos). Para o órgão cérebro, o uso de alimentação no ensaio resultou em uma diminuição significativa da atividade dos biomarcadores CAT e MDA, enquanto que o oposto foi observado no

biomarcador GST. Já para o órgão fígado, o uso de alimentação no ensaio resultou em um aumento significativo da atividade do biomarcador MDA. Com isso, observando-se que a maioria das comparações entre controles com e sem uso de alimentação não apontaram significância estatística entre si ($p > 0,05$), optou-se, como modelo para os ensaios subsequentes (exposições aos contaminantes), a concordância com a Norma ABNT 15088/16, que estabelece como parâmetro a não alimentação de peixes da espécie *Danio rerio* para ensaios de 96 horas.

5.2. ENSAIOS COM OS ORGANISMOS EXPOSTOS AOS CONTAMINANTES

Os resultados das análises de biomarcadores de estresse oxidativo nas diferentes exposições, padronizados pela concentração de proteína no lisado de tecido ($\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$), seguem descritos a seguir.

Devido à variabilidade do organismo modelo, mesmo utilizando-se peixes *Danio rerio* englobados pelo parâmetro estabelecido pela Norma ABNT 15088/16, que preconiza o uso de indivíduos adultos correspondendo ao comprimento de 1-3 centímetros, foi observada por vezes escassez de massa do órgão fígado para as análises, principalmente no lote de peixes utilizado na exposição mista de carbamazepina com Cd.

5.2.1. BIOMARCADOR CATALASE

Os resultados obtidos pela análise do biomarcador catalase referentes às diferentes exposições, seguem apresentados na figura 8.

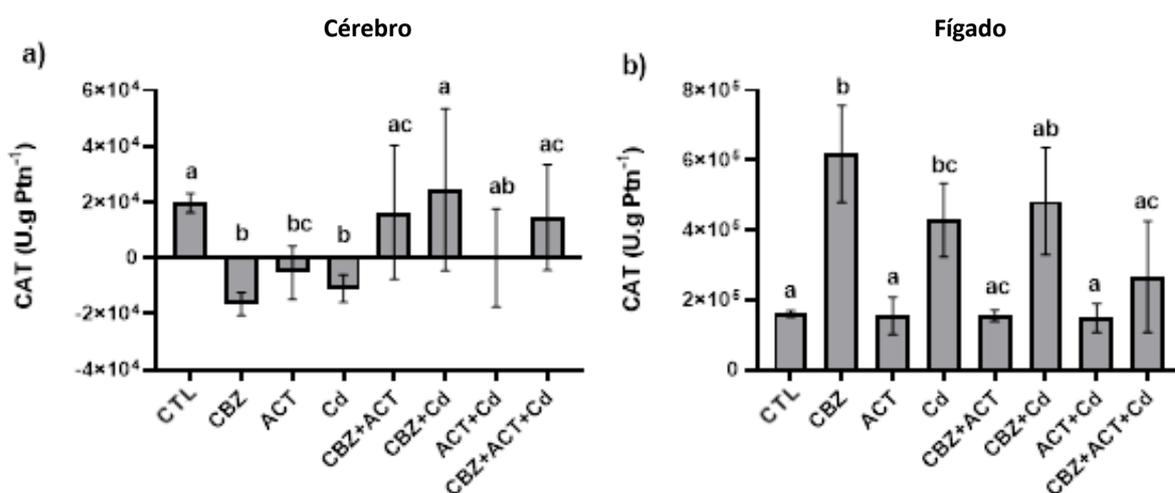


Figura 8 - Níveis da atividade enzimática da catalase (CAT) nas amostras de cérebro (a) e fígado (b) de peixes expostos. Letras diferentes acima das colunas indicam significância estatística entre grupos, segundo o teste Welch ANOVA ($p \leq 0,05$) corrigido pelo teste Welch T. CTL: controle, CBZ: carbamazepina. ACT: acetamiprida, Cd: cádmio.

Diferente do observado nos demais biomarcadores analisados, os valores de atividade de CAT no órgão cérebro (figura 8 [a]) não apresentaram uma distribuição padronizada entre efeitos dos contaminantes. Esse fato explica-se pela baixa atividade de CAT associada a esse órgão (SIMONIAN; COYLE, 1996), como já relatado em estudos anteriores realizados pelo grupo do setor de ecotoxicologia do laboratório CESTEJ da FIOCRUZ, com zebrafish expostos por 96 horas a diferentes contaminantes (GOMES *et al.*, 2019). No entanto, foram encontrados dados na literatura referentes a atividade de CAT em cérebro de trutas, como relatado nos estudos de Li *et al.* (2010). Esses autores observaram um aumento significativo da atividade de CAT no cérebro de trutas expostas (à 0,2 mg L⁻¹ de CBZ) nos primeiros 7 dias, seguido de sucessivas inibições de atividade observadas em 21 e em 42 dias de exposição (Li *et al.*, 2010). Esse fato denota o comportamento da atividade da enzima CAT ao longo do tempo, conforme já abordado no parágrafo anterior. Além disso, ressalta-se que o cérebro de trutas aparentemente apresenta maior produção de CAT em comparação com o de zebrafish em exposições por curtos períodos (até 7 dias). Dessa forma destaca-se também o trabalho de Sarkar *et al.* (2014), que, semelhando ao presente estudo, não observaram diferenças significativas na atividade de CAT no cérebro de peixes zebrafish nos primeiros 7 dias de exposição à 50 µg L⁻¹ do metal arsênio (As₂O₃). Sarkar *et al.* (2014), no entanto, observaram um aumento da atividade de CAT em 14 dias de exposição, o qual seria explicado como uma resposta do organismo para eliminação das EROs geradas a partir da presença do contaminante, indicando que a pequena atividade de CAT no cérebro de peixes zebrafish estaria associada ao estímulo dos primeiros dias de exposição (semelhante ao observado no presente estudo).

Em relação ao órgão fígado (figura 8 [b]), foi observado aumento da atividade de CAT nas exposições unitárias de CBZ (aproximadamente 3 vezes maior que o controle) e de cádmio (aproximadamente 1,6 vezes maior que o controle). Assim, ressalta-se que os resultados da exposição unitária de CBZ, podem estar relacionados ao fato deste contaminante ser metabolizado principalmente no órgão fígado, podendo ser inferidos como a resposta do organismo (aumento da atividade de CAT) para a eliminação de seu principal metabólito ativo, a carbamazepina-10,11-epóxido (CBZ-EP), de atuação conhecidamente tóxica (AL KHALILI; MURPHY, 2019; VALDÉS *et al.*, 2016; ALMEIDA, 2012; MIAO; METCALFE, 2003). Além disso, a CBZ é relatada como capaz de bioacumular nesse órgão, podendo causar danos a funções hepáticas em peixes (VALDÉS *et al.*, 2016; AHFS, 2007). Além disso, o órgão fígado é considerado um dos principais locais de destino do Cd que

entra no corpo (juntamente com os rins), podendo acumular por anos, acarretando em lesões hepáticas (ATDSR, 2012). Visto isso, os resultados da análise do fígado dos organismos expostos à CBZ e a Cd, apontariam para uma resposta do sistema de defesa antioxidante do organismo à estas exposições, visando combater o estresse oxidativo. Esse fato é sustentado pela comumente relatada elevada atividade de CAT, visando detoxificar espécies reativas como o H_2O_2 , geradas em situações de presença de contaminantes xenobióticos, como CBZ e Cd (COGO *et al.*, 2009). No entanto, a atividade de CAT também estaria relacionada a fatores como a concentração do contaminante e tempo de exposição. Dessa forma, quanto às exposições unitárias de CBZ, destacam-se os estudos realizados por Li *et al.* (2011), no qual foi observado um aumento significativo da atividade de CAT no órgão fígado, em trutas expostas por 96 h à concentração de $19,9 \text{ mg L}^{-1}$ de CBZ, concordando com os resultados do presente estudo, indicando que o aumento de CAT observado é considerado uma resposta à presença de EROs (espécies reativas de oxigênio), visando sua detoxificação. Quanto à literatura relacionada à resposta do órgão fígado para a exposição unitária de Cd, Wang *et al.* (2011) observaram um efeito semelhante ao do presente estudo, pelo aumento da atividade de CAT em caranguejos expostos por 7 dias à $7,25 \text{ mg L}^{-1}$ de Cd, explicando que a indução de CAT estaria relacionada à resposta do organismo ao contaminante, visando a manutenção de atividades fisiológicas. Já em ensaios com períodos mais prolongados, como nos estudos de Banni *et al.* (2011), foi observado que 21 dias de exposição de peixes zebrafish à $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ de Cd já seriam suficientes para promover um declínio na atividade de CAT, confirmando a característica de resposta da atividade desta enzima no órgão fígado, apresentando inicialmente um aumento para detoxificação das EROs geradas em decorrência do contaminante, seguido de uma tendência de declínio conforme maiores períodos de exposição.

Já em relação à atividade de CAT para a exposição unitária de ACT no órgão fígado, foram observados níveis semelhantes aos do controle ($p > 0,05$). Esse fato, relaciona-se com o observado nos estudos de Ge *et al.* (2015), Yan *et al.* (2015a) e Yan *et al.* (2015b), nos quais, assim como no presente estudo, não foram identificadas, segundo os autores, diferenças óbvias entre as atividades de CAT e controles no fígado de peixes zebrafish expostos por 7 dias a diferentes agrotóxicos neonicotinóides, nas concentrações de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$, $0,6 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,3 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. Os três trabalhos citados, foram realizados ensaios com diferentes tempos de exposição aos contaminantes, 7, 14, 21 e 28 dias. Ge *et al.* (2015) explicam que semelhança entre os níveis de CAT e controle no sétimo dia, denotaria

que esta enzima não foi tão sensível inicialmente ao neonicotinóide quanto outros biomarcadores à baixa concentrações. Dessa forma, o mesmo efeito teria ocorrido nos resultados da exposição à ACT no presente estudo. Acrescenta-se que essa hipótese estaria de acordo com os estudos Tišler *et al.* (2009), que, a partir de um estudo de exposição do crustáceo *Daphnia magna*, sugeriram que a atividade de CAT não caracterizaria um biomarcador sensível precoce de exposição ao neonicotinóide imidacloprida. No entanto, em relação a maiores tempos de exposição, Ge *et al.* (2015) observaram ao longo do ensaio (14, 21 e 28 dias), um aumento na atividade de CAT, seguido de um leve declínio, indicando efeitos na resposta do organismo para esta enzima relacionados ao fator tempo de exposição, denotando um estímulo inicial para a quebra de H₂O₂ (sobretudo relacionados à atividade da enzima SOD, mais sensível que a CAT). Após o estímulo inicial, foi observada uma tendência de inibição, indicando desequilíbrio no balanço oxidativo. Em concordância, as mesmas características de semelhança com controle à 7 dias, seguida das tendências de aumento e declínio, foram observadas nos trabalhos de Yan *et al.* (2015a) e Yan *et al.* (2015b).

Em relação aos resultados das exposições mistas, os mesmos não permitiram a afirmação de ocorrência de aumento na atividade de CAT em relação ao controle, que devido à característica de suas distribuições e desvio padrão, apontando para a semelhança estatística. Além disso, nas comparações entre a exposições unitárias no órgão fígado e suas respectivas misturas, foram observados casos de diminuições significativas nas atividades de CAT apenas para as comparações entre CBZ *vs.* CBZ+ACT, CBZ *vs.* CBZ+ACT+Cd e Cd *vs.* ACT+Cd, não sendo observada variação significativa entre as demais exposições mistas e suas respectivas exposições unitárias. Assim, uma vez que os efeitos das misturas dos contaminantes na atividade de CAT se mostraram menores que a soma de seus respectivos efeitos unitários, foi sugerida interação negativa entre os contaminantes de estudo, denotando uma característica antagônica entre os mesmos, para a atividade da enzima CAT. Ressalta-se também, que os resultados das exposições mistas com ACT (tanto combinada com CBZ, quanto com Cd), apresentaram valores brutos menores que os das demais misturas de contaminantes. Esse resultado pode sugerir que o organismo pode ter estado susceptível a ação das EROs formadas nestas exposições (como já demonstrado pela elevação da atividade de CAT nas exposições individuais de CBZ e Cd), porém sem a ação de eliminação pela CAT. Destaca-se assim, a comparação entre CBZ e CBZ+ACT, que mostrou uma diminuição significativa de cerca de 0,7 vezes da atividade da CAT no fígado. Esse fato pode

ter relação com a aparente baixa sensibilidade dessa enzima com o contaminante ACT, conforme reportado anteriormente pelos estudos de Ge *et al.* (2015) e Tišler *et al.* (2009), sendo, portanto, observados efeitos de sensibilidade menor que a esperada para todas as exposições mistas com presença de ACT. Em relação à interação entre Cd+CBZ, Almeida *et al.* (2018), assim como no presente estudo, observaram uma semelhança estatística entre as exposições de Cd ($0,5 \mu\text{g L}^{-1}$) e Cd+CBZ ($0,5 \mu\text{g L}^{-1} + 1,0 \mu\text{g L}^{-1}$), em organismo aquático ameijoia (*Ruditapes philippinarum*) exposto por 28 dias. Almeida *et al.* (2018) atribuíram essa semelhança estatística a uma ausência de interação entre Cd e CBZ, apesar de os valores de atividade de CAT para a exposição combinada não ter sido classificada como a soma entre os resultados das exposições unitárias.

5.2.2. BIOMARCADOR GLUTATIONA-S-TRANSFERASE

Os resultados das análises do biomarcador glutaciona-S-transferase nas diferentes exposições, seguem apresentados na figura 9.

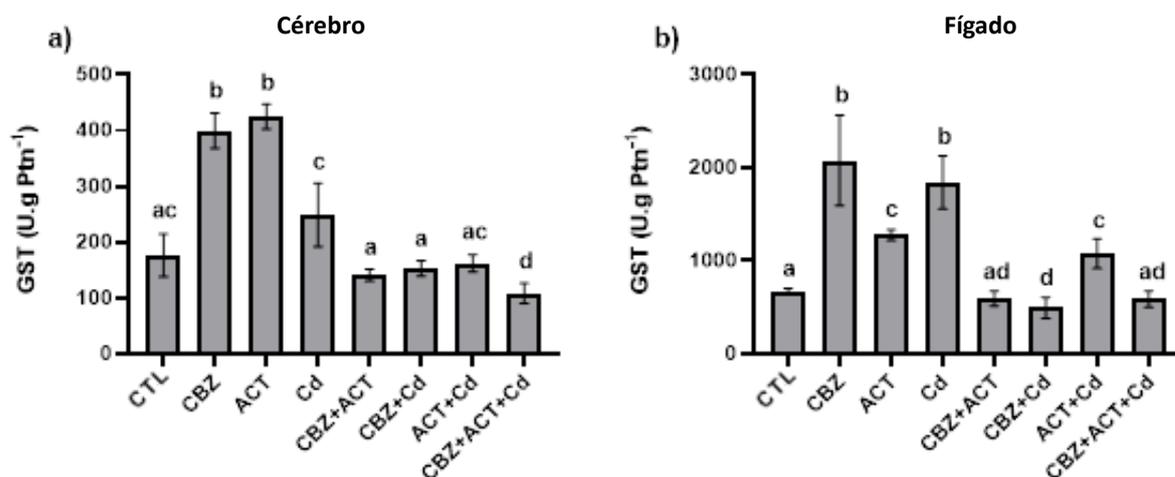


Figura 9 - Níveis do biomarcador glutaciona-S-transferase (GST) nas amostras de cérebro (a) e fígado (b) de peixes expostos. Letras diferentes acima das colunas indicam significância estatística entre grupos, segundo o teste Welch ANOVA ($p \leq 0,05$) corrigido pelo teste Welch T. CTL: controle, CBZ: carbamazepina. ACT: acetamiprida, Cd: cádmio.

Nos resultados de atividade de GST no órgão cérebro, observados na figura 9 (a), comparando-se o controle analisado e exposições unitárias aos contaminantes, foi observado um aumento significativo em cerca de 1,2 vezes na exposição unitária de carbamazepina (CBZ) e de 1,4 vezes na exposição unitária de acetamiprida (ACT). Já a atividade de GST para a exposição unitária à Cd, foi considerada estatisticamente semelhante ao controle. De modo semelhante, nas exposições mistas, foram observados em geral valores de atividade de GST equiparados aos observados no controle e menores que os observados nas exposições unitárias, indicando um comportamento diferenciado dos contaminantes quando combinados. Assim, a influência das exposições unitárias à CBZ e Cd no aumento da atividade de GST no referido órgão, condiz com a já esperada interação de CBZ e de ACT com estruturas cerebrais, acarretando em observações diferenciadas entre exposições unitárias e controle. Esses resultados, portanto, estariam relacionados com fato de o órgão cérebro ser compreendido como o órgão alvo de atuação da CBZ, que é utilizada para

tratamentos psicoterápicos em humanos, atuando no sistema nervoso central limitando transmissões sinápticas por meio do bloqueio de canais de sódio, além de estar relacionada aos receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA), relacionado aos canais de cálcio e à inibição do SNC (LIU *et al.*, 2006; USP DI, 2006). Ressalta-se também a já relatada capacidade da CBZ em atravessar a barreira hematoencefálica de peixes, como reportado por Valdés *et al.*, (2016). Em relação à ACT, ressalta-se sua capacidade de atuação no cérebro como alvo primário, sendo sua ação tóxica em vertebrados relacionada à sua atuação como agonista do receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 4\beta 2$ nAChR (TOMIZAWA; CASIDA, 2005; TERAYAMA *et al.*, 2016). Apesar desses fatos, foi observado que as exposições mistas desses contaminantes (CBZ+ACT, CBZ+Cd e CBZ+ACT+Cd) resultaram na diminuição da atividade de GST em comparação com as exposições unitárias, sugerindo uma relação antagônica entre os contaminantes de estudo nos efeitos observados no órgão cérebro.

Semelhante ao observado no órgão cérebro, a atividade de GST no órgão fígado (figura 9 [b]) apresentou aumento quando o organismo modelo é exposto aos contaminantes de forma unitária em comparação com o controle, demonstrado pelos aumentos significativos na exposição à CBZ (atividade 2 vezes maior que o controle), ACT (0,9 vezes maior) e Cd (1,7 vezes maior). Dessa forma, a esperada diferença entre exposições unitárias e controle, no órgão fígado, estaria relacionada aos efeitos dos contaminantes de estudo relatados na literatura, indicada a seguir. Dessa forma, ressalta-se que os resultados da exposição unitária de CBZ, como já citado anteriormente, estariam relacionados à capacidade da CBZ causar danos a funções hepáticas em peixes e ao fato de o órgão fígado ser o principal local de metabolização de CBZ, denotando uma resposta do organismo para a eliminação do metabólito tóxico CBZ-EP (AL KHALILI; MURPHY, 2019; VALDÉS *et al.*, 2016; ALMEIDA, 2012; MIAO; METCALFE, 2003). Já a ACT, é relatada como tendo o órgão fígado como um de seus principais alvos de acumulação, podendo acarretar em hipertrofia hepática (CALEPA, 2000). Ressalta-se também a já relatada ação do Cd no órgão fígado, por sua capacidade de acumulação e de operar danos a esse órgão (ATDSR, 2012). Apesar desses fatos, semelhante ao observado para o órgão cérebro, de modo geral foram verificadas diminuições significativas na atividade de GST nas exposições mistas de contaminantes em relação às exposições unitárias, sugerindo uma relação antagônica entre os contaminantes de estudo nos efeitos observados nesse órgão, excetuando-se apenas a comparação entre as exposições ACT e ACT+Cd, que pode representar uma maior resposta do organismo para o combate de EROs associadas à exposição mista de ACT+Cd.

Sabendo-se que biomarcador GST atua no metabolismo de fase II, estimulando a combinação entre GSH e espécies reativas geradas por contaminantes, visando que estas sejam excretadas do organismo, ressalta-se que o aumento observado de modo geral nos resultados da atividade de GST nas exposições unitárias, pode denotar a resposta do organismo à presença destas espécies reativas, em ambos os órgãos (YAN *et al.*, 2015a). Assim, os resultados do presente estudo concordam com os relatados por Ge *et al.* (2015), que analisaram amostras de fígado de peixes *Danio rerio* expostos à 0,3 mg L⁻¹ do neonicotinóide imidacloprida, notando uma tendência de aumento na atividade de GST em 7 dias de exposição e um aumento significativo à 14 dias, seguido de valores equiparáveis ao controle em 21 dias e menores que o controle em 28 dias. A tendência de aumento da atividade de GST nos primeiros dias de exposição, associada à resposta do metabolismo de peixes zebrafish, também foi reportada no trabalho de Yan *et al.* (2015a). Esses autores, enfatizaram que a atividade dessa enzima aumenta conforme o aumento dos fatores tempo de exposição e concentração de contaminante, visando estimular a combinação de GSH com substâncias reativas, seguindo-se a observada diminuição da atividade, possivelmente devido ao consumo dos estoques de GST enquanto substrato e/ou à produção de metabólitos (decorrentes do processo de detoxificação) capazes de inibir ou reduzir a atividade de GST. Dessa forma, no estudo citado de Yan *et al.* (2015a) foram analisadas amostras de fígado de peixes *Danio rerio* expostos à 0,6 mg L⁻¹ do neonicotinóide nitempiram por 7, 14, 21 e 28 dias, havendo uma tendência de aumento da atividade de GST até 21 dias, seguida de uma tendência de diminuição até 28 dias. Além disso, os resultados do presente estudo foram condizentes com os apresentados por Jin *et al.* (2015), que observaram um aumento significativo da concentração de GST no tecido de larvas de *Danio rerio* expostos ao contaminante cádmio (10 µM) por 96 horas. Assim, baixas concentrações de contaminantes (como as do presente estudo, na ordem de µg L⁻¹) tendem apresentar aumento na atividade de GST como resposta do organismo para o metabolismo de eliminação dessas substâncias, no entanto maiores concentrações e exposições prolongadas podem consumir totalmente os estoques de GST, além de gerar aumento da produção de subprodutos capazes de inibir sua atividade (YAN *et al.*, 2015a; COGO *et al.*, 2009). Sendo assim, um aumento na atividade de GST teria relação com um aumento de GSH, devido ao seu papel como catalizadora da conjugação entre GSH e espécies reativas. Dessa forma, a outra via desse fato é exemplificada pelo estudo de Almeida *et al.* (2014), no qual explicam que seus resultados de menores atividades de GST em bivalves expostos a 0,9 µg L⁻¹ de CBZ por 28 dias,

poderiam estar relacionados à presença de menores níveis de GSH disponíveis para reações de conjugação, acarretando em menores níveis GST envolvidos na fase II da biotransformação de CBZ.

Em relação às exposições mistas, tanto os resultados observados no órgão fígado, como no cérebro, indicaram que houve interação negativa entre os contaminantes de estudo, sugerindo uma relação de antagonismo, apontada pelos menores valores de atividade de GST observada principalmente nas exposições CBZ+ACT, CBZ+Cd e CBZ+ACT+Cd, em comparação com exposições unitárias. Esse dado, no entanto, diverge do apresentado no estudo de Almeida *et al.* (2018), no qual foi observado um aumento significativo nos valores de GST quando Cd ($0.5 \mu\text{g L}^{-1}$) foi combinado com CBZ ($1.0 \mu\text{g L}^{-1}$), em análise utilizando o organismo aquático ameijoia (*Ruditapes philippinarum*) exposto por 28 dias. Almeida *et al.* (2018), no entanto, explicam que tanto o aumento, quanto a manutenção da atividade de GST são esperados em bivalves expostos a CBZ. Além da hipótese de manutenção da atividade de GST ao nível do controle nas exposições mistas no presente estudo, uma vez que os níveis de GSH nestas exposições apresentaram aumento, ressalta-se que a atividade de GST para estas exposições pode ter representado uma menor parcela de atuação desta enzima como catalisadora da conjugação de radicais livres com GSH em comparação com o observado nas exposições unitárias, o que denotaria uma ação de GSH centralizada no combate às EROs, não sendo catalisada pela GST nas reações de fase II, o que explicaria a disparidade entre os níveis de GST e GSH nestas exposições.

5.2.3. BIOMARCADOR GLUTATIONA REDUZIDA

Os resultados das análises do biomarcador glutathiona reduzida, comparando-se controle e diferentes exposições aos contaminantes de estudo, são apresentados na figura 10.

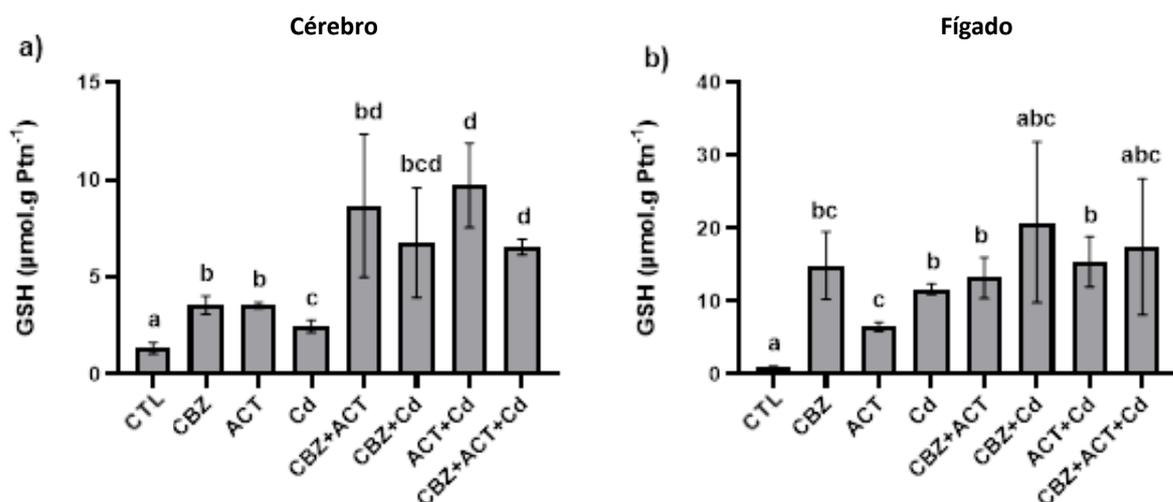


Figura 10 - Níveis do biomarcador glutathiona reduzida (GSH) nas amostras de cérebro (a) e fígado (b) de peixes expostos. Letras diferentes acima das colunas indicam significância estatística entre grupos, segundo o teste Welch ANOVA ($p \leq 0,05$) corrigido pelo teste Welch T. CTL: controle, CBZ: carbamazepina. ACT: acetamiprida, Cd: cádmio.

Os resultados observados nas análises do biomarcador glutathiona reduzida no órgão cérebro (figura 10 [a]) indicaram um aumento significativo para todas as exposições em comparação com o controle. Assim, destacaram-se os aumentos significativos no órgão cérebro referentes às exposições unitárias de CBZ e ACT (aumentos de 1,65 e de 1,62 vezes, respectivamente) e à exposição mista de ACT+Cd (aumento de 6,2 vezes). Já para o órgão fígado, destacaram-se a exposição unitária de CBZ (aumento de 13 vezes) e a exposição mista de CBZ+Cd (aumento de aproximadamente 18 vezes). Dessa forma, todas as análises do biomarcador GSH demonstraram uma tendência de aumento de sua concentração quando o organismo modelo é exposto aos contaminantes estudados, independentemente de serem exposições unitárias ou em mistura. Essa diferença entre exposições e controle, denotaria uma resposta do organismo aos contaminantes de estudo, por meio da capacidade de GSH atuar no metabolismo de eliminação de espécies reativas geradas a partir dos contaminantes, condizendo com sua esperada ação tóxica no órgão cérebro, conforme abordado

anteriormente por Liu *et al.* (2006), USP DI (2006), Valdés *et al.* (2016), Tomizawa e Casida (2005), Terayama *et al.* (2016), e no órgão fígado, abordado por Al Khalili e Murphy (2019), Almeida (2012), Miao e Metcalfe (2003), além das agências CALEPA (2000) e ATDSR (2012), com destaque para os efeitos observados na exposição unitária de CBZ neste órgão (fígado), possivelmente associada à ação de seu metabólito tóxico CBZ-EP (VALDÉS *et al.*, 2016).

Em relação à comparação entre exposições unitárias e suas respectivas misturas, as concentrações de GSH no órgão cérebro indicaram que as exposições unitárias de CBZ, ACT e Cd apresentaram um aumento quando administradas juntas. Para a exposição unitária de CBZ, embora o acréscimo de Cd (CBZ+Cd) tenha representado um aumento de 1,9 vezes, não pôde ser afirmado que este aumento tenha sido estatisticamente significativo, assim como o observado na comparação CBZ *vs.* CBZ+ACT (aumento de 1,4 vezes). No entanto, esses resultados podem ser ressaltados como uma possível tendência de aumento de GSH. De modo semelhante, o mesmo é observado nas comparações entre as exposições ACT *vs.* CBZ+ACT (aumento de 1,4 vezes) e Cd *vs.* CBZ+Cd (aumento de 1,7 vezes). Contudo, ressalta-se que as demais exposições em misturas com acetamiprida e com cádmio apresentaram aumento significativo em relação à suas respectivas exposições unitárias, com destaque para a comparação entre as exposições Cd *vs.* ACT+Cd, que apresentou um aumento de cerca de 2,9 vezes.

Dessa forma, foi observada uma tendência de interação entre os três contaminantes de estudo nas diferentes exposições mistas de duplas de contaminantes quanto ao biomarcador GSH no órgão cérebro, sugerindo um efeito aditivo para as combinações CBZ+ACT e CBZ+Cd, uma vez que as concentrações de GSH para estas exposições mistas foi semelhante à soma dos respectivos efeitos observados nas exposições unitárias de CBZ, ACT e Cd. Além disso, a interação observada na exposição ACT+Cd sugeriu um efeito sinérgico significativo, uma vez que a concentração de GSH desta exposição ($9,72 \mu\text{mol g}^{-1}$) foi maior que a soma das concentrações unitárias de acetamiprida ($3,55 \mu\text{mol g}^{-1}$) e de cádmio ($2,48 \mu\text{mol g}^{-1}$). Contudo, embora a exposição CBZ+ACT+Cd tenha apresentado uma concentração de GSH significativamente maior que a dos valores das exposições unitárias, a mesma demonstrou um valor de GSH menor que a soma das exposições unitárias dos contaminantes de estudo.

Em relação às concentrações de GSH no órgão fígado (figura 10 [b]), semelhante ao verificado para o órgão cérebro, a maioria das comparações entre exposições unitárias e suas respectivas misturas não apresentou diferença significativa, no entanto, de modo geral pode ser considerada uma tendência de aumento quando os contaminantes foram administrados de forma combinada. Destacou-se, portanto, a comparação entre as exposições ACT vs. ACT+Cd, na qual foi observada um aumento significativo na concentração de GSH. Assim, foi observada a ocorrência de interação entre os contaminantes quando combinados, culminando em uma resposta do organismo, indicada pela tendência de aumento na concentração de GSH, denotando sua ação no metabolismo de eliminação de espécies reativas relacionadas à presença de CBZ, ACT e Cd no órgão fígado.

O tiol GSH é considerado como o mais abundante antioxidante intracelular, podendo atuar tanto na eliminação de espécies reativas mais diretamente, quanto conjugando-se com estas substâncias, em uma combinação estimulada pela enzima GST, para torná-las mais solúveis em água, beneficiando a excreção e a degradação destes contaminantes (WANG *et al.*, 2017; COGO *et al.*, 2009; YAN *et al.*, 2015a, LI *et al.*, 2010). Além disso, o GSH participa como substrato em reações enzimáticas envolvendo GPx e GR. Sabendo disso, sugere-se que o aumento de concentração de GSH (apontando para um aumento da razão GSH/GSSG) estaria associado à capacidade de resposta celular ao estresse oxidativo operado por contaminantes xenobióticos (WANG *et al.*, 2017; COGO *et al.*, 2009). Dessa forma, em resumo, os resultados da figura 10 indicaram o aumento significativo nas concentrações de GSH em todas as exposições comparadas com o controle, em ambos os órgãos. Portanto, o aumento da concentração de GSH observado neste estudo, apontaria para a ocorrência de aumento da resposta celular em defesa contra espécies reativas decorrentes das diferentes exposições administradas ao organismo modelo. Ressalta-se, portanto, o trabalho de Tian *et al.* (2018), no qual foi atribuído à atuação de GSH no combate de EROs (catalisada pela GST), o motivo da tendência de aumento e do significativo aumento de GSH observados em peixes expostos por 60 dias à 0,1 mg L⁻¹ e à 0,5 mg L⁻¹ (respectivamente) do neonicotinóide imidacloprida. De modo semelhante, esse tipo de atuação conjunta de GSH e GST na fase II de biotransformação de substâncias, portanto, teria sido observado também no presente estudo em ambos os órgãos, notadamente nas exposições unitárias, uma vez que foram observados, de modo geral, aumentos da atividade de GST em paridade com os aumentos da concentração de GSH. No entanto, nas exposições mistas em ambos os órgãos (principalmente no cérebro), teria sido observada preferencialmente a atuação de GSH na

eliminação direta de espécies reativas, uma vez que estes resultados mostraram-se díspares em relação à atividade de GST (SUN *et al.*, 2007). Com isso, ressalta-se o trabalho de Sun *et al.* (2007), no qual foi observado, assim como no presente estudo, um aumento na concentração de GSH (em fígado de peixes *goldfish* exposto à 0,5 mg L⁻¹ do contaminante orgânico HC Orange N°1 por 10 dias). Segundo os autores, esse aumento estaria relacionado à capacidade de GSH atuar na defesa antioxidante do organismo contra espécies reativas de oxigênio, visando atenuar o estresse oxidativo e promover o equilíbrio intracelular. No entanto, Sun *et al.* (2007) acrescentam que situações de estresse oxidativo severas podem acarretar na diminuição dos níveis de GSH, podendo indicar danos à capacidade adaptativa do organismo (danos ao sistema antioxidante). Dessa forma, ressalta-se os trabalhos de Li *et al.* (2010) e de Zhu, Li e Zheng (2018), os quais realizaram ensaios com peixes expostos por 42 e 105 dias (respectivamente), tendo encontrado resultados de diminuição da concentração de GSH em exposições aos contaminantes CBZ (0,2 mg L⁻¹) e Cd (5 µg L⁻¹) (respectivamente), denotando que, assim como o observado na discussão dos tópicos anteriores, o fator tempo de exposição pode influenciar na produção de EROs e, logo, na resposta antioxidante do organismo. Ressalta-se que, no estudo de Li *et al.* (2010), citado acima, foi observada uma tendência de diminuição da concentração de GSH mesmo quando administrada uma exposição de 1 µg L⁻¹, nos mesmos 42 dias de exposição. Tanto Li *et al.* (2010), quanto Zhu, Li e Zheng (2018), indicaram que a diminuição da concentração de GSH observada, estaria relacionada com a quebra do balanço entre EROs e capacidade de resposta do sistema antioxidante, concordando com a afirmação de Sun *et al.* (2007) sobre estes efeitos, reportada anteriormente. Contudo, não foram encontrados estudos que confirmem a hipótese de diminuição progressiva de GSH em animais aquáticos, conforme aumento do tempo de exposição à neonicotinóides. Dessa forma, a partir da literatura apresentada acima, infere-se que efeitos semelhantes aos relatados para os demais contaminantes, seriam os esperados no caso de exposições prolongadas de animais aquáticos à ACT, conforme os efeitos de aumento na concentração de GSH à 96 horas de exposição, observado no presente estudo, para ambos os órgãos. Com isso, de modo geral, pode-se compreender que os resultados do presente estudo apontam para o aumento de EROs em decorrência das exposições aos contaminantes, culminando em uma resposta do sistema antioxidante por meio do aumento das concentrações de GSH, visando o equilíbrio redox celular e caracterizando respostas já observadas na literatura para exposições à neonicotinóides e respostas iniciais à CBZ e a Cd, em concentrações à níveis ambientais.

5.2.4. BIOMARCADOR METALOTIONEÍNA

Os resultados obtidos pela análise do biomarcador MT referentes às diferentes exposições, seguem apresentados na figura 11.

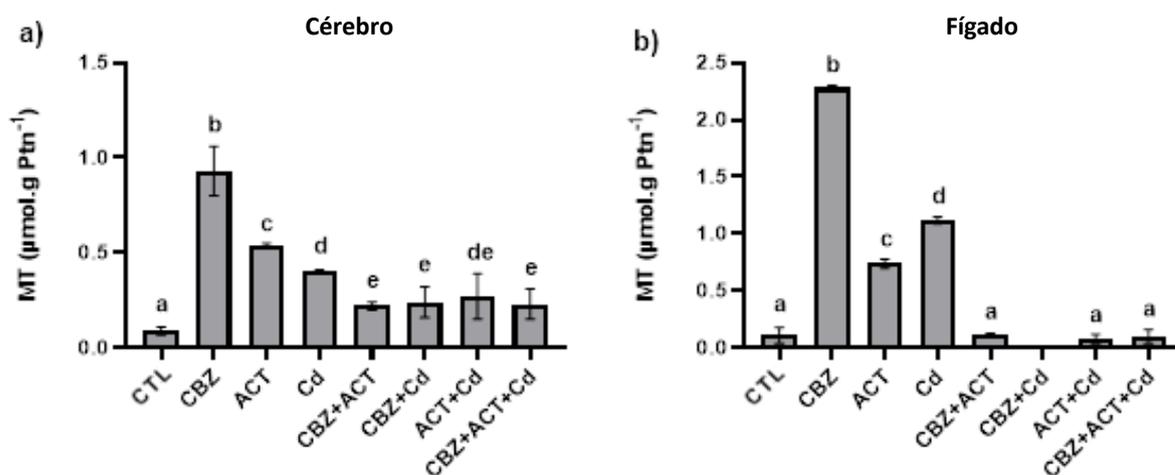


Figura 11 - Gráfico dos níveis do biomarcador metalotioneína (MT) nas amostras de cérebro (a) e fígado (b) de peixes expostos. Letras diferentes acima das colunas indicam significância estatística entre grupos, segundo o teste Welch ANOVA ($p \leq 0,05$) corrigido pelo teste Welch T. CTL: controle, CBZ: carbamazepina. ACT: acetamiprida, Cd: cádmio.

Os resultados observados nas análises da figura 11 (a) no órgão cérebro, indicaram um aumento significativo de todas as exposições unitárias em relação ao controle. Esse fato foi demonstrado pelos aumentos de 9 vezes na exposição à CBZ, 6 vezes à ACT e 3 vezes à Cd. Além disso, foram observados aumentos significativos nas exposições mistas em relação ao controle, com destaque para o aumento de 2 vezes na exposição à ACT+Cd. Dessa forma, assim como observado para os demais biomarcadores, as diferenças entre os valores de MT entre exposição e controle, estariam relacionadas ao potencial tóxico dos contaminantes de estudo nesse órgão, conforme reportado por Liu *et al.* (2006), USP DI (2006), Valdés *et al.* (2016), Tomizawa e Casida (2005) e Terayama *et al.* (2016), denotando que o aumento de MT seria uma resposta do organismo para o combate de espécies reativas decorrentes da exposição aos contaminantes. Ressalta-se também que foram observadas diminuições significativas nos resultados das exposições mistas em comparação com suas exposições unitárias, excetuando-se a comparação entre Cd vs. ACT+Cd, a qual, entretanto, apresentou

uma tendência de diminuição de MT. Assim, destaca-se a interação negativa observada entre os três contaminantes de estudo, uma vez que as concentrações observadas nas exposições mistas foram inferiores às observadas nas exposições unitárias, sugerindo uma relação antagônica entre os contaminantes.

Semelhante ao observado no órgão cérebro, os resultados da figura 11 (b) para o órgão fígado demonstraram aumentos significativos nas exposições unitárias em relação ao controle (aumento de 19 vezes para CBZ, 5,7 vezes para ACT e de 9 vezes para Cd). Destaca-se, portanto, o resultado observado na exposição unitária de carbamazepina no referido órgão, o qual possivelmente estaria relacionado à atuação do metabólito tóxico CBZ-EP, conforme já observado para os demais biomarcadores (VALDÉS *et al.*, 2016). Além disso, assim como observado para os demais biomarcadores, as diferenças entre exposições unitárias e controles denotam a esperada ação tóxica de CBZ, ACT e Cd no órgão fígado, conforme demonstrado em CALEPA (2000), ATDSR (2012), Al Khalili e Murphy (2019), Almeida (2012) e Miao e Metcalfe (2003). Em relação às exposições mistas, semelhante ao visto para o órgão cérebro, também foi observada uma possível interação antagônica quando os contaminantes são administrados juntos, porém, desta vez, por meio de valores semelhantes aos do controle.

Uma vez compreendido que o biomarcador MT exerce um papel importante no transporte e na detoxificação metálica nos organismos (e na eliminação de espécies reativas de oxigênio), o aumento de sua produção pode ser induzido por estressores ambientais como espécies reativas de oxigênio e metais (CHEN *et al.*, 2007; ZHU; LI; ZHENG; 2018). Dessa forma, os resultados apresentados da figura 11 indicaram aumento na concentração de MT nas exposições unitárias de carbamazepina, acetamiprida e cádmio em relação ao controle, sugerindo a indução de MT associada à resposta do organismo modelo à presença de espécies reativas, geradas a partir dos contaminantes CBZ, ACT e Cd, conforme apontam Banni *et al.* (2011) e Wu *et al.* (2007). No entanto, Wu *et al.* (2007) apontam que a relação entre o aumento de MT e a exposição ao Cd seria observada apenas até o ponto em que a exposição causasse efeitos deletérios ao sistema fisiológico antioxidante, denotando que estágios mais iniciais de exposição refletiriam o aumento de MT, enquanto que situações de exposições mais severas (por exemplo, exposições prolongadas), refletiriam na inibição de MT e, logo, em desequilíbrio no sistema redox celular. Assim, ressalta-se que os resultados de Wu *et al.* (2007) identificaram um efeito de dependência do fator tempo na concentração de MT, após

observar um aumento na concentração de MT em fígado de tilápias expostas à 4,45 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Cd por 5 horas, com aumentos ainda maiores à 5 e 15 dias. De modo semelhante, Zhu, Li e Zheng (2018) também identificaram um aumento significativo na concentração de MT em fígado de peixes *Danio rerio* expostos à 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cádmio por 15 semanas. Tanto Wu *et al.* (2007), quanto Zhu, Li e Zheng (2018), justificam que os aumentos na concentração de MT estariam relacionados à eliminação de Cd ou ao combate das EROs geradas por este contaminante. Já em relação aos níveis de MT associados à exposição à CBZ, Gomes *et al.* (2019), observaram uma diminuição e uma tendência de diminuição das concentrações de MT nos órgãos cérebro e fígado (respectivamente), e uma tendência de aumento no órgão rim de peixes *zebrafish* expostos por 96 horas à 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ de CBZ e do fármaco clonazepam (CZP). Segundo Gomes *et al.* (2019), a tendência de aumento de MT observada no órgão rim apontaria para a ação de excreção dos contaminantes (sobretudo CZP), indicando a possível ação de MT no sequestro de radicais livres. No entanto, observando-se os resultados de Gomes *et al.* (2019) para os órgãos cérebro e fígado, infere-se que os menores níveis de MT observados em relação ao controle, sugerem que a concentração de 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ (3 vezes maior que a utilizada no presente estudo) já seria capaz de operar efeitos de inibição da referida proteína. Sobre a relação entre CBZ e MT, destaca-se também o estudo de Contardo-Jara *et al.* (2011), que identificou uma diminuição significativa na expressão gênica de MT mRNA em guelras de mexilhões *Dreissena polymorpha* após 7 dias de exposição à 0,23 $\mu\text{g L}^{-1}$ de CBZ, indicando que estes resultados estariam relacionados ao potencial de estresse oxidativo relacionado à CBZ, provocando danos às guelras do organismo e, assim, a diminuição nos níveis de MT. Além disso, embora não tenham sido encontrados na literatura estudos que abordem níveis de MT relacionados à pesticidas neonicotinóides, destaca-se o estudo de Mosleh *et al.* (2004), que investigaram efeitos do agrotóxico Isoproturon no organismo aquático *Tubifex tubifex* exposto por 7 e 15 dias. Mosleh *et al.* (2004) identificaram aumentos significativos nos níveis de MT à 7 e também à 15 dias de exposição (porém em menor escala), indicando que a evolução da concentração de MT foi dependente do tempo de exposição e que o aumento observado teria relação com a atuação de MT no mecanismo de defesa celular contra o estresse decorrente da exposição. De modo semelhante, Paris-Palacios *et al.* (2003), em administração do pesticida procimidona (0,2 mg L^{-1}) em peixes *Rutilus rutilus*, também identificaram uma relação de MT com o aumento do tempo de exposição, traduzido em uma significativa indução de MT nos primeiros 4 dias de exposição (associada à resposta adaptativa do organismo ao estresse), seguindo-se uma

diminuição significativa após 14 dias (atribuída à danos hepáticos operados pelo contaminante).

As hipóteses de resposta do organismo para o combate de EROs decorrentes das exposições aos contaminantes de estudo e de eliminação do metal Cd mais diretamente, destacadas pela literatura apresentada, explicariam o aumento de MT observado no presente estudo. E ainda, denotam que, em uma situação de contaminação no ambiente natural, os níveis de MT no organismo de estudo, poderiam apresentar aumento para conter as cargas de estresse acarretadas pelos contaminantes. Porém, com o prolongamento do tempo de exposição (ou aumento da concentração dos contaminantes), seriam observados aumentos da carga de estresse, podendo acarretar em danos ao sistema antioxidante, resultando em diminuições nos níveis de MT, apontando para o estresse oxidativo e o desequilíbrio redox celular (WU *et al.*, 2007). Além disso, os níveis de MT nas exposições em misturas no órgão fígado, sugeriram uma eficiência adaptativa do organismo aos contaminantes combinados, no entanto, os níveis de MT significativamente maiores que o controle, observados no órgão cérebro, alertam para a possibilidade de que os contaminantes de estudo na concentração aplicada, seriam capazes de produzir danos oxidativos neste órgão conforme prolongamento do tempo de exposição.

5.2.5. ANÁLISES DOS NÍVEIS DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Os resultados das análises dos níveis de peroxidação lipídica pelo biomarcador malondialdeído nas diferentes exposições, são apresentados na figura 12.

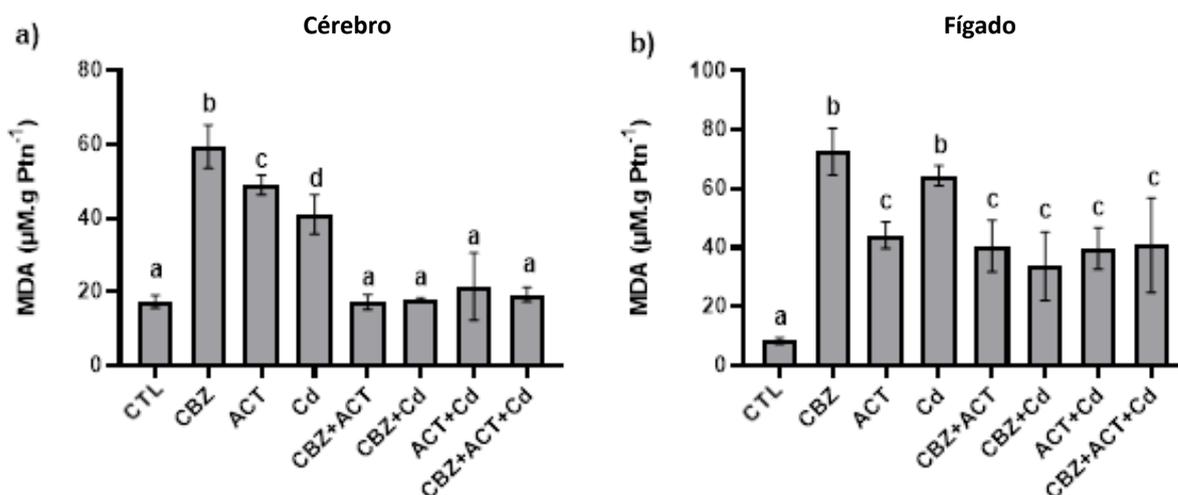


Figura 12 - Gráfico dos níveis do biomarcador malondialdeído (MDA) nas amostras de cérebro e fígado de peixes expostos. Letras diferentes acima das colunas indicam significância estatística entre grupos, segundo o teste Welch ANOVA ($p \leq 0,05$) corrigido pelo teste Welch T. CTL: controle, CBZ: carbamazepina. ACT: acetamiprida, Cd: cádmio.

Os resultados da figura 12 (a) para o órgão cérebro mostraram um aumento significativo na concentração do biomarcador MDA nas exposições unitárias dos contaminantes em relação ao controle, indicando aumentos de 1,3 vezes para o contaminante Cd, 1,8 vezes para ACT e, em destaque, o aumento de 2,4 vezes para CBZ. Esses resultados, portanto, condizem com a já esperada ação tóxica dos contaminantes de estudo no referido órgão, conforme indicado por Liu *et al.* (2006), USP DI (2006), Valdés *et al.* (2016), Tomizawa e Casida (2005) e Terayama *et al.* (2016), indicando que os maiores níveis de MDA em relação ao controle teriam relação com o aumento da produção deste biomarcador pela ocorrência de níveis de peroxidação lipídica decorrente da exposição aos contaminantes. No entanto, ressalta-se que os valores de MDA para as exposições mistas não apresentaram significância estatística quando comparados com o controle.

Nos resultados referentes ao órgão fígado, foi observado um aumento da concentração do biomarcador MDA em todas as exposições em relação ao controle (valores estatisticamente significativos em todos os casos), com destaque para a exposição unitária de CBZ (aumento de aproximadamente 7,50 vezes). Assim, semelhante ao observado no órgão cérebro, esses resultados condizem com o já esperado efeito tóxico dos contaminantes de estudo no órgão fígado, e assim, estariam relacionados à ocorrência de peroxidação lipídica resultante da exposição aos contaminantes de estudo (CALEPA, 2000; ATDSR (2012); Al Khalili e Murphy (2019); ALMEIDA, 2012; MIAO, METCALFE, 2003). Em relação a isso, destaca-se sobretudo o maior nível de MDA reportado, observado na exposição à CBZ, possivelmente relacionado com a atuação de seu metabólito tóxico CBZ-EP (VALDÉS *et al.*, 2016; CALEPA, 2000; ATDSR, 2012); Al Khalili e Murphy (2019); ALMEIDA, 2012; MIAO, METCALFE, 2003). Embora tenha sido observado que os resultados de MDA para as exposições mistas tenham sido significativamente maiores que o controle, sugerindo a ocorrência de peroxidação lipídica decorrente das exposições, ressalta-se que estas, entretanto, apresentaram concentrações significativamente abaixo ou semelhantes às observadas em suas respectivas exposições unitárias.

Assim, sabendo-se que o biomarcador MDA é um dos principais produtos da peroxidação lipídica, sua concentração, determinada pelo método TBARS (*thiobarbituric acid reactive substances*), está relacionada com os níveis de peroxidação lipídica no organismo, a qual vem sendo considerada o principal agente causador de danos em células sob stress oxidativo (BARTOSKOVA *et al.*, 2014; GE *et al.*, 2015). Dessa forma, os resultados apresentados para ambos os órgãos indicaram aumento nas concentrações de MDA nas exposições unitárias de CBZ, ACT e Cd em relação ao controle, apontando, portanto, para a ocorrência de estresse oxidativo associado à peroxidação lipídica nos tecidos do organismo modelo (neste caso, principalmente no órgão fígado), podendo acarretar em danos à funções celulares (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). De modo semelhante, no estudo realizado por Li *et al.* (2010), foi observada uma tendência de aumento após 21 dias de exposição e um aumento significativo nos níveis de peroxidação lipídica (pelo método TBARS) após 42 dias de exposição, em análises de cérebro de trutas da espécie *Oncorhynchus mykiss* expostas à 0,2 mg L⁻¹ de carbamazepina. Li *et al.* (2010) compararam seus resultados de TBARS com os de atividade enzimática nos organismos testados, tendo encontrado de modo geral, um aumento na atividade enzimática (CAT, SOD, GPx) nos primeiros 7 dias de exposição (relacionando à resposta do sistema antioxidante à exposição),

seguindo-se uma tendência de diminuição aos 21 dias e de uma inibição aos 42 dias. Segundo os autores, essas inibições de atividade enzimática possivelmente relacionam-se com o aumento nos níveis de peroxidação lipídica, que teria comprometido o sistema de defesa celular. Portanto, estima-se que caso fosse aplicado um maior tempo de exposição do contaminante CBZ no presente estudo, seriam esperados resultados semelhantes aos de Li *et al.* (2010), com um gradativo comprometimento do sistema antioxidante e um aumento da peroxidação lipídica.

Além disso, destaca-se também o estudo de Topal *et al.* (2017), no qual foi constatado o aumento significativo dos níveis de MDA (juntamente com o das enzimas SOD, CAT e GPx) no cérebro de trutas expostas por 21 dias à 5 mg L⁻¹ do neonicotinóide imidacloprida, indicando a ocorrência de peroxidação lipídica e de uma resposta do sistema antioxidante do organismo visando eliminar as EROs decorrentes da exposição ao contaminante. De modo semelhante, Banni *et al.* (2011) também observaram um aumento significativo na concentração de MDA, porém, acompanhado da inibição significativa dos níveis de enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx), em fígado de peixes *Danio rerio* expostos à 0,4 mg L⁻¹ de Cd por 21 dias, relacionando tanto o aumento de MDA, quanto a inibição da atividade enzimática, à atuação tóxica do contaminante Cd. Dessa forma, uma vez observados no presente estudo menores níveis de MDA na exposição unitária de ACT em comparação com as exposições unitárias CBZ e de Cd no órgão fígado (também observado nos demais biomarcadores), foram inferidas duas hipóteses para este fato. A primeira hipótese é a de menor toxicidade de contaminantes neonicotinóides em relação às demais exposições unitárias utilizadas, por uma maior eficácia do referido órgão na desintoxicação deste contaminante e a segunda hipótese é a de uma menor sensibilidade, associada ao órgão fígado, à esta família de contaminantes (GE *et al.*, 2015). Destaca-se também, que os menores valores de MDA para a exposição unitária de Cd no órgão cérebro (também observado para os demais biomarcadores), refletiria uma maior sensibilidade do referido órgão aos contaminantes CBZ e ACT, uma vez que este é considerado seu órgão alvo primário de atuação (LIU *et al.*, 2006; USP DI, 2006; TOMIZAWA; CASIDA, 2005).

Destaca-se também a relação de dependência entre o fator tempo de exposição e o aumento de MDA, indicada por Zheng *et al.* (2016b) em relação ao contaminante Cd. Assim, Zheng *et al.* (2016b) constatou uma tendência de aumento nos níveis de MDA já nas primeiras 24 horas e um aumento significativo após 96 horas de exposição à 1 mg L⁻¹ de Cd,

em cérebro e em fígado de peixes zebrafish, explicando que estes resultados teriam relação com a geração de excesso de EROs pelo contaminante Cd, provocando a peroxidação lipídica.

Uma vez observada a literatura apresentada, bem como os níveis de MDA e dos demais biomarcadores (acima dos observados no controle nas exposições unitárias), ressalta-se a hipótese de que os resultados de exposição por 96 horas aplicadas no presente estudo, sugeririam um estágio intermediário entre o processo de diminuição dos biomarcadores e aumento da peroxidação lipídica. Assim, maiores tempos de exposição sob concentrações subletais dos contaminantes de estudo, conforme o cenário ambiental, poderiam acarretar em aumento na geração de EROs, resultando no aumento na peroxidação lipídica.

Já em relação às exposições mistas, foram observados níveis de MDA acima dos contatados no controle, apenas nas exposições para o órgão fígado, denotando a ocorrência de peroxidação lipídica, porém de modo atenuado em relação às exposições unitárias dos contaminantes. Apesar da já relatada carência de estudos na literatura com exposições mistas relacionadas à ambientes aquáticos, destaca-se o estudo de Almeida *et al.* (2018), no qual foi observado que ameijoas da espécie *Ruditapes philippinarum*, expostas por 28 dias à combinação de Cd ($0,5 \mu\text{g L}^{-1}$) com CBZ ($1,0 \mu\text{g L}^{-1}$), apresentaram menores valores de peroxidação lipídica em comparação com a exposição unitária à Cd ($0,5 \mu\text{g L}^{-1}$), assemelhando-se ao resultados observados no presente estudo. Os autores explicam que a presença do metal teria atenuado o efeito da CBZ. Além disso, ressalta-se que a diminuição nos níveis de peroxidação lipídica na exposição combinada de CBZ+Cd, observados no estudo de Almeida *et al.* (2018), poderiam estar relacionados ao aumento nos níveis de GST, que possui a capacidade de atuar amenizando a peroxidação lipídica celular (YAN *et al.*, 2015a). Assim, infere-se que efeitos semelhantes aos observados por Almeida *et al.* (2018), teriam influenciado os resultados do presente estudo para as exposições mistas, podendo ter ocorrido atenuação dos efeitos da CBZ quando em conjunto com o metal Cd. Além disso, ressalta-se a hipótese de eficácia do sistema antioxidante no combate às EROs geradas a partir dos contaminantes de estudo, sobretudo associada aos níveis de GSH, maiores que os observados no controle e, ainda, à possível atuação protetiva por enzimas antioxidantes não analisadas, como SOD e GPx.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo avaliou, por meio de biomarcadores de estresse oxidativo, os efeitos subletais observados no organismo modelo *Danio rerio* exposto à carbamazepina, acetamiprida e cádmio (concentrações na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$) em sistemas unitários e em misturas. As análises dos diferentes biomarcadores (GST, CAT, GSH, MT e MDA) para exposições unitárias e misturas dos contaminantes, demonstraram, de modo geral, alterações nos níveis de todos os biomarcadores estudados, nos órgãos cérebro e fígado. Dessa forma, alerta-se para a possibilidade de quebra da homeostase dos organismos, associada ao aumento das espécies reativas de oxigênio (estresse oxidativo), demonstrada pela ocorrência de peroxidação lipídica. Além disso, excetuando-se os resultados de GSH, que sugeriram por vezes interações potenciais e aditivas nos efeitos das combinações de contaminantes, destaca-se que os demais biomarcadores apresentaram resultados para exposições em mistura menores que a soma dos respectivos resultados de exposição unitária, sugerindo uma interação antagônica entre os contaminantes para GST, CAT, MT e MDA.

Ressalta-se que os resultados das exposições unitárias de CBZ resultaram nos maiores efeitos de resposta dos diferentes biomarcadores (CAT, GST, GSH, MT e MDA), sugerindo que este contaminante ambiental teria sido o mais nocivo dentre os três. Uma vez que essa resposta para CBZ foi observada principalmente para órgão fígado, infere-se que os efeitos deste contaminante teriam sido agravados pela atuação do metabólito tóxico CBZ-EP formado no referido órgão. Por outro lado, o contaminante ACT foi o que apresentou os menores níveis de respostas dos biomarcadores para órgão fígado, possivelmente relacionados à uma menor sensibilidade do órgão em relação a este contaminante, já reportada pela literatura, sobretudo quanto à atividade da enzima CAT. No entanto, ressalta-se que, para as exposições no órgão cérebro, o contaminante Cd foi o que apresentou menores valores de resposta dos biomarcadores de estudo, possivelmente devido à maior sensibilidade deste órgão aos contaminantes CBZ e ACT, uma vez ser este seu órgão alvo de atuação. Ressalta-se também que, os resultados do presente estudo indicaram que a contaminação com Cd na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$, concentração 8 vezes menor que o permitido para lançamento de efluentes pela Norma CONAMA 430/11, é capaz de causar alterações no sistema antioxidante, resultando em peroxidação lipídica, alertando para a permissividade legislativa na liberação desse contaminante no ambiente em níveis comprovadamente

danosos para organismos aquáticos. Por fim, os níveis de peroxidação lipídica observados em conjunto com níveis de biomarcadores, significativamente superiores aos de controles, sugeriu que o cenário de uma contaminação por 96 horas aos contaminantes de estudo na concentração utilizada, teria indicado em estágio intermediário dos efeitos tóxicos das substâncias, apontando que em maiores tempos de exposição, seriam observados danos ao sistema antioxidante do organismo, podendo causar a inibição dos biomarcadores CAT, GST, GSH e MT, e níveis ainda maiores de peroxidação lipídica.

Assim, uma vez sugerida a ocorrência de estresse oxidativo associado à concentração ambiental dos contaminantes emergentes estudados, alerta-se para a possibilidade de os mesmos efeitos serem observados em situações semelhantes no ambiente natural em organismos não alvo, sobretudo pela persistência associada a estes contaminantes. Além disso, alerta-se para a necessidade de novos estudos de investigação desses contaminantes e de seus efeitos, sobretudo combinados com contaminantes já regulamentados, para aumento do conhecimento de seus reais efeitos aos organismos não alvo e ao meio ambiente natural e, assim, podendo influenciar positivamente na elaboração de leis mais restritivas quanto a contaminantes que podem afetar aspectos de saúde pública.

7. RECOMENDAÇÕES FUTURAS

Uma vez compreendida a importância dos avanços nos estudos dos efeitos de contaminantes emergentes à concentrações ambientais, sobretudo com uma abordagem que engloba diferentes combinações de contaminantes, ressalta-se a necessidade de novos estudos para aprofundamento compreensão da problemática de saúde pública. Assim, são recomendadas novas investigações que permitam, por exemplo, ampliar o entendimento dos efeitos não letais dos contaminantes de estudo por meio da análise dos biomarcadores acetilcolinesterase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase e glutathione oxidada. Além disso, sobretudo, são recomendadas avaliações dos efeitos destes contaminantes administrados sob a forma de exposições crônicas, permitindo observações ainda mais realistas sobre seus potenciais efeitos tóxicos à concentrações ambientais.

8. REFERÊNCIAS

AEBI, H. Oxygen Radicals in Biological Systems. *Methods in Enzymology* v. 105, p. 121–126, 1984.

AL KHALILI, Y.; MURPHY P. B. Carbamazepine Toxicity. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Publicado em: jan 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507852/>>. Acessado em: fev. 2019.

ALCÂNTARA, I. L. *et al.* Determination of River Water Samples by Flame AAS after On-line Preconcentration in Mini- Column Packed with 2-Aminothiozole-modified Silica Gel. v. 20 2004. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/analsci/20/7/20_7_1029/_pdf>.

AL-HADITHI, N.; SAAD, B.; GROTE, M.. A solid bar microextraction method for the liquid chromatographic determination of trace diclofenac, ibuprofen and carbamazepine in river water. *Microchimica Acta* v. 172, n. 1–2, p. 31–37, 2011.

ALMEIDA, Â. *et al.* Effects of single and combined exposure of pharmaceutical drugs (carbamazepine and cetirizine) and a metal (cadmium) on the biochemical responses of *R. philippinarum*. *Aquatic Toxicology*, v. 198, p. 10–19, 2018.

ALMEIDA, Â. *et al.* Presence of the pharmaceutical drug carbamazepine in coastal systems: Effects on bivalves. *Aquatic Toxicology* v. 156, p. 74–87, 2014.

ALMEIDA, C. A. A. Identificação e determinação de fármacos ansiolíticos e antiepiléticos e seus metabólitos em efluente hospitalar. Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil, 2012. Disponível em: <<http://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/4242/ALMEIDA%2c%20CARLOS%20ALBERTO%20ARAUJO%20DE.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>.

AMERICAN BYRD CONSERVANCY. The Impact of the Nation's Most Widely Used Insecticides on Birds. USA, 2013.

ANDERSON, T. A. *et al.* Effects of landuse and precipitation on pesticides and water quality in playa lakes of the southern high plains. *Chemosphere* v. 92, n. 1, p. 84–90, 2013.

ANVISA. Anuário estatístico do mercado farmacêutico – 2016. Brasil, 2017b.

ANVISA. Carbamazepina. Brasil, 2017c. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=17530232016&pIdAnexo=3477659>.

ANVISA. Índice Monográfico A29 - Acetamiprido. Brasil, 2017a.

APHA/AWWA/WEF. Standard methods for the examination of water and wastewater. 23^a ed.: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. EUA, 2017.

ARMILIATO, N.. Toxicidade celular e bioquímica do glifosato sobre ovários de peixe *Danio rerio*. 2014.

ATDSR. Toxicological Profile for Cadmium., 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK158838/pdf/Bookshelf_NBK158838.pdf>.

BABIĆ, S. *et al.* Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* v. 26, n. 11, p. 1043–1061, 2007.

BANNI, M. *et al.* Mechanisms underlying the protective effect of zinc and selenium against cadmium-induced oxidative stress in zebrafish *Danio rerio*. *BioMetals*, v. 24, n. 6, p. 981–992, 2011.

BARBOSA, K. B. F. Biomarcadores do estresse oxidativo e determinantes da síndrome metabólica em adultos jovens saudáveis. Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de Doutor Scientiae. Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil, 2010.

BARBOSA, M. R. *et al.* Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. *Ciência Rural* v. 44, n. 3, 2014.

BARTOSKOVA, M. *et al.* Norfloxacin—Toxicity for Zebrafish (*Danio rerio*) Focused on Oxidative Stress Parameters. *BioMed Research International*, v. 2014, p. 1–6, 2014.

BENDER, K. J. S. Avaliação do potencial neuroprotetor de fármacos antipsicóticos em alterações bioquímicas, moleculares e comportamentais induzidas por antagonista de receptor NMDA (MK-801) em peixe zebra (*Danio rerio*). Tese apresentada como requisito para obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Brasil, 2011.

BENDZ, D. *et al.* Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Høje River in Sweden. *Journal of Hazardous Materials* v. 122, n. 3, p. 195–204, 2005.

BENSON, R. *et al.* Human health screening and public health significance of contaminants of emerging concern detected in public water supplies. *Science of the Total Environment* 579, 1643–1648, 2017.

BRASIL, CONAMA 23/96. Definições e o tratamento a ser dado aos resíduos perigosos, conforme as normas adotadas pela Convenção da Basileia sobre o controle de Movimentos Transfronteiriços de Resíduos perigosos e seu Depósito. Brasil, 1996.

BRASIL, CONAMA 430/11. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes. Brasil, 2011.

BRASIL, ABNT NBR 15088/16. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes (*Cyprinidae*). Ed.: 3^a. Edição. Brasil, 2016.

BRASIL, CONAMA 420/09. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Brasil, 2009.

CALCAGNO, E. *et al.* Effects of carbamazepine on cortisol levels and behavioral responses to stress in the fish *Jenynsia multidentata*. *Physiology & Behavior* v. 158, p. 68–75, 2016.

CALEPA - California Environmental Protection Agency / Department of Pesticide Regulation; Summary of toxicology data Acetamiprid. EUA, 2000.

- CARBALLAL, Sebastián *et al.* Sulfenic Acid Formation in Human Serum Albumin by Hydrogen Peroxide and Peroxynitrite. *Biochemistry* v. 42, n. 33, p. 9906–9914, 2003.
- CARBO, L. *et al.* Determination of pesticides multiresidues in shallow groundwater in a cotton-growing region of Mato Grosso, Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society* v. 19, n. 6, p. 1111–1117, 2008.
- CARLOS, L. *et al.* Photochemical fate of a mixture of emerging pollutants in the presence of humic substances. *Water Research* v. 46, n. 15, p. 4732–4740, 2012.
- CASTIGLIONI, S. *et al.* A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters. *Journal of Chromatography A* v. 1092, n. 2, p. 206–215, 2005.
- CEDERGREEN, N.. Quantifying Synergy: A Systematic Review of Mixture Toxicity Studies within Environmental Toxicology. *PLoS ONE* v. 9, n. 5, p. e96580, 2014.
- CHEN, H. *et al.* Carbamazepine disrupts molting hormone signaling and inhibits molting and growth of *Eriocheir sinensis* at environmentally relevant concentrations. *Aquatic Toxicology*, v. 208, p. 138–145, 2019.
- CHEN, W. Y. *et al.* Expression pattern of metallothionein, MTF-1 nuclear translocation, and its dna-binding activity in zebrafish (*danio rerio*) induced by zinc and cadmium. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 26, n. 1, p. 110, 2007.
- CHIARELLO, M. *et al.* Determinação de agrotóxicos na água e sedimentos por HPLC-HRMS e sua relação com o uso e a ocupação do solo. *Química Nova*, 2016. Disponível em: <http://quimicanova.sbq.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=6536&nomeArquivo=AR20160314.pdf>. Acessado em: nov. 2017.
- COGO, A. J. D. *et al.* Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. *Natureza on line* v. 7, n. 1, p. 37–42, 2009.
- CORBI, J. J. *et al.* Diagnóstico ambiental de metais e organoclorados em córregos adjacentes a áreas de cultivo de cana-de-açúcar (Estado de São Paulo, Brasil). *Química Nova* p. 61–65, 2006.

COSTA, C. R. *et al.* A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química Nova* v. 31, n. 7, p. 1820–1830, 2008.

COTINGUIBA, G. G. *et al.* Método de avaliação da defesa antioxidante: uma revisão de literatura. *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde* v. 15, n. 3, 2013.

DAMASCENO, E. P. Toxicidade, toxicocinética e bioacumulação de cádmio e mercúrio nos microcrustáceos marinhos *Artemia sp.* e *Mysidopsis juniae*. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Marinhas Tropicais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Marinhas Tropicais - Área de concentração: Análise de impactos ambientais da região costeira. Universidade Federal do Ceará. Brasil, 2016.

DEMIR, V. *et al.* Determination and health risk assessment of heavy metals in drinking water of Tunceli, Turkey. *Water Resources* v. 42, n. 4, p. 508–516, 2015.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics* v. 82, n. 1, p. 70–77, 1959.

ERK, M. *et al.* Evaluation of different purification procedures for the electrochemical quantification of mussel metallothioneins. *Talanta* v. 57, n. 6, p. 1211–1218, 2002.

FARRÉ, M. L. *et al.* Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* v. 27, n. 11, p. 991–1007, 2008.

FERREIRA, D. Parâmetros de estresse oxidativo e estudo de lesões histopatológicas em Jundiás (*Rhmdia quelen*) expostos a agroquímicos. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Maria. Universidade Federal de Santa Maria. Brasil, 2010.

GALUS, M. *et al.* Effects of chronic, parental pharmaceutical exposure on zebrafish (*Danio rerio*) offspring. *Aquatic Toxicology*, v. 151, p. 124–134, 2014.

GE, W. *et al.* Oxidative Stress and DNA Damage Induced by Imidacloprid in Zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 63, n. 6, p. 1856–1862, 2015.

GOMES, T. B. *et al.* Sublethal psychotropic pharmaceutical effects on the model organism *Danio rerio*: Oxidative stress and metal dishomeostasis. *Ecotoxicology and Environmental Safety* v. 171, p. 781–789, 2019.

GOMIS, J. *et al.* Waste sourced bio-based substances for solar-driven wastewater remediation: Photodegradation of emerging pollutants. *Chemical Engineering Journal* v. 235, p. 236–243, 2014.

GOUVEA, L. R. Recuperação de zinco, cádmio e cobre de licores sulfúricos provenientes de resíduos industriais da metalurgia Extrativa do zinco. Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear. Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, Belo Horizonte. Brasil, 2008.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. Free Radicals in Biology and Medicine. *Nova York: Oxford University Press*: 851 p. v. 1. 2007.

HAMMILL, K. M. *et al.* The effects of parental carbamazepine and gemfibrozil exposure on sexual differentiation in zebrafish (*Danio rerio*): Parental drug exposure alters sexual differentiation in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 37, n. 6, p. 1696–1706, 2018.

HEFFERN, K.; TIERNEY, K.; GALLAGHER, E. P. Comparative effects of cadmium, zinc, arsenic and chromium on olfactory-mediated neurobehavior and gene expression in larval zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, v. 201, p. 83–90, 2018.

IARC. Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1–119. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php>. , out. 2017

IBGE. Vazante - Panorama. Censo Demográfico de 2010. Brasil, 2019. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/mg/vazante/panorama>>. Acessado em jan. 2019.

IGANSI, G. N. Efeito da exposição ao cádmio sobre dano oxidativo, morte celular e comportamento de zebrafish. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Brasil, 2012.

JIN, Y. *et al.* Embryonic exposure to cadmium (II) and chromium (VI) induce behavioral alterations, oxidative stress and immunotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicology and Teratology*, v. 48, p. 9–17, 2015.

KÄGI, J. H. R. Overview of metallothionein. *Methods in enzymology* v. 205 p. 613–626, 1991.

KOSJEK, T. *et al.* Mass spectrometry for identifying pharmaceutical biotransformation products in the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* v. 26, n. 11, p. 1076–1085, 2007.

LATTUADA, R. M. *et al.* Determination of metals by total reflection X-ray fluorescence and evaluation of toxicity of a river impacted by coal mining in the south of Brazil. *Journal of Hazardous Materials* v. 163, n. 2–3, p. 531–537, 2009.

LAWRENCE, C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture* v. 269, n. 1–4, p. 1–20, 2007.

LECLERCQ, M. *et al.* Presence and Fate of Carbamazepine, Oxcarbazepine, and Seven of Their Metabolites at Wastewater Treatment Plants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* v. 56, n. 3, p. 408–415, 2009.

LEFCORT, H. *et al.* Indirect Effects of Heavy Metals on Parasites May Cause Shifts in Snail Species Compositions. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* v. 43, n. 1, p. 34–41, 2002.

LEME, C. V. D. *et al.* GSTM1 and GSTT1 genes analysis in head and neck cancer patients. *Revista da Associação Médica Brasileira* v. 56, n. 3, p. 299–303, 2010.

LI, Z. H. *et al.* Acute toxicity of carbamazepine to juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on antioxidant responses, hematological parameters and hepatic EROD. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 74, n. 3, p. 319–327, 2011.

LI, Z. H. *et al.* Modulation of antioxidant defence system in brain of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after chronic carbamazepine treatment. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* v. 151, n. 1, p. 137–141, 2010.

- LINDOLFO, N. S. O impacto ambiental decorrente do processo industrial na área e nos arredores da companhia mercantil e industrial Ingá da Ilha da Madeira (município de Itaguaí, RJ). *Khóra: Revista Transdisciplinar* v. 2, n. 2, 2015.
- LIU, L. *et al.* The mechanism of carbamazepine aggravation of absence seizures. *J Pharmacol Exp Ther* v. 319 (2) p. 790-8, 2006.
- LOOS, R.; LOCORO, G.; CONTINI, S. Occurrence of polar organic contaminants in the dissolved water phase of the Danube River and its major tributaries using SPE-LC-MS2 analysis. *Water Research* v. 44, n. 7, p. 2325–2335, 2010.
- MA, R. *et al.* Characterization of pharmaceutically active compounds in Dongting Lake, China: Occurrence, chiral profiling and environmental risk. *Science of The Total Environment* v. 557–558, p. 268–275, 2016.
- MAGNA, Gustavo Alonso Muñoz *et al.* Avaliação da exposição ao Pb e Cd em crianças de 0 a 17 anos por consumo de alimentos vegetais cultivados em solos contaminados no município de Santo Amaro (BA). *Engenharia Sanitaria e Ambiental* v. 19, p. 3–12, 2014.
- MAIN, A. R. *et al.* Widespread Use and Frequent Detection of Neonicotinoid Insecticides in Wetlands of Canada's Prairie Pothole Region. *PLoS ONE* v. 9, n. 3, p. e92821, 2014.
- MASSARSKY, A.; KOZAL, J. S.; DI GIULIO, R. T. Glutathione and zebrafish: Old assays to address a current issue. *Chemosphere* v. 168, p. 707–715, 2017.
- MATAMOROS, V.; SALVADÓ, V. Evaluation of the seasonal performance of a water reclamation pond-constructed wetland system for removing emerging contaminants. *Analytical Chemistry*, v. 75, n. 15, 2003.
- MIAO, X.; METCALFE, C. D. Determination of Carbamazepine and Its Metabolites in Aqueous Samples Using Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Chemosphere* v. 86, n. 2, p. 111–117, 2012
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano. 978-85-334-1240-8. Brasil, 2006.

MMA - Ministério do Meio Ambiente. Patrimônio natural da humanidade, Pantanal guarda biodiversidade única. Notícia publicada em 14 out. 2010. Brasil, 2019. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/informma/item/6622-patrimonio-natural-da-humanidade-pantanal-guarda-biodiversidade-unica>>. Acessado em jan. 2019.

MOSIALOU, E. Microsomal Glutathione Transferase and Oxidative Stress. Dissertação de Pós-Doutorado – Institute of Environmental Medicine, Division of Toxicology, Estocolomo, Suécia, 1993. Disponível em: <<https://elibrary.ru/item.asp?id=6863693>>.

MOSLEH, Y. Y. *et al.* Metallothionein induction in aquatic oligochaete *Tubifex tubifex* exposed to herbicide isoproturon. *Environmental Toxicology*, v. 19, n. 1, p. 88–93, 2004.

MPF - MINISTÉRIO PÚBLICO FEDERAL. MPF quer fim da mineração de zinco em Vazante/MG. Notícia publicada em 21 nov. 2008. Brasil, 2019. Disponível em: <<http://www.prmg.mpf.mp.br/imprensa/noticias/meio-ambiente/mpf-quer-fim-da-mineracao-de-zinco-em-vazante-mg>>. Acessado em jan. 2019.

PAL, A. *et al.* Emerging contaminants of public health significance as water quality indicator compounds in the urban water cycle. *Environment International* v. 71, p. 46–62, 2014.

PARIS-PALACIOS, S.; BIAGIANTI-RISBOURG, S.; VERNET, G. Metallothionein induction related to hepatic structural perturbations and antioxidative defences in roach (*Rutilus rutilus*) exposed to the fungicide procymidone. *Biomarkers*, v. 8, n. 2, p. 128–141, 2003.

PETERSON, G. L. A Simplification of the Protein Assay Method of Lowry *et al.* Which is More Generally Applicable. *Analytical Biochemistry* v. 83, p. 346-356, 1977.

PIRES, E. P. Toxicidade de Hydroxymethylfurfural e Thiamethoxam para *Apis mellifera Linnaeus*, 1758 (Hymenoptera: Apidae). Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras no programa de Pós-Graduação em Agronomia/Entomologia, área de concentração em Entomologia Agrícola. Universidade Federal de Lavras, Lavras. Brasil, 2013.

PUBCHEM. Carbamazepine. 2017. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/carbamazepine#section=Vapor-Pressure>>. Acessado em: 13 nov. 2017.

QIANG, Liyuan *et al.* Environmental concentration of carbamazepine accelerates fish embryonic development and disturbs larvae behavior. *Ecotoxicology* v. 25, n. 7, p. 1426–1437, 2016.

RADOVIĆ, T. *et al.* Determination of pharmaceuticals and pesticides in river sediments and corresponding surface and ground water in the Danube River and tributaries in Serbia. *Environ Monit Assess* v. 187, n. 4092, 2015.

RANA, S. V. S.; VERMA, S. Protective effects of GSH, vitamin E, and selenium on lipid peroxidation in cadmium-fed rats. *Biological Trace Element Research* v. 51, 1996.

REISCHL, E. *et al.* Distribution, adaptation and physiological meaning of thiols from vertebrate hemoglobins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, v. 146, p. 22–53, 2007.

RIBEIRO, S. M. R. *et al.* A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. *Bioscience jornal*, v. 21, n. 3, 2005.

RIBEIRO, A. C. A. *et al.* Pesticide residues in surface waters at the headwaters of São Lourenço River-MT, Brazil: validation of a method using solid-phase extraction and liquid chromatography. *Química Nova* v. 36, n. 2, p. 284–290, 2013.

RODRIGUES, I. L. P. Metalotioneínas como biomarcadores de poluição por metais-traços em corpos d'água utilizando Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758) como organismos-teste. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Biomonitoramento, do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia, como requisito final para obtenção do Título de Mestre em Ecologia e Biomonitoramento. Universidade Federal da Bahia, Salvador. Brasil, 2007.

SADARIA, A. M.; SUPOWIT, S. D.; HALDEN, R. U. Mass Balance Assessment for Six Neonicotinoid Insecticides During Conventional Wastewater and Wetland Treatment: Nationwide Reconnaissance in United States Wastewater. *Environmental Science & Technology* v. 50, n. 12, p. 6199–6206, 2016.

SANCHES, S. M. *et al.* Quality of public water supply of Ribeirão Preto in the Guarani aquifer area: metals and nitrate analyses. *Ambiente e Água. An Interdisciplinary Journal of Applied Science* v. 5, n. 2, p. 202–216, 2010.

SANTOS, L. H. M. L. M. *et al.* Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials* v. 175, n. 1–3, p. 45–95, 2010.

SANTOS, N. *et al.* Chronic effects of carbamazepine on zebrafish: Behavioral, reproductive and biochemical endpoints. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 164, p. 297–304, 2018.

SARKAR, S. *et al.* Low dose of arsenic trioxide triggers oxidative stress in zebrafish brain: Expression of antioxidant genes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 107, 1–8, 2014.

SEIBT, K. J. Influência de fármacos antipsicóticos sobre a hidrólise de nucleotídeos extracelulares e acetilcolina em cérebro de zebrafish (*Danio rerio*). Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Brasil, 2009.

SHIHOMATSU, H. M. Desenvolvimento e validação de metodologia SPE-LC-MS para a determinação de fármacos e droga de abuso nas águas da represa Guarapiranga - São Paulo / SP, Brasil Tese apresentada para o Grau de Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Autarquia Associada à Universidade de São Paulo, São Paulo. Brasil, 2015.

SIES, Helmut; MOSS, Karen M. A role of mitochondrial glutathione peroxidase in modulating mitochondrial oxidations in liver. *The FEBS Journal* v. 84, n. 2, p. 377–383, 1978.

SIMONIAN, N. A.; COYLE, J. T. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* V. 36, p. 83-106, 1996.

STANLEY, J. K. *et al.* Enantiospecific sublethal effects of the antidepressant fluoxetine to a model aquatic vertebrate and invertebrate. *Chemosphere* v. 69, n. 1, p. 9–16, 2007.

STARNER, K.; GOH, K. S. Detections of the Neonicotinoid Insecticide Imidacloprid in Surface Waters of Three Agricultural Regions of California, USA, 2010–2011. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* v. 88, n. 3, p. 316–321, 2012.

SUN, S. P.; ZENG, X.; LEMLEY, A. T. Nano-magnetite catalyzed heterogeneous Fenton-like degradation of emerging contaminants carbamazepine and ibuprofen in aqueous suspensions and montmorillonite clay slurries at neutral pH. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* v. 371, p. 94–103, 2013.

SUN, Y. *et al.* Bioaccumulation and ROS generation in liver of freshwater fish, goldfish *Carassius auratus* under HC Orange No. 1 exposure. *Environmental Toxicology*, v. 22, n. 3, p. 256–263, 2007.

TERAYAMA, H. *et al.* Acetamiprid Accumulates in Different Amounts in Murine Brain Regions. *Int. J. Environ. Res. Public Health* v. 13, p. 937, 2016.

TIAN, X. *et al.* Chronic brain toxicity response of juvenile Chinese rare minnows (*Gobio-cypris rarus*) to the neonicotinoid insecticides imidacloprid and nitenpyram. *Chemosphere*, v. 210, p. 1006–1012, 2018.

TIŠLER, T. *et al.* Hazard identification of imidacloprid to aquatic environment. *Chemosphere* v. 76, p. 907–914, 2009.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of Selective Action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* v. 45, n. 1, p. 247–268, 2005.

TOPAL, A. *et al.* Neurotoxic responses in brain tissues of rainbow trout exposed to imidacloprid pesticide: Assessment of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine activity, oxidative stress and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere*, v. 175, p. 186–191, 2017.

USP DI - United States Pharmacopeial Convention. Drug information for the health care professional. Greenwood Village, CO: Thomson/MICROMEDEX, v.1, 2006. Disponível em: <<https://www.worldcat.org/title/usp-di-volume-1-drug-information-for-the-health-care-professional/oclc/823378244>>. Acessado em: 03 mar. 2019.

VALDÉS, M. E. *et al.* Bioaccumulation and bioconcentration of carbamazepine and other pharmaceuticals in fish under field and controlled laboratory experiments. Evidences of carbamazepine metabolization by fish. *Science of the Total Environment* v. 557–558, p. 58–67, 2016.

VASCONCELOS, S. M. L. *et al.* Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo. *Química Nova*, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VERLICCHI, P. *et al.* Hospital effluents as a source of emerging pollutants: An overview of micropollutants and sustainable treatment options. *Journal of Hydrology* v. 389, n. 3–4, p. 416–428, 2010.

WANG, L. *et al.* Cadmium-Induced Oxidative Stress and Apoptotic Changes in the Testis of Freshwater Crab, *Sinopotamon henanense*. *PLoS ONE*, v. 6, n. 11, p. e27853, 2011.

WANG, X. *et al.* Mechanism of Neonicotinoid Toxicity: Impact on Oxidative Stress and Metabolism. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 58, n. 1, p. 471–507, 2017.

WANG, Y. *et al.* Single and joint toxicity assessment of four currently used pesticides to zebrafish (*Danio rerio*) using traditional and molecular endpoints. *Chemosphere* v. 192, p. 14–23, 2018.

WASANA, H. M. S. *et al.* Drinking water quality and chronic kidney disease of unknown etiology (CKDu): synergic effects of fluoride, cadmium and hardness of water. *Environmental Geochemistry and Health* v. 38, n. 1, p. 157–168, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION & INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY. Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation. Environmental Health Criteria. Geneva: World Health Organization, v. 222, 2001.

WU, S. M.; SHIH, M.-J.; HO, Y.-C. Toxicological stress response and cadmium distribution in hybrid tilapia (*Oreochromis* sp.) upon cadmium exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 145, n. 2, p. 218–226, 2007.

XING, P. *et al.* Acute severe multiorgan dysfunction syndrome with oral acetamiprid poisoning. *Journal of the Formosan Medical Association* v. 116, n. 2, p. 131–132, 2017.

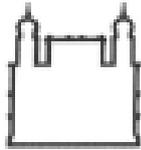
XU, Li *et al.* Occurrence, speciation and transportation of heavy metals in 9 coastal rivers from watershed of Laizhou Bay, China. *Chemosphere* v. 173, p. 61–68, 2017.

YAN, S. *et al.* Toxic effects of nitenpyram on antioxidant enzyme system and DNA in zebrafish (*Danio rerio*) livers. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 122, p. 54–60, 2015a.

- YAN, S. H. *et al.* Thiamethoxam induces oxidative stress and antioxidant response in zebrafish (*Danio rerio*) livers: toxic effects of thiamethoxam on zebrafish livers. *Environmental Toxicology*, v. 31, n. 12, p. 2006–2015, 2015b.
- YANG, M. *et al.* The Relationship between Behavior Responses and Brain Acetylcholinesterase (AChE) Activity of Zebrafish (*Danio rerio*) in Cadmium Stress. *International Journal of Fisheries Science and Research*, v. 1(1), p. 1002, 2017.
- YAO, X.; MIN, H.; LV, Z. Response of superoxide dismutase, catalase, and ATPase activity in bacteria exposed to acetamiprid. *Biomedical and Environmental Sciences* v. 19, n. 4, p. 309, 2006.
- YUAN, S.-S. *et al.* Negative effect of chronic cadmium exposure on growth, histology, ultrastructure, antioxidant and innate immune responses in the liver of zebrafish: Preventive role of blue light emitting diodes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* v. 139, p. 18–26, 2017.
- ZHANG, H.; ZHAO, L. Influence of sublethal doses of acetamiprid and halosulfuron-methyl on metabolites of zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Aquatic Toxicology* v. 191, p. 85–94, 2017.
- ZHENG, J.-L. *et al.* Acute exposure to waterborne cadmium induced oxidative stress and immunotoxicity in the brain, ovary and liver of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, v. 180, p. 36–44, 2016b.
- ZHENG, S. *et al.* Distribution and risk assessment of 82 pesticides in Jiulong River and estuary in South China. *Chemosphere* v. 144, p. 1177–1192, 2016a.
- ZHU, Q.-L.; LI, W.-Y.; ZHENG, J.-L. Life-cycle exposure to cadmium induced compensatory responses towards oxidative stress in the liver of female zebrafish. *Chemosphere*, v. 210, p. 949–957, 2018.

ANEXO I

Documentos de aprovação do comitê de ética da FIOCRUZ



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-Presidência de Pesquisa e
Coleções Biológicas - VPPCB



Comissão de Ética
no Uso de Animais

LICENÇA

LM-3/18

Certificamos que o protocolo (P-14/17.5), intitulado "**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE COMPOSTOS FARMACÊUTICOS POR MEIOS DE BIOMARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PEIXES *Danio rerio***", sob a responsabilidade de **ENRICO MENDES SAGIORO** atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 18/12/2021 e inclui o uso total de:

Danio rerio

- 1.890 machos, peso: 280 gramas;
- 1.890 fêmeas, peso: 280 gramas;

Rio de Janeiro, 27 de março de 2018.


Etelcia Moraes Molinaro
Vice-Coordenadora da CEUA/FIOCRUZ

Etelcia M. Molinaro
Vice - Coordenadora
CEUA/FIOCRUZ
SIAPE 0463096

ANEXO II

Laudos de monitoramento físicoquímico da água utilizadas nos ensaios



DEPARTAMENTO DE SANEAMENTO E SAÚDE AMBIENTAL
SETOR DE ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS
RESULTADOS DE ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS



Amostras		Resultados (valores médios das determinações de três replicatas)			
Nº registro Lab. DSSA	Data de recebimento Lab. DSSA	Condutividade (25 °C) (µS/cm)	Dureza Total (como mg de CaCO ₃ / L)	Oxigênio Dissolvido (20 °C) (mg/L)	pH (20 °C) (unidade de pH)
138/18	14/03/2018	90,08	18,66	10,84	7,40
166/18	22/03/2018	96,19	21,02	8,20	7,55
167/18	22/03/2018	96,05	20,73	8,08	7,33
172/18	26/03/2018	98,32	20,94	6,75	7,48
173/18	26/03/2018	99,47	21,11	6,38	7,18
180/18	02/04/2018	141,28	25,16	19,35	7,76
181/18	02/04/2018	140,53	25,82	18,83	7,56
207/18	06/04/2018	150,99	26,65	14,80	7,71
208/18	06/04/2018	151,97	27,85	14,79	7,44
209/18	09/04/2018	106,21	21,33	8,19	7,64
210/18	09/04/2018	108,15	21,61	8,37	7,42
211/18	09/04/2018	106,71	21,25	8,36	7,32
212/18	09/04/2018	106,34	21,38	8,33	7,31
222/18	13/04/2018	116,50	23,51	6,28	7,62
223/18	13/04/2018	121,52	24,85	6,20	7,27
224/18	13/04/2018	115,20	22,49	7,06	7,21

Analista (s): Gabriel, Lucas, Vinícius e Denise

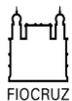


DEPARTAMENTO DE SANEAMENTO E SAÚDE AMBIENTAL
SETOR DE ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS
RESULTADOS DE ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS



Amostras		Resultados (valores médios das determinações de três replicatas)			
Nº registro Lab. DSSA	Data de recebimento Lab. DSSA	Condutividade (25 °C) (µS/cm)	Dureza Total (como mg de CaCO ₃ / L)	Oxigênio Dissolvido (20 °C) (mg/L)	pH (20 °C) (unidade de pH)
505/18	16/07/2018	217,90	21,70	4,65	6,22
506/18	16/07/2018	218,96	36,17	5,10	6,32
507/18	16/07/2018	217,20	36,06	5,09	6,30
508/18	16/07/2018	216,76	36,22	4,92	6,30
549/18	20/07/2018	220,80	21,70	2,92	6,71
550/18	20/07/2018	221,02	36,39	2,85	6,71
551/18	20/07/2018	218,90	35,84	2,75	6,64
552/18	20/07/2018	220,35	36,29	2,74	6,70
573/18	30/07/2018	144,90	-	2,67	6,88
574/18	30/07/2018	142,92	-	2,71	6,92
575/18	30/07/2018	143,22	-	2,66	6,95
576/18	30/07/2018	141,83	-	2,68	6,90
592/18	03/08/2018	151,30	21,70	2,79	6,70
593/18	03/08/2018	148,06	23,77	2,65	6,66
594/18	03/08/2018	145,25	23,30	2,67	6,76
595/18	03/08/2018	99,25	24,09	2,67	7,30

Analista (s): Gabriel, Lucas, Vinicius, Denise, Matheus e Thais

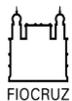


DEPARTAMENTO DE SANEAMENTO E SAÚDE AMBIENTAL
SETOR DE ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS
RESULTADOS DE ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS



Amostras		Resultados (valores médios das determinações de três replicatas)			
Nº registro Lab. DSSA	Data de recebimento Lab. DSSA	Condutividade (25 °C) (µS/cm)	Dureza Total (como mg de CaCO ₃ / L)	Oxigênio Dissolvido (20 °C) (mg/L)	pH (20 °C) (unidade de pH)
596/18	06/08/2018	149,80	21,70	2,01	6,97
597/18	06/08/2018	155,40	45,32	2,04	7,18
598/18	06/08/2018	155,16	45,45	2,02	7,19
599/18	06/08/2018	152,98	45,19	2,19	7,30
600/18	10/08/2018	148,40	21,70	2,62	7,18
601/18	10/08/2018	150,24	48,29	2,71	7,22
602/18	10/08/2018	147,00	49,76	2,68	7,14
614/18	10/08/2018	149,58	48,36	2,41	7,10
624/18	17/08/2018	114,50	21,73	2,52	7,18
625/18	17/08/2018	192,18	41,21	2,10	6,87
626/18	17/08/2018	166,32	40,68	2,45	7,03
627/18	17/08/2018	165,21	40,85	2,46	7,00
628/18	17/08/2018	156,93	40,35	2,40	7,00
629/18	17/08/2018	155,36	47,32	2,43	6,90

Analista (s): Gabriel, Denise, Matheus e Thais

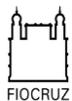


DEPARTAMENTO DE SANEAMENTO E SAÚDE AMBIENTAL
SETOR DE ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS
RESULTADOS DE ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS



Amostras		Resultados (valores médios das determinações de três replicatas)			
Nº registro Lab. DSSA	Data de recebimento Lab. DSSA	Condutividade (25 °C) (µS/cm)	Dureza Total (como mg de CaCO ₃ / L)	Oxigênio Dissolvido (20 °C) (mg/L)	pH (20 °C) (unidade de pH)
642/18	21/08/2018	172,60	21,70	2,45	7,15
643/18	21/08/2018	166,99	20,32	2,72	7,14
644/18	21/08/2018	161,40	19,25	2,69	7,11
645/18	21/08/2018	160,62	19,52	2,55	7,00
739/18	28/08/2018	229,53	21,73	3,24	7,15
740/18	28/08/2018	218,32	23,49	3,24	7,26
741/18	28/08/2018	244,45	23,06	3,23	7,23
742/18	28/08/2018	245,46	23,37	3,94	7,30
784/18	05/10/2018	348,44	21,73	2,48	7,44
785/18	05/10/2018	353,55	23,46	2,48	7,69
786/18	05/10/2018	352,14	23,30	2,30	7,59
787/18	05/10/2018	341,07	23,13	2,31	7,40
792/18	09/10/2018	353,29	21,73	2,61	7,25
793/18	09/10/2018	348,66	22,13	2,44	7,23
794/18	09/10/2018	345,33	22,11	2,34	7,22
795/18	09/10/2018	335,84	22,05	2,39	7,20

Analista (s): Gabriel, Denise, Matheus e Thais

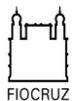


DEPARTAMENTO DE SANEAMENTO E SAÚDE AMBIENTAL
SETOR DE ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS
RESULTADOS DE ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS



Amostras		Resultados (valores médios das determinações de três replicatas)			
Nº registro Lab. DSSA	Data de recebimento Lab. DSSA	Condutividade (25 °C) (µS/cm)	Dureza Total (como mg de CaCO ₃ / L)	Oxigênio Dissolvido (20 °C) (mg/L)	pH (20 °C) (unidade de pH)
822/18	19/10/2018	242,90	21,70	2,63	6,41
823/18	19/10/2018	243,13	21,43	2,55	6,43
824/18	19/10/2018	244,31	21,83	2,51	6,38
825/18	19/10/2018	243,83	21,52	2,19	6,30
829/18	23/10/2018	259,80	21,70	2,18	7,06
830/18	23/10/2018	263,63	23,59	2,15	7,02
831/18	23/10/2018	255,56	22,92	2,61	6,99
832/18	23/10/2018	253,18	22,58	2,75	7,00
835/18	26/10/2018	175,90	21,70	2,44	6,69
836/18	26/10/2018	190,90	25,58	2,32	6,55
837/18	26/10/2018	175,23	23,97	2,35	6,60
838/18	26/10/2018	199,43	25,81	2,73	6,50
855/18	30/10/2018	207,90	25,47	2,29	6,78
856/18	30/10/2018	227,32	26,14	2,33	6,80
857/18	30/10/2018	205,30	24,37	2,61	6,86
858/18	30/10/2018	235,20	26,92	2,58	6,80

Analista (s): Gabriel, Denise, Matheus e Thais



DEPARTAMENTO DE SANEAMENTO E SAÚDE AMBIENTAL
SETOR DE ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS
RESULTADOS DE ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS



Amostras		Resultados (valores médios das determinações de três replicatas)			
Nº registro Lab. DSSA	Data de recebimento Lab. DSSA	Condutividade (25 °C) (µS/cm)	Dureza Total (como mg de CaCO ₃ / L)	Oxigênio Dissolvido (20 °C) (mg/L)	pH (20 °C) (unidade de pH)
871/18	01/11/2018	123,90	20,12	6,98	6,97
872/18	01/11/2018	126,42	20,84	6,58	6,95
873/18	01/11/2018	131,65	20,64	6,50	6,81
874/18	01/11/2018	131,79	21,05	6,06	6,90
880/18	05/11/2018	143,00	19,60	6,65	7,10
881/18	05/11/2018	145,12	21,10	6,39	6,90
882/18	05/11/2018	149,80	20,40	7,04	7,10
883/18	05/11/2018	148,30	19,30	7,29	7,05
908/18	09/11/2018	120,40	22,30	7,18	6,91
909/18	09/11/2018	117,37	22,14	7,17	6,84
910/18	09/11/2018	131,91	24,29	7,28	6,77
911/18	09/11/2018	129,10	23,83	7,03	6,70
924/18	13/11/2018	138,90	23,02	6,29	6,80
925/18	13/11/2018	140,83	23,31	6,35	6,39
926/18	13/11/2018	157,27	24,73	7,41	6,91
927/18	13/11/2018	153,03	23,42	6,87	6,90

Analista (s): Gabriel, Denise, Matheus e Thais

