

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

EBERTON LUIZ AIRES RIBAS

AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DA DAPIRONA SÓDICA EM *Oreochromis niloticus* ATRAVÉS DE BIOMARCADORES

CURITIBA

2022

EBERTON LUIZ AIRES RIBAS

AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DA DIPIRONA SÓDICA EM *Oreochromis niloticus* ATRAVÉS DE BIOMARCADORES

ECOTOXICOLOGICAL EVALUATION OF DIPYRONE IN *Oreochromis niloticus* THROUGH BIOMARKERS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), como requisito para obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Orientadora: Profa. Dra. Wanessa Algarte Ramsdorf Nagata

CURITIBA

2022



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Esta licença permite compartilhamento, remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Curitiba



EBERTON LUIZ AIRES RIBAS

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DA DAPIRONA SÓDICA EM OREOCHROMIS NILOTICUS
ATRAVÉS DE BIOMARCADORES**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Ciência E Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Tecnologias E Processos Ambientais.

Data de aprovação: 24 de Fevereiro de 2022

Prof.a Wanessa Algarte Ramsdorf Nagata, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof Daniel Bussolaro, Doutorado - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Paraná (Ifpr)

Prof Laercio Dante Stein Piancini, Doutorado - Universidade Federal do Paraná (Ufpr)

Prof.a Taynah Vicari, Doutorado - Universidade Federal do Paraná (Ufpr)

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 24/02/2022.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradecer à Deus pelo dom da vida e pelo sólido alicerce diante das adversidades e provações impostas. Não foi nada fácil trilhar este caminho com tantos obstáculos, os quais foram transpostos com muita confiança em Deus.

Aos meus pais Luiz e Zeni, pelo amor incondicional, pelos valores essenciais e pelo apoio em todos os momentos; foi graças a eles que, de alguma forma, cheguei até aqui.

À toda família e amigos, que contribuíram e contribuem com seu carinho, paciência, companheirismo e palavras de otimismo. De fato, mesmo distantes, foram bases importantes nesta trajetória. Obrigado pela paciência e apoio de sempre. Em memória, à minha irmã Andréia, que para mim nunca deixou de existir, e que certamente de onde estiver, está sempre na torcida por mim.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), fundamentais para a realização das pesquisas e práticas laboratoriais, especialmente Eduarda, Isabela, Júlia, Yorrannys, Marcos e Monique. O trabalho mútuo e cooperativo é fator determinante para cumprir toda a demanda de testes e análises.

À minha orientadora Wanessa, pelo apoio e parceria, e que me abriu as portas para o Universo da Ecotoxicologia, até então pouco explorado por mim. Cada ensinamento, correção, dica e sugestão, além das comemorações em torno dos resultados obtidos, contribuíram diretamente no melhoramento desta pesquisa.

A todos os professores da UTFPR e do programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, sem exceções, pelos ensinamentos e contribuições com o processo ensino-aprendizagem, que enriquecem nossa carreira e nos mostram o quão fantástico é o “mundo da Ciência”. Em especial à professora Adriane, por estimular a melhoria contínua e apoio ao longo do programa, tanto dentro da sala de aula, quanto em laboratório e na Qualificação.

À banca de qualificação, composta pelas professoras Adriane e Lúcia, e à banca da defesa final, constituída pelos professores Taynah Vicari, Laercio Stein Piancini e Daniel Bussolaro, pelas contribuições e aceite em compor esta importante e essencial fase do mestrado.

À UTFPR e ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, por tornarem possível a realização desta pesquisa, em especial ao Laboratório Multiusuário de Equipamentos e Análises Ambientais (LAMEAA) e ao professor Thomaz, pela possibilidade de uso de equipamentos e por todo o suporte necessário, garantindo a obtenção dos resultados que nortearam toda a pesquisa.

*“Que todos os nossos esforços estejam sempre
focados no desafio à impossibilidade. Todas as
grandes conquistas humanas vieram daquilo que
parecia impossível”.*

Charles Chaplin

RESUMO

RIBAS, E. **AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DA DAPIRONA SÓDICA EM *Oreochromis niloticus* ATRAVÉS DE BIOMARCADORES**. 2022. 86 p. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2022.

Contaminantes emergentes (CE) se referem a uma classe de produtos cada vez mais presente nos ecossistemas. Sabe-se que a presença dessas substâncias nos ambientes possui ação toxicológica, especialmente nos ambientes aquáticos. Entre estes contaminantes, podemos citar os fármacos, que muitas vezes acabam destinados aos corpos d'água, tornando-se persistentes nesses meios. Conseqüentemente, os organismos que vivem nesses ambientes estão vulneráveis à reatividade do meio, estando expostos a alterações mutagênicas, metabólicas, morfológicas, comportamentais, perda do seu habitat natural e mortalidade. O presente estudo investigou, através de bioensaios, os efeitos provocados pelo fármaco dipirona sódica, em peixes *Oreochromis niloticus* (Tilápia do Nilo), após exposição hídrica subcrônica pelo período de 21 dias, através de análises de biomarcadores genéticos e bioquímicos. Foram avaliadas três concentrações subletais do fármaco: 0,7; 4,9 e 34,3 mg/L, definidas de acordo com a literatura. A renovação da água e do fármaco foi realizada diariamente na proporção de $\frac{3}{4}$ do volume total de cada aquário. Foram realizados dois bioensaios, nas mesmas condições experimentais, com o intuito de aumentar o número de organismos amostrados. Foi avaliada a genotoxicidade, através do ensaio cometa, em células de sangue e de tecido renal, sendo que em sangue, foi observado diferença estatística significativa entre os grupos expostos às três concentrações, em relação ao grupo controle negativo, em ambos os bioensaios. Para o tecido renal, a análise do material genético dos organismos do bioensaio 1 apresentou diferença entre o grupo controle negativo e a concentração de 34,3 mg/L, enquanto que no bioensaio 2 foi observada diferença significativa entre os três grupos de exposição e o grupo controle negativo. No teste do micronúcleo písceo, diferenças significativas foram constatadas entre os grupos de exposição 4,9 mg/L e 34,3 mg/L em relação ao grupo controle negativo, em ambos os bioensaios, caracterizando uma ação genotóxica do fármaco. A atividade da AChE em músculo apresentou inibição nos animais expostos às três concentrações do fármaco, nos dois bioensaios enquanto que a atividade da AChE em cérebro não apresentou alteração em relação ao grupo controle negativo. Em relação à atividade da GST em fígado, verificou-se diferenças entre os grupos de animais, no bioensaio 1: diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controle negativo e grupos de exposição 4,9 e 34,3 mg/L; no bioensaio 2 não observou-se diferença entre os grupos analisados. A análise do fator de condição de Fulton evidenciou que a exposição subcrônica às concentrações avaliadas da dipirona sódica não afetou a saúde geral dos animais. Os resultados encontrados no presente trabalho demonstram o potencial efeito ecotoxicológico do fármaco dipirona sódica para a espécie de peixe *O. niloticus*.

Palavras-chave: bioensaio; fármacos; ensaio cometa; AChE; micronúcleo; GST.

ABSTRACT

RIBAS, E. **ECOTOXICOLOGICAL EVALUATION OF DIPYRONE IN *Oreochromis niloticus* THROUGH BIOMARKERS**. 2022. 86 p. Dissertation - Postgraduate Program in Environmental Science and Technology. Federal Technological University of Paraná (UTFPR). Curitiba, 2022.

Emerging contaminants (EC) refer to a class of products increasingly present in ecosystems. It is known that the presence of these substances in environments have toxicological action, especially in aquatic environments. Among these contaminants, we can mention drugs, which often end up in water bodies, becoming persistent in these environments. Consequently, the organisms that live in these environments are vulnerable to the reactivity of the environment, which can result in mutagenic and morphological reactions, loss of their natural habitat and mortality. The present study investigated, through bioassays, the effects caused by the drug sodium dipyrone, in fish *Oreochromis niloticus* (Nile Tilapia), after subchronic water exposure for a period of 21 days, through analysis of genetic and biochemical biomarkers. Three drug sublethals concentrations were evaluated: 0.7; 4.9 and 34.3 mg/L, defined according to the literature. The renewal of water and drug was performed daily in the proportion of $\frac{3}{4}$ of the total volume of each aquarium. Two bioassays were carried out, under the same experimental conditions, in order to increase the number of organisms sampled. Statistical analyzes were performed using parametric and non-parametric methods. Genotoxicity was evaluated through the comet assay in blood and renal tissue cells, and in blood, a statistically significant difference was observed between the groups exposed to the three concentrations, in relation to the negative control group, in both bioassays. For renal tissue, the analysis of the genetic material of organisms in bioassay 1 showed a difference between the negative control group and the concentration of 34.3 mg/L, while in bioassay 2 a significant difference was observed between the three exposure groups and the negative control group. In the piscine micronucleus test, significant differences were found between the 4.9 mg/L and 34.3 mg/L exposure groups in relation to the negative control group, in both bioassays, characterizing a genotoxic action of the drug. AChE activity in muscle showed inhibition in animals exposed to the three concentrations of the drug, in both bioassays, while AChE activity in brain showed no change in relation to the negative control group. Regarding the activity of GST in the liver, there were differences between the groups of animals in bioassay 1: statistically significant differences between the negative control group and groups of exposure 4.9 and 34.3 mg/L; in bioassay 2 there was no difference between the groups analyzed. Fulton's condition factor analysis showed that subchronic exposure to the evaluated concentrations of sodium dipyrone did not affect the general health of the animals. The results found in the present work demonstrate the potential ecotoxicological effect of the drug sodium dipyrone for the fish species *O. niloticus*.

Keywords: bioassay; drugs; comet assay; AChE; micronucleus; GST.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Estrutura química da dipirona sódica | 19 |
| Figura 2 - Fórmula estrutural do 4-metilaminoantipirina, qual é hidrolisada naturalmente no fluido gástrico após ingestão do medicamento | 20 |
| Figura 3 - Esquema demonstrando o processo mais comum de contaminação de corpos d'água desde a ingestão do fármaco até a chegada do mesmo ao ambiente | 21 |
| Figura 4 - Principais espécies de tilápias criadas no Brasil | 24 |
| Figura 5 - Exemplar de <i>Oreochromis niloticus</i> , considerando a média de aferição do comprimento dos organismos expostos nos dois bioensaios | 25 |
| Figura 6 - Principais etapas do Ensaio cometa | 29 |
| Figura 7 - Imagens do ensaio cometa no microscópio óptico - classes de danos em eritrócitos de peixes – tamanho 10 μm | 30 |
| Figura 8 - Células em análise de micronúcleo, sendo a de nº 1 uma célula normal; de nº 2 a 5 células com anormalidades cromossômicas e nº 6 formação de micronúcleo – aumento 1000x | 31 |
| Figura 9 - Tanque para aclimação dos organismos teste – 250 L | 37 |
| Figura 10 - Disposição de aquários de vidro para testes de contaminação – 25 L – Bioensaio 1 | 38 |
| Figura 11 - Dados verificados com coleta de água de modo aleatório, dos tanques de aclimação no bioensaio 1 | 48 |
| Figura 12 - Dados verificados com coleta de água de modo aleatório, dos tanques de aclimação no bioensaio 2 | 49 |
| Figura 13 - Representação gráfica da aferição dos dados biométricos de massa (A) e comprimento (B) dos organismos expostos ao fármaco, no bioensaio 1 | 50 |
| Figura 14 - Representação gráfica da aferição dos dados biométricos de massa (A) e comprimento (B) dos organismos expostos ao fármaco, no bioensaio 2 | 50 |
| Figura 15 - Representação gráfica da análise do Fator de condição de Fulton dos organismos expostos ao fármaco, no bioensaio 1 | 51 |
| Figura 16 - Representação gráfica da análise do Fator de condição de Fulton dos organismos expostos ao fármaco, no bioensaio 2 | 51 |
| Figura 17 - Representação gráfica dos resultados genotóxicos, obtidos na exposição subcrônica de tilápias ao fármaco dipirona sódica, nos bioensaios 1 (A) e B (2) em amostras de sangue. Letras iguais no gráfico significa que não houve diferença significativa entre os grupos. Letras diferentes indicam diferença significativa, ou seja, $p < 0,05$ | 52 |
| Figura 18 - Representação gráfica dos resultados genotóxicos, obtidos na exposição subcrônica de tilápias ao fármaco dipirona sódica, nos bioensaios 1 (A) e 2 (B), em amostras de tecido renal. Letras iguais no gráfico significa que não houve diferença significativa entre os grupos. Letras diferentes indicam diferença significativa, ou seja, $p < 0,05$ | 53 |
| Figura 19 - Representação gráfica dos resultados no teste micronúcleo písceo (micronúcleo e alterações morfológicas), obtidos na exposição subcrônica de tilápias ao fármaco dipirona sódica, no bioensaios 1 (A) e 2 (B). Letras iguais no gráfico significa que não houve diferença significativa entre os grupos. Letras diferentes indicam diferença significativa, ou seja, $p < 0,05$ | 54 |
| Figura 20 - Representação gráfica dos resultados obtidos após exposição à dipirona sódica nos bioensaios 1 (A) e 2 (B), após análise do biomarcador de AChE em amostras de cérebro de tilápias. Letras iguais no gráfico significa que não houve diferença significativa entre os grupos. Letras diferentes indicam diferença significativa, ou seja, $p < 0,05$ | 54 |
| Figura 21 - Representação gráfica dos resultados obtidos após exposição à dipirona sódica nos bioensaios 1 (A) e 2 (B), através da análise com biomarcador de AChE em músculo de tilápias. Letras iguais no gráfico significa que não houve diferença significativa entre os grupos. Letras diferentes indicam diferença significativa, ou seja, $p < 0,05$ | 55 |
| Figura 22 - Representação gráfica dos resultados obtidos após exposição à dipirona sódica nos bioensaios 1 (A) e 2 (B) através da análise com biomarcador de AChE em músculo de tilápias. Letras iguais no gráfico significa que não houve diferença significativa entre os grupos. Letras diferentes indicam diferença significativa, ou seja, $p < 0,05$ | 56 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Principais características do fármaco Dipirona Sódica | 19 |
| Tabela 2 - Quantidade de solução de dipirona sódica adicionada diariamente por aquário, conforme concentrações determinadas | 38 |
| Tabela 3 - Visão geral das alterações observadas nos grupos expostos ao fármaco Dipirona Sódica, em relação ao controle negativo (CN) | 57 |

LISTA DE SIGLAS

| | |
|--------|--|
| AA | Aminoantipirina |
| AAA | Acetilaminoantipirina |
| ACh | Acetilcolina |
| AChE | Acetilcolinesterase |
| BchE | Butirilcolinesterase |
| CAS | <i>Chemical abstracts servisse</i> |
| CEUA | Comissão de Ética no Uso de Animais |
| CN | Controle negativo |
| CONCEA | Conselho Nacional de Controle de experimentação animal |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| ETE | Estações de tratamento de esgoto |
| FAA | Formilaminoantipirina |
| GST | Glutathione S-transferase |
| LMP | Agarose de baixo ponto de fusão |
| MAA | Metilaminoantipirina |
| UTFPR | Universidade Tecnológica Federal do Paraná |

SUMÁRIO

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 | OBJETIVOS | 16 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL..... | 16 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 16 |
| 3 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 17 |
| 3.1 | CONTAMINANTES EMERGENTES..... | 17 |
| 3.2 | DIPIRONA SÓDICA..... | 18 |
| 3.3 | ORGANISMO TESTE NA ANÁLISE DE ALTERAÇÕES AMBIENTAIS.. | 23 |
| 3.3.1 | Oreochromis niloticus..... | 24 |
| 3.4 | TESTES ECOTOXICOLÓGICOS | 25 |
| 3.5 | BIOMARCADORES | 27 |
| 3.5.1 | Biomarcadores somáticos | 28 |
| 3.5.2 | Ensaio Cometa | 28 |
| 3.5.3 | Teste de Micronúcleo Písceo – MN | 30 |
| 3.5.4 | Biomarcadores bioquímicos | 32 |
| 3.5.4.1 | Neurotoxicidade: Acetilcolinesterase (AChE) | 32 |
| 3.5.4.2 | Biotransformação: Glutathione S-transferase (GST) | 33 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 35 |
| 4.1 | SOLUÇÕES-TESTE | 35 |
| 4.2 | ACLIMATAÇÃO DOS PEIXES | 36 |
| 4.3 | EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA AO CONTAMINANTE | 37 |
| 4.4 | COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO E DE DADOS BIOMÉTRICOS.. | 39 |
| 4.5 | METODOLOGIA DO ENSAIO COMETA | 39 |
| 4.5.1 | Pré-cobertura das lâminas | 39 |
| 4.5.2 | Montagem das lâminas | 40 |
| 4.5.3 | Corrida eletroforética | 41 |
| 4.5.4 | Análise dos nucleóides | 42 |
| 4.6 | TESTE MICRONÚCLEO PÍSCEO | 42 |
| 4.7 | BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS | 43 |
| 4.7.1 | Determinação das concentrações de proteínas | 44 |
| 4.7.2 | Acetilcolinesterase (AChE) - Cérebro e músculo | 46 |
| 4.7.3 | Atividade da Glutathione S-transferase - GST - Fígado | 46 |
| 4.8 | ANÁLISES ESTATÍSTICAS | 47 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 5 | RESULTADOS | 48 |
| 6 | DISCUSSÃO ... | 58 |
| 7 | CONCLUSÃO | 62 |
| | REFERÊNCIAS | 63 |
| | ANEXO A | 70 |
| | APÊNDICE A - Cálculo utilizado para determinar quantidade necessária de tampão | 71 |
| | APÊNDICE B - Preparo da solução tampão de eletroforese | 72 |
| | APÊNDICE C - Preparo dos tampões bioquímicos (de acordo com protocolo “Biomarcadores Bioquímicos – laboratório de toxicologia celular, UTFPR” – Glutathione S-transferase – GST (Kenn <i>et al</i> , 1976) e Acetilcolinesterase – AChE (Elman <i>et al.</i> , 1961)..... | 73 |
| | APÊNDICE D - Cálculo da determinação das soluções de exposição | 74 |
| | APÊNDICE E – Valores de média e desvio padrão obtidos na aferição dos dados biométricos para os grupos controle negativo e de exposição ao fármaco, nas concentrações 0,7; 4,9 e 34,3 mg/L; tabelas A e B, respectivamente para os bioensaios 1 e 2 | 76 |
| | APÊNDICE F – Valores obtidos da análise do fator de condição de Fulton, por meio da análise dos dados biométricos de tilápias, após exposição subcrônica ao fármaco dipirona sódica | 77 |
| | APÊNDICE G – Classes de danos em células de sangue – ensaio cometa Bioensaio 1 | 78 |
| | APÊNDICE H – Classes de danos em células de tecido renal – ensaio cometa Bioensaio 1 | 79 |
| | APÊNDICE I – Classes de danos em células de sangue – ensaio cometa Bioensaio 2 | 80 |
| | APÊNDICE J – Classes de danos em células de tecido renal – ensaio cometa Bioensaio 2 | 81 |
| | APÊNDICE K – Frequência de micronúcleos e de alterações nucleares em 2000 eritrócitos analisados em cada lâmina com sangue de cada organismo – bioensaio 1 e 2 | 82 |
| | APÊNDICE L – Massa das amostras de fígado, após exposição subcrônica ao fármaco Dipirona Sódica, para realização da normalização | 83 |
| | APÊNDICE M - Massa dos órgãos cérebro e músculo de tilápias, após exposição subcrônica ao fármaco dipirona sódica, para realização da normalização das proteínas e testes com biomarcadores bioquímicos..... | 84 |
| | APÊNDICE N - Massa dos órgãos cérebro e músculo de tilápias, após exposição subcrônica ao fármaco dipirona sódica, para realização da normalização das proteínas e testes com biomarcadores bioquímicos | 85 |

1 INTRODUÇÃO

Contaminantes emergentes se referem a classes de substâncias que apresentam risco potencial de alterar as condições físicas, químicas e biológicas do ambiente em que estão inseridos. Isso pode ocasionar impactos ecológicos e efeitos na saúde dos seres vivos, incluindo danos no seu metabolismo e material genético (GIL *et al.*, 2012).

São exemplos de classes de contaminantes emergentes: hormônios endógenos e sintéticos, nanomateriais, plastificantes, cafeína, produtos de higiene pessoal e fármacos. Esses micropoluentes podem inserir-se no ambiente através de águas residuárias e domésticas ou por atividades industriais. De modo geral, não são removidos através dos métodos tradicionais de tratamentos de água, portanto, persistindo no ambiente (GIL *et al.*, 2012).

Entre esses contaminantes no ambiente, o fármaco dipirona sódica – também denominado metamizol, entre outros nomes comerciais - ocupa um importante espaço, pois possui ampla comercialização em mais de 100 países, como por exemplo, Alemanha, Espanha, Rússia, Argentina, México e Brasil. Muito de sua utilização e comercialização estão associados às suas características farmacêuticas eficazes, como ação analgésica, antipirética, espasmolítica, possível ação anti-inflamatória, tolerabilidade gastrointestinal favorável, baixo custo de aquisição e ampla disponibilidade (GUIMARÃES *et al.*, 2021; LUTZ, 2019).

Por outro lado, mais de 30 países, entre eles Suécia, EUA, Japão, Reino Unido, Austrália e Irã proibiram a comercialização deste medicamento (JASIECKA *et al.*, 2014), associando-o à efeitos colaterais crônicos e reações adversas como agranulocitose, nefrite intersticial, hepatite, alveolite, pneumonite e doenças cutâneas graves (WANNMACHER, 2005).

Os efeitos colaterais, em sua maioria, desaparecem com a descontinuação do uso do medicamento. Em outros casos, como a agranulocitose, pode tornar-se fatal à saúde do paciente (LUTZ, 2019).

Ambientalmente, os metabólitos da dipirona sódica parecem ser mais persistentes, muito em consequência da instabilidade da molécula do fármaco

(PAMPLONA, 2011), e da degradação sob luz ultravioleta visível, ocasionando a quebra de ligações químicas do medicamento (MORIWAKI *et al.*, 2001).

Além disso, levando em conta que a dipirona sódica é rapidamente hidrolisada no organismo do paciente (entre 1 e 2 horas após ingestão do medicamento) (LUTZ, 2019), e apresentando meia vida de 2,6 a 3,25 h no seu metabólito final, o 4-formilaminoantipirina (FAA) (JASIECKA *et al.*, 2014), esgotos domésticos apresentam metabólitos ao invés do medicamento em sua formulação inicial. Entre os metabólitos encontrados, pode-se mencionar a 4-metilaminoantipirina (4-MAA), 4-MAA, 4-AA, 4-acetilaminoantipirina (4-AAA) e 4-formilaminoantipirina (FAA), entre outros (JASIECKA *et al.*, 2014).

Diante dos aspectos apresentados, este trabalho teve por objetivo analisar os efeitos tóxicos da dipirona sódica. Para essa análise, foram realizados dois bioensaios com três diferentes concentrações subletais do medicamento, empregando peixes da espécie *Oreochromis niloticus* como organismos-teste.

Os efeitos da dipirona sódica sobre os organismos-teste foram determinados através da análise dos biomarcadores genéticos (de genotoxicidade - ensaio cometa e de mutagenicidade - teste do micronúcleo písceo), bioquímicos (de neurotoxicidade - atividade de Acetilcolinesterase e de biotransformação - atividade da Glutathione S-transferase) e somático (Fator de condição de Fulton).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ecotoxicidade de concentrações subletais da dipirona sódica em *Oreochromis niloticus*, através da análise de biomarcadores, após exposição hídrica subcrônica pelo período de 21 dias.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar os efeitos genotóxicos e mutagênicos do fármaco dipirona sódica, após exposição hídrica subcrônica.
- Analisar os efeitos ecotoxicológicos da dipirona sódica em *Oreochromis niloticus* através da análise dos biomarcadores bioquímicos acetilcolinesterase e Glutathione S-transferase.
- Avaliar a saúde geral dos organismos empregando o fator de condição de Fulton.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Contaminantes emergentes

Conforme Vieira (2017), contaminação ambiental ocorre quando qualquer agente, sendo este físico, químico ou biológico, se encontra presente no ambiente em concentrações e formas que possam ser nocivas para o bem-estar, a saúde ou a segurança da população dos seres vivos.

Uma das principais vias de contaminação de corpos d'água ocorre pela eliminação de esgoto não tratado, sendo um grave problema ambiental, pois causa poluição em rios e represas, além de interferir na qualidade da água para abastecimento de cidades e irrigação de lavouras (ESCHER *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2016).

As estações de tratamento de esgoto (ETE) caracterizam uma importante rota de entrada de xenobióticos nos corpos hídricos. Embora existam cada vez mais avanços tecnológicos, a remoção de poluentes ainda se mostra insuficiente (SILVA *et al.*, 2016; WINKLER *et al.*, 2001). Essas substâncias são provenientes de atividades domésticas, humanas (metabólicas), agrícolas e industriais, e constituem um importante grupo de materiais específicos, os chamados contaminantes (ou poluentes) emergentes (BARCELÓ; LÓPEZ, 2008).

O termo emergente, conforme Vieira (2017) advém da preocupação recente sobre essas substâncias, com base em novos conhecimentos sobre seus riscos à saúde e contaminação ambiental, englobando substâncias novas provenientes dos avanços tecnológicos e outras que são utilizadas há anos. São exemplos de contaminantes emergentes: fármacos (entre eles: analgésicos, antibióticos, hormônios esteroides, entre outros); produtos de higiene pessoal (xampus, cremes, sabonetes); surfactantes e produtos industriais.

Uma das características desse grupo de compostos é que eles não precisam perdurar no meio ambiente para causar efeitos negativos, visto que suas altas taxas de transformação e remoção são compensadas por sua contínua introdução no ambiente (TEJADA; QUIÑONES; PENA, 2014).

A constante presença no meio, mais especificamente nos ambientes aquáticos, apresenta potencial risco de alterar as condições físicas, químicas e

biológicas desse meio, podendo causar impactos ecológicos e efeitos no metabolismo e na saúde dos seres vivos (GIL *et al.*, 2012).

Com relação aos fármacos, Bila e Dezoti (2003) descrevem que esta classe de contaminantes emergentes são encontrados com grande frequência em efluentes de tratamentos de esgotos e também em águas naturais, muito por consequência de atividades cotidianas, como por exemplo, a própria excreção desses fármacos por humanos. Os autores explicam que a resistência aos processos de tratamento convencional e a não remoção pelos sistemas de tratamentos de esgotos, tornam os fármacos persistentes no meio.

3.2 Dipirona sódica

Dipirona sódica ou metamizol, também comercialmente denominado Analgina, Anador, Magnopyrol e Novalgina, entre outros nomes, refere-se ao princípio ativo de um dos medicamentos de efeito anestésico com ampla comercialização no Brasil, inclusive livre de obrigatoriedade de prescrição médica (ISQUIBOLA; RODRIGUES, 2019).

Este medicamento é comercializado em diversas formulações, como por exemplo, em solução oral, injetável e na forma de comprimidos (GOMES, 2018).

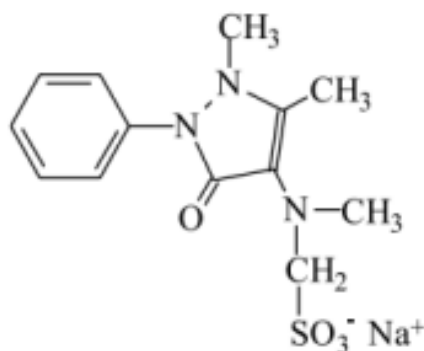
Na indústria farmacêutica, além do efeito analgésico, é recomendado como anti-inflamatório e antipirético, não possuindo ação narcótica. Apesar de ainda não ter o mecanismo de ação no organismo totalmente esclarecido, este medicamento atua tanto no sistema nervoso central como no periférico (GARCEZ *et al.*, 2018).

Junior (2007) menciona que no Brasil, na classe dos medicamentos com ação analgésica e antipirética, a dipirona ocupou o primeiro lugar entre os medicamentos mais utilizados (aproximadamente 31%), seguida do paracetamol (cerca de 27,9%) e da aspirina (27%) no ano de 2006.

Posteriormente, Aragão (2018) analisou dados referentes à comercialização de fármacos no país, e verificou que, somente na região metropolitana da cidade de São Paulo, entre abril/2016 e abril/2017, a dipirona esteve em primeiro lugar entre os fármacos comercializados, atingindo a marca de 488 toneladas, seguida da metformina, com 310 toneladas comercializadas.

Quimicamente, a dipirona sódica apresenta um grupo metanosulfonato, geralmente associado ao íon sódio ou magnésio, sendo a estrutura composta por N-(2,3-dimetil-5-oxo-1-fenil-3-pirazolin-4-il)-N-metilaminometanossulfonato (figura 1) (PEREIRA *et al*, 2002).

Figura 1. Estrutura química da dipirona sódica



Fonte: Pereira et al, 2002.

Tabela 1. Principais características do fármaco Dipirona sódica

| Nome comercial | Dipirona Sódica |
|--------------------|---|
| Fórmula molecular | $C_{13}H_{16}N_3NaO_4S \cdot H_2O$ |
| Aparência | Pó cristalino branco ou quase branco; inodoro. |
| Ponto de fusão | 180 °C |
| Peso Molecular | 351,4 g.mol ⁻¹ |
| Densidade | 1 g.cm ³ |
| Classe terapêutica | Analgésico e Antipirético. |
| Solubilidade | Solúvel em água e metanol (500 g/L a 20 °C), pouco solúvel em etanol. |
| Composição sólida: | Cada porção de 500 mg contém: dipirona sódica monoidratada: 500 mg |

Fonte: adaptado de Farmacopeia Brasileira (2011)

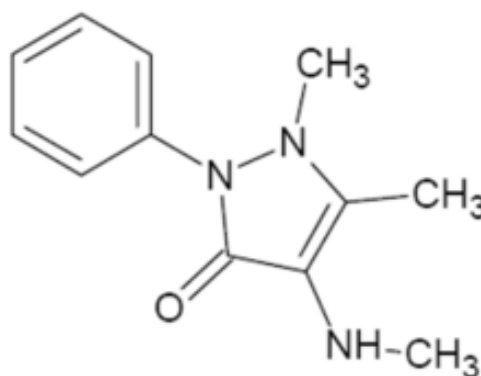
Clinicamente, o uso da dipirona iniciou-se em 1922, tendo proibida sua comercialização em mais de 30 países, como Austrália, Estados Unidos, Japão e Suécia, devido ao risco potencial de efeitos colaterais como agranulocitose (ERGÜN *et al.*, 2004).

Por outro lado, seu uso é bastante difundido em alguns países da Europa (Alemanha, Itália e Espanha) e América do Sul, além do Brasil como mencionado anteriormente (DE ARAÚJO *et al.*, 2019).

Por ser hidrossolúvel, a dipirona pode ser administrada em grandes doses, o que representa vantagem e, certamente, contribui para o uso indiscriminado deste fármaco, principalmente como constituinte de associações medicamentosas (NASCIMENTO, 2006).

Após ingestão via oral, a dipirona é rapidamente hidrolisada para 4-metilamino-antipirina (4-MAA) (Figura 2) (LUTZ, 2019). Em seguida, este composto é metabolizado por reações enzimáticas complexas no fluido gástrico para diversos outros compostos, como 4-formilaminoantipirina (4-FAA) e 4-aminoantipirina (4-AA), os quais serão excretados pela urina em cerca de 60% da dose de dipirona inicialmente administrada (ERGÜN *et al.*, 2004; NASCIMENTO, 2006).

Figura 2. Fórmula estrutural do 4-metilaminoantipirina, que é hidrolisada naturalmente no fluido gástrico após ingestão do medicamento.



Fonte: adaptado de Isquibola e Rodrigues (2019)

Conseqüentemente, os metabólitos alcançam os corpos d'água em esgotos domésticos e chegam às estações de tratamento, em sua maioria, em concentrações na ordem de µg/L (ROSAL *et al.*, 2010).

O processo desde a ingestão do medicamento até a excreção na urina apresenta o período de meia vida entre 2,6 a 3,25 h no seu metabólito final, o 4-formilaminoantipirina (FAA) (JASIECKA *et al.*, 2014). Após esta interação do medicamento com o organismo, os metabólitos do fármaco seguem para o meio ambiente através dos esgotos domésticos (figura 3).

Figura 3. Esquema demonstrando o processo mais comum de contaminação de corpos d'água desde a ingestão do fármaco até a chegada do mesmo ao ambiente.



Fonte: adaptado de ERGÜN *et al.*, 2004; NASCIMENTO, 2006; ROSAL *et al.*, 2010

Com relação à ecotoxicidade da dipirona sódica, não são encontrados muitos dados científicos que possam elucidar os efeitos genotóxicos e mutagênicos do medicamento, mas nas pesquisas que são encontradas sobre a ação deste fármaco, há relatos de efeitos sobre o organismo exposto (GOMES *et al.*, 2018).

Pamplona (2011) realizou a exposição hídrica de peixes *Rhamdia quelen*, por um período de 15 dias, em três concentrações deste fármaco: 0,5; 5 e 50 µg/L,

e observou a ação genotóxica do fármaco na menor concentração de exposição. Verificou também a diminuição de eritrócitos, trombócitos e leucócitos após o período de exposição nos três grupos, em comparação com o grupo controle. A autora também menciona alterações teciduais como necrose crônica com deposição fibrosa, vacuolização dos capilares e constrição e alteração do parênquima renal, neste caso, na exposição à maior concentração do fármaco.

Em outro estudo, Cestari *et al.* (2018) realizaram a exposição de peixes juvenis de *Rhamdia quelen* por 21 dias ao fármaco dipirona e verificaram que a concentração de exposição 5,0 µg/L causou danos ao DNA de células hepáticas e renais tanto na exposição isolada (somente dipirona) quanto em associação com o medicamento paracetamol (2,5 µg/L).

As problemáticas com relação à presença de fármacos no ambiente, a ineficiência de métodos de tratamento de água que possui fármacos e seus metabólitos e a necessidade de aprimoramento de políticas públicas para produtos farmacêuticos no ambiente, requerem técnicas de tratamento de resíduos para minimizar e mitigar as contaminações cada vez mais acentuadas (ARAGÃO, 2018; ISQUIBOLA; RODRIGUES, 2019). Uma das técnicas aplicadas se refere à utilização de luz ultravioleta visível (UV/Vis), que ocasiona a degradação de moléculas, favorecendo a ocorrência de fotólise (quebra das ligações químicas) (MORIWAKI *et al.*, 2001).

Isquibola e Rodrigues (2019) realizaram um experimento de análise de degradação da dipirona sódica. Para tanto, comprimidos contendo 500 mg de dipirona sódica foram solubilizados em ácido clorídrico (HCl). Considerando a região de espectro entre 200 e 400 nm do fármaco, as amostras foram submetidas à luz ultravioleta visível por 2 horas. Nas leituras de absorvância, os autores observaram diminuição da concentração da dipirona sódica nas soluções dos comprimidos do fármaco durante o tempo de exposição à luz UV/Vis, com média geral de 50,36% de degradação do fármaco em meio ácido e absorvância em 258 nm. Também verificou-se a formação do principal metabólito da dipirona sódica devido a sua hidrólise em solução aquosa, o 4-metilaminoantipirina (4-MAA) e diminuição da absorvância específica do 4-MAA, em 254 nm (ISQUIBOLA; RODRIGUES, 2019).

3.3 Organismo teste na análise de alterações ambientais

Os organismos-teste são espécies que podem ser utilizados na análise da alteração ocasionada pelas transformações em seu habitat, sejam por alterações decorrentes em sua morfologia, interações com o meio e pela sua presença ou ausência no ambiente de estudo (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

De modo geral, esses organismos podem representar a interferência de um elemento ou substâncias químicas presentes no ambiente, observando-se por exemplo, as alterações ocorridas em sua fisiologia. As condições do ambiente interferem diretamente na resposta desses organismos à exposição, tais como: a temperatura, a disponibilidade de nutriente, a radiação e a morfologia do meio (BAGLIANO, 2012; TUNDISI, 2008).

O uso de animais para avaliar a contaminação de ambientes aquáticos vem se aprimorando desde o século XIX. Já nessa época, pesquisava-se o uso de organismos vegetais e animais, com o objetivo de simular a realidade do ambiente contaminado e o organismo ali exposto (KNIE; LOPES, 2004).

Segundo os mesmos autores, ao longo do tempo, diversas técnicas e parâmetros foram verificados para se padronizar os organismos aplicáveis aos métodos ao nível de mono espécies, como por exemplo: a sensibilidade do organismo; fácil manejo; fácil cultura em laboratório; importância na cadeia alimentar, entre outros.

Entre os organismos teste utilizados na pesquisa de ambientes aquáticos e sua toxicidade, os peixes apresentam-se como bons representantes. São animais vertebrados, vivem nos mais variados ambientes aquáticos, com seu ciclo de vida intimamente relacionado a este meio. Com aproximadamente 28.000 espécies conhecidas, representam mais de 50% dos vertebrados descritos (ESTEVES, 2011).

A relevância da análise da ação de um determinado contaminante no animal está relacionada aos órgãos definidos como “alvos”. Estruturas como o fígado (principal órgão envolvido no metabolismo) e o rim podem indicar alterações de ação tóxica aguda ou crônica, pois são órgãos que estarão em contato direto com o contaminante (LINS *et al.*, 2010).

3.3.1 *Oreochromis niloticus*

De acordo com Pereira e Silva (2012), as tilápias constituem a ordem dos *Perciformes*, família *Ciclidae*, gênero *Oreochromis*, animais de origem africana, sendo identificadas aproximadamente 70 espécies (figura 4), estando entre os peixes mais indicados para a criação em regiões tropicais.

Estima-se que a tilápia foi introduzida no Brasil a partir de 1953, com a importação da *Tilapia rendalli*, proveniente do Congo Belga. Em 1971, foram importadas as espécies Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e a tilápia Zanzibar (*Oreochromis hornorum*) (PEREIRA; SILVA, 2012).

Neste contexto, estima-se que a espécie *O. niloticus* foi primeiramente introduzida na região Nordeste (em 1971), e posteriormente distribuída por todas as regiões do território brasileiro, desde a Bacia do Rio Amazonas até o Rio Grande do Sul (RODRIGUES, 2007).

Figura 4. Principais espécies de tilápias criadas no Brasil



Fonte: Manual Prático de Criação – VIDAL (acesso em out/2020)

Atualmente, a tilápia do nilo é um peixe bastante difundido no Brasil e provavelmente a espécie mais conhecida, com elevada importância econômica e comercial, sendo um dos peixes de água doce mais cultivado em pisciculturas e com grande utilização em pesquisas como bioindicador de poluição aquática (VIRGENS *et al.*, 2015). Esta espécie possui como especificidades: diversidade

alimentar, boa adaptação em condições ambientais adversas, resistência a doenças, entre outras (ZHOU *et al.*, 1998).

A espécie empregada nos bioensaios neste trabalho foi a *Oreochromis niloticus* (LINNAEUS, 1758) ou Tilápia do Nilo (Figura 5), um peixe com ampla importância na aquicultura, ocorrendo em diversos tipos de habitats dulcícolas, tais como rios, lagos, canais e águas salobras. É um organismo bem adaptável naturalmente a temperaturas que variam entre 13 e 33 °C, e entre 8 a 42°C em situações de exposição, atingindo a maturidade sexual entre 3 e 6 meses de vida, de acordo com a temperatura na qual está se desenvolvendo. A reprodução ocorre em temperaturas superiores a 20°C, com desovas podendo ocorrer mensalmente ao longo do ano (RODRIGUES, 2007; ZHOU *et al.*, 1998).

Figura 5. Exemplar de *Oreochromis niloticus*, considerando a média de aferição do comprimento dos organismos expostos nos dois bioensaios.



Fonte: Manual Prático de Criação – VIDAL

3.4 Testes ecotoxicológicos

Ensaio ecotoxicológicos com organismos aquáticos vivos ou organismos-teste são a principal ferramenta da Ecotoxicologia, e objetivam avaliar os efeitos tóxicos de uma substância química - tais como metais pesados, contaminantes orgânicos e inorgânicos, agrotóxicos, entre outros - sobre os organismos vivos, populações e comunidades de um ecossistema, e também para realizar o biomonitoramento de um ecossistema aquático (LAMEIRA, 2012; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Essa contextualização é necessária para mensurar dados de análise e conceitos necessários nos estudos de prevenção, contenção e tratamento de danos causados pelos contaminantes nos corpos de água e no ecossistema em geral (OGA *et al.*, 2008).

Nos testes ecotoxicológicos, organismos são expostos a várias concentrações de uma substância química ou de um efluente por um determinado período de seu ciclo de vida. Por meio destes ensaios, podem ser observados efeitos mutagênicos, teratogênicos, citogenéticos, fisiológicos e letais (LAMEIRA, 2012). São inúmeros os métodos aplicáveis na avaliação ecotoxicológica e o emprego de biomarcadores em ecossistemas aquáticos.

Avalia-se a toxicidade em ambientes aquáticos utilizando métodos e análises por meio de organismos representativos, e também pela análise dos sedimentos característicos. Essas atividades de pesquisa possuem registro histórico de quase cem anos atrás, com a utilização de peixes nas primeiras análises registradas (OGA *et al.*, 2008).

Como consequências dessa avaliação, torna-se possível mensurar concentrações admissíveis de componentes químicos, os aspectos e impactos ambientais decorrentes da contaminação, determinar a concentração de um poluente químico no ambiente analisado e os efeitos consequentes na qualidade da água. Consequentemente, torna-se possível estipular melhorias e desenvolvimento de técnicas adequadas (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Entre os principais tipos de testes toxicológicos, de acordo com as definições propostas por Oga *et al.* (2008), que mencionam a resolução nº 1/78 do Conselho Nacional de Saúde (1978) para caracterização do efeito toxicológico de uma substância, pode-se citar o teste de toxicidade aguda, que é utilizado para determinar o efeito de um contaminante em órgãos sensíveis à toxicidade, em um curto espaço de tempo (geralmente por dosagem única e exposição de 24 horas de duração).

No teste de toxicidade subcrônica, a exposição do organismo teste ao contaminante ocorre em doses/concentrações múltiplas (geralmente três níveis de dose), cujo período de exposição não excede 10% do tempo de vida do organismo teste, objetivando qual será o tempo de latência para o surgimento de efeitos relacionados à dose administrada no experimento; reversibilidade de efeitos; surgimento de lesões/danos.

Azevedo e Chasin (2004) mencionam o teste de toxicidade crônica ou teste de longa duração, e engloba o estudo da toxicidade correspondente por toda a vida do organismo teste, por exposição prolongada ao contaminante (geralmente este tempo é superior a três meses, podendo levar de meses a anos, dependendo da espécie utilizada no experimento). Neste tipo de teste, os animais devem ser submetidos a testes clínicos frequentes, e ao final do experimento, faz-se necessária a autópsia completa do organismo, visando a análise de anormalidades ou doenças decorrentes da exposição.

3.5 Biomarcadores

De modo geral, biomarcadores são modificações biológicas (expressadas em fluídos corpóreos, células ou tecidos) que demonstram a ação de contaminantes em um determinado organismo (LIVINGSTONE, 1993).

Walker *et al.* (1996) mencionam que os biomarcadores também podem ser caracterizados avaliando como os efeitos tóxicos de poluentes (os chamados xenobióticos) agem em um determinado organismo e como este responde à contaminação, em níveis comportamentais, fisiológicos ou metabólicos.

Existem vários tipos de biomarcadores, que se distinguem de acordo com sua aplicabilidade. Entre os critérios para definir a utilização de um determinado biomarcador, podemos citar: a especificidade ao xenobiótico e sua ação no organismo teste, a facilidade na aplicabilidade do método e a correta avaliação dos resultados obtidos (STEGEMAN *et al.*, 1992).

Também como critério de seleção é possível mencionar a determinação de limites de exposição do organismo teste ao contaminante (dose-resposta) e a caracterização de valores de exposição e efeito do xenobiótico. Os biomarcadores podem ser subdivididos em biomarcadores de efeito, de exposição e de suscetibilidade (ZAGATTO E BERTOLETTI, 2008).

Os biomarcadores de efeito detectam os efeitos adversos bioquímicos ou fisiológicos ocorridos da exposição e absorção de uma determinada substância (parâmetro biológico medido no organismo, que demonstra a interatividade do contaminante com os receptores biológicos) (AMORIM, 2003; VAN DER OOST, BEYER; VERMEULEN, 2003).

Biomarcadores de exposição são utilizados para avaliar a exposição individual ou coletiva de organismos, atuando na detecção e quantificação de uma substância. Já os biomarcadores de suscetibilidade demonstram a resposta que o organismo oferece à contaminação (exposição) ao qual foi submetido, sendo por fatores genéticos ou adquiridos (ZAGATTO E BERTOLETTI, 2008).

3.5.1 Biomarcadores somáticos

Aplicando o biomarcador somático Fator de Fulton (1904) na análise dos dados biométricos de organismos analisados, é possível verificar a saúde geral dos organismos, isto é, verificar o grau de bem estar dos animais no ambiente em que vivem, relacionando os dados biométricos aferidos (comprimento e peso) e aplicando a relação $Kf = W/L^3$ do fator “K”, em que “Kf” determina o fator de Fulton, o “W” refere-se ao peso do organismo (em gramas) e “L” especifica o tamanho total do indivíduo (em centímetros) (BRAGA, 1986; VAZZOLER, 1982).

Deste modo, o fator de condição de Fulton estabelece uma relação isométrica entre peso e comprimento (FLYNN et al., 2010).

3.5.2 Ensaio cometa

O ensaio cometa é um dos principais ensaios aplicados na detecção de compostos genotóxicos no meio ambiente, empregado para analisar danos ocorridos no material genético do organismo teste (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). Segundo os mesmos autores, a técnica se refere a uma eletroforese em microgel, em que se combinam técnicas bioquímicas de fácil aplicabilidade.

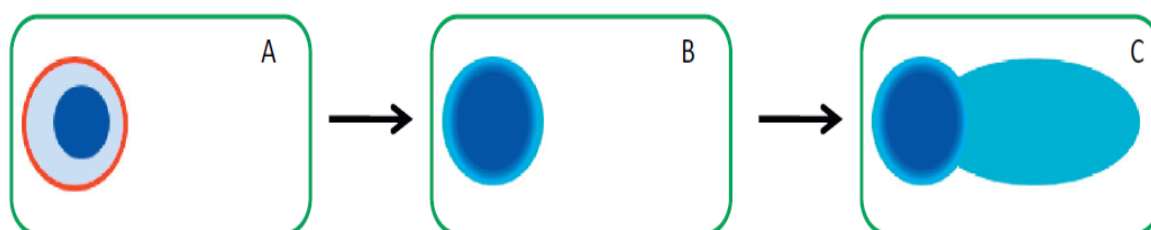
O ensaio cometa pode ser executado em qualquer tipo de célula nucleada, sendo comumente utilizadas amostras de sangue, as quais apresentam grande quantidade de eritrócitos (cerca de 97% do material). Como principais vantagens da aplicabilidade do teste cometa, seja para fins de monitoramento e genotoxicidade (fita simples e fita-dupla do DNA), pode-se mencionar a rápida execução, dispêndio de pequena quantidade de amostra, sensibilidade,

confiabilidade e custo acessível (RAMSDORF, 2011; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Da Silva (2007) explica que, essencialmente, o ensaio ocorre em três etapas:

- de início as células são incorporadas em gel de agarose e então são espalhadas pela superfície de uma lâmina, o que caracteriza a preparação do material que será analisado;
- as células então recebem uma corrente elétrica que faz com que ocorra uma migração dos segmentos de DNA livres, resultantes de quebras, para fora do núcleo: esta etapa denomina-se eletroforese;
- na avaliação dos nucleóides, observa-se o seguinte: as que apresentam um nucleóides íntegros (formação de círculos), não apresentaram dano detectável no DNA. Já as células lesadas podem ser identificadas por uma espécie de cauda, similar a um cometa, formada pelos fragmentos de DNA, conforme o esquema da figura 6, sendo A para a célula normal; B a célula em início de descompactação e C a formação da cauda, após eletroforese (AFANASIEVA; SIVOLOB, 2018).

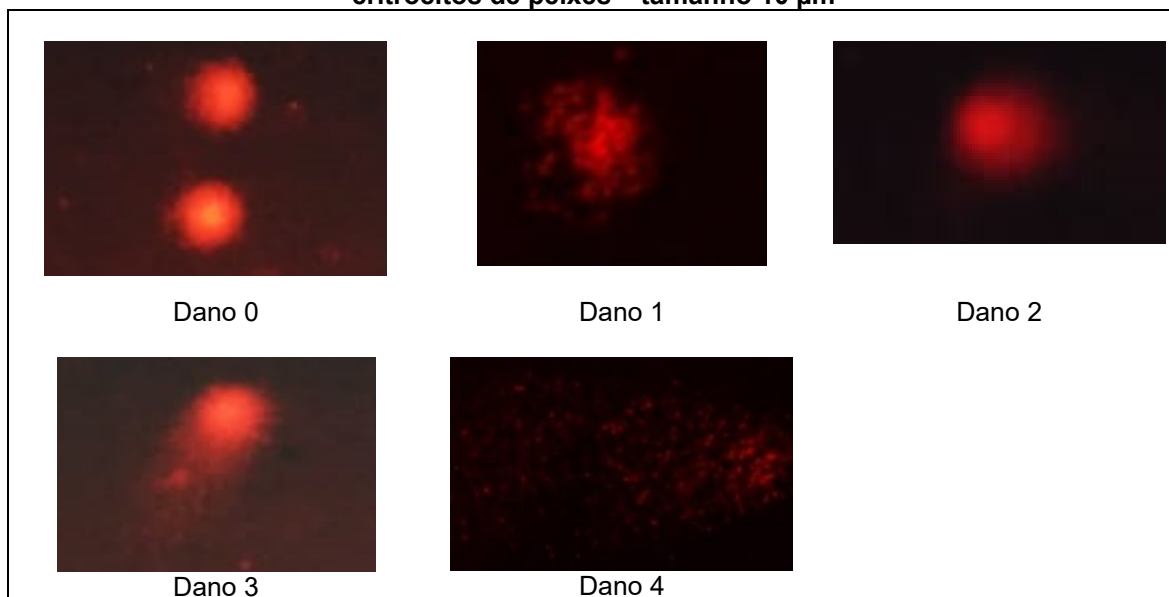
Figura 6. Principais etapas do Ensaio Cometa



Fonte: Afanasieva e Sivolob, 2018

Ainda de acordo com Da Silva (2007), os danos no DNA são determinados conforme a intensidade das quebras ocorridas neste material, sendo classificados geralmente como: dano 0 (sem danos aparentes, nucleóides sem formação de cauda característica), dano 1 (dano leve), dano 2 (dano médio), dano 3: (dano alto) ou dano 4 (dano máximo) (figura 7).

Figura 7. Imagens do ensaio cometa no microscópio óptico - classes de danos em eritrócitos de peixes – tamanho 10 μ m



Fonte: autoria própria (2022)

Na aplicabilidade de ensaio cometa, Afanasieva e Sivolob (2018) realizaram uma revisão das técnicas de realização do ensaio, determinando as vantagens de utilização do método, como a sensibilidade do teste na avaliação de material genético e a formação do cometa característico na representatividade do dano ocorrido no DNA.

3.5.3 Teste de Micronúcleo Písceo

O teste foi inicialmente desenvolvido por Schmid (1975) para estudo em células da medula óssea de camundongos, e posteriormente adaptado para estudo em células sanguíneas de peixes em laboratório, por Hoofman e de Raat (1982).

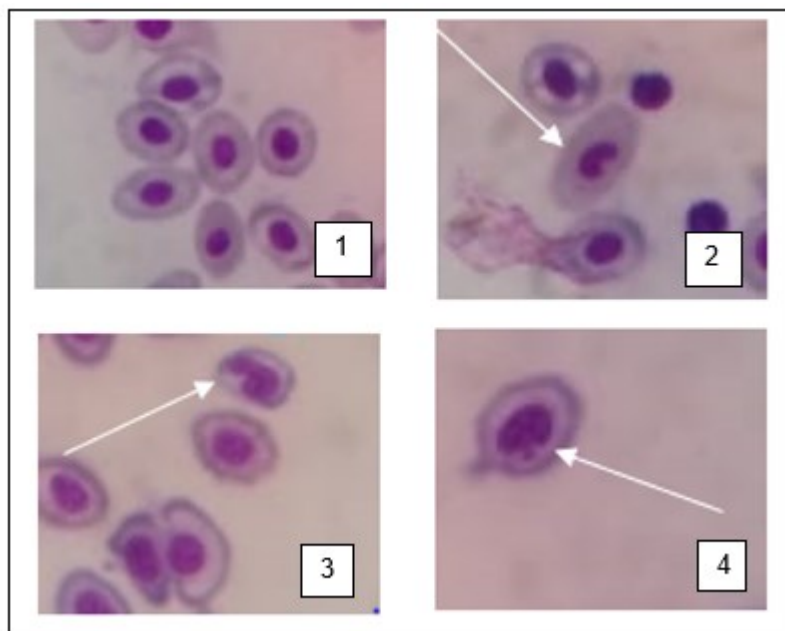
O teste de micronúcleo é utilizado para detectar a alteração genotóxicas e também aqueles que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal durante a divisão celular. É um teste que avalia a estrutura de fragmentos do material genético proveniente do núcleo principal. Esta reação é decorrente da ação de agentes físicos, químicos ou biológicos sobre o material genético (JÚNIOR, 2011; RAMSDORF, 2011).

Fenech (2007) classifica o teste de micronúcleos como um dos testes mais utilizados e aplicáveis para avaliar a genotoxicidade de um xenobiótico *in vivo*, apresentando alta sensibilidade como indicador de danos cromossômicos, na análise de material genético retirado de tecidos hematopoiéticos e epiteliais de muitos organismos teste.

Como vantagem, a aplicação deste ensaio caracteriza-se pela relativa simplicidade e rapidez na execução. A formação de micronúcleos pode ser observada durante o ciclo celular, obtendo-se um grande número de células para análise e contagem (HEDDLE *et al.*, 1983).

Na avaliação das células através de microscopia óptica, verificam-se alterações morfológicas nucleares entre 1000 e 2000 células, com membranas celulares e nucleares intactas. Assim, analisam-se células com anormalidades cromossômicas e com formações de micronúcleo (Figura 8), resultantes de quebras que não foram incorporadas no núcleo principal das células filhas após o processo mitótico (BENINCÁ, 2006).

Figura 8. Células em análise de micronúcleo, sendo a de nº 1 uma célula normal; de nº 2 e 3 células com anormalidades cromossômicas e nº 4 formação de micronúcleo – aumento 1000x



Fonte: autoria própria (2022)

Em peixes, o teste de micronúcleo (denominado micronúcleo písceo), permite avaliar o dano cromossômico estrutural ou numérico, sendo geralmente

realizado com eritrócitos do sangue periférico, fornecendo resposta genotóxica em estudos ambientais (RAMSDORF, 2011).

3.5.4 Biomarcadores bioquímicos

Biomarcadores bioquímicos são capazes de detectar precocemente as alterações ocorrentes, sendo sensíveis à presença de certos poluentes e os efeitos metabólicos nos organismos expostos. Portanto, apresentam alta especificidade e sensibilidade à ação de xenobióticos (STEGEMAN *et al.*, 1992).

Na análise de biomarcadores bioquímicos, é possível verificar as alterações ocorrentes nos sistemas enzimáticos, decorrentes de processos metabólicos de detoxificação dos organismos expostos à contaminação, que inicialmente absorveram e acumularam compostos químicos em seus tecidos e órgãos diante da situação de exposição ao xenobiótico (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Entre os biomarcadores bioquímicos, pode-se citar os biomarcadores de estresse oxidativo (através do qual se verificam danos oxidativos como lipoperoxidação, oxidação de proteínas e o dano ao DNA) (BIRBEN *et al.*, 2012), os de Neurotoxicidade (neurotransmissores), e os Biomarcadores de Biotransformação, como exemplo a análise da ação da enzima GST (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

3.5.4.1 Neurotoxicidade: Acetilcolinesterase (AChE)

A acetilcolina (ACh) é um dos principais neurotransmissores do sistema nervoso autônomo, podendo ser encontrada no organismo em junções neuroefetoras parassimpáticas e neuromusculares somáticas, na medula adrenal e também no sistema nervoso central (KLEMZ; ASSIS, 2005).

Por sua vez, a acetilcolinesterase (AChE) é a enzima responsável pela hidrólise deste neurotransmissor, atuando na regulação da transmissão do impulso nervoso (ADAMS, 1992) em todas as fibras pré-ganglionares do sistema nervoso autônomo, além das fibras parassimpáticas pós-ganglionares e também em

algumas simpáticas pós-ganglionares (ADAMS, 1992). A avaliação da atividade da acetilcolinesterase é um biomarcador de exposição e de efeito neurotóxico (MORAIS *et al.*, 2016).

De modo geral, o mecanismo de transmissão do impulso nervoso inicia com a liberação da acetilcolina no espaço intersináptico ou entre a fibra nervosa e a célula efetora. Este neurotransmissor, então, liga-se a um receptor colinérgico, gerando assim um potencial pós-sináptico e a consequente propagação do impulso nervoso. Finalmente, ACh é liberada e então hidrolisada (em um processo rápido e dinâmico) pela enzima acetilcolinesterase nas sinapses colinérgicas (FREITAS, 2009; GRISARN *et al.*, 1999; ROSSI, 2008).

Desta forma, a análise da atividade da Acetilcolinesterase (AChE), juntamente com um outro importante biomarcador de neurotoxicidade, a butirilcolinesterase (BChE) – ambas encontradas em todas as classes de vertebrados - figuram como importante biomarcador de neurotoxicidade em peixes (VAN DER OOST, BEYER E VERMEULEN, 2003), os quais mostram-se importantes elucidadores de efeitos neurotoxicológicos de contaminantes (MUTHULAKSHMI *et al.*, 2018).

3.5.4.2 Biotransformação: Glutathione S-transferases (GST)

As enzimas glutathione S-transferases (GST) em peixes são bastante concentradas no fígado, correspondendo a uma grande fração das proteínas hepáticas solúveis (STEGEMAN *et al.*, 1992).

Em menor concentração e com menor atividade enzimática, estão presentes também em tecidos extra-hepáticos. De acordo com Cnubben *et al.* (2001), esta enzima catalisa a conjugação de vários compostos (tais como carcinógenos, poluentes ambientais, drogas e muitos outros xenobióticos) com o tripeptídeo glutathione e, desta forma, atua no processo de detoxificação, reduzindo a possibilidade de ligação dos compostos à outras macromoléculas celulares, como por exemplo o DNA, pois estabelecem ligações covalentes com os compostos tóxicos (STEGEMAN *et al.*, 1992).

A enzima Glutathione S-transferase tem importante função de detoxificação de xenobióticos, sendo assim, um biomarcador de exposição ambiental a

poluentes. Pode ocorrer inibição ou estímulo da atividade enzimática, situação relacionada ao contaminante presente no ambiente. Mas em ambas as situações, a enzima GST desempenha uma importante função de proteção contra danos oxidativos e também de formação de produtos peroxidativos (VAN DER OOST, BEYER E VERMEULEN, 2003).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Soluções-teste

O fármaco dipirona sódica (nº registro *Chemical Abstracts Service* - CAS: 68-89-3) foi adquirido comercialmente, marca Delaware® (Importadora Química LTDA), de fórmula molecular $C_{13}H_{16}N_{13}NaO_4S.H_2O$, sob lote interno nº 754/2019 e lote do fabricante (Hebei Jiheng) nº 2160937, de acordo com o certificado de análise da Importadora Química nº 619117P5006L80/19 (Anexo 1).

A exposição dos peixes ao fármaco ocorreu via hídrica pelo período de 21 dias ocorrendo, portanto, um teste subcrônico. As concentrações de exposição, empregadas nos bioensaios, foram determinadas após pesquisa bibliográfica, observando os níveis de concentração da dipirona sódica consideradas letais e subletais. Lameira (2012), empregando *Danio rerio*, obteve o valor médio de $CL_{50/96h}$ de 3670 ($\pm 0,89$) mg/L e a concentração em que a autora observou efeitos de embriotoxicidade foi de 4,49 mg/L ($\pm 0,50$) mg/L.

Dessa forma, as concentrações de exposição foram assim estabelecidas: 4,9 mg/L (concentração intermediária) com derivações 7 vezes acima (34,3 mg/L; maior concentração) e 7 vezes abaixo; (0,7 mg/L; menor concentração). Assim garantimos estarmos trabalhando com concentrações subletais, uma vez a maior concentração empregada no presente trabalho foi aproximadamente 100 vezes menor que a $CL_{50/96h}$ para o *D. rerio*.

Devido à instabilidade da molécula de dipirona sódica, relatada na literatura, a solução teste foi preparada a cada 24 horas, sendo imediatamente utilizada na exposição, conforme as quantidades definidas nos cálculos realizados (Apêndice 1). Sobre esse aspecto, Pamplona (2011) observou, através de análises em cromatografia líquida, a cinética de degradação da dipirona sódica em aquários contendo peixes *Rhamdia quelen* expostos ao contaminante. As taxas de degradação observadas, segundo a autora, foram de 72,94% para as primeiras 24 horas de exposição e de 76,98%, em 48 horas.

Mesmo sendo observadas oscilações da concentração de dipirona sódica após uma série de experimentos, a autora relata que observou uma constante de concentração do fármaco, sendo aplicável a reposição no experimento,

obedecendo a proporção 3/4 da água dos aquários e do contaminante a cada 24 horas.

Dessa forma, na realização desta pesquisa, preparou-se no primeiro dia de exposição 50 mL de solução de dipirona sódica e água filtrada deionizada (solução mãe). Para os demais dias de exposição, diariamente preparou-se 25 mL da solução.

4.2 Aclimação dos peixes

Previamente à realização dos bioensaios, o projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UTFPR), sendo aprovado sob o Protocolo nº 23064.040939/2019-86.

Para o desenvolvimento dos bioensaios, foram adquiridos comercialmente com produtor local (Psicultura Ceasa – Curitiba/PR) 200 organismos juvenis (sendo 100 organismos para o bioensaio realizado em novembro de 2019 e 100 organismos para o bioensaio realizado em março de 2020) da espécie *Oreochromis niloticus*. Inicialmente ocorreu a aclimação dos organismos em laboratório, utilizando tanque de 250 L de polietileno (Figura 9), por 42 dias com condições controladas, sendo:

- Aclimação em tanque de 250 L de polietileno contendo água filtrada declorada, com renovação diária de 30% do volume total para remoção de impurezas e resíduos;
- Alimentação diária uma vez ao dia com ração comercial (teor de proteínas: 30%);
- Fotoperíodo (12 horas no claro e 12 horas no escuro);
- Aferição diária do pH e temperatura da água do tanque;
- Aeração constante com bombas de oxigênio.

Figura 9. Tanque para aclimação dos organismos teste – 250 L



Fonte: autoria própria (2022)

4.3 Exposição subcrônica ao contaminante

Após o período de aclimação, ocorreu a transferência dos juvenis para aquários de 25 L (Figura 10), também com aeração constante e sendo transferido um peixe de cada vez.

No bioensaio 1 (realizado em novembro de 2019), cada aquário foi composto por um grupo de 10 organismos – totalizando 4 aquários - e no bioensaio 2 (em março de 2020), foram 5 animais por aquário (sendo então 2 aquários para cada situação de exposição), com um total de 8 aquários. Esta modificação no bioensaio 2 (emprego de 5 peixes por aquário) foi necessária em virtude do maior tamanho dos organismos e para atender a recomendação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA (que recomenda a proporção: 1g de peixe por L de água).

A realização dos testes em duas etapas (dois bioensaios), foi necessária para aumentar o número de organismos avaliados e buscando maior confiabilidade estatística dos dados. Nos dois bioensaios foram obedecidas as mesmas condições de exposição. Durante a apresentação dos resultados, em nenhum momento houve a junção dos dados dos bioensaios, ou seja, os resultados dos bioensaios sempre foram analisados isoladamente.

A exposição via hídrica ocorreu pelo período de 21 dias em ambos os bioensaios (bioensaios subcrônicos), com a solução preparada com a dipirona

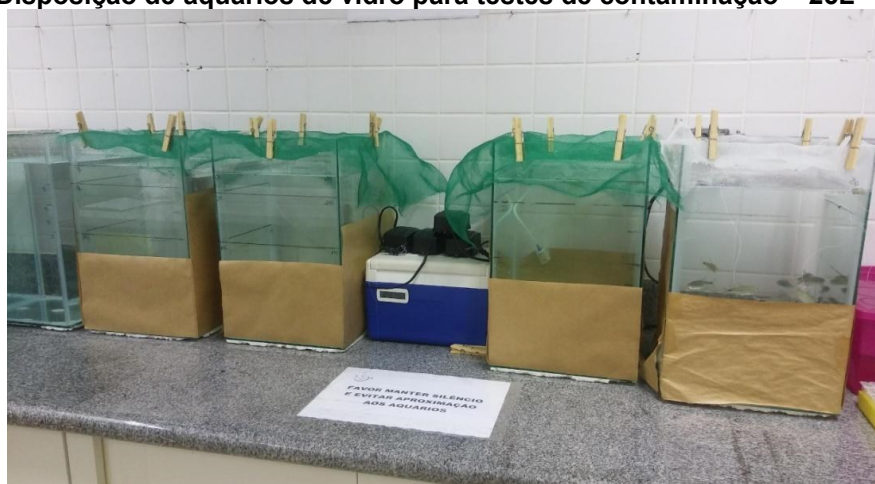
sódica nas concentrações 0,7; 4,9 e 34,3 mg/L diluído em água filtrada; a solução foi pipetada e diluída diretamente nos respectivos aquários, conforme tabela 2.

Tabela 2. Quantidade de solução de dipirona sódica adicionada diariamente por aquário (24 L), conforme concentrações determinadas

| Aquário / Exposição ao fármaco | Concentração (mg/L) | Quantidade de solução por aquário (mL) | Nº do aquário | |
|--------------------------------|---------------------|---|---------------|-------------|
| | | | Bioensaio 1 | Bioensaio 2 |
| Concentração mínima | 0,7 | Solução mãe: Concentração: 29,4 mg/L 0,38 | 01 | 01 e 02 |
| Concentração intermediária | 4,9 | 2,66 | 02 | 03 e 04 |
| Concentração máxima | 34,3 | 18,7 | 03 | 05 e 06 |

O método de exposição nos bioensaios foi semiestático, ou seja, com renovação diária da solução contaminante nos respectivos aquários de exposição. Assim como na fase da aclimatação, diariamente ocorreu a renovação da água em todos os aquários, com as taxas de renovação sendo realizadas na proporção de $\frac{3}{4}$ do volume total de cada aquário, para higienização e remoção de impurezas. Também se realizou o controle diário de pH, temperatura, fotoperíodo e oxigenação da água (aeração), e o fornecimento diário de ração comercial.

Figura 10. Disposição de aquários de vidro para testes de contaminação – 25L – Bioensaio 1



Fonte: autoria própria (2022)

4.4 Coleta do material biológico e de dados biométricos

Após a fase de exposição dos peixes, ocorreu o sacrifício dos organismos, adotando os seguintes procedimentos:

- a) anestesia por benzocaína (diluição na proporção 10 mL do anestésico: 1L de água);
- b) cada peixe foi sacrificado individualmente, mantendo o organismo na solução anestésica e aguardando alguns instantes (cerca de 40 segundos) até que fosse verificado o cessar da locomoção;
- c) realizou-se a coleta de dados biométricos de cada organismo – comprimento (em centímetros - cm) e massa corpórea (em gramas - g) -, com valores anotados em carta controle;
- d) o sangue foi coletado através de corte longitudinal entre a papila urogenital e a boca, utilizando tubo capilar por punção cardíaca imediata após o corte. O sangue coletado (aproximadamente 10 µL) foi colocado em microtubo com soro bovino fetal (1 mL) e acondicionado em caixa com gelo para ensaio cometa. Ainda com sangue, através da técnica do esfregaço, preparou-se uma lâmina para o teste do micronúcleo píceo;
- e) coleta dos demais materiais biológicos armazenados individualmente: músculo, cérebro e fígado (coletados e imediatamente congelados em ultrafreezer - 80°C, para análises bioquímicas) e rim (acondicionado em microtubo com 1 mL soro bovino fetal para realização do ensaio cometa).

4.5 Metodologia do ensaio cometa

4.5.1 Pré-cobertura das lâminas

Inicialmente foram preparadas as lâminas, limpando a superfície dessas com algodão e álcool, identificando-as e cobrindo-as com agarose, seguindo o protocolo proposto por Singh *et al.* (1988) e validado no Laboratório de Ecotoxicologia da UTFPR.

Para a etapa foram dissolvidos 1,5 g de agarose normal em 100 mL de PBS, realizando aquecimento e agitação constante, por cerca de duas horas.

Transcorrido este tempo, a agarose resfriou à temperatura ambiente, até solidificar. Este material solidificado foi então picado com espátula e levado ao aquecimento e depois ao agitador com barra de agitação magnética no béquer de 500 mL. A etapa de dissolução foi realizada novamente.

Logo após, a agarose liquefeita foi transferida para um béquer de 50 mL e este foi mantido em banho-maria a 80°C. Neste béquer com a solução de agarose preparada, cada lâmina (limpa e devidamente identificada) foi mergulhada, limpa na porção inferior e colocada para secar em superfície plana pelo período de 24 horas em temperatura ambiente. Após esse período, verificou-se visualmente a adesão da agarose às lâminas.

4.5.2 Montagem das lâminas

Inicialmente, foram dissolvidos 0,1g de agarose de baixo ponto de fusão LMP em 20 mL de PBS, a qual foi aquecida em béquer de 50 mL em micro-ondas por aproximadamente 1 minuto, sob agitação para dissolução. Essa agarose LMP foi mantida refrigerada, sendo somente aquecida (37°C) no momento da montagem das lâminas.

Após anestesia do peixe, foram coletadas alíquotas de sangue de cada organismo exposto no bioensaio e esse sangue foi acondicionado em microtubos de 1,5 mL contendo 1mL de soro bovino fetal. Esses tubos ficaram guardados em caixa térmica com gelo e na ausência de luz, assim como as demais etapas que prosseguem.

Para a montagem das lâminas do ensaio cometa com sangue, retirou-se 10 µL de sangue (adicionado ao soro bovino fetal) e este foi adicionado à 120 µL de agarose LMP aquecida por 30 segundos em microondas, e essa mistura foi transferida para a lâmina previamente coberta com agarose. Para a montagem das lâminas do ensaio cometa com tecido renal, foi inicialmente homogeneizada uma alíquota (fragmento do tecido renal com cerca de 0,5cm³) em soro bovino fetal (1 mL) e 15 µL dessa suspensão celular foi adicionada à 120 µL de agarose LMP. A mistura foi transferida para a lâmina previamente coberta com agarose. Após a deposição, adicionou-se uma lamínula para obtenção de uma fina camada e essa

lâmina coberta com lamínula foi armazenada em geladeira em superfície plana, por 15 minutos.

Realizou-se o mesmo procedimento para todas as amostras de sangue e tecido renal coletados. As lâminas foram então retiradas da geladeira e após 15 minutos, cada lamínula foi removida delicadamente. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em cubetas contendo solução de Lise (solução contendo 89 mL de Lise estoque (890 mL de H₂O destilada, 146, g de NaCl, 37,2 g de Ácido Etilenodiaminotetracético – EDTA, 1,2 g de TRIS 10 mM, 8 g de NaOH e 10 g de Lauril Sarcosinato de Sódio), 10 mL de DMSO e 1 mL de Triton X-100). As cubetas foram envoltas por papel alumínio, identificadas e mantidas na geladeira por 24 horas.

4.5.3 Corrida eletroforética

A corrida de eletroforese ocorreu na ausência de luz. Inicialmente, foi preparado o tampão de eletroforese pH 13,0 (apêndice 2). As lâminas foram retiradas das cubetas com a solução de lise refrigerada, e transferidas para a cuba de eletroforese com gelo, dispostas horizontalmente, permanecendo na cuba com solução tampão de eletroforese por 30 minutos com o equipamento desligado, possibilitando a desespiralização do DNA. Em seguida, foram verificados os parâmetros aferidos com adição ou remoção da solução tampão de eletroforese (25V e 300mA).

Iniciou-se a corrida de eletroforese por 25 minutos e, após esse tempo, as lâminas foram delicadamente retiradas da cuba e imediatamente neutralizadas com tampão TRIS de pH 7,5 (procedimento realizado por 3 vezes, com intervalo de 5 minutos entre elas). As lâminas foram colocadas inclinadas para secar à temperatura ambiente, e em seguida, foram fixadas em etanol absoluto por 5 minutos. Após secagem, foram acondicionadas em caixa porta-lâminas até o momento da análise.

4.5.4 Análise dos nucleóides

Para análise em microscópio de epifluorescência (marca / modelo Leica 020-518.500 DM/LS), as lâminas foram coradas com 20 µL de brometo de etídeo (20 µl/mL) por lâmina e cobertas com lamínula. A análise ocorreu no escuro, com observação de 100 nucleóides por lâmina, com objetiva de aumento 40x, sendo atribuído uma classe de dano (0, 1, 2, 3 e 4) de cada nucleóide de acordo com a cauda formada e intensidade de material genético na cabeça.

Os valores de danos de cada um dos 100 nucleóides por organismo foram anotados em planilha para cálculo dos escores. Para a obtenção dos escores, aplicou-se uma fórmula em planilha do Excel, para cálculo do escore atribuído ao dano (ou ausência de dano) no DNA. Foi atribuído um escore para cada lâmina analisada, calculando-se o escore da seguinte forma:

$$\text{Cálculo do escore} = (n \text{ classe } 0 \times 0) + (n \text{ classe } 1 \times 1) + (n \text{ classe } 2 \times 2) + (n \text{ classe } 3 \times 3) + (n \text{ classe } 4 \times 4)$$

Em que:

“n classe” se refere ao total de danos obtidos na análise por lâmina, classificados como danos 0, 1, 2, 3 e 4.

4.6 Teste micronúcleo písceo

No teste micronúcleo písceo, que objetiva a análise de micronúcleos e de alterações morfológicas nucleares em eritrócitos, realizou-se o seguinte procedimento: primeiramente as lâminas foram limpas e identificadas. Após anestesia e coleta do sangue, as lâminas foram preparadas com um esfregaço do sangue circulante e mantidas à temperatura ambiente para secagem por 24 horas.

Fixou-se em etanol por 25 minutos, e foram dispostas inclinadas para secar à temperatura ambiente. Essas lâminas foram então coradas com solução de Giemsa (preparada com 10 mL do corante Giemsa e 90 mL do tampão fosfato pH 6,8) por 13 minutos, submersas e dispostas paralelamente em cubetas de vidro. Na

sequência, foram retiradas das cubetas e lavadas rapidamente em água corrente, a fim de remover excessos de corante e colocadas para secar ao ar, inclinadas.

As lâminas foram submetidas à análise dos micronúcleos e alterações morfológicas nucleares em microscópio óptico (Olympus, CX31). Para leitura, ajustou-se a lâmina focando a objetiva do microscópio na menor ampliação, e em seguida, realizado ajuste com a objetiva de 40x. Colocou-se uma gota de óleo de imersão e passou-se para a objetiva de 100x.

Com os ajustes necessários concluídos, em cada lâmina, verificou-se a presença de micronúcleo e de alterações morfológicas nucleares em 2.000 eritrócitos por lâmina, sendo cada lâmina percorrida em sentido “zig-zag”. Foi anotado o número de micronúcleos e de alterações morfológicas nucleares por lâmina, para análise estatística.

4.7 Biomarcadores bioquímicos

Os testes bioquímicos foram realizados com os órgãos (cérebro, músculo e fígado) coletados dos animais seguindo protocolo padrão disponível no Laboratório de Ecotoxicologia da UTFPR, elaborado segundo a literatura (análise da atividade da enzima GST segundo Keen *et al.*, 1976 e atividade da enzima acetilcolinesterase – AChE segundo Ellman *et al.*, 1961).

Após coleta dos órgãos, o material biológico foi imediatamente acondicionado no ultrafreezer, refrigerado a -80°C em microtubos individuais devidamente identificados. Após três semanas, os materiais foram descongelados (porém mantidos em condições adequadas de temperatura, em caixas térmicas com gelo).

Realizou-se a pesagem de cada um dos órgãos (tubo por tubo, identificado conforme o nº da amostra (peixe) e respectivo órgão de análise) e foram anotados os valores obtidos para posterior cálculo de padronização nas diluições nos respectivos tampões (apêndices 11 e 12). Após esta prática, foram preparadas as soluções tampão para homogeneização das amostras. Para o fígado (atividade da GST), foi utilizado solução Tampão Tris-HCl 20 mM, EDTA 1,0 mM, pH 7,6

enquanto que, para cérebro e músculo (atividade da acetilcolinesterase), utilizou-se a solução tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5 (Apêndice 3).

No caso dos procedimentos para cérebro e músculo, foram considerados os seguintes critérios de pesagem antes da homogeneização:

- Cérebro: homogeneizou-se na proporção “1 parte tampão: 1 parte cérebro”, como exemplo: 0,1 g de massa do cérebro em 1 mL do tampão de homogeneização (tampão fosfato de potássio).
- Músculo: homogeneizado em tampão fosfato na proporção 2 partes tampão: 1 parte do músculo, como exemplo: 1 mL tampão: 0,05 g de músculo.

Concluídas as etapas de pesagens das amostras e preparadas as soluções tampão, procedeu-se a homogeneização das amostras, triturando-as no homogeneizador na velocidade mínima do aparelho, de modo individual (com assepsia da ponteira do homogeneizador a cada amostra, utilizando água filtrada e secagem da ponteira, evitando, desta forma, possíveis contaminações).

Adicionou-se em cada microtubo sua respectiva solução tampão, nas dosagens calculadas previamente, conforme a proporção de 0,2 g de tecido para 2 mL de volume final. Em seguida, as amostras foram centrifugadas em grupos de 36 tubos por vez, a 12.000 g de velocidade, durante 20 min e 4 °C.

Foram separadas as alíquotas do sobrenadante das amostras centrifugadas, em microtubos de 2 mL, e novamente acondicionados à temperatura de -80°C no ultra freezer. Foi verificado que todas as amostras ficaram com aspecto translúcido.

Foram consideradas as seguintes alíquotas dos materiais biológicos:

- Fígado: Atividade das enzimas = 200 µL (após quantificação de proteínas, as amostras foram normalizadas para 1,0 mg/mL em tampão de homogeneização - Tampão Tris-HCl 20 mM, EDTA 1,0 mM, pH 7,6, PMSF 1 mM).
- Cérebro/músculo: Determinação da concentração de proteínas = 50 µL. Atividade da acetilcolinesterase = 200 µL.

4.7.1 Determinação das concentrações de proteínas

Antes da realização dos testes bioquímicos, é imprescindível proceder a quantificação da concentração de proteínas, utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976), a fim de que as amostras finais apresentem a concentração

de proteínas em valores aproximadamente parecidos. O método transcorreu conforme as etapas que se seguem, sendo realizado primeiramente todas as amostras de cérebro, seguindo para músculo e por último as amostras de fígado:

- a) em uma microplaca de 96 poços realizou-se a pipetagem das amostras centrifugadas (materiais sobrenadantes) - todos em triplicatas: foram pipetados 10 μ L do controle/ referência - denominado como "branco" da microplaca (adicionado 10 μ L de tampão, que é o branco), 10 μ L do tampão respectivo do órgão a ser analisado (cérebro, fígado e músculo) e 10 μ L de solução padrão de albumina do soro bovino (BSA) em cada poço da microplaca, para testagem do sobrenadante, a fim de verificar a necessidade de diluição. Em cada poço com os materiais pipetados, foram adicionados 250 μ L do reativo de Bradford pronto.
- b) em seguida, verificou-se visualmente as colorações apresentadas de característica azulada: a cor da amostra pipetada ficou menos intensa que a coloração do padrão BSA (soro de albumina bovina) e mais intensa que a coloração do tampão, portanto, não foi necessário realizar a diluição.
- c) realizou-se o cálculo para determinar a quantidade necessária de tampão conforme apêndice 4.
- d) para quantificação da concentração de proteínas: em todas as amostras aplicou-se as repetições em triplicatas, pipetando-se 10 μ L em cada um dos poços. Pipetou-se 10 μ L do branco (tampão empregado na homogeneização) e 10 μ L de albumina de soro bovina – BSA, preparado a 1 mg/mL PBS, para curva-padrão nas concentrações: 0; 0,125; 0,250; 0,500; 1,0 mg BSA/mL.

Para a curva padrão preparou-se as seguintes concentrações: 500 μ g/mL, 250 μ g/mL e 125 μ g/mL. Os reagentes para a curva foram preparados em tubos de eppendorfs. Em cada tubo adicionou-se 100 μ L de água de osmose. Seguindo o protocolo, procedeu-se à adição de BSA em cada tubo respectivo à concentração desejada, iniciando pelo tubo de 500 μ g/mL, onde adicionou-se 100 μ L de BSA, agitando em seguida. Já no segundo tubo, de 250 μ g/mL, adicionou-se 100 μ L da solução preparada anteriormente (de 500 μ g/mL), agitando em seguida.

Por fim, no terceiro tubo, de 125 μ g/mL, adicionou-se 100 μ L da solução preparada anteriormente (de 250 μ g/mL), agitando em seguida. Pipetou-se em todos os poços da microplaca 250 μ L do reativo de Bradford utilizando a micropipeta multicanal, com o cuidado de proteger a microplaca da incidência de

luz. Imediatamente a placa foi inserida na leitora de espectrofotometria, a qual já estava com os parâmetros configurados, incluindo o *layout* da microplaca, para medição da absorbância a 595 nm.

Verificadas as diluições com base na análise da coloração, organizou-se o mapa da microplaca com disposição em triplicatas, seguindo a numeração específica de cada organismo e cada órgão coletado (exemplo: peixe 01/ fígado: 01F). Fez-se necessário diluir 06 amostras na proporção de 1:8 para 1:10, pois as mesmas apresentaram valor de ABS maior que 1,0 mg BSA/mL. Os valores obtidos foram planilhados, para cálculo da concentração das proteínas (dados de ABS com resultante das médias e subtraindo o valor da média do branco). As demais amostras foram diluídas na proporção 1:8.

4.7.2 Acetilcolinesterase (AChE) - Cérebro e músculo

Inicialmente normalizou-se as amostras de músculo e cérebro para 1,0 mg/mL, diluindo-as em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5. Pipetou-se 20 µL do sobrenadante da amostra (em triplicata) em microplaca, mais 20 µL do tampão (branco, em triplicata) na microplaca (padronizou-se a adição do branco sempre nos três primeiros poços da microplaca).

Na sequência, pipetou-se 130 µL de solução de DTNB com micropipeta multicanal (Solução de DTNB a 0,75 mM e adição de 0,0042 g de DTNB em 500 µL de metanol). Diluiu-se adicionando 13,5 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5). Pipetou-se 50 µL de iodeto de acetiltiocolina com micropipeta multicanal (Solução de iodeto de acetiltiocolina a 9 mM (6 mL) - com a diluição de 0,0161 g de iodeto de acetiltiocolina em 6 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5).

Foi verificado o acréscimo na absorbância imediatamente a 405 nm (tempo total de leitura = 5-7 min) em espectrofotômetro de microplaca.

4.7.3 Atividade da Glutathione S-transferase - GST - Fígado

Inicialmente as amostras foram normalizadas para 1,0 mg/mL (em tampão de homogeneização - Tampão Tris-HCl 20 mM, EDTA 1,0 mM, pH 7,6, PMSF 1

mM). Pipetou-se 20 μ L de tampão tris-EDTA (branco) em microplaca, em triplicatas, mais 20 μ L da amostra em microplaca.

O preparo do meio de reação ocorreu em duas fases, devido a quantidade de amostras para teste: pesou-se 0,0186 g de GSH ([GSH] final = 1,5 mM) e 0,0162 g de CDNB final = 2 mM - inicialmente diluído em 2 mL de etanol PA, sendo o preparo realizado em banho de gelo moído. Homogeneizou-se em um béquer o GSH e o CDNB pH 6,5 em 38 mL de tampão fosfato de potássio (0,1 M) - procedimento realizado na capela do laboratório, com armazenamento do meio de reação em banho maria T = 25°C). Utilizando micropipeta multicanal, pipetou-se 180 μ L de meio de reação. Concluindo todas as pipetagens, a microplaca foi inserida no espectrofotômetro previamente ajustado, para leitura da absorbância a 340 nm (tempo total = 300 s).

4.8 Análises estatísticas

Para a análise dos dados estatísticos, utilizou-se o software “*GraphPad Prism*” na versão 5.0, o qual permitiu compilar os dados observados na pesquisa, analisando-os estatisticamente e representando-os graficamente.

Os valores obtidos diretamente do *software* da leitora de microplaca (modelo “FluoStarOmega”, marca BMSG Labtech®) foram planilhados, considerando o valor do branco corrigido (branco: se refere à solução tampão usada na diluição dos órgãos, descrito no item metodologia), com base em dados brutos das medições nos 15 ciclos de leitura em cada uma das análises de AChE e GST (tempo inicial de 0 segundos e final de 9 min 20 s).

5 RESULTADOS

Antes de iniciar a exposição ao fármaco, os peixes foram mantidos em período de aclimação em laboratório. Em cada um dos bioensaios (1 e 2), foram submetidos ao processo de aclimação cem peixes juvenis, totalizando duzentos organismos aclimatados. Ocorreram mortes de dez indivíduos na aclimação do bioensaio 1, e de treze indivíduos no bioensaio 2.

Na exposição ao fármaco dipirona sódica, ocorreu mortalidade somente no bioensaio 2, no qual registrou-se a morte de dois organismos nos aquários destinados à concentração de 34,3 mg/L, já no início da exposição. As mortes possivelmente ocorreram pela não adaptação dos organismos à nova condição ambiental, e também porque foi observado a presença de fungos nos peixes mortos.

Durante todos dos dias da aclimação, os parâmetros controlados (fotoperíodo, temperatura (T°) e pH) mantiveram-se constantes: a temperatura obtida foi de $20^{\circ}\text{C} \pm 3,0$ para os dois bioensaios. O pH manteve-se na faixa de $7,0 \pm 0,5$ para o bioensaio 1 e de $7,3 \pm 0,5$ (Figuras 11 e 12).

Apesar das mortes registradas relatadas anteriormente, considera-se que a aclimação ocorreu dentro da normalidade esperada e sem interferência nos resultados dos ensaios ecotoxicológicos com os peixes, garantindo que os organismos estavam em boas condições no que se refere à sua saúde.

Figura 11. Dados verificados com coleta de água de modo aleatório, dos tanques de aclimação no bioensaio 1

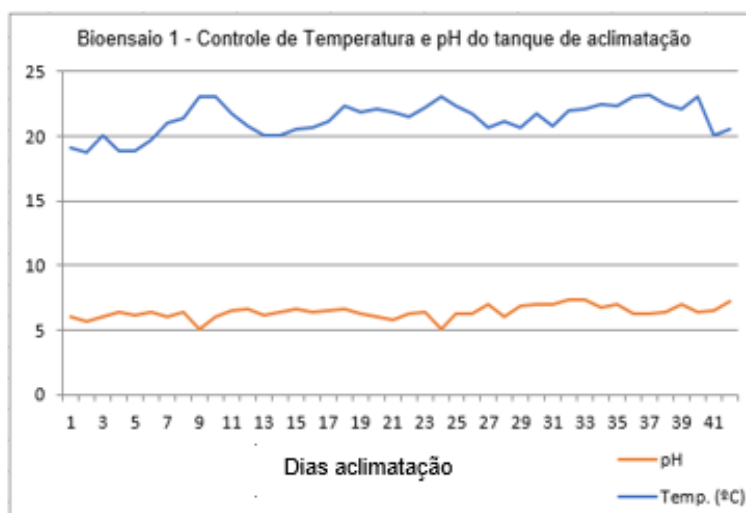
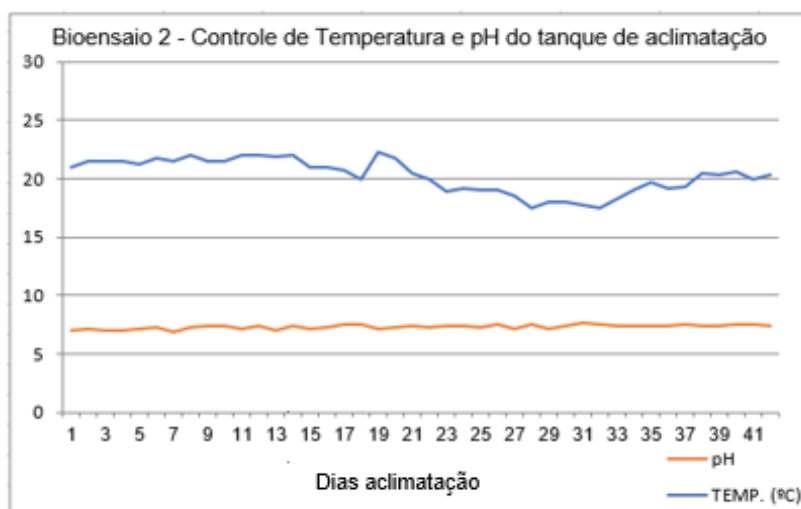


Figura 12. Dados verificados com coleta de água de modo aleatório, dos tanques de aclimação no bioensaio 2



Com relação aos dados morfométricos, realizou-se a aferição do comprimento (cm) e massa (g) de cada organismo, em ambos os bioensaios, após anestesia com Benzocaína (apêndice E).

Com os dados biométricos coletados (figuras 13 e 14, respectivamente para os bioensaios 1 e 2) e análise do Fator de de Fulton (K) (figuras 15 e 16, respectivamente para os bioensaios 1 e 2), em ambas as análises se aplicou análise de variância (ANOVA), e foi possível verificar que não houve diferença significativa entre os dados biométricos dos organismos dos grupos controle negativo e nos 3 grupos de exposição, considerando o nível de significância de 5%. O mesmo ocorreu ao avaliar os dados obtidos no Fator de condição de Fulton (apêndice F).

Figura 13. Representação gráfica da aferição dos dados biométricos de massa (A) e comprimento (B) dos organismos expostos ao fármaco, no bioensaio 1

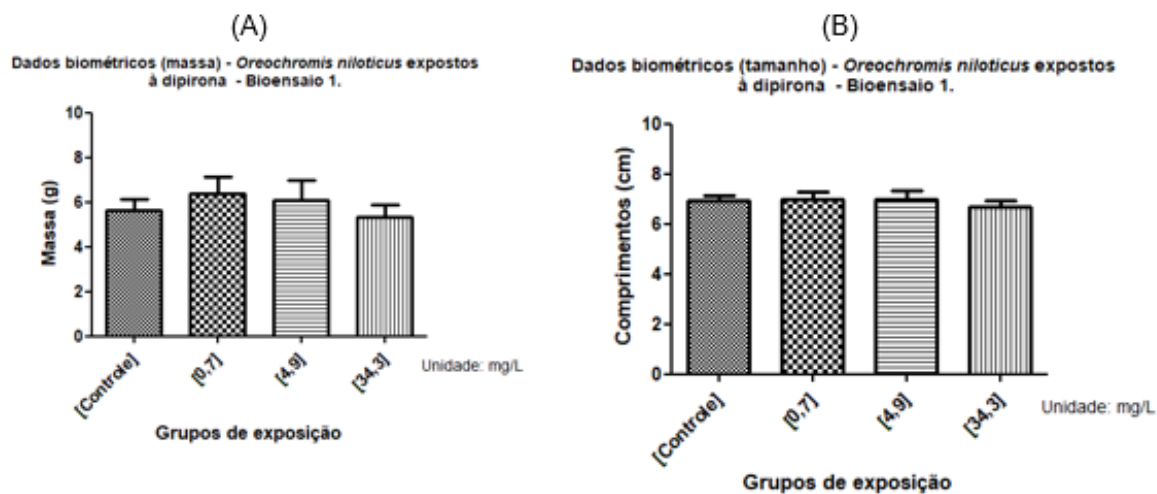


Figura 14. Representação gráfica da aferição dos dados biométricos de massa (A) e comprimento (B) dos organismos expostos ao fármaco, no bioensaio 2

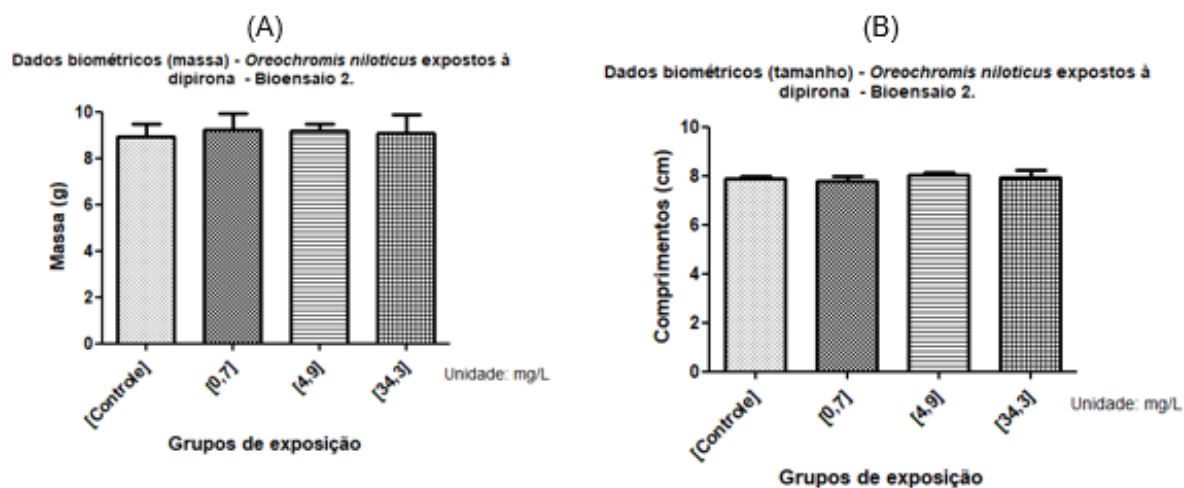


Figura 15. Representação gráfica da análise do Fator de condição de Fulton dos organismos expostos ao fármaco, no bioensaio 1

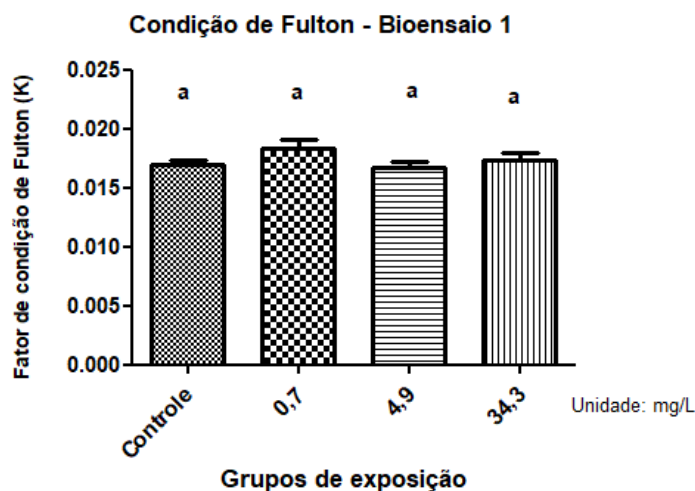
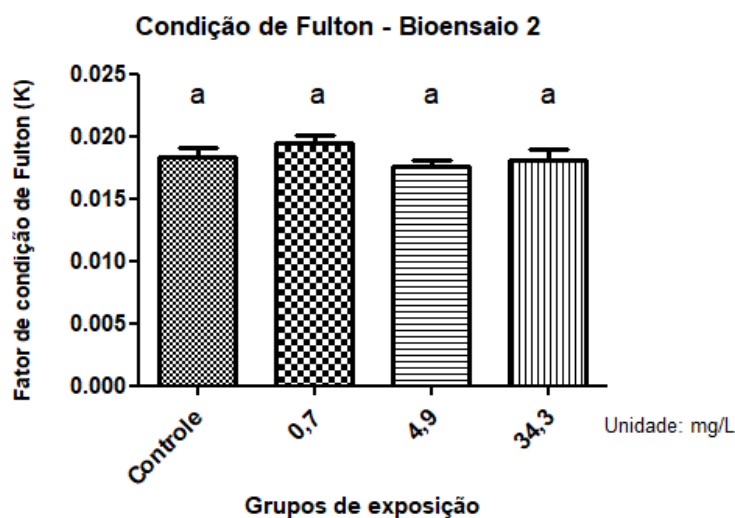


Figura 16. Representação gráfica da análise do Fator de condição de Fulton dos organismos expostos ao fármaco, no bioensaio 2

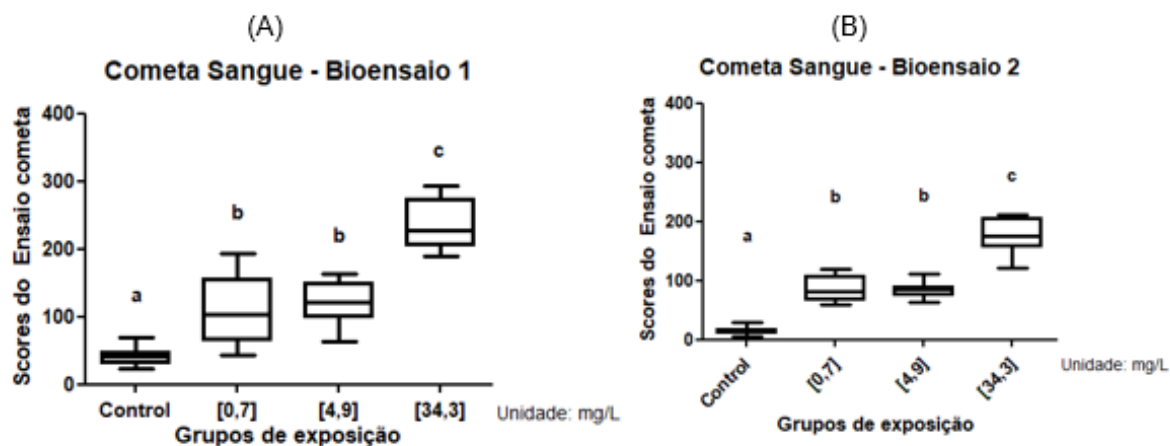


No ensaio cometa, com os escores calculados, verificou-se, por meio do teste de Kruskal-Wallis, diferença estatística significativa entre os grupos expostos às três concentrações de dipirona em relação ao grupo controle negativo nas células do sangue, em ambos os bioensaios, com os maiores danos no material genético sendo encontrados nos exemplares expostos às maiores concentrações da dipirona sódica (4,9 mg/L e 34,3 mg/L).

Também no ensaio cometa observou-se diferença estatística no grupo exposto à maior concentração, em relação aos grupos de exposição intermediária

e de menor concentração, nos bioensaios 1 e 2. Os valores encontrados estão dispostos nos apêndices 6 a 9 e na figura 17, sendo “A” para bioensaio 1 e “B” para bioensaio 2.

Figura 17. Representação gráfica dos resultados genotóxicos, obtidos na exposição subcrônica de tilápias ao fármaco dipirona sódica, nos bioensaios 1 (A) e 2 (B) em amostras de sangue. Letras iguais no gráfico significa que não houve diferença significativa entre os grupos. Letras diferentes indicam diferença significativa, ou seja, $p < 0,05$

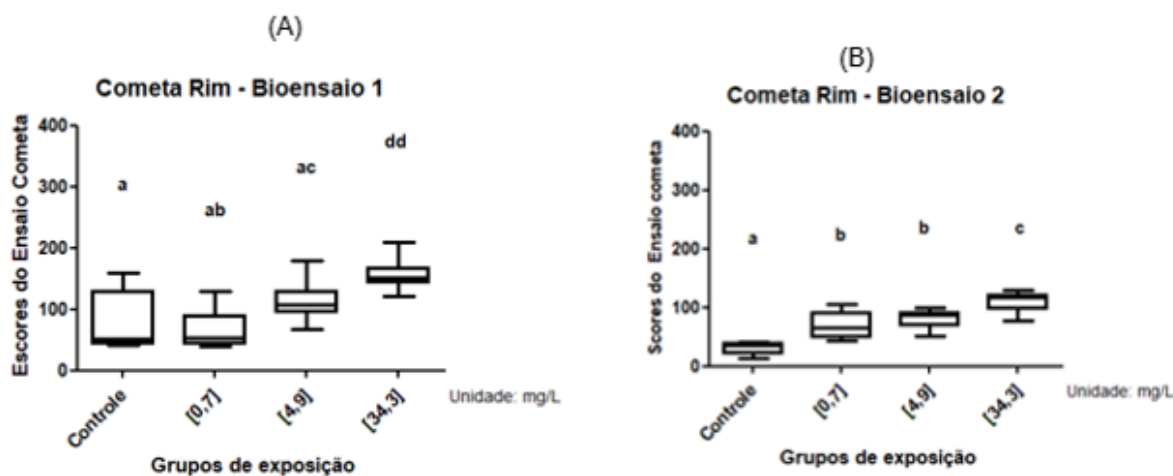


Para o tecido renal, a análise do material genético dos organismos do bioensaio 1 demonstrou diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle negativo e a concentração de 34,3 mg/L.

Ainda no bioensaio 1, o grupo de exposição intermediária (4,9 mg/L) e de maior concentração (34,3 mg/L) apresentaram diferença significativa em relação ao grupo de exposição de menor concentração (0,7 mg/L).

Com relação ao bioensaio 2, foi observada diferença significativa entre os três grupos de exposição à dipirona sódica em relação ao grupo controle negativo (figura 18, sendo “A” para o bioensaio 1 e “B” para o bioensaio 2).

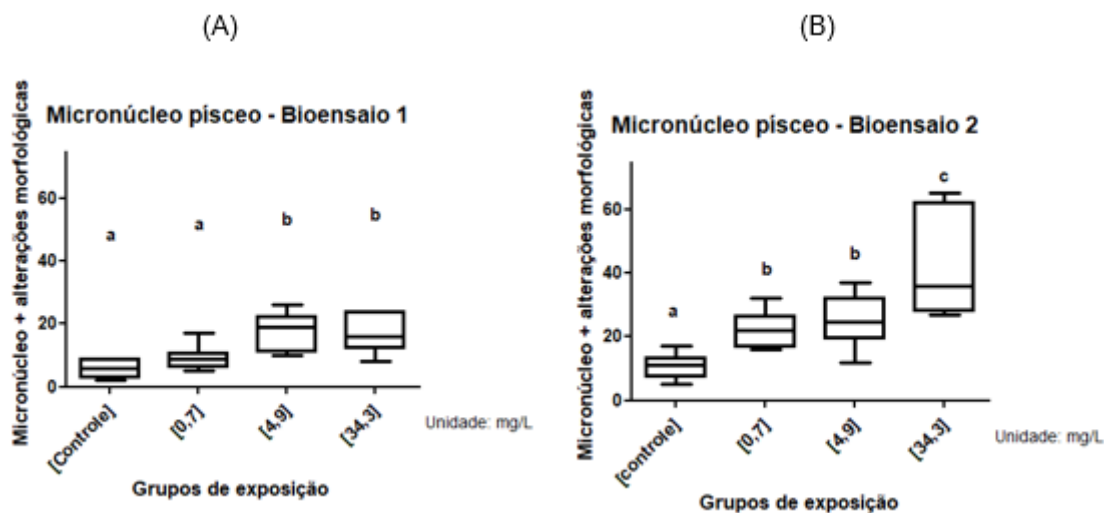
Figura 18. Representação gráfica dos resultados genotóxicos, obtidos na exposição subcrônica de tilápias ao fármaco dipirona sódica, nos bioensaios 1 (A) e 2 (B), em amostras de tecido renal. Letras iguais no gráfico significa que não houve diferença significativa entre os grupos. Letras diferentes indicam diferença significativa, ou seja, $p < 0,05$



No teste do Micronúcleo Písceo, foi possível observar diferenças significativas entre os grupos de exposição 4,9 mg/L e 34,3 mg/L em relação ao grupo controle negativo no bioensaio 1 e nos 3 grupos de exposição no bioensaio 2, também em relação ao grupo controle negativo (Figura 19, sendo “A” para bioensaio 1 e “B” para bioensaio 2).

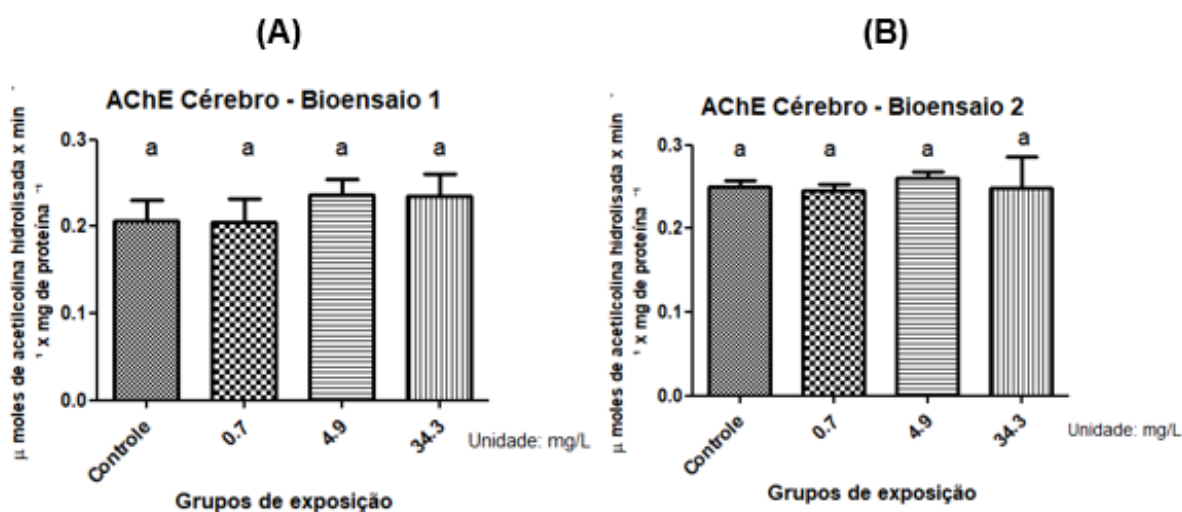
Além disso, observou-se diferença estatisticamente significativa ao comparar os grupos de exposição 0,7 mg/L com os grupos 4,9 mg/L e 34,4 mg/L no bioensaio 1. No bioensaio 2, a diferença estatística foi observada entre os grupos 0,7 mg/L e 34,3 mg/L e entre 4,9 mg/L e 34,3 mg/L.

Figura 19. Representação gráfica dos resultados no teste micronúcleo pisceio (micronúcleo e alterações morfológicas), obtidos na exposição subcrônica de tilápias ao fármaco dipirona sódica, no bioensaios 1 (A) e 2 (B). Letras iguais no gráfico significa que não houve diferença significativa entre os grupos. Letras diferentes indicam diferença significativa, ou seja, $p < 0,05$



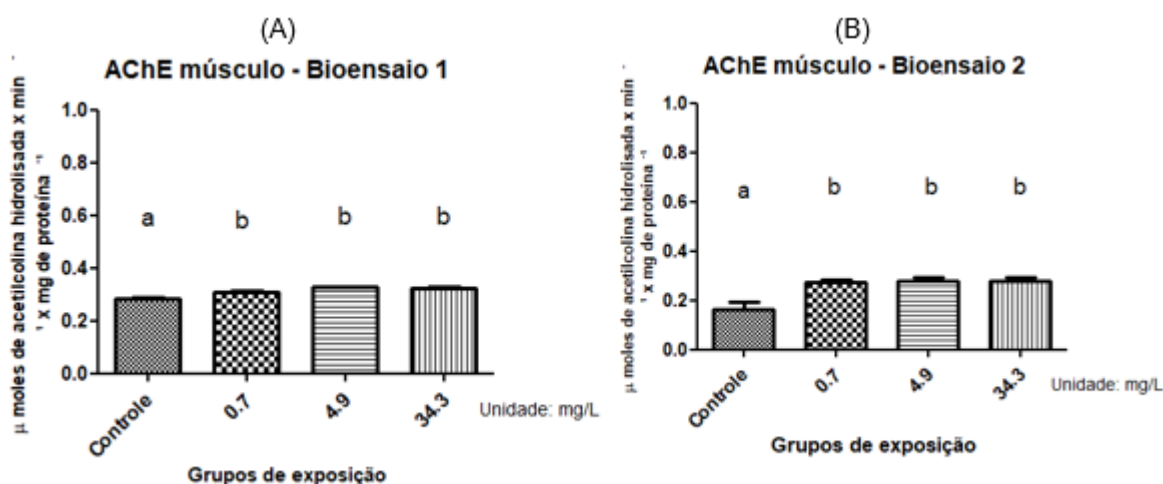
Com relação aos efeitos do fármaco dipirona sódica na atividade enzimática dos organismos, na análise *Post hoc* - comparação múltipla de Bonferroni - e de variância ANOVA, verificou-se que não houve diferença significativa na atividade de Acetilcolinesterase em cérebro dos organismos teste nos dois bioensaios (figura 20).

Figura 20. Representação gráfica dos resultados obtidos após exposição à dipirona sódica nos bioensaios 1 (A) e 2 (B), após análise do biomarcador de AChE em amostras de cérebro de tilápias. Letras iguais no gráfico significa que não houve diferença significativa entre os grupos. Letras diferentes indicam diferença significativa, ou seja, $p < 0,05$



Avaliando a atividade de Acetilcolinesterase em músculo (Figura 21, sendo A para bioensaio 1 e B para bioensaio 2), também se aplicou análise de variância ANOVA e *Post hoc* – comparação múltipla de Bonferroni e, comparando o grupo controle negativo com os 3 grupos de exposição ao fármaco, foi possível observar diferença significativa tanto no bioensaio 1 quanto no bioensaio 2 entre as três concentrações de exposição ao fármaco, em relação ao grupo controle negativo. Assim, verificou-se que já na menor concentração de dipirona sódica ocorreu ação do fármaco no aumento (estímulo) da atividade da enzima AChE.

Figura 21. Representação gráfica dos resultados obtidos após exposição à dipirona sódica nos bioensaios 1 (A) e 2 (B), através da análise com biomarcador de AChE em músculo de tilápias. Letras iguais no gráfico significa que não houve diferença significativa entre os grupos. Letras diferentes indicam diferença significativa, ou seja, $p < 0,05$

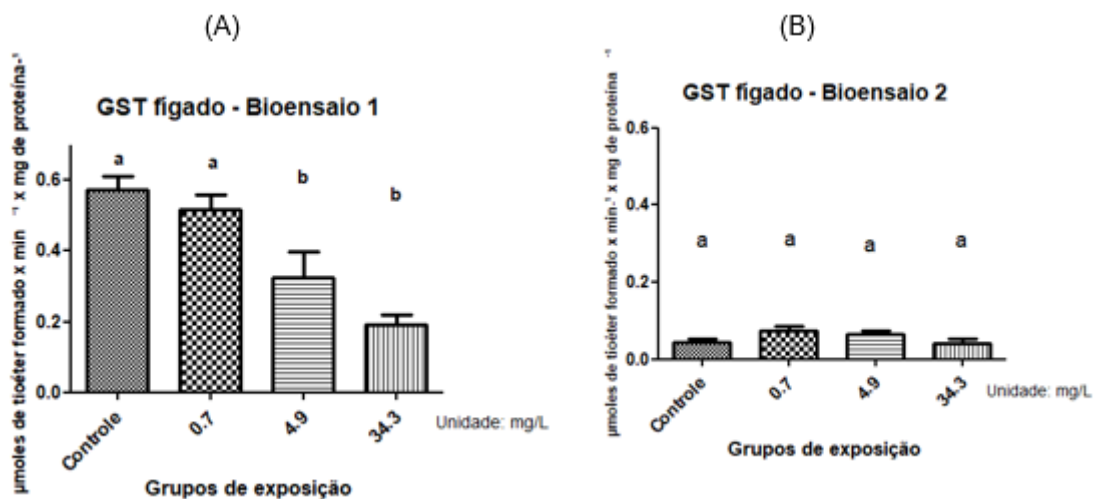


Para glutationa S-transferase (GST), análise da atividade realizada nas amostras de fígado dos peixes, também aplicando os métodos estatísticos ANOVA e Bonferroni (Figura 22, sendo A para bioensaio 1 e B para bioensaio 2), verificou-se as seguintes situações de diferenças entre os grupos de animais, no bioensaio 1: diferenças significativas entre grupo controle negativo e grupos de exposição 4,9 e 34,3 mg/L, e também no comparativo do grupo 0,7 mg/L com os grupos 4,9 e 34,3 mg/L (nesses grupos de exposição ao fármaco, os dados demonstram que ocorreu inibição enzimática).

Não foram observadas diferenças estatísticas significativas nos dados obtidos no bioensaio 2.

A atividade da enzima GST somente foi inibida no bioensaio 1, enquanto que no bioensaio 2 não foram observadas alterações estatisticamente significativas.

Figura 22. Representação gráfica dos resultados obtidos após exposição à dipirona sódica nos bioensaios 1 (A) e 2 (B), na análise do biomarcador GST em tilápias, em amostras de fígado. Letras iguais no gráfico significa que não houve diferença significativa entre os grupos. Letras diferentes indicam diferença significativa, ou seja, $p < 0,05$

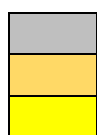


Contextualizando os resultados obtidos na avaliação ecotoxicológica da dipirona sódica, a tabela 3 demonstra, de modo geral, os dados obtidos nos bioensaios 1 e 2, em comparativo o grupo controle negativo (CN) em relação aos três grupos de concentrações (0,7; 4,9 e 34,3 mg/L) nos quais os organismos testes foram submetidos à exposição.

Tabela 3. Visão geral das alterações observadas nos grupos expostos ao fármaco Dipirona Sódica, em relação ao controle negativo (CN)

| Parâmetros | Bioensaio 1 | | | | Bioensaio 2 | | | |
|--------------------|------------------------------|----------|----------|-----------|-------------|----------|----------|-----------|
| | CN | 0,7 mg/L | 4,9 mg/L | 34,3 mg/L | CN | 0,7 mg/L | 4,9 mg/L | 34,3 mg/L |
| Condição de Fulton | Gray | Gray | Gray | Gray | Gray | Gray | Gray | Gray |
| Genotoxicidade | Ensaio cometa (sangue) | Orange | Orange | Orange | Gray | Orange | Orange | Orange |
| | Ensaio cometa (tecido renal) | Gray | Gray | Orange | Gray | Orange | Orange | Orange |
| Mutagenicidade | Micronúcleo pisco | Gray | Orange | Orange | Gray | Orange | Orange | Orange |
| Neurotoxicidade | AChE - cérebro | Gray | Gray | Gray | Gray | Gray | Gray | Gray |
| | AChE - músculo | Gray | Orange | Orange | Gray | Orange | Orange | Orange |
| Biotransformação | GST | Gray | Yellow | Yellow | Gray | Gray | Gray | Gray |

LEGENDA



- Sem diferença significativa em relação ao CN.
- Observado aumento de dano / indução da atividade enzimática.
- Observada diminuição / inibição da atividade enzimática.

6 DISCUSSÃO

Antes da realização das exposições, na solução contaminante, composta por dipirona sódica e água, observou-se na análise visual uma mudança da coloração bastante acentuada indo de uma fase quase incolor para uma coloração verde-amarelada intensa, além de aumento de pH da solução após o período de 24 horas, corroborando com a pesquisa de Isquibola e Rodrigues (2019), que verificaram, em um estudo referente à degradação da dipirona sódica, a facilidade de hidrólise do fármaco, em solução aquosa.

Os autores também mencionam que a fotólise do metabólito 4-metilaminoantipirina (4-MAA) pode resultar em outros compostos, os quais apresentam menor massa molecular e uma difícil degradação natural, com conseqüente mineralização e liberação de compostos e íons inorgânicos como por exemplo CO₂, Cl⁻ e SO₄.

Com relação aos resultados obtidos para ensaio cometa, ao analisar os dados dos dois bioensaios e nos dois materiais biológicos coletados (eritrócitos e tecido renal), foi possível detectar o efeito genotóxico da dipirona sódica em todas as concentrações de exposição ao fármaco.

Lameira (2012) verificou a ação genotóxica do fármaco em *D. rerio*, em concentrações na ordem de 0,7 a 50,0 µg/L (similares às concentrações já observadas ambientalmente e em esgotos tratados), onde verificou-se lesões renais agudas e crônicas e danos ao DNA das células hepáticas dos organismos expostos (CESTARI *et al.*, 2018; PAMPLONA *et al.*, 2011).

Não são muitas as pesquisas relacionadas à ação do fármaco dipirona sódica, com relação à ação genotóxica e mutagênica em peixes (GOMES, 2017). A mesma escassez de dados é verificada em análises com mamíferos (GOMES *et al.*, 2021). Mas, entre os poucos trabalhos encontrados, há relatos de potencial efeito genotóxico do fármaco. Por exemplo, em células de linhagem celular de rim de macaco verde africano (VERO) tratadas com concentração única de 5 mM de dipirona sódica, Gomes *et al.* (2021) observaram a indução de aumento no índice de dano DNA, utilizando o ensaio cometa na avaliação genotóxica. Os pesquisadores observaram um aumento significativo na apoptose das células tratadas com o fármaco, tanto pelo período de 24 horas como no de 48 horas.

Arkhipchuk et al., 2004 analisaram, utilizando organismos testes pertencentes à diferentes grupos sistemáticos, como por exemplo invertebrados das espécies *Ceriodaphnia affinis* e *Hydra attenuata*; vertebrados das espécies *Carpas crucianas*, *Carassius auratus gibelio* e em *Allium cepa*, efeitos tóxicos, genotóxicos e citotóxicos da dipirona sódica. Em todos os casos, a dipirona apresentou uma toxicidade aguda na concentração 500mg de metamizol.

Segundo Grisolia e Starling (2001), utilizando o teste micronúcleo písceo, é possível verificar a formação de micronúcleos, resultante de quebra cromossômica ou aneuploidia durante a divisão celular, ocasionados pelos contaminantes. Na realização deste experimento, tanto no bioensaio 1 quanto no bioensaio 2, analisando estatisticamente os dados obtidos na análise de micronúcleos e considerando significância de 5%, não foram observadas diferenças significativas entre os três grupos dos dois bioensaios, comparando os resultados com o grupo controle negativo (apêndice J).

No teste micronúcleo písceo, ao avaliar as alterações morfológicas (ou anomalias nucleares), Alberts *et al.* (2002) explicam que ocorre influência de compostos citotóxicos sobre a integridade da lâmina nuclear, a qual confere estabilidade e o formato característico do núcleo celular. Os núcleos anômalos apresentam-se com formato não oval. A frequência de formação de deformações nucleares foram mais evidentemente observadas nas concentrações intermediária (4,9 mg/L) e na maior concentração (34,3 mg/L) no bioensaio 1 e nas três concentrações empregadas no bioensaio 2 (apêndice K).

O aumento de alterações morfológicas, evidenciando o efeito genotóxico do fármaco dipirona sódica, corrobora com o ensaio cometa, no que diz respeito à ação tóxica do fármaco nos animais expostos.

Sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase, a avaliação da inibição ou indução da atividade dessa enzima tem se mostrado muito satisfatória para avaliar os efeitos tóxicos de uma substância, pois ela é responsável pelo controle das taxas de acetilcolina, um mediador químico muito importante na transmissão de impulso nervoso; é uma enzima muito presente no cérebro e também na junção neuromuscular de vertebrados (NOGUEIRA, 2013).

A diminuição da atividade da enzima compromete a transmissão do impulso nervoso (LARINE, 1993). Por outro lado, a indução da atividade enzimática, assim como foi observado nesta pesquisa, ao analisar a atividade enzimática em músculo

dos organismos expostos nas três concentrações de dipirona sódica (0,7; 4,9 e 34,3 mg/L) nos dois bioensaios, pode estar associada ao fenômeno da apoptose, pois a expressão da AChE é capaz de inibir a proliferação celular e desencadear este processo (LARINE, 1993).

Na análise da enzima Glutathione S-transferase, conforme Van Der Oost, Beyer e Vermeulen (2003), geralmente se observa aumento da atividade enzimática ou pouca alteração na atividade de GST (este último caso, inclusive, é a forma mais comum de ocorrência), diante da exposição ao contaminante.

Outros trabalhos empregando diferentes contaminantes em peixes (como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e polifenilas bicloradas) observaram aumento da atividade das enzimas GST em células hepáticas, porém, grande parte das pesquisas demonstrou que não houve diferenças significativas (EATON; BAMMLER, 1999; PAMPLONA *et al.*, 2011).

No que se refere ao contaminante dipirona sódica, nos experimentos realizados por Pamplona (2011), na exposição de peixes *Ramdhia quelem* ao xenobiótico pelo período de 15 dias, a atividade da GST também se apresentou diminuída no grupo exposto à concentração de 50 µg/L. Neste caso, a autora menciona que o decréscimo da atividade enzimática pode ser considerada benéfica, pois sugerem uma resposta adaptativa a um ambiente tóxico. De modo geral, na realização dos bioensaios e avaliação dos resultados obtidos, foram constatados os potenciais efeitos genotóxicos e mutagênicos da dipirona sódica, além da alteração da atividade da enzima GST no bioensaio 1. A atividade da enzima GST só foi inibida no bioensaio 1, enquanto que no bioensaio 2 não foram observadas alterações estatisticamente significativas. Essas diferenças podem estar relacionadas também à saúde dos animais expostos e ao desenvolvimento corporal dos mesmos. Conforme relatado anteriormente e nos dados biométricos, os peixes do bioensaio 2 se apresentaram maiores que os do bioensaio 1, e portanto, mais desenvolvidos morfologicamente, o que pode ter contribuído com a menor interatividade dos animais com o contaminante.

Sobre o estágio de vida dos peixes, a sensibilidade dos animais é mais aparente em peixes juvenis, que em geral se apresentam mais suscetíveis e vulneráveis às ações do contaminante no qual está exposto (MURAMOTO, 1983; JEZIERSKA *et al.*, 2009; MCINTYRE *et al.*, 2014).

A perda de materiais biológicos nas coletas realizadas no sacrifício, bem como o preparo incorreto de lâminas para leitura, são pontos que não interferiram na análise geral, porém diminuíram a quantidade de resultados. Este ponto influenciou na escolha de realização de dois bioensaios, visando o aumento do “n” amostral.

A realização desta pesquisa demonstrou o potencial efeito ecotoxicológico do fármaco dipirona sódica em tilápias em situação de bioensaio. Ainda há poucos trabalhos de pesquisa elucidando a ação tóxica deste fármaco em organismos aquáticos, dados esses que são essenciais para as tratativas necessárias para o correto descarte de medicamentos, e também no que se refere à melhorias em técnicas de tratamento de esgotos domésticos.

7 CONCLUSÃO

Com base nas análises dos dados biométricos e do fator de condição de Fulton, foi possível verificar que o fármaco não afetou a saúde geral dos exemplares de *O. niloticus* após a exposição subcrônica por 21 dias, nas concentrações de dipirona sódica que variaram de 0,7 a 34,3 mg/L.

Porém, com relação à análise da genotoxicidade, verificou-se que o fármaco apresenta potencial capacidade de causar danos no material genético das células do sangue e do tecido renal dos organismos expostos. O dano genotóxico foi verificado nos exemplares expostos às concentrações 4,9 e 34,3 mg/L, já que a ocorrência de alterações morfológicas nos eritrócitos foi mais acentuada, em comparação com a ocorrência de micronúcleos.

Através da análise dos biomarcadores bioquímicos, foi possível verificar que, embora o biomarcador de neurotoxicidade acetilcolinesterase não tenha apresentado diferenças significativas em amostras de cérebro, foi verificado em músculo dos animais a alteração da atividade da enzima AChE, sendo observada a indução da ação da enzima já em baixas concentrações de exposição (0,7 mg/L).

Também se observou alteração da atividade enzimática de GST nas amostras de fígado dos organismos expostos no bioensaio 1, nas exposições intermediária e de maior concentração estabelecida.

As análises dos biomarcadores genéticos e bioquímicos, realizadas nesta pesquisa, corroboram com trabalhos sobre contaminação de corpos d'água por fármacos residuais, tanto em monitoramento ambiental quanto em simulações em laboratório (bioensaios). Foi acertiva a escolha dos referidos biomarcadores para análise, seguindo os protocolos validados no laboratório de Ecotoxicologia da UTFPR.

Direcionando esta análise ao fármaco dipirona sódica, foco deste estudo, é nítida a necessidade de um maior aprofundamento nas questões ambientais do descarte e destinação desta substância no meio ambiente, mais especificamente nos corpos d'água. Ainda são escassos os estudos voltados à esta questão do fármaco dipirona sódica e seus metabólitos no ambiente. Também fica evidente a necessidade de busca por contínuas elucidações nos métodos de tratamentos de água e esgostos, considerando o uso/descarte adequado desses materiais, considerando a reposição recorrente do medicamento.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, H. R. Drogas que Atuam Sobre os Sistemas Nervosos Somático e Autônomo. In: BOOTH, N. H.; McDONALD, L. E. **Farmacologia e Terapêutica em Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. P. 57-109.
- AFANASIEVA, K.; SIVOLOB, A. Physical principles and new applications of comet assay. **Biophysical chemistry**, v. 238, p. 1-7, 2018.
- ARAGÃO, R. B. de A. **Fármacos como poluentes emergentes em ambientes aquáticos: panorama de consumo na Região Metropolitana de São Paulo e quadro comparativo de políticas públicas entre países**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de São Paulo, Diadema – São Paulo, 2018.
- ARKHIPCHUK, V. V.; V. V. GONCHARUK, V. P. CHERNYKH, MALOSHTAN L. N.; GRITSENKO I. S.; Use of a Complex Approach for Assessment of Metamizole Sodium and Acetylsalicylic Acid Toxicity, Genotoxicity and Cytotoxicity; **Journal of applied toxicology**, 24, 401–407, 2004.
- AZEVEDO, Fausto Antônio de; CHASIN, Alice Aparecida da Matta. A Ecotoxicologia na análise do risco químico. **Salvador: Centro de Recursos Ambientais – CRA**, v. 432, 2004.
- BAGLIANO, V. Principais organismos utilizados como bioindicadores relatados com uso de avaliadores de danos ambientais. **Revista Meio Ambiente e Sustentabilidade**, v. 2, n. 1, p. 24-40, 2012.
- BARCELÓ, D.; LÓPEZ, M. J. Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. **Jornadas de presentación de resultados: el estado ecológico de las masas de agua. Panel científico-técnico de 63ª asamblea de la política de aguas** (Fundación Nueva Cultura del agua), **Sevilla**, p. 1-27, 2008.
- BENINCÁ, C. Biomonitoramento das lagoas estuarinas do Camacho-Jaguaruna (SC) e Santa Marta-Laguna (SC), utilizando *Geophagus bresiliensis* (Cichlidae). 2006.
- BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química nova**, v. 26, p. 523-530, 2003.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRAGA, F.M. DE S. Estudo entre fator de condição e relação peso/comprimento para alguns peixes marinhos. *Revista Brasileira de Biologia*. v.46, p.339-346, 1986.

CESTARI, M. M. et al. Avaliação da genotoxicidade da mistura dos micropoluentes dipirona e paracetamol no peixe *Rhamdia quelen*. 1 ed. **XV Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia – anais de resumo**, p. 349-350, Aracaju – SE, 2018.

CNUBBEN, N. H. P.; RIETJENS, I. M. C. M.; WORTELBOER, H.; van ZANDEN, J.; van BLADEREN, P. The interplay of glutathione-related process in antioxidant defense. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, p. 141-152, 2001.

DA SILVA, J. O uso do ensaio cometa para o ensino de genética toxicológica. **Genética na escola**, v. 2, p. 30-37, 2007.

DE ARAÚJO, R. K.; WOLFF, D. B.; CARISSIMI, E. Fármacos em águas residuárias: efeitos ambientais e remoção em wetlands construídos. **Revista DAE**, v. 67, n. 218, p. 137-155, 2019.

EATON, D. L.; BAMMLER, T. K. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. **Toxicological sciences: uma 64apaver 64apave of the Society of Toxicology**, v. 49, n. 2, p. 156-164, 1999.

ELLMAN, G. L. *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88-95, 1961.

ERGÜN, H.; FRATTARELLI, D. AC; ARANDA, J. V. Characterization of the role of physicochemical factors on the hydrolysis of dipyrone. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 35, n. 3, p. 479-487, 2004.

ESCHER, M. A. et al. A problemática ambiental da contaminação dos recursos hídricos por fármacos. **Brazilian Journal of Environmental Sciences (Online)**, n. 51, p. 141-148, 2019.

ESTEVES, F. A. **Fundamentos de Limnologia**. 3. Ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2011. 826 p.

FARMACOPEIA Brasileira. 5° ed., v. 1, p. 912-914, 2011. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/farmacopeia_volume-2_2010_monografias.pdf> Acesso em: 03 jan. 2022.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature protocols**, v. 2, n. 5, p. 1084-1104, 2007.

FLYNN, M. N. et al. Relação peso-comprimento de populações de *Mugil curema* (Valenciennes, 1836) dos canais de Piaçaguera e Bertioga, São Paulo. **Revista de Brasileira Zoociências**, Juiz de Fora, MG. 2010.

GARCEZ, B. B. D. et al. Toxicidade aguda da dipirona sódica in vitro utilizando o bioindicador de toxicidade *Artemia salina* Leach. **Revinter**, v. 11, n. 02, p. 114-119, 2018.

GIL, M. J. et al. Contaminantes emergentes em águas, efectos y posibles 65apaverine65. **P+L – Producción + Limpia**, v. 7, n. 2, p. 52-73, 2012.

GOMES, R. N. **Desenvolvimento de metodologia eletroanalítica para determinação de dipirona em amostras de medicamentos, de águas naturais e de urina humana**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

GRISARN, D.; STERNFELD, M.; ELDOR, A.; GLICK, D.; SOREQ, H. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. **Eur. J. Biochemical**, n. 264, p. 672-686, 1999.

GRISOLIA, C. K.; STARLING, F. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 491, n. 1-2, p. 39-44, 2001.

GUIMARÃES, F. P. et al. Política de proibição da dipirona: uma reflexão. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 3, p. 11007-11019, 2021.

HEDDLE, J. A. et al. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity: A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 123, n. 1, p. 61-118, 1983.

HOOFTMAN, Ria N.; DE RAAT, W. K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. **Mutation 65apaveri Letters**, v. 104, n. 1-3, p. 147-152, 1982.

ISQUIBOLA, G.; RODRIGUES, E. C. Estudo da degradação de dipirona sódica comercial por meio de luz ultravioleta e visível. **Revista Brasileira de Iniciação Científica**, v. 6, n. 7, p. 82-93, 2019.

JASIECKA, A.; MASLANKA, T.; JAROSZEWSKI, J. J. Pharmacological characteristics of metamizole. **Polish 65apave of veterinary sciences**, v. 17, n. 1, 2014.

JEZIERSKA, Barbara; ŁUGOWSKA, Katarzyna; WITESKA, Małgorzata. The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review). **Fish physiology and biochemistry**, v. 35, n. 4, p. 625-640, 2009.

JÚNIOR, E. O. C. **Biomonitoramento em áreas poluídas e não poluídas do Rio Uberabinha, região de Uberlândia Minas Gerais, por meio de análise de micronúcleos e frequência de cromossomos B em bagre (*Rhamdia quelen*)**. 2011. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, 2011.

- JUNIOR, L. H. M. **Eletrodos voltamétricos e amperométricos para determinação de espécies de interesse farmacêutico**. 2007. 166 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP, 2007.
- KEEN, JAMES H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 20, p. 6183-6188, 1976.
- KLEMZ, C.; ASSIS, H. C. S. Efeitos do endossulfano na atividade da acetilcolinesterase de cascudo (*Ancistrus multispinnis*, Fish, Teleostei). **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v. 3, n. 4, p. 51-58, 2005.
- KNIE, J.L.W. e LOPES, E. W. B. **Testes Ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis: FATMA / GTZ, 2004. 289 p.
- KRUSKAL, William H.; WALLIS, W. Allen. Use of ranks in one-criterion variance analysis. **Journal of the American statistical Association**, v. 47, n. 260, p. 583-621, 1952.
- LAMEIRA, V. **Estudo dos efeitos ecotoxicológicos dos fármacos paracetamol e dipirona sódica para organismos aquáticos**. 2012. Tese (Doutorado em Ciências – Tecnologia Nuclear – Materiais) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- LARINI, L. Inseticidas. In: Larine, L. **Toxicologia**, 2ª ed. São Paulo: Manole Ltda. 1993. P. 136-163.
- LINS, J. A. P. N. et al. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v. 8, n. 4, p. 469-484, 2010.
- LIVINGSTONE, D. R. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 57, n. 3, p. 195-211, 1993.
- LUTZ, M. Metamizole (dipyrone) and the liver: a review of the literature. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 59, n. 11, p. 1433-1442, 2019.
- MORIWAKI, C.; BRESCANSIN, E. G.; HIOKA, N.; MAIONCHI, F.; MATIOLI, G. Estudo da degradação do fármaco Nabumetona por fotólise direta. **Acta Scientiarum**. Maringá, v. 23, n. 3, p. 651-654, 2001.
- MUTHULAKSHMI et al. Zearalenone induced embryo and neurotoxicity in zebrafish model (*Danio rerio*): Role of oxidative stress revealed by a multi biomarker study. **Chemosphere**, vol. 198, p. 111-121, 2018.
- MURAMOTO S. Vertebral column damage and decrease of calcium concentration of fish exposed experimentally to cadmium. **Environ Pollut.**, p. 125–133, 1983.

- NASCIMENTO, A. P. Desenvolvimento e validação de metodologia para medicamentos 67apaver dipirona sódica e cloridrato de 67apaverine isolados e em associação. 2006. Tese (Doutorado em Produção e Controle Farmacêuticos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- NOGUEIRA, L. A. M. **Análise dos efeitos de fármacos no meio ambiente aquático: uso de biomarcadores**. 2013. Tese – Universidade Fernando Pessoa, 2013.
- NUNES, B. A presença de fármacos no ambiente. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 1, n. 1, p. 43-54, 2011.
- OGA, S. *et al.* **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu. 2008. P. 58-70.
- PAMPLONA, J. H. *et al.* Subchronic effects of dipyrone on the fish species *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 74, n. 3, p. 342-349, 2011.
- PEREIRA, A. V.; PENCKOWSKI, L.; VOSGERAU, M.; SASSÁ, M. F. Determinação espectrofotométrica de dipirona em produtos farmacêuticos por injeção em fluxo pela geração de íons triiodeto. **Química Nova**. Brasil, v. 25, n. 4, p. 553-557, 2002.
- PEREIRA, A. C; SILVA, R. F. Produção de tilápias. **Programa Rio Rural**, 2012. Acesso em 03 dez 2020: <http://www.pesagro.rj.gov.br/downloads/riorural/31_Producao_de_Tilapias.pdf>
- RAMSDORF, W. **Avaliação da toxicidade dos compostos fibronil, nitrato de chumbo e naftaleno em peixes**. 2011. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.
- 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**. 2007. Dissertação (Programa de Pós- Graduação em Ecologia e Biomonitoramento) – Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2007.
- ROSAL, R. *et al.* Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. **Water Research**, v. 44, n. 2, p. 578-588, 2010.
- ROSSI, S. **Uso de biomarcadores para a detecção de efeitos subletais dos Pesticidas Roundup e Hexaron em *Astyanax sp.* (Pisces, Teleostei)**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Farmacologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- SCHMID, C. W.; DEININGER, P. L. Sequence organization of the human genome. **Cell**, v. 6, n. 3, p. 345-358, 1975.

SILVA, R. F. et al. Identificação e quantificação de contaminantes emergentes em estações de tratamento de esgoto. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 3, p. 702-715, 2016.

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

STEGEMAN, J. J.; BROUWER, M.; DI GIULIO, R.T.; FÖRLIN, L.; FOWLER, B.A.; SANDERS, B.M.; VAN VELD, P.A. Molecular Responses to Environmental Contamination: Enzyme and Protein Systems as Indicators of Chemical Exposure and Effect. In: **Biomarkers**. CRC Press, p. 235-336, 1992.

TEJADA, C.; QUIÑONEZ, E. PEÑA, M. Contaminantes emergentes uma aguas: metabolitos de fármacos. Uma revisão. **Revista Facultad de Ciencias Biológicas** - Universidad Militar Nueva Granada, v. 10, n. 1, p. 80-101, 2014.

TUNDISI, J. G.; TUNDISI, T. M. **Limnologia**. São Paulo: Ed. Oficina de Textos. 2008. P. 228-245; 506-512.

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

VAZZOLER, A. E. A M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos**: teoria e prática. Maringá: EDUEM, p. 169, 1996.

VIDAL. Tilápias: Manual Prático de Criação. **Centro de Produções Técnicas**. Acesso em 03/2020: <
<http://cptstatic.s3.amazonaws.com/pdf/cpt/piscicultura/tilapias-cursos-cpt.pdf>>

VIEIRA, L. M. **Contaminantes Prioritários e Emergentes e o Saneamento Ambiental**. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia Uberlândia, Minas Gerais, 2017.

VIRGENS, A. C.; CASTRO, R. L.; CRUZ, Zilma M. A. Alterações histológicas em brânquias de *Oreochromis niloticus* (Tilapia-do-Nilo) expostas o Acefato, Difenconazol e Sulfluramida. **Natureza on line**, v. 13, n. 1, p. 26-31, 2015.

WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M. E PEAKALL, D. B. **Principles of Ecotoxicology**. Londres: Taylor e Francis. 1996.

WANNMACHER, L. Paracetamol *versus* Dipirona: como mensurar o risco?, v. 2, n. 5 Brasília, abril de 2005. Disponível em: <
http://www.sausedireta.com.br/docsupload/1340026793novo_paracetamol.pdf>
Acesso em 01/08/2020.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Ed). **Ecotoxicologia aquática princípios e aplicações**. São Carlos: Rima, 2008.

ZHOU, H. Y. et al. Metal concentrations in sediments and tilapia collected from inland waters of Hong Kong. **Water Research**, v. 32, n. 11, p. 3331-3340, 1998.

Winkler, M., Lawrence, Jr. Selective degradation of ibuprofen and cloflbric acid in tow model river bioflm. **Water Research**, p. 3197-3205, 2001.

ANEXO A – Certificado de análise do contaminante Dipirona Sódica (marca: Delaware)



IMPORTADORA QUÍMICA DELAWARE LTDA.

CERTIFICADO DE ANÁLISE

Documento: N° 619177*5006L80/19

Data Emissão: 24/06/2019

Ordem de Fracionamento: 17511

| Insumo | | DIPIRONA SÓDICA | |
|--------------------|------------------------------------|-----------------|------------|
| Fórmula Molecular | $C_{12}H_{14}N_2NaO_4S \cdot H_2O$ | Peso Molecular | 351,4 |
| Origem | CHINA | Procedência | BRASIL |
| Classe Terapêutica | ANALGÉSICO | DCB | 09564 |
| Lote Interno | 754/19 | CAS | 5907-38-0 |
| Fabricante | HEBEI JIHENG | Lote Fabricante | 2180937 |
| Data Fabricação | 26/09/2016 | Data Validade | 25/09/2020 |

Análises Físico-Químicas

| Testes | Especificações | Resultados |
|------------------------------------|---|---------------|
| *Aspecto | Pó cristalino branco ou quase branco. | De acordo |
| *Solubilidade | Solúvel em água e metanol, pouco solúvel em etanol, praticamente insolúvel em éter etílico, acetona, benzeno e clorofórmio. | De acordo |
| *Aspecto da Solução | Limpida | De acordo |
| *Cor da Solução | Teste | Passa teste |
| *Acidez ou Alcalinidade | Máximo 0,1 mL NaOH 0,02 M | 0,08 mL |
| *Impurezas Solúveis em Clorofórmio | Máximo 0,5 % | 0,16 % |
| *Perda por Dessecação | 4,9 a 5,3 % | 5,16 % |
| *Doseamento (Base Anidra) | 99,0 a 100,5 % | 100,06 % |
| Identificação (A, B, C e D) | Análises Realizadas pelo Fabricante (DAB 10) | |
| Metais Pesados | Positivo | De acordo |
| Sulfato | Máximo 0,004 % | < 0,004 % |
| Impurezas Solúveis em Clorofórmio | Máximo 0,1 % | < 0,1 % |
| Densidade Aparente | Máximo 0,5 % | 0,30 % |
| Substâncias Relacionadas | Informativo | 0,3391 g / mL |
| | Máximo 1,0 % | < 1,0 % |
| | Solventes Residuais | |
| Etanol | Máximo 2000 ppm | 32,79 ppm |
| Formaldeído | Máximo 500 ppm | < 500 ppm |

Os resultados presentes neste Certificado de Análise tem seus valores restritos a este lote.

Referência Bibliográfica: Farmacopéia Brasileira, 5ª Edição, DAB 10.

Conservação: Em recipientes herméticos, ao abrigo da luz, calor e umidade. Temperatura: 15 a 30 °C.

*Testes realizados em nosso Laboratório de Controle de Qualidade.

Resultado **APROVADO**

Ederlito da Silva Lisboa
Farmacêutico Responsável
CRF-RS 13382

APÊNDICE A – CÁLCULO UTILIZADO PARA DETERMINAR QUANTIDADE NECESSÁRIA DE TAMPÃO

Cálculo realizado de acordo com a fórmula química para cálculo da concentração:

$$C_1.V_1 = C_2.V_2, \text{ sendo:}$$

C₁: concentração mãe

V₁: volume necessário

C₂: concentração do teste

V₂: volume final

$$1\text{mg/mL}.V_1 = 0,125 \text{ mg/mL} \times 200 \text{ microlitros}$$

$$V_1 = 25 \text{ microlitros de BSA}$$

$$200 - 25 \rightarrow 175 \text{ microlitros de tampão.}$$

APÊNDICE B – PREPARO DA SOLUÇÃO TAMPÃO DE ELETROFORESE

- a) Em um béquer de 250 mL, pesar 21,6 g de NaOH;
- b) Adicionar devagar 54 mL de água pura;
- c) Adicionar a pulga magnética;
- d) Agitar até dissolver o NaOH;
- e) No béquer grande (da sala cometa) colocar 1800 mL de água pura gelada (manter água gelada sempre).
- f) Adicionar 9 mL da solução pronta de EDTA.
- g) Colocar os 54 mL com NaOH dissolvido.
- h) Agitar;
- i) Verificar pH com fita indicadora (deve ficar azul, próxima a pH= 12,0).
- j) Levar béquer grande para sala cometa.

APÊNDICE C – PREPARO DOS TAMPÕES BIOQUÍMICOS (DE ACORDO COM PROTOCOLO “BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS – LABORATÓRIO DE TOXICOLOGIA CELULAR, UFPR” – GLUTATIONA S-TRANSFERASE – GST (KEEN ET AL., 1976) E ACETILCOLINESTERASE – AChE (ELLMAN ET AL., 1961)).

1. FÍGADO: (glutaciona S-transferase)

Solução Tampão Tris-HCl 20 mM, EDTA 1,0 mM, pH 7,6: para o preparo dissolveu-se 2,423 g de Tris-base ($MM = 121,14 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) e 0,372 g de EDTA sal dissódico ($MM = 372,24 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) em 950 mL de água deionizada. Em seguida, foi acertado o pH para 7,6 com HCl e completada a solução com água deionizada para o volume final de 1000 mL.

2. CÉREBRO E MÚSCULO: (para o ensaio da acetilcolinesterase)

Solução tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5: inicialmente preparou-se a solução determinada como “1”, procedendo da seguinte forma:

a) Preparo da solução de K_2HPO_4 0,1 M:

Dissolveu-se 6,9672 g de K_2HPO_4 ($MM = 174,18 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) em 350 mL de água filtrada e acertou-se o volume para 400 mL.

Em seguida, preparou-se a solução determinada como “2”, conforme segue:

b) Preparo da solução de KH_2PO_4 0,1 M:

Dissolveu-se 5,4436 g de KH_2PO_4 ($MM = 136,09 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) em 350 mL de água filtrada e acertou-se o volume para 400 mL.

c) Misturou-se lentamente as soluções 1 e 2 até atingir o pH de 7,5.

APÊNDICE D – CÁLCULO DA DETERMINAÇÃO DAS SOLUÇÕES DA EXPOSIÇÃO

1. Solução Mãe – aquário 24L: concentração mãe foi estipulada aleatoriamente, de acordo com médias verificadas nas concentrações determinadas, sendo:

29400:

29,4g ----- 1000 mL

m1 ----- 50 mL (para preparo da solução)

$1000 \times = 1,470$

$x = 1,47$ g de dipirona para 50 mL de água.

- 1.1. Quantidade de solução para os demais dias de exposição (em relação ao determinado de 1,47 g do fármaco):

14,7g ----- 1000 mL

m2 x ----- 25 mL

$1000 \times = 367,5$

$x = 0,3675$ g de dipirona para 25 mL de água.

Nota 1. Dividiu-se pela metade a concentração do contaminante, para dobrar o volume que seria pipetado nos aquários. Se fosse mantida a concentração 29,4 g/L, os volumes seriam muito pequenos. Assim, calculou-se $29,4 \text{ g/L} / 2 = 14,7 \text{ g/L}$.

Nota 2. Preparo da solução para troca 1/3 de renovação da água (8L de esgotamento).

Nota 3. Para troca de 2/3 de renovação da água (16 L de esgotamento), preparou-se solução com $0,3675 \text{ g} \times 2$ (0,735 g da dipirona em 50 mL de água).

2. Preparo de soluções para diluição em 24L – 1º dia de contaminação:

2.1. CONCENTRAÇÃO 1 \rightarrow 0,6995 mg/L de dipirona sódica

$$C_1.V_1 = C_2.V_2$$

$$29400 \text{ mg/L} \cdot V_1 = 0,6995 \text{ mg/L} \cdot 24$$

$$V_1 = 16,788 \text{ mg/L} / 29400 \text{ mg/L} = 0,0005710204 \rightarrow 0,57 \text{ mL de solução.}$$

2.2. CONCENTRAÇÃO 2 \rightarrow 4,9 mg/L de dipirona sódica

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$29400 \text{ mg/L} \cdot V_1 = 4,9 \text{ mg/L} \cdot 24$$

$$V_1 = 117,6 \text{ mg/L} / 29400 \text{ mg/L} = 0,004 \text{ mg/L} \rightarrow 4 \text{ mL de solução.}$$

2.3. CONCENTRAÇÃO 3 \rightarrow 34,3 mg/L de dipirona sódica

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$29400 \text{ mg/L} \cdot V_1 = 34,3 \text{ mg/L} \cdot 24$$

$$V_1 = 823,2 \text{ mg/L} / 29400 \text{ mg/L} = 0,028 \text{ mg/L} \rightarrow 28 \text{ mL de solução.}$$

3. Preparo de soluções para diluição em 24L – demais dias de contaminação:

3.1. CONCENTRAÇÃO 1 \rightarrow 0,6995 mg/L de dipirona sódica (699 $\mu\text{g/L}$).

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$14700 \text{ mg/L} \cdot V_1 = 0,6995 \text{ mg/L} \cdot 8$$

$$V_1 = 3,81 \cdot 10^{-1} \text{ L} = 0,38 \text{ mL de solução.}$$

3.2. CONCENTRAÇÃO 2 \rightarrow 4,9 mg/L de dipirona sódica (4900 $\mu\text{g/L}$)

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$14700 \text{ mg/L} \cdot V_1 = 4,9 \text{ mg/L} \cdot 8$$

$$V_1 = 2,67 \cdot 10^{-3} \text{ L} = 2,67 \text{ mL de solução.}$$

3.3. CONCENTRAÇÃO 3 \rightarrow 34,3 mg/L de dipirona sódica ($3,43 \cdot 10^4 \mu\text{g/L}$)

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$14700 \text{ mg/L} \cdot V_1 = 34,3 \text{ mg/L} \cdot 8$$

$$V_1 = 0,01867 \text{ L} = 18,7 \text{ mL de solução.}$$

APÊNDICE E – VALORES DE MÉDIA E DESVIO PADRÃO OBTIDOS NA AFERIÇÃO DOS DADOS BIOMÉTRICOS PARA OS GRUPOS CONTROLE NEGATIVO, E DE EXPOSIÇÃO AO FÁRMACO, NAS CONCENTRAÇÕES 0,7; 4,9 E 34,3 MG/L; TABELAS A E B, RESPECTIVAMENTE PARA OS BIOENSAIOS 1 E 2.

A – Dados morfométricos de comprimento e massa dos organismos, após exposição ao fármaco Dipirona Sódica, no bioensaio 1.

| Organismo | Comprimento (cm) | | | | Peso (g) | | | |
|---------------|------------------|----------|----------|-----------|----------|----------|----------|-----------|
| | Controle | 0,7 mg/L | 4,9 mg/L | 34,3 mg/L | Controle | 0,7 mg/L | 4,9 mg/L | 34,3 mg/L |
| 1 | 7,00 | 9,00 | 8,20 | 8,00 | 5,46 | 11,25 | 8,75 | 8,70 |
| 2 | 7,50 | 6,50 | 7,50 | 6,60 | 6,46 | 5,25 | 7,39 | 4,89 |
| 3 | 8,20 | 6,50 | 6,40 | 5,00 | 8,87 | 4,65 | 4,01 | 2,53 |
| 4 | 6,20 | 7,00 | 6,00 | 6,50 | 4,38 | 5,54 | 4,26 | 4,87 |
| 5 | 7,80 | 7,00 | 7,00 | 7,30 | 7,11 | 6,06 | 5,40 | 6,66 |
| 6 | 7,30 | 7,60 | 5,70 | 6,90 | 6,57 | 7,96 | 2,68 | 5,85 |
| 7 | 6,00 | 7,20 | 8,50 | 6,80 | 4,11 | 7,73 | 9,82 | 6,43 |
| 8 | 6,60 | 5,70 | 6,20 | 6,40 | 4,78 | 3,46 | 4,08 | 4,08 |
| 9 | 6,30 | 5,60 | 8,30 | 7,00 | 4,09 | 4,03 | 10,63 | 5,13 |
| 10 | 6,20 | 7,70 | 6,00 | 6,50 | 4,62 | 8,05 | 3,58 | 4,41 |
| MÉDIA | 6,91 | 6,98 | 6,98 | 6,70 | 5,65 | 6,40 | 6,06 | 5,36 |
| DESVIO PADRÃO | 0,77 | 1,00 | 1,07 | 0,76 | 1,57 | 2,36 | 2,86 | 1,68 |

B – Dados morfométricos de comprimento e massa dos organismos, após exposição ao fármaco Dipirona Sódica, no bioensaio 2.

| Organismo | Comprimento (cm) | | | | Peso (g) | | | |
|---------------|------------------|----------|----------|-----------|----------|----------|----------|-----------|
| | Controle | 0,7 mg/L | 4,9 mg/L | 34,3 mg/L | Controle | 0,7 mg/L | 4,9 mg/L | 34,3 mg/L |
| 1 | 8,30 | 7,60 | 8,20 | 7,50 | 9,56 | 9,64 | 9,07 | 7,41 |
| 2 | 7,70 | 8,70 | 8,00 | * | 7,99 | 11,51 | 9,12 | * |
| 3 | 7,70 | 8,10 | 8,60 | 9,32 | 7,56 | 9,44 | 10,37 | 10,00 |
| 4 | 8,80 | 8,00 | 8,30 | 8,00 | 12,97 | 11,29 | 10,36 | 10,60 |
| 5 | 7,40 | 8,00 | 8,00 | 6,70 | 7,61 | 11,33 | 8,33 | 5,00 |
| 6 | 7,90 | 7,00 | 8,00 | 8,50 | 8,44 | 6,46 | 10,00 | 12,38 |
| 7 | 7,60 | 8,60 | 7,60 | 7,50 | 10,84 | 11,17 | 7,29 | 9,04 |
| 8 | 7,60 | 7,60 | 8,09 | 8,20 | 7,51 | 8,56 | 9,96 | 10,42 |
| 9 | 8,20 | 7,50 | 8,00 | * | 9,00 | 7,55 | 8,77 | * |
| 10 | 7,40 | 6,60 | 7,60 | 7,90 | 7,99 | 5,52 | 8,54 | 7,90 |
| MÉDIA | 7,86 | 7,77 | 8,03 | 7,95 | 8,95 | 9,25 | 9,18 | 9,09 |
| DESVIO PADRÃO | 0,45 | 0,65 | 0,32 | 0,78 | 1,76 | 2,17 | 2,29 | 2,29 |

*Dados não foram coletados devido a mortalidade dos organismos expostos.

**APÊNDICE F – VALORES OBTIDOS DA ANÁLISE DO FATOR DE
CONDIÇÃO DE FULTON, POR MEIO DA ANÁLISE DOS DADOS
BIOMÉTRICOS DE TILÁPIAS, APÓS EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA AO
FÁRMACO DIPIRONA SÓDICA.**

| | Controle | 0,7 mg/L | 4,9 mg/L | 34,3 mg/L |
|--------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Bioensaio 1 | 0.0159 | 0.0154 | 0.0159 | 0.0170 |
| | 0.0153 | 0.0191 | 0.0175 | 0.0170 |
| | 0.0161 | 0.0169 | 0.0153 | 0.0202 |
| | 0.0184 | 0.0162 | 0.0197 | 0.0177 |
| | 0.0150 | 0.0177 | 0.0157 | 0.0171 |
| | 0.0169 | 0.0181 | 0.0145 | 0.0178 |
| | 0.0190 | 0.0207 | 0.0160 | 0.0204 |
| | 0.0166 | 0.0187 | 0.0171 | 0.0156 |
| | 0.0164 | 0.0229 | 0.0186 | 0.0150 |
| | 0.0194 | 0.0176 | 0.0166 | 0.0161 |
| MÉDIA | 0.0165 | 0.0179 | 0.0163 | 0.0171 |
| DESV. PAD | 0.0015 | 0.0022 | 0.0016 | 0.0018 |
| Bioensaio 2 | 0.0167 | 0.0220 | 0.0164 | 0.0176 |
| | 0.0175 | 0.0175 | 0.0178 | 0.0183 |
| | 0.0166 | 0.0178 | 0.0163 | 0.0124 |
| | 0.0190 | 0.0221 | 0.0181 | 0.0207 |
| | 0.0188 | 0.0221 | 0.0163 | 0.0166 |
| | 0.0171 | 0.0188 | 0.0195 | 0.0202 |
| | 0.0247 | 0.0176 | 0.0166 | 0.0214 |
| | 0.0171 | 0.0195 | 0.0188 | 0.0189 |
| | 0.0163 | 0.0179 | 0.0171 | 0.0190 |
| | 0.0197 | 0.0192 | 0.0195 | 0.0160 |
| MÉDIA | 0.0173 | 0.0190 | 0.0175 | 0.0186 |
| DESV. PAD | 0.0025 | 0.0019 | 0.0013 | 0.0027 |

**APÊNDICE G – CLASSES DE DANOS EM CÉLULAS DE SANGUE – ENSAIO
COMETA BIOENSAIO 1**

| Grupos de exposição | Organismo | Classe de danos analisados | | | | | Total de nucleóides analisados | Escore | Mediana |
|--------------------------------|-----------|-------------------------------|----|----|----|----|--------------------------------------|--------|---------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | | | |
| Controle Negativo | 1 | 74 | 12 | 8 | 3 | 3 | 100 | 49 | 41,0 |
| | 2 | 81 | 10 | 4 | 5 | 0 | 100 | 33 | |
| | 3 | 74 | 23 | 2 | 1 | 0 | 100 | 30 | |
| | 4 | 59 | 21 | 11 | 9 | 0 | 100 | 70 | |
| | 5 | 75 | 12 | 5 | 8 | 0 | 100 | 46 | |
| | 6 | 75 | 13 | 4 | 7 | 1 | 100 | 46 | |
| | 7 | 80 | 18 | 1 | 1 | 0 | 100 | 23 | |
| | 8 | 76 | 15 | 2 | 6 | 1 | 100 | 41 | |
| | 9 | 86 | 2 | 3 | 8 | 1 | 100 | 36 | |
| | 10 | * | * | * | * | * | * | * | |
| Exposição 0,7 mg/L | 11 | 37 | 18 | 10 | 32 | 3 | 100 | 146 | 102,5 |
| | 12 | 20 | 10 | 29 | 39 | 2 | 100 | 193 | |
| | 13 | 43 | 25 | 16 | 14 | 2 | 100 | 107 | |
| | 14 | 71 | 8 | 9 | 12 | 0 | 100 | 62 | |
| | 15 | 60 | 22 | 9 | 9 | 0 | 100 | 67 | |
| | 16 | 52 | 17 | 14 | 15 | 2 | 100 | 98 | |
| | 17 | 47 | 36 | 7 | 10 | 0 | 100 | 80 | |
| | 18 | 74 | 12 | 12 | 1 | 1 | 100 | 43 | |
| | 19 | 39 | 28 | 16 | 14 | 3 | 100 | 114 | |
| | 20 | 13 | 25 | 34 | 24 | 4 | 100 | 181 | |
| Exposição 4,9 mg/L | 21 | 36 | 28 | 27 | 9 | 0 | 100 | 109 | 122,0 |
| | 22 | 53 | 33 | 12 | 1 | 1 | 100 | 64 | |
| | 23 | 26 | 27 | 15 | 30 | 2 | 100 | 155 | |
| | 24 | 29 | 33 | 27 | 9 | 2 | 100 | 122 | |
| | 25 | 20 | 40 | 26 | 11 | 3 | 100 | 137 | |
| | 26 | 24 | 48 | 19 | 8 | 1 | 100 | 114 | |
| | 27 | 32 | 51 | 14 | 3 | 0 | 100 | 88 | |
| | 28 | * | * | * | * | * | * | * | |
| | 29 | 18 | 44 | 21 | 11 | 6 | 100 | 143 | |
| | 30 | 18 | 35 | 19 | 22 | 6 | 100 | 163 | |
| Exposição 34,3 mg/L | 31 | * | * | * | * | * | * | * | 228,0 |
| | 32 | 10 | 17 | 14 | 53 | 6 | 100 | 228 | |
| | 33 | 16 | 25 | 16 | 39 | 4 | 100 | 190 | |
| | 34 | 20 | 13 | 15 | 46 | 6 | 100 | 205 | |
| | 35 | 10 | 19 | 25 | 43 | 3 | 100 | 210 | |
| | 36 | 24 | 10 | 10 | 50 | 6 | 100 | 204 | |
| | 37 | 13 | 9 | 11 | 55 | 12 | 100 | 244 | |
| | 38 | 11 | 3 | 6 | 66 | 14 | 100 | 269 | |
| | 39 | 3 | 4 | 6 | 71 | 16 | 100 | 293 | |
| | 40 | 3 | 2 | 22 | 61 | 12 | 100 | 277 | |

Grupos de exposição ao fármaco Dipirona Sódica com renovação hídrica a cada 24 horas.

*Não foi possível obter resultados para esses organismos, lâminas com sobreposição de células.

**APÊNDICE H – CLASSES DE DANOS EM CÉLULAS DE TECIDO RENAL –
ENSAIO COMETA BIOENSAIO 1**

| Grupos de exposição | Organismo | Classe de danos analisados | | | | | Total de nucleóides analisados | Escore | Mediana |
|--|-----------|----------------------------|----|----|----|----|--------------------------------|--------|---------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | | | |
| Controle Negativo (água filtrada) | 1 | 89 | 7 | 3 | 1 | 0 | 100 | 16 | 52,0 |
| | 2 | * | * | * | * | * | * | * | |
| | 3 | 87 | 8 | 4 | 1 | 0 | 100 | 19 | |
| | 4 | 81 | 10 | 7 | 2 | 0 | 100 | 30 | |
| | 5 | 90 | 8 | 2 | 0 | 0 | 100 | 12 | |
| | 6 | 87 | 9 | 4 | 0 | 0 | 100 | 17 | |
| | 7 | 90 | 5 | 0 | 0 | 0 | 95 | 5 | |
| | 8 | 90 | 7 | 2 | 1 | 0 | 100 | 14 | |
| | 9 | 87 | 11 | 2 | 0 | 0 | 100 | 15 | |
| | 10 | 92 | 5 | 3 | 0 | 0 | 100 | 11 | |
| Exposição 0,7 mg/L | 11 | 43 | 15 | 18 | 22 | 2 | 100 | 117 | 54,0 |
| | 12 | 49 | 20 | 17 | 14 | 0 | 100 | 96 | |
| | 13 | 51 | 31 | 4 | 12 | 2 | 100 | 75 | |
| | 14 | 53 | 28 | 8 | 10 | 1 | 100 | 74 | |
| | 15 | 55 | 34 | 8 | 3 | 0 | 100 | 59 | |
| | 16 | 44 | 24 | 21 | 10 | 1 | 100 | 96 | |
| | 17 | * | * | * | * | * | * | * | |
| | 18 | 39 | 19 | 23 | 18 | 1 | 100 | 119 | |
| | 19 | 60 | 21 | 16 | 2 | 1 | 100 | 59 | |
| | 20 | 50 | 23 | 19 | 7 | 1 | 100 | 82 | |
| Exposição 4,9 mg/L | 21 | 51 | 19 | 21 | 7 | 2 | 100 | 82 | 107,0 |
| | 22 | * | * | * | * | * | * | * | |
| | 23 | 59 | 16 | 10 | 15 | 0 | 100 | 81 | |
| | 24 | 52 | 16 | 11 | 17 | 4 | 100 | 89 | |
| | 25 | 38 | 29 | 13 | 19 | 1 | 100 | 112 | |
| | 26 | 49 | 32 | 12 | 6 | 1 | 100 | 74 | |
| | 27 | 59 | 21 | 8 | 9 | 3 | 100 | 64 | |
| | 28 | 48 | 26 | 14 | 11 | 1 | 100 | 87 | |
| | 29 | 58 | 12 | 14 | 16 | 0 | 100 | 88 | |
| | 30 | * | * | * | * | * | * | * | |
| Exposição 34,3 mg/L | 31 | 29 | 31 | 14 | 21 | 5 | 100 | 122 | 151,5 |
| | 32 | * | * | * | * | * | * | * | |
| | 33 | 11 | 14 | 16 | 53 | 6 | 100 | 205 | |
| | 34 | 17 | 14 | 18 | 44 | 7 | 100 | 182 | |
| | 35 | * | * | * | * | * | * | * | |
| | 36 | 19 | 16 | 21 | 33 | 11 | 100 | 157 | |
| | 37 | 5 | 27 | 14 | 40 | 14 | 100 | 175 | |
| | 38 | 6 | 7 | 9 | 62 | 16 | 100 | 211 | |
| | 39 | * | * | * | * | * | * | * | |
| | 40 | 15 | 20 | 6 | 45 | 14 | 100 | 167 | |

Grupos de exposição ao fármaco Dipirona Sódica com renovação hídrica a cada 24 horas.

*Não foi possível obter resultados para esses organismos, lâminas com sobreposição de células.

APÊNDICE I – CLASSES DE DANOS EM CÉLULAS DE SANGUE – ENSAIO COMETA BIOENSAIO 2

| Grupos de exposição | Organismo | Classe de danos analisados | | | | | Total de nucleóides analisados | Escore | Mediana |
|-----------------------------------|-----------|----------------------------|----|----|----|---|--------------------------------|--------|---------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | | | |
| Controle Negativo (água filtrada) | 1 | 73 | 15 | 9 | 3 | 0 | 100 | 42 | 15,0 |
| | 2 | 50 | 24 | 17 | 9 | 0 | 100 | 85 | |
| | 3 | 65 | 22 | 9 | 3 | 1 | 100 | 53 | |
| | 4 | 74 | 11 | 5 | 10 | 0 | 100 | 51 | |
| | 5 | * | * | * | * | * | * | * | |
| | 6 | 78 | 13 | 1 | 6 | 2 | 100 | 41 | |
| | 7 | 73 | 14 | 9 | 4 | 0 | 100 | 44 | |
| | 8 | * | * | * | * | * | * | * | |
| | 9 | 39 | 7 | 24 | 30 | 0 | 100 | 145 | |
| | 10 | 17 | 28 | 37 | 15 | 3 | 100 | 159 | |
| Exposição 0,7 mg/L | 11 | 67 | 21 | 10 | 2 | 0 | 100 | 47 | 82,0 |
| | 12 | 52 | 39 | 5 | 4 | 0 | 100 | 61 | |
| | 13 | 48 | 34 | 6 | 10 | 2 | 100 | 84 | |
| | 14 | 76 | 13 | 7 | 4 | 0 | 100 | 39 | |
| | 15 | 68 | 15 | 3 | 12 | 2 | 100 | 65 | |
| | 16 | 73 | 15 | 9 | 3 | 0 | 100 | 42 | |
| | 17 | 71 | 17 | 8 | 4 | 0 | 100 | 45 | |
| | 18 | 38 | 18 | 22 | 20 | 2 | 100 | 130 | |
| | 19 | 48 | 20 | 10 | 20 | 2 | 100 | 108 | |
| | 20 | 61 | 33 | 5 | 1 | 0 | 100 | 46 | |
| Exposição 4,9 mg/L | 21 | 50 | 35 | 13 | 2 | 0 | 100 | 67 | 84,5 |
| | 22 | 47 | 16 | 20 | 17 | 0 | 100 | 107 | |
| | 23 | 56 | 7 | 16 | 20 | 1 | 100 | 103 | |
| | 24 | 37 | 17 | 22 | 19 | 5 | 100 | 138 | |
| | 25 | 40 | 39 | 14 | 7 | 0 | 100 | 88 | |
| | 26 | 22 | 10 | 40 | 22 | 6 | 100 | 180 | |
| | 27 | 44 | 23 | 22 | 10 | 1 | 100 | 101 | |
| | 28 | 36 | 30 | 10 | 24 | 0 | 100 | 122 | |
| | 29 | * | * | * | * | * | * | * | |
| | 30 | 45 | 19 | 16 | 17 | 3 | 100 | 114 | |
| Exposição 34,3 mg/L | 31 | 19 | 10 | 17 | 51 | 3 | 100 | 209 | 175,0 |
| | 32 | 23 | 24 | 33 | 19 | 1 | 100 | 151 | |
| | 33 | 29 | 28 | 24 | 17 | 2 | 100 | 135 | |
| | 34 | 25 | 35 | 14 | 22 | 4 | 100 | 145 | |
| | 35 | 27 | 18 | 33 | 20 | 2 | 100 | 152 | |
| | 36 | 22 | 24 | 29 | 20 | 5 | 100 | 162 | |
| | 37 | 32 | 33 | 19 | 13 | 3 | 100 | 122 | |
| | 38 | 22 | 38 | 14 | 20 | 6 | 100 | 150 | |
| | 39 | 21 | 22 | 36 | 21 | 0 | 100 | 157 | |
| | 40 | 15 | 19 | 42 | 17 | 7 | 100 | 182 | |

Grupos de exposição ao fármaco Dipirona Sódica com renovação hídrica a cada 24 horas.

*Não foi possível obter resultados para esses organismos, lâminas com sobreposição de células.

**APÊNDICE J – CLASSES DE DANOS EM CÉLULAS DE TECIDO RENAL –
ENSAIO COMETA BIOENSAIO 2**

| Grupos de exposição | Organismo | Classe de danos analisados | | | | | Total de nucleóides analisados | Score | Mediana |
|--|-----------|----------------------------|----|----|----|----|--------------------------------|-------|---------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | | | |
| Controle Negativo (água filtrada) | 1 | 83 | 14 | 2 | 1 | 0 | 100 | 21 | 36,0 |
| | 2 | 75 | 15 | 9 | 1 | 0 | 100 | 36 | |
| | 3 | 79 | 17 | 4 | 0 | 0 | 100 | 25 | |
| | 4 | 73 | 17 | 8 | 2 | 0 | 100 | 39 | |
| | 5 | 77 | 11 | 8 | 4 | 0 | 100 | 39 | |
| | 6 | * | * | * | * | * | * | * | |
| | 7 | 82 | 16 | 2 | 0 | 0 | 100 | 20 | |
| | 8 | 69 | 20 | 11 | 0 | 0 | 100 | 42 | |
| | 9 | 89 | 9 | 2 | 0 | 0 | 100 | 13 | |
| | 10 | 77 | 10 | 9 | 4 | 0 | 100 | 40 | |
| Exposição 0,7 mg/L | 11 | 57 | 22 | 16 | 4 | 1 | 100 | 66 | 66,0 |
| | 12 | 46 | 26 | 23 | 5 | 0 | 100 | 87 | |
| | 13 | 59 | 31 | 5 | 4 | 1 | 100 | 53 | |
| | 14 | 69 | 19 | 11 | 1 | 0 | 100 | 44 | |
| | 15 | 54 | 28 | 12 | 4 | 2 | 100 | 64 | |
| | 16 | 60 | 37 | 3 | 0 | 0 | 100 | 43 | |
| | 17 | * | * | * | * | * | * | * | |
| | 18 | 32 | 33 | 26 | 7 | 2 | 100 | 106 | |
| | 19 | 46 | 19 | 27 | 7 | 1 | 100 | 94 | |
| | 20 | 41 | 33 | 24 | 2 | 0 | 100 | 87 | |
| Exposição 4,9 mg/L | 21 | 47 | 28 | 15 | 9 | 1 | 100 | 85 | 88,0 |
| | 22 | * | * | * | * | * | * | * | |
| | 23 | 41 | 26 | 16 | 14 | 3 | 100 | 100 | |
| | 24 | 52 | 31 | 8 | 9 | 0 | 100 | 74 | |
| | 25 | 63 | 29 | 2 | 6 | 0 | 100 | 51 | |
| | 26 | 50 | 37 | 5 | 6 | 2 | 100 | 65 | |
| | 27 | 41 | 31 | 9 | 14 | 5 | 100 | 91 | |
| | 28 | 40 | 37 | 14 | 9 | 0 | 100 | 92 | |
| | 29 | 44 | 31 | 15 | 9 | 1 | 100 | 88 | |
| | 30 | 41 | 34 | 14 | 10 | 1 | 100 | 92 | |
| Exposição 34,3 mg/L | 31 | 38 | 25 | 12 | 21 | 4 | 100 | 112 | 116,5 |
| | 32 | * | * | * | * | * | * | * | |
| | 33 | 47 | 29 | 23 | 1 | 0 | 100 | 78 | |
| | 34 | 36 | 32 | 11 | 13 | 8 | 100 | 93 | |
| | 35 | 30 | 20 | 15 | 22 | 13 | 100 | 116 | |
| | 36 | 35 | 27 | 18 | 18 | 2 | 100 | 117 | |
| | 37 | 29 | 31 | 27 | 13 | 0 | 100 | 124 | |
| | 38 | 37 | 20 | 14 | 23 | 6 | 100 | 117 | |
| | 39 | * | * | * | * | * | * | * | |
| | 40 | 35 | 18 | 14 | 28 | 5 | 100 | 130 | |

Grupos de exposição ao fármaco Dipirona Sódica com renovação hídrica a cada 24 horas.

*Não foi possível obter resultados para esses organismos. Amostras insuficientes.

**APÊNDICE K - FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS EM 2000 ERITRÓCITOS
ANALISADOS EM CADA LÂMINA COM SANGUE DE CADA ORGANISMO -
BIOENSAIO 1 E 2**

| Grupos de exposição | Organismo | Nº de eritrócitos analisados por lâmina | Micronúcleo | |
|--|-----------|---|-------------|-------------|
| | | | Bioensaio 1 | Bioensaio 2 |
| | 1 | 2000 | 0 | 0 |
| | 2 | 2000 | 0 | 0 |
| | 3 | 2000 | 0 | 0 |
| | 4 | 2000 | 0 | 0 |
| Controle Negativo (água filtrada) | 5 | 2000 | 0 | 0 |
| | 6 | 2000 | 0 | 0 |
| | 7 | 2000 | 0 | 0 |
| | 8 | 2000 | 0 | * |
| | 9 | 2000 | 0 | 1 |
| | 10 | 2000 | 0 | 1 |
| | 11 | 2000 | 0 | 1 |
| | 12 | 2000 | 1 | 0 |
| | 13 | 2000 | 0 | 2 |
| | 14 | 2000 | 1 | 0 |
| Exposição 0,7 mg/L | 15 | 2000 | 0 | 0 |
| | 16 | 2000 | 0 | 0 |
| | 17 | 2000 | * | 0 |
| | 18 | 2000 | * | 1 |
| | 19 | 2000 | 0 | 0 |
| | 20 | 2000 | 0 | 0 |
| | 21 | 2000 | 0 | 0 |
| | 22 | 2000 | 0 | 0 |
| | 23 | 2000 | 0 | 1 |
| | 24 | 2000 | 0 | 2 |
| Exposição 4,9 mg/L | 25 | 2000 | 1 | 2 |
| | 26 | 2000 | 1 | 0 |
| | 27 | 2000 | 2 | 1 |
| | 28 | 2000 | * | 1 |
| | 29 | 2000 | 1 | 1 |
| | 30 | 2000 | 2 | 0 |
| | 31 | 2000 | 1 | 1 |
| | 32 | 2000 | 0 | * |
| | 33 | 2000 | 2 | 0 |
| | 34 | 2000 | 0 | 2 |
| Exposição 34,3 mg/L | 35 | 2000 | 0 | 1 |
| | 36 | 2000 | 0 | 0 |
| | 37 | 2000 | 1 | * |
| | 38 | 2000 | 2 | 0 |
| | 39 | 2000 | 1 | * |
| | 40 | 2000 | 1 | 0 |

Quantidade de amostra insuficiente. Não foi possível obter resultados para os organismos identificados com ().

**APÊNDICE L – FREQUÊNCIA DE ALTERAÇÕES NUCLEARES EM 2000
ERITRÓCITOS ANALISADOS EM CADA LÂMINA COM SANGUE, DE CADA
ORGANISMO - BIOENSAIO 1 E 2**

| Grupos de exposição | Organismo | Nº de eritrócitos analisados por lâmina | Alterações nucleares | |
|--------------------------------------|-----------|---|----------------------|-------------|
| | | | Bioensaio 1 | Bioensaio 2 |
| Controle Negativo (água filtrada) | 1 | 2000 | 2 | 4 |
| | 2 | 2000 | 3 | 6 |
| | 3 | 2000 | 5 | 5 |
| | 4 | 2000 | 3 | 7 |
| | 5 | 2000 | 4 | 9 |
| | 6 | 2000 | 7 | 6 |
| | 7 | 2000 | 7 | 7 |
| | 8 | 2000 | 9 | * |
| | 9 | 2000 | 9 | 9 |
| | 10 | 2000 | 8 | 10 |
| Exposição 0,7 mg/L | 11 | 2000 | 6 | 14 |
| | 12 | 2000 | 9 | 17 |
| | 13 | 2000 | 5 | 25 |
| | 14 | 2000 | 16 | 23 |
| | 15 | 2000 | 8 | 32 |
| | 16 | 2000 | 7 | 24 |
| | 17 | 2000 | * | 17 |
| | 18 | 2000 | * | 20 |
| | 19 | 2000 | 11 | 26 |
| | 20 | 2000 | 10 | 16 |
| Exposição 4,9 mg/L | 21 | 2000 | 10 | 20 |
| | 22 | 2000 | 14 | 30 |
| | 23 | 2000 | 11 | 11 |
| | 24 | 2000 | 25 | 23 |
| | 25 | 2000 | 18 | 29 |
| | 26 | 2000 | 0 | 20 |
| | 27 | 2000 | 10 | 36 |
| | 28 | 2000 | * | 32 |
| | 29 | 2000 | 10 | 16 |
| | 30 | 2000 | 17 | 24 |
| Exposição 34,3 mg/L | 31 | 2000 | 18 | 26 |
| | 32 | 2000 | 15 | * |
| | 33 | 2000 | 12 | 31 |
| | 34 | 2000 | 22 | 50 |
| | 35 | 2000 | 14 | 50 |
| | 36 | 2000 | 10 | 28 |
| | 37 | 2000 | 23 | * |
| | 38 | 2000 | 6 | 36 |
| | 39 | 2000 | 23 | * |
| | 40 | 2000 | 15 | 40 |

Quantidade de amostra insuficiente. Não foi possível obter resultados para os organismos identificados com ().

APÊNDICE M - MASSA DAS AMOSTRAS DE FÍGADO, APÓS EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA AO FÁRMACO DIPIRONA SÓDICA, PARA REALIZAÇÃO DA NORMALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS E TESTES COM BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS.

| Grupos de exposição | Organismo | Massa Fígado (em g) | |
|--|-----------|---------------------|-------------|
| | | Bioensaio 1 | Bioensaio 2 |
| Controle Negativo (água deionizada) | 1 | 0.0330 | 0.0182 |
| | 2 | 0.0467 | 0.0104 |
| | 3 | 0.0354 | 0.0071 |
| | 4 | 0.0063 | 0.0323 |
| | 5 | 0.0260 | 0.0188 |
| | 6 | 0.0228 | 0.0440 |
| | 7 | 0.0362 | 0.0293 |
| | 8 | 0.0062 | 0.0485 |
| | 9 | 0.0455 | 0.0319 |
| | 10 | 0.0203 | 0.0424 |
| Exposição 0,7 mg/L | 11 | 0.0071 | 0.0511 |
| | 12 | 0.0176 | 0.0587 |
| | 13 | 0.0276 | 0.0330 |
| | 14 | 0.0155 | 0.0236 |
| | 15 | 0.0152 | 0.0607 |
| | 16 | 0.0504 | 0.0445 |
| | 17 | 0.0224 | 0.0821 |
| | 18 | 0.0105 | 0.0567 |
| | 19 | 0.0133 | 0.0462 |
| | 20 | 0.0383 | 0.0021 |
| Exposição 4,9 mg/L | 21 | 0.0175 | 0.0099 |
| | 22 | 0.0144 | 0.0406 |
| | 23 | 0.0274 | 0.0300 |
| | 24 | 0.0308 | 0.0480 |
| | 25 | 0.0211 | 0.0478 |
| | 26 | 0.0176 | 0.0557 |
| | 27 | 0.0241 | 0.0201 |
| | 28 | 0.0327 | 0.0441 |
| | 29 | 0.0281 | 0.0928 |
| | 30 | 0.0383 | 0.0264 |
| Exposição 34,3 mg/L | 31 | 0.0537 | 0.0540 |
| | 32 | 0.0390 | * |
| | 33 | 0.0187 | 0.0230 |
| | 34 | 0.0218 | 0.0655 |
| | 35 | 0.0161 | 0.0330 |
| | 36 | 0.0194 | 0.0549 |
| | 37 | 0.0109 | 0.0250 |
| | 38 | 0.0182 | 0.0613 |
| | 39 | 0.0241 | * |
| | 40 | 0.0259 | 0.0473 |

*Quantidade de amostra insuficiente. Sem análise.

APÊNDICE N - MASSA DOS ÓRGÃOS CÉREBRO E MÚSCULO DE TILÁPIAS, APÓS EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA AO FÁRMACO DIPIRONA SÓDICA, PARA REALIZAÇÃO DA NORMALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS E TESTES COM BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS.

| Grupos de exposição | Organismo | Massa de cérebro (g) | | Massa de músculo (g) | |
|--|-----------|----------------------|-------------|----------------------|-------------|
| | | Bioensaio 1 | Bioensaio 2 | Bioensaio 1 | Bioensaio 2 |
| Controle Negativo (água filtrada) | 1 | 0.0200 | 0.0288 | 0.0696 | 0.0668 |
| | 2 | 0.0384 | 0.0268 | 0.0761 | 0.0470 |
| | 3 | 0.0303 | 0.0442 | 0.0759 | 0.0484 |
| | 4 | 0.0281 | 0.0413 | 0.0470 | 0.0917 |
| | 5 | 0.0367 | 0.0309 | 0.0669 | 0.0460 |
| | 6 | 0.0235 | 0.0316 | 0.0669 | 0.0275 |
| | 7 | 0.0045 | 0.0290 | 0.0777 | 0.0468 |
| | 8 | 0.0246 | 0.0352 | 0.0585 | 0.0652 |
| | 9 | 0.0230 | 0.0402 | 0.0447 | 0.0828 |
| | 10 | 0.0066 | 0.0230 | 0.0690 | 0.0499 |
| Exposição 0,7 mg/L | 11 | 0.0088 | 0.0251 | 0.0646 | 0.0444 |
| | 12 | 0.0185 | 0.0226 | 0.0575 | 0.0806 |
| | 13 | 0.0301 | 0.0325 | 0.0688 | 0.0719 |
| | 14 | 0.0263 | 0.0293 | 0.0641 | 0.0890 |
| | 15 | 0.0296 | 0.0364 | 0.0606 | 0.0860 |
| | 16 | 0.0285 | 0.0393 | 0.0635 | 0.0579 |
| | 17 | 0.0100 | 0.0377 | 0.0456 | 0.0804 |
| | 18 | 0.0275 | 0.0354 | 0.0502 | 0.0889 |
| | 19 | 0.0180 | 0.0446 | 0.0555 | 0.0446 |
| | 20 | 0.0346 | 0.0300 | 0.0736 | 0.0601 |
| Exposição 4,9 mg/L | 21 | 0.0128 | 0.0400 | 0.0654 | 0.0668 |
| | 22 | 0.0289 | 0.0386 | 0.0505 | 0.0662 |
| | 23 | 0.0210 | 0.0360 | 0.0516 | 0.0594 |
| | 24 | 0.0252 | 0.0552 | 0.0569 | 0.0581 |
| | 25 | 0.0257 | 0.0406 | 0.0523 | 0.0463 |
| | 26 | 0.0190 | 0.0460 | 0.0728 | 0.0487 |
| | 27 | 0.0367 | 0.0503 | 0.0487 | 0.0421 |
| | 28 | 0.0161 | 0.0375 | 0.0665 | 0.0532 |
| | 29 | 0.0243 | 0.0377 | 0.0748 | 0.0731 |
| | 30 | 0.0295 | 0.0336 | 0.0735 | 0.0565 |
| Exposição 34,3 mg/L | 31 | 0.0533 | 0.0312 | 0.0793 | 0.0437 |
| | 32 | 0.0232 | * | 0.0574 | * |
| | 33 | 0.0087 | 0.0302 | 0.0434 | 0.0690 |
| | 34 | 0.0236 | 0.0453 | 0.0523 | 0.0721 |
| | 35 | 0.0356 | 0.0323 | 0.0684 | 0.0542 |
| | 36 | 0.0206 | 0.0459 | 0.0643 | 0.0402 |
| | 37 | 0.0297 | 0.0441 | 0.0549 | 0.0812 |
| | 38 | 0.0211 | 0.0412 | 0.0597 | 0.0809 |
| | 39 | 0.0333 | * | 0.0695 | * |
| | 40 | 0.0233 | 0.0330 | 0.0744 | 0.0455 |

* Quantidade de amostra insuficiente. Sem análise.